

Mikrobieller Befall von Elektrotauchlack in der Automobilindustrie

Von der Fakultät für Geo- und Biowissenschaften
der Universität Stuttgart, zur Erlangung der Würde
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung.

Vorgelegt von
Ina Katrin Gühring
aus Albstadt.

Hauptberichter : Prof. Dr. Christoph Syldatk
Mitberichter : Prof. Dr. Hans-Joachim Knackmuss
Termin der
mündlichen Prüfung : 04.04.2000

Universität Stuttgart
Institut für Bioverfahrenstechnik

2000

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, daß diese Arbeit von mir selbst verfaßt wurde und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel angewandt wurden.

Ina Katrin Gühring

Die vorliegende Arbeit wurde im mikrobiologischen Labor der Verfahrensentwicklung Umweltschutz (VUS) der DaimlerChrysler AG , Werk Sindelfingen, dem Institut für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart in Zusammenarbeit mit dem Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim erstellt.

Ich bedanke mich herzlich bei Frau Dr. Adinolfi, Herrn Prof. Dr. Syldatk, Herrn Dr. Eberspächer und Fr. Emmert für die hervorragende Betreuung, Zusammenarbeit und stete Diskussionsbereitschaft. Zusätzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Syldatk für die Möglichkeit, dieses Thema in diesem Rahmen bearbeiten zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Knackmus vom Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart gilt mein Dank für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein weiterer Dank gilt der gesamten Abteilung VUS und VBT, Herrn Dr. Kautt und Herrn Schnell für die Möglichkeit zur Durchführung und die Unterstützung dieser Arbeit.

Auch danke ich Herrn Leitz, Brigitte Beutinger, Michaela Weimer, Frank Gerlach, Jochen Witte und Patricia Nikodem für die stetige Unterstützung, Hilfsbereitschaft und vor allem die sehr schöne Zusammenarbeit im Labor in der Schwertstraße und später im Labor im Bau 40 der DaimlerChrysler AG.

Bei Herrn Dr. Hilpert und Frau Juhle vom Forschungszentrum Ulm der DaimlerChrysler AG bedanke ich mich herzlich für die experimentelle und fachliche Unterstützung.

Bei Frau Ute Schweizer und Herrn Joachim Klein vom Institut für Technische Genetik der Universität Stuttgart bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Durchführung der Pulsed Field Gelelektrophorese.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei allen ungenannten Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen, die mir mit Rat und Tat beiseite standen und ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|---|-----------|
| | Abkürzungsverzeichnis | 5 |
| 1. | Einleitung | 7 |
| 1.1 | Fertigungsprozeß im Werk Sindelfingen der DaimlerChrysler AG | 8 |
| 1.2 | Die kathodische Tauchlackierung (KTL) | 11 |
| 1.2.1 | Lackkomponenten und Zusammensetzung | 11 |
| 1.2.2 | Funktionsweise des Abscheidemechanismus | 13 |
| 1.2.3 | Die KTL-Anlage | 14 |
| 1.2.4 | Biozide im Elektrotauchlack | 15 |
| 1.2.5 | Mikrobieller Befall von KT-Lack | 19 |
| 1.3 | Eigenschaften von <i>Burkholderia cepacia</i> | 19 |
| 1.4 | Aufgabenstellung | 22 |
| 2. | Material und Methoden | 24 |
| 2.1 | Chemikalien, Reagenzien und Medien | 24 |
| 2.2 | Kultivierung der Bakterien | 24 |
| 2.3 | Zusammensetzung der Medien | 24 |
| 2.4 | Analytische Methoden | 30 |
| 2.4.1 | Chemische Parameter | 30 |
| 2.4.2 | Physikalische Parameter | 34 |
| 2.4.3 | Biochemische Methoden | 35 |
| 2.5 | Mikrobiologische Methoden | 39 |
| 2.5.1 | Biologische Parameter | 39 |
| 2.5.2 | Identifizierung der Mikroorganismen | 40 |
| 2.5.3 | Proteinbestimmung | 43 |
| 2.5.4 | Bestimmung von Siderophoren | 43 |
| 2.6 | Versuche zur Ermittlung der Ursachen von Beschichtungsstörungen und der Verkeimbarkeit des Elektrotauchlacks | 43 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.6.1 | Ursachen der Beschichtungsstörungen | 44 |
| 2.6.1.1 | Einfluß der Biomasse | 45 |
| 2.6.1.2 | Einfluß des Wachstums von <i>Burkholderia cepacia</i> in KT-Lack | 46 |
| 2.6.1.3 | Einfluß der Stoffwechselprodukte | 48 |
| 2.6.2 | Ursachen der Verkeimbarkeit des Elektrotauchlacks | 49 |
| 2.6.2.1 | Wachstumsversuch mit lebenden Zellen, bzw. Zellaufschluß von <i>Burkholderia cepacia</i> in KTL-Flüssigmedium und Zugabe einer leicht verwertbaren Kohlenstoffquelle | 49 |
| 2.6.2.2 | KTL-Alterung im MINICOATER | 50 |
| 2.6.2.3 | Verkeimung von Proben aus der KTL-Anlage Sindelfingen 34-I mit aus 34-II isolierten Mikroorganismen | 51 |
| 2.6.2.4 | Empfindlichkeit der aus Elektrotauchlack isolierten Mikroorganismen gegenüber Silberkationen | 53 |
| 2.6.2.5 | Einfluß des KTL-Anteils im Ultrafiltrat auf die Verkeimbarkeit mit <i>Burkholderia cepacia</i> | 54 |
| 2.6.2.6 | Verkeimung von Ultrafiltrat und Rezirkulat | 55 |
| 2.7 | Wachstums- und Hemmversuche in Reinkulturen | 56 |
| 2.7.1 | Wachstumsversuche im Minimalmedium | 56 |
| 2.7.2 | Hemmversuche im Minimalmedium mit D-/L-Lactat als C-Quelle und verschiedenen Lacklösemitteln | 57 |
| 2.7.3 | Bestimmung der toxischen Konzentration von Silbernitrat | 57 |
| 2.7.4 | Bestimmung der toxischen Konzentration von Isothiazolinon | 58 |
| 2.8 | Monitoring der KTL-Anlage | 58 |
| 2.8.1 | Nachstellung der KTL-Anlage | 61 |
| 2.8.2 | Verkeimung gealterter Proben aus der KTL-Anlage | 61 |
| 2.8.3 | Fed Batch mit aus der Vorbehandlung isolierten Mikroorganismen in KTL-Medium im Labormaßstab | 62 |
| 2.8.4 | Vergleich der Plasmid-DNA von aus verschiedenen Quellen isolierten <i>B. cepacia</i> mittels Pulsed Field Gelelektrophorese (PFGE) | 65 |
| 2.9 | Versuche zur Problemlösung | 68 |
| 2.9.1 | Teilneutralisierung von Elektrotauchlack mit Salpetersäure | 68 |
| 2.9.2 | Effekte der Zugabe von Ethylbenzol, bzw. Xylol in verkeimtes KTL-Material | 69 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 2.9.3 | Einfluß der Dosierung von Phenoxypropanol in verkeimtes KTL-Material und Einfluß der Kühlung bei 4°C auf das Überleben der Bakterien | 70 |
| 3. | Ergebnisse | 72 |
| 3.1 | Ursachen der Beschichtungsstörungen und Verkeimbarkeit des Elektrottauchlacks | 72 |
| 3.1.1 | Ursachen der Beschichtungsstörungen | 72 |
| 3.1.1.1 | Einfluß der Biomasse | 72 |
| 3.1.1.2 | Einfluß des Wachstums von <i>Burkholderia cepacia</i> in KT-Lack | 73 |
| 3.1.1.3 | Einfluß der Stoffwechselprodukte | 78 |
| 3.1.2 | Ursachen der Verkeimbarkeit des Elektrottauchlacks | 80 |
| 3.1.2.1 | Wachstumsversuch mit lebenden Zellen, bzw. Zellaufschluß von <i>Burkholderia cepacia</i> in KTL-Flüssigmedium und Zugabe einer leicht verwertbaren Kohlenstoffquelle | 80 |
| 3.1.2.2 | KTL-Alterung im Minicoater | 82 |
| 3.1.2.3 | Verkeimung von Proben aus der KTL-Anlage Sindelfingen 34-I mit aus 34-II isolierten Mikroorganismen | 85 |
| 3.1.2.4 | Empfindlichkeit der aus Elektrottauchlack isolierten Mikroorganismen gegenüber Silberkationen | 86 |
| 3.1.2.5 | Einfluß des KTL-Anteils im Ultrafiltrat auf die Verkeimbarkeit mit <i>Burkholderia cepacia</i> | 86 |
| 3.1.2.6 | Verkeimung von Ultrafiltrat und Rezirkulat | 87 |
| 3.2 | Wachstums- und Hemmversuche in Reinkulturen | 88 |
| 3.2.1 | Wachstumsversuche im Minimalmedium | 89 |
| 3.2.2 | Hemmversuche im Minimalmedium mit D-/L-Lactat als C-Quelle und verschiedenen Lacklösemitteln | 94 |
| 3.2.3 | Bestimmung der für <i>B. cepacia</i> toxischen Konzentration von Silbernitrat | 100 |
| 3.2.4 | Bestimmung der für <i>B. cepacia</i> toxischen Konzentration von Isothiazolinon | 103 |
| 3.3 | Monitoring der KTL-Anlage | 107 |
| 3.3.1 | Bestimmung der chemischen, physikalischen und biochemischen Parameter | 110 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.3.2 | Bestimmung der Lebendkeimzahlen | 112 |
| 3.3.3 | Identifizierung der Mikroorganismen | 115 |
| 3.3.4 | Nachstellung der KTL-Anlage | 117 |
| 3.3.5 | Verkeimung gealterter Proben aus der KTL-Anlage | 118 |
| 3.3.6 | Fed Batch mit aus der Vorbehandlung isolierten Mikroorganismen in KTL-Medium im Labormaßstab | 119 |
| 3.3.7 | Vergleich der Plasmid-DNA von aus verschiedenen Quellen isolierten <i>B. cepacia</i> mittels Pulsed Field Gelelektrophorese (PFGE) | 119 |
| 3.4 | Versuche zur Problemlösung | 122 |
| 3.4.1 | Teilneutralisierung von Elektrotauchlack mit Salpetersäure | 122 |
| 3.4.2 | Effekte der Zugabe von Ethylbenzol, bzw. Xylol in verkeimtes KTL-Material | 122 |
| 3.4.3 | Einfluß der Dosierung von Phenoxypropanol in verkeimten KT- Lack und Einfluß der Kühlung bei 4°C auf das Überleben der Bakterien | 124 |
| 4. | Diskussion und Ausblick | 126 |
| 4.1 | Beschichtungsstörungen | 126 |
| 4.2 | Verkeimbarkeit des Elektrotauchlacks | 127 |
| 4.3 | Monitoring der KTL-Anlage | 132 |
| 4.4 | Ausblick | 136 |
| 5. | Zusammenfassung | 138 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 141 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|--|
| AgNO ₃ | Silbernitrat |
| AV | Arbeitsvolumen |
| BM | Bindemittel |
| BSB ₅ | Biochemischer Sauerstoffbedarf in 5 Tagen |
| CSB | Chemischer Sauerstoffbedarf |
| CG 400 | Cathoguard 400 Elektrotauchlack, enthält Silbernitrat |
| C-Quelle | Kohlenstoffquelle |
| d | Schichtdicke [μm] |
| D | Verdünnungsrate [h^{-1}] |
| EB | Ethylbenzol |
| ETL | Elektrotauchlack |
| EW | E-Wasser = entsalztes Wasser |
| F | Fließrate [$1/\text{h}$] |
| GC/MSD | Gaschromatograph gekoppelt an Massenspektrometerdetektor |
| HCl | Salzsäure |
| HD | Vollmedium |
| IC | Ionenchromatograph |
| ICP-AES | Inductively-Coupled-Plasma-Atomic-Emission-Spectroscopy |
| K | Kelvin |
| KT-Lack | Kathodischer Tauchlack |
| KTL | Kathodische Tauchlackierung |
| LDH | Lactatdehydrogenase |
| LF | Leitfähigkeit [$\mu\text{S}/\text{cm}$] |
| LKZ | Lebendkeimzahl [K/ml] |
| MCC | Mini Compact Car (Smart) |
| MEQ _S | Milliequivalent an Säure |
| MM | Minimalmedium |
| MO | Mikroorganismen |
| NADH | Nicotinamidadenindinucleotid |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| OD ₅₄₆ | optische Dichte bei einer Wellenlänge von 546 Nanometer (nm) |
| Q | Ladung [As/cm^2] |

| | |
|---------------------|---|
| PP | Pigmentpaste |
| PPH | Phenoxypropanol |
| ppm | parts per million |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (rounds per minute) |
| RZ | Rezirkulat |
| RF | Reinfiltrat |
| SK | Schikanekolben |
| TC | Total Carbon [mg/l] |
| TOC | Total Organic Carbon [mg/l] |
| UF | Ultrafiltrat |
| VA | Versuchsansatz |
| VBH | Vorbehandlung |
| VE-H ₂ O | VE-Wasser = vollentsalztes Wasser |
| WS 1 | Wirksubstanz 1 = 5-Chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on von „Chemfil“ |
| Z | Zone |
| ZA | Zellaufschluß |
| ZABA | Zentrale Abwasser Aufbereitungsanlage |
| ZS | Zellsuspension |

1. Einleitung

Die Verschärfung von umweltrechtlichen Gesetzen, wie z. B. die Abwasserverordnung, führte in der Industrie im allgemeinen dazu, auf umweltschädliche Substanzen möglichst zu verzichten und den Abwasserstrom zu verringern. Dies kann unter anderem durch Reinigung und Kreislaufführung des Abwassers erreicht werden. Durch Verminderung der z. T. biozid wirkenden Schadstoffe, wie Lösemittel und Schwermetalle, wird ein Wachstum von Mikroorganismen ermöglicht, wo immer Wasser mit Spuren organischer, aber auch anorganischer Substanzen vorhanden ist (Kunz, 1992). Dadurch treten in der Industrie vermehrt Verkeimungen in verschiedenen Bereichen auf. Die vielfältige Anpassungsfähigkeit der Mikroorganismen durch Mutation und Selektion kann sich die Industrie zur Aufreinigung von Kreislaufwasser und damit zur Reduzierung des Abwasserstroms, bzw. der Schadstofffracht des abgeleiteten Wassers zu nutze machen. So werden z. B. Teilströme aus der Wasserbasislackierung der DaimlerChrysler AG mit Hilfe eines Belebtschlammreaktors und einer Pflanzenkläranlage soweit aufgereinigt, daß das Abwasser im Kreislauf geführt werden kann.

Die Entwicklung einer Mikroflora kann aber auch negative Auswirkungen mit sich bringen. Das Wachstum von Algen und Bakterien kann Wasser ungenießbar, bzw. durch Ausscheidung von Stoffwechselprodukten oder Toxinen auch krankheitserregend machen. Mikrobiologisches Wachstum kann sich unter anderem in Kühlsystemen in unterschiedlichem Ausmaß störend auswirken (Flemming, 1993). Schleimbildende Bakterien können Verstopfungen an Wärmetauschern, sulfatreduzierende Keime und Eisenbakterien Korrosionsschäden verursachen. Biofilme führen in Anlagen zur Wasseraufbereitung wie Umkehrosmose und Ionenaustauschern zu Kontamination des Wassers oder zur Verblockung von Membranen, erhöhtem Reinigungsaufwand und verkürzten Standzeiten der Systeme (Flemming, 1993). Häufig ist selbst nährstoffarmes bidestilliertes Wasser von mikrobiellen Verkeimungen betroffen (Dott, 1983).

In der Automobilindustrie traten mit der Umstellung auf umweltfreundlichere Lackmaterialien (Reduktion der Schwermetalle und des Lösemittelanteils) vermehrt Bakterien in Elektrotauchanlagen auf. Zeitgleich waren Beschichtungsstörungen an den Karossen zu beobachten, welche mit einem pH-Anstieg des Lackmaterials,

Schichtdickenanstieg, teilweise Ablättern des Lacks („Striptease“ Effekt), Oberflächenstörungen (Pusteln, Blasen, Krater), schlechterem Umgriff, einer Bildung von Lackschlamm und geringerem Schichtwiderstand verbunden war. Dies führte teilweise zur Notwendigkeit, die Lackierbecken völlig neu zu befüllen und den alten Inhalt unter erheblichem Kostenaufwand zu entsorgen. Dabei entstehen allein durch Entsorgung und Neubefüllung Kosten von ca. 2 Millionen DM, wobei der Produktionsausfall von täglich 2.000 Karossen noch nicht mit eingerechnet ist. Ungeklärt war zu diesem Zeitpunkt jedoch, ob Bakterien für die fehlerhafte Beschichtung verantwortlich waren, oder ob die Beschichtungsstörungen durch chemische Faktoren bedingt worden waren. Im Werk Sindelfingen der DaimlerChrysler AG erfolgt die Grundierung der Karossen mit Hilfe der kathodischen Tauchlackierung (KTL). Das vorrangige Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob ein mikrobieller Befall des KT-Lacks die beobachteten Lackierschäden verursacht und welche Keime in welchen Anlagenteilen überleben.

1.1 Fertigungsprozeß im Werk Sindelfingen der DaimlerChrysler AG

Das Werk Sindelfingen der DaimlerChrysler AG ist ein Karosserie- und Montagewerk mit den Fertigungsbereichen Preßwerk, Rohbau, Lackierung und Montage. Die einzelnen Schritte der Lackierung einer Karosse sind schematisch in Abbildung 1 dargestellt. Nach der Montage muß die Karosse in der Vorbehandlung intensiv von den anhaftenden Fetten, Ölen, Verarbeitungshilfsmitteln, Rost und Schmutz gereinigt werden, um eine bestmögliche Haftung des Grundierungslacks (Elektrotauchlack) zu gewährleisten (s. Abb. 2). In den ersten drei Zonen der Vorbehandlung (VBH1-3, Vor-, Spritz- und Tauchentfetten) erfolgt die Reinigung der Karossen von Fett-, Schmutz- und Metallpartikeln mit Hilfe von Wasser, Tensiden und alkalischen Reinigern. Auf die Entfettung folgt nach zwei Spülzonen (VBH4, 5) mit VE-Wasser die Tauchaktivierung (VBH6), in der ein Oberflächenzustand eingestellt wird, der eine gleichmäßige Phosphatierung (VBH7) ermöglicht. Die Phosphatierung dient als Korrosionsschutz. Dabei wird eine feinkristalline Deckschicht gebildet, die für die darauf abzuschneidenden Lackschichten einen Haftgrund bietet und die Unterrostung der später im Gebrauch eventuell beschädigten Lackschicht verhindert. Das Tauchphosphatierbad enthält unter anderem Zink, Nickel, Mangan, Soda (Na_2CO_3), Phosphorsäure, Fluorid und Wasser.

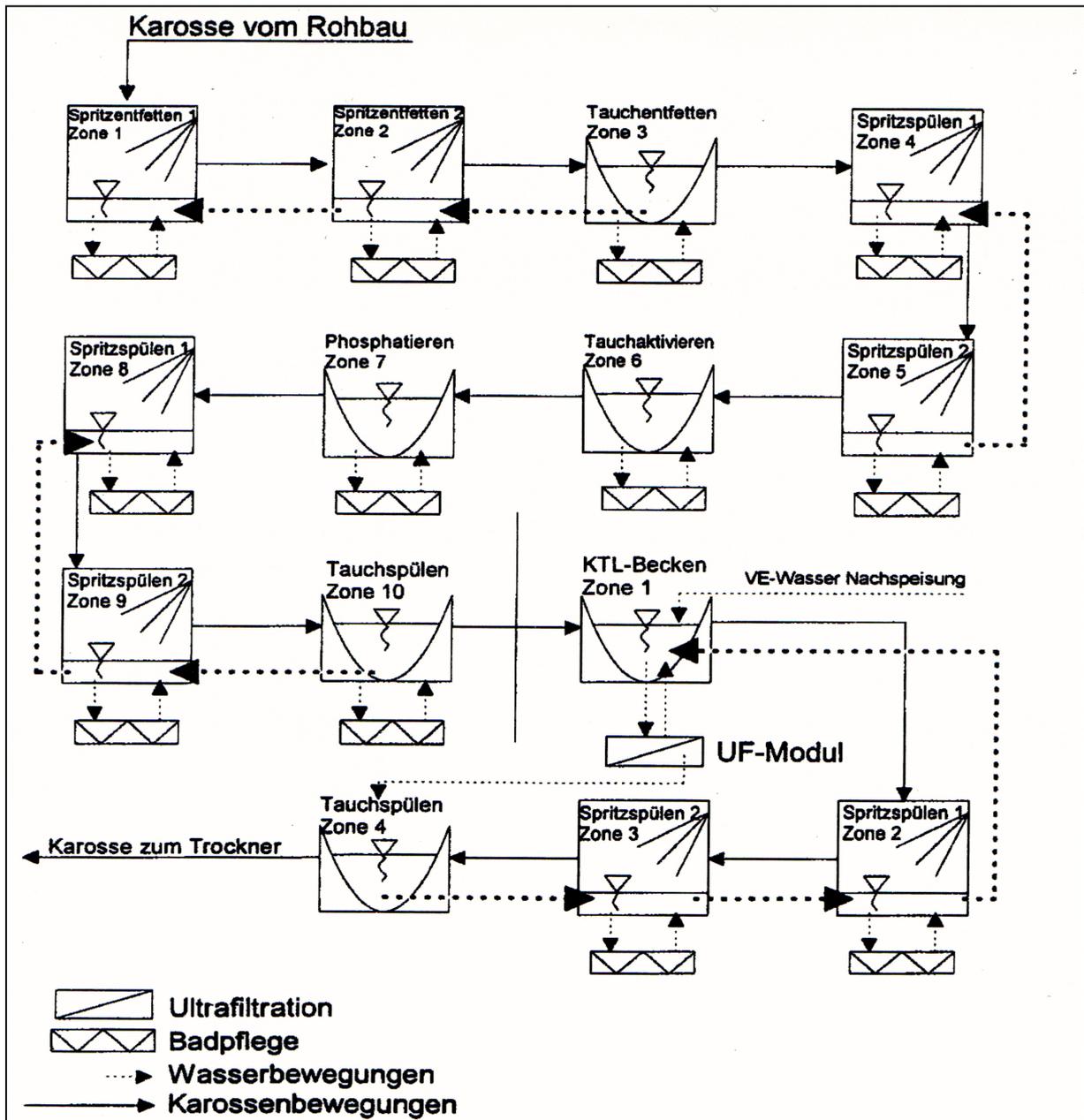


Abb. 2: Schematisches Verfahrensfliessbild der Karossen-Vorbehandlung und der KTL-Anlage in Sindelfingen, Bau 34 (Untersuchungsbericht, Fa. Pall, 1998)

Der Phosphatierung folgen noch drei weitere Spülzonen mit entsalztem Wasser (EW), bevor die Karossen in die kathodische Tauchlackierung (KTL-Anlage) weitergeleitet werden (s. Abb. 7, Abschnitt 1.2.3). Nach der Elektrotauchlackierung wird der Lack bei 175°C eingebrannt (Schichtdicke ca. 19-21 µm) und die Karossen werden getrocknet, wobei anschließend kleine Fehler der Tauchlackierung durch Schleifen bereinigt werden. Als zweite Lackschicht wird das Füller-Material aufgetragen. Es besteht aus Kunstharzlacken, ebnet die Oberfläche und wird bei 150°C getrocknet. Als farbgebende Schicht wird anschließend der Decklack aufgebracht. Er besteht aus Kunstharzen, Pigmenten, Füllstoffen sowie Lösemitteln.

Die Gewährleistung der Staubfreiheit erfolgt durch eine Vorreinigung mit Straußenfedern. Alle Karossen erhalten als abschließende Schicht den Klarlack. Nach der Decklackierung werden die Fahrzeuge getrocknet. Die dabei entstehenden Lösemitteldämpfe werden über einen Abluftfilter geleitet, wo eine Adsorption an Aktivkohle erfolgt.

1.2 Die kathodische Tauchlackierung (KTL)

Elektrotauchverfahren sind elektrochemische Lackiersysteme zur automatisierten Beschichtung von Massengütern. Die Elektrotauchlackierung ist eine sehr umweltfreundliche Methode, da als Lösemittel Wasser eingesetzt und eine Materialausbeute von bis zu 95 % erreicht wird. Dabei werden nur 5 % des eingesetzten Lacks über die Spülzonen ausgetragen. Man erhält durch diese Art der Lackierung eine sehr gleichmäßige Beschichtung sowohl der Metalloberflächen, als auch der Hohlräume, was man als guten Umgriff bezeichnet. Ein weiterer Vorteil ist bei diesem System die Zuverlässigkeit bei der Automatisierung, wobei in der Regel gleichmäßige Schichtdicken und Oberflächen erzielt werden können.

1.2.1 Lackkomponenten und Zusammensetzung

Elektrotauchlacke sind ein 3 Komponentensystem und bestehen zu ungefähr 80 % aus Wasser. Der Rest sind Bestandteile des Bindemittels (BM) und der Pigmentpaste (PP; Festkörper = nicht flüchtiger Anteil, ca. 20 %), ein geringer Teil organische Lösemittel (1 – 2 %), Säuren (0,4 %) und Additive (BASF-Broschüre, 1994; s. Abb. 3). Das Bindemittel in Form einer Dispersion setzt sich aus 35 % Festkörper (aminiertes, wasserunlösliches Epoxidharz auf Bisphenol-A-Basis (primäre oder sekundäre Amine), Vernetzerharz (auf der Basis von mit Alkoholen oder Glykolen verkappten Isocyanaten), Weichmacher (modifizierte Polyether), sowie ca. 2 % Lösemittel und aus 63 % Wasser zusammen (s. Abb. 4). Das aminierte Epoxidharz muß durch Zugabe einer organischen Säure (Neutralisationsmittel) in eine wasserdispergierbare Form gebracht werden. Oft wird nur ein Teil der funktionellen Gruppen mit Neutralisationsmittel umgesetzt. Das molare Verhältnis von Säure zu funktioneller Gruppe wird als Neutralisationsgrad bezeichnet. Ein Neutralisationsgrad von 30-40 % reicht aus, um die gewünschte Wasserdispergierbarkeit zu erreichen (s. Abb. 6).

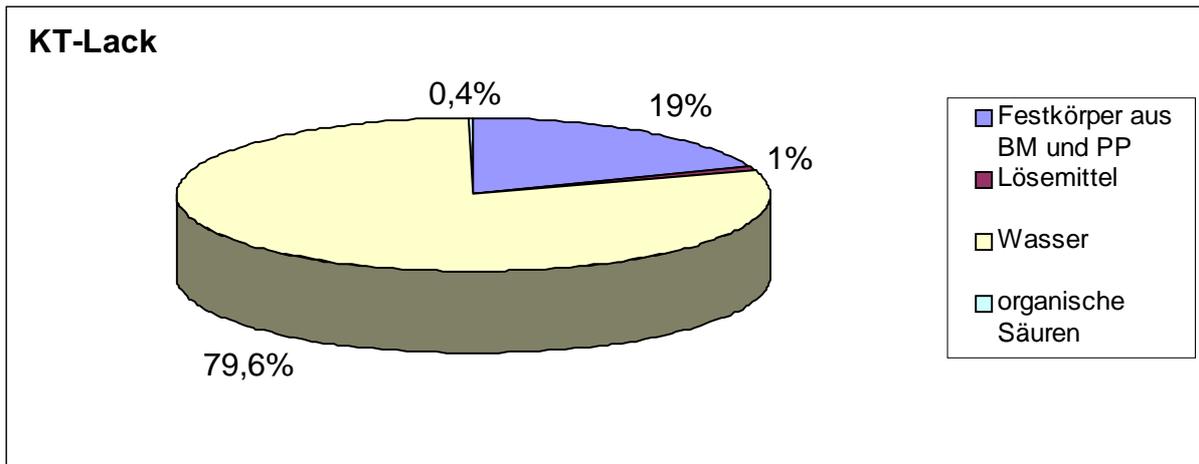


Abb. 3: Zusammensetzung eines Elektrotauchlacks (KT-Lack)

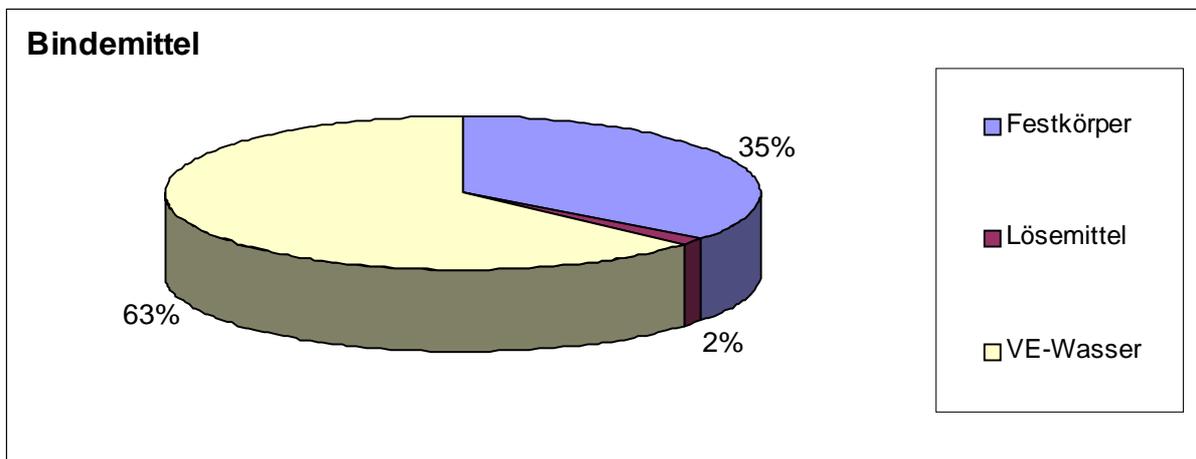


Abb. 4: Zusammensetzung eines Bindemittels (BM) für Elektrotauchlacke

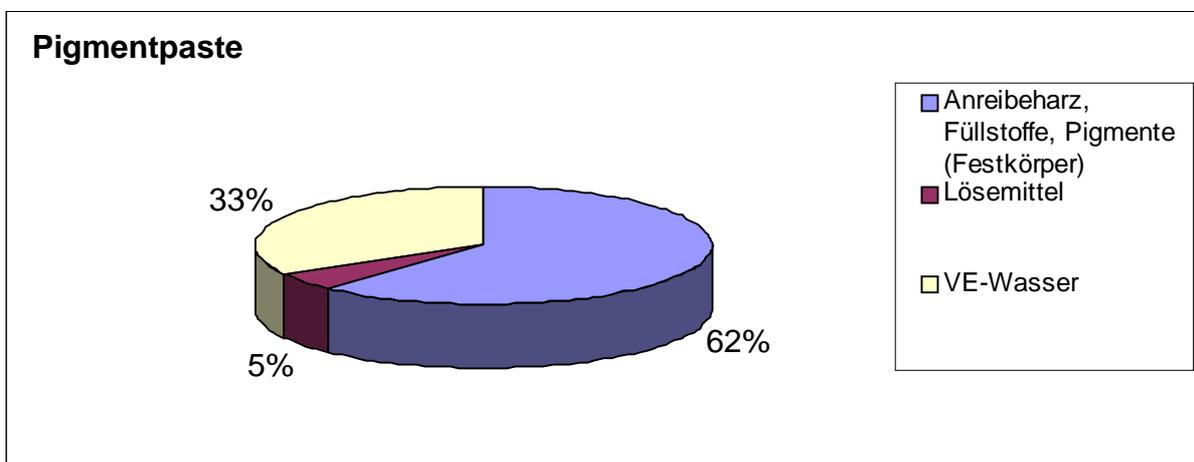


Abb. 5: Zusammensetzung einer Pigmentpaste (PP) für Elektrotauchlacke

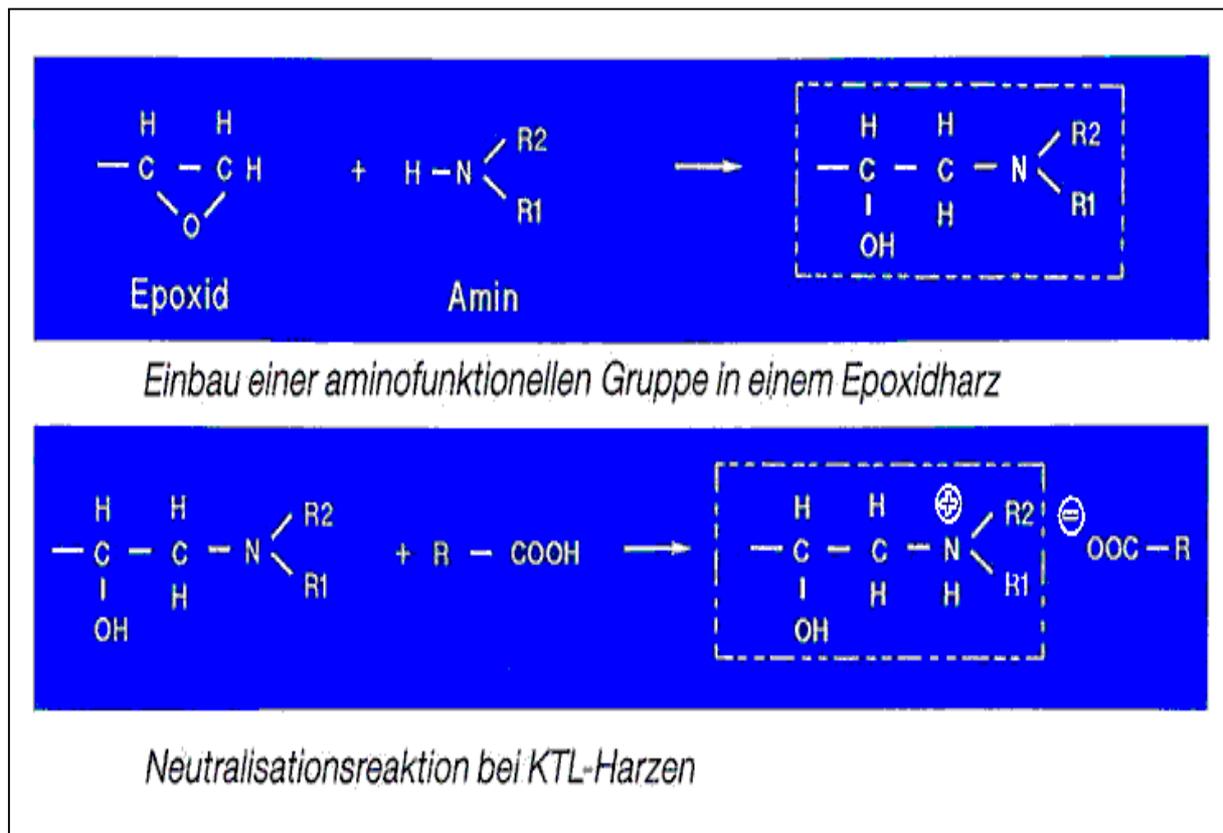


Abb. 6: Funktionelle Gruppen in Epoxidharzen (BASF-Broschüre, 1994)

Die chemische Vernetzung der Bindemittelmoleküle bei hohen Temperaturen führt zu einem lösemittelbeständigen, mechanisch-technologisch einwandfreien Film. Einige Bestandteile der Pigmentpaste (s. Abb. 5) sind Titandioxid, Eisenoxid, Ruß, Reibharz (Basis Epoxidharz), Füllstoffe (Aluminium- oder Magnesium-Silikate) und Zinnverbindungen (insgesamt ca. 62 %), Neutralisationsmittel (Milchsäure, Essigsäure; ca. 0,4 %) und Biozidzusatz (5 ppm Ag^+ als AgNO_3). Pigmente sollten nicht reaktiv sein und keine wasserlöslichen Verunreinigungen enthalten (Chlorid, Sulfat, etc.). Als Produktklassen der Lösemittel (ca. 5 %) können hier niedermolekulare Alkohole, aliphatische und aromatische Glykolether und Ketone genannt werden. Der Wasseranteil beträgt ca. 33 % (BASF Broschüre, 1994).

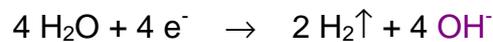
1.2.2 Funktionsweise des Abscheidemechanismus

Bei der kathodischen Tauchlackierung fungiert das Werkstück als Kathode. Die Lackabscheidung erfolgt durch die im folgenden beschriebenen Vorgänge an der wässrigen Diffusionsgrenzschicht:

☞ **Wasserunlösliches Kunstharz** wird **emulgierbar** durch Neutralisation mit einer

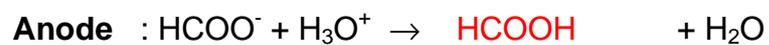
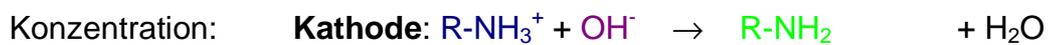


☞ Anlegen einer Spannung, Elektrolyse des Wasser:



☞ **OH⁻ - Ionen** an der Kathode verschieben den pH-Wert in den alkalischen Bereich (Grenzschicht mit pH 11-13)

☞ **Wasseremulgiertes KTL** koaguliert an der Kathode durch hohe **OH⁻**-



☞ Bildung eines **abgeschiedenen Films: R-NH₂**

1.2.3 Die KTL-Anlage

Die Elektrotauchanlage (s. Abb. 7) besitzt im wesentlichen 4 Einheiten: den Lackkreislauf, die Ultrafiltration, den Spülkreislauf und das Anolytssystem. Durch den Lackkreislauf erfolgt eine Umwälzung des Elektrotauchlacks, welche eine Bildung von Strömungstoträumen und Sedimentation der Pigmente verhindert. Die mittlere Strömungsgeschwindigkeit sollte bei 0,3 m/s liegen, was einer Umwälzung des Beckeninhalts von ca. 4-6 mal pro Stunde entspricht. Im Zuge der Umwälzung erfolgt eine Filtration des Lacks über eine Filtereinheit, um eventuell in das Lackierbad gelangte Schmutzpartikel abzutrennen, sowie eine Ultrafiltration, um Permeat zur Spülung der Karossen nach dem Beschichten zur Verfügung zu stellen. Die Nachkompensation an Bindemittel und Pigmentpaste erfolgt ebenfalls durch den Lackkreislauf, indem die Komponenten der Rückführung des Retentats in das Elektrotauchbecken zugesetzt werden. Das Volumen des Lackbades beträgt ca. 260 m³, das der Spülzonen entspricht dem des Lacks. Der Materialverbrauch beträgt ca. 2,5 kg Elektrotauchlack/Karosserie. Durch das Anolytssystem werden die bei dem Abscheideprozeß frei werdenden Säureanionen durch Dialysezellen abgetrennt, da

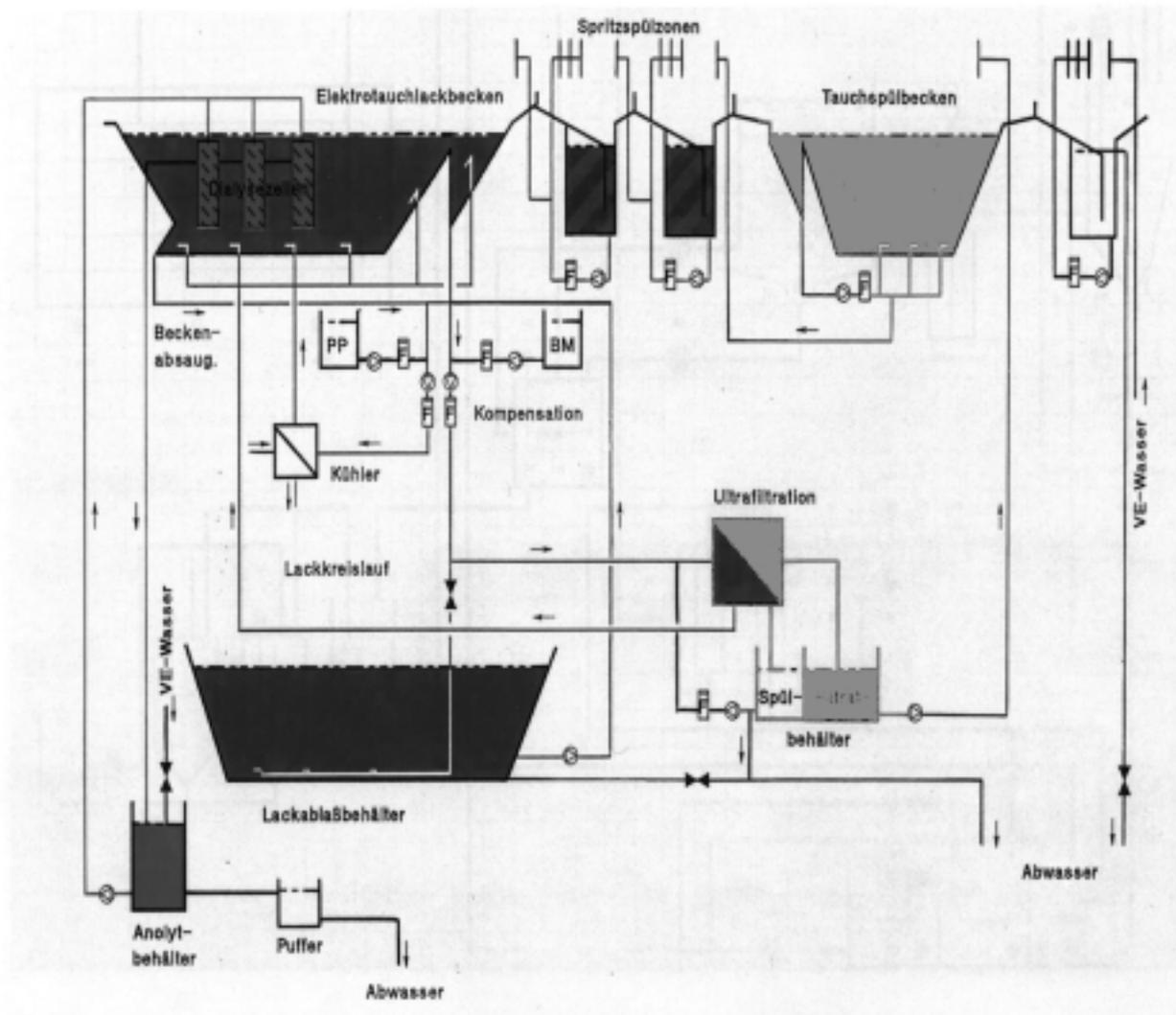


Abb. 7: Schematische Darstellung einer KTL-Anlage (BASF-Broschüre, 1994)

sonst eine Ansäuerung des Elektrotauchlacks erfolgen würde. Zum Verdunstungsausgleich wird in das Lackbad vollentsalztes Wasser (VE-Wasser) zudosiert. Zur Elektrotauchlackierung werden ca. 200-400 V Gleichstrom eingesetzt, was einer Stromstärke von ca. $6-15 \text{ A/m}^2$ beschichteter Fläche entspricht. Die Badtemperatur sollte zwischen 20 und 32°C liegen, der pH-Wert bei 5,9. Die Anoden bestehen meist aus Graphit, wobei auch Edelstahl möglich ist.

1.2.4 Biozide im Elektrotauchlack

Nach Umstellung auf umweltfreundlichere Lackformulierungen wurde ein bakterieller Befall der Lacke immer mehr zu einem Problem. In Holzlacken auf Wasserbasis wurde z. B. eine Entfärbung des Materials durch Bakterien beobachtet (Hansen,

1997). In Elektrotauchlacken und anderen Wasserbasislacken werden zur Konservierung des Lacks Biozide eingesetzt (Dalton, 1988). Nachdem das KTL-Material einer Anlage der DaimlerChrysler AG aufgrund von Bakterienbefall unter erheblichem Kostenaufwand ausgetauscht werden mußte, wird dem Lack vom Hersteller ab Werk Silbernitrat beigemischt. Sollten trotz dieser Maßnahme Mikroorganismen in den Lackieranlagen überleben, wird mit Hilfe des Biozids Chemfil (Wirkstoff Isothiazolinon) stoßdesinfiziert.

➤ Silber

Silber findet aufgrund seiner bakteriostatischen und bakteriziden Eigenschaften viele verschiedenen Anwendungen. So wird das Metall neben der Lackkonservierung z. B. auch in der Medizin zur Wunddesinfektion eingesetzt (Marino et al., 1985; Wright, et al., 1998; Modak et al., 1988). Damit Silber toxische Effekte auf Bakterienwachstum entwickeln kann, muß es in ionischer Form vorliegen, metallisches Silber hat keinerlei hemmenden Einfluß (Derzharin et al., 1987; Trevors, 1987; Williams et al., 1989). Silber besitzt in der äußeren Anwendung im Vergleich zu anderen Schwermetallen für den Menschen eine äußerst geringe Toxizität (Fowler & Nordberg, 1979; Savadian et al., 1989) und ein sehr breites Wirkungsspektrum. Die Vermehrung von grampositiven und gramnegativen Bakterien, Viren, Hefen und Pilzen wird inhibiert (Avakayan, 1966; Deitch et al., 1987; Williams et al., 1989; Trevors, 1987). Die toxischen Silberkonzentrationen liegen je nach Organismus zwischen 0,001-20 mg/l Silberanionen, wobei sich die Literaturangaben stark voneinander unterscheiden (Derzharin et al., 1987). Die Toxizität des Silbers wird allerdings von sehr vielen Faktoren beeinflusst, wie z. B. der Komplexbildung mit Phosphaten, Chloriden, Peptonen, Proteinen, sowie durch die Anwesenheit anderer Metalle, Anzahl der Mikroorganismen, Wasserhärte und pH-Wert (Thurman & Gerba, 1989; Trevors, 1987). Die Wirkungsmechanismen der Silbertoxizität sind sehr komplex. Sie beruhen wahrscheinlich auf Wechselwirkungen der Silberanionen mit DNA, RNA, Aminosäuren und Proteinen (Trevors, 1987, Thurman & Gerba, 1989). Es kommt unter anderem zur Bildung von DNA- oder RNA-Silberkomplexen, die eine Replikation hemmen, sowie zur Denaturierung der Nukleinsäuren, Reaktion mit Cytochromen der Atmungskette, Beeinflussung des Elektronentransports, Inhibierung der Enzymaktivität durch Komplexbildung mit funktionellen Gruppen (kovalente Bindung mit SH-Gruppen (Brunt, 1996), Interaktion mit der Zellmembran und daraus

resultierender veränderter Permeabilität (Savadian et al., 1989; Thurman & Gerba, 1989; Trevors, 1987; Williams et al., 1989). Trotz der starken Toxizität von Silber sind auch hier Resistenzbildungen bekannt (Slawson et al., 1994; Haefeli, 1984). Silberresistente Bakterien konnten aus mit Silber kontaminierten Standorten (z. B. Abwasser, Boden silberverarbeitender Industrie, fotografischer Abfall) isoliert werden (Savadian, 1989). Dazu gehören unter anderem Enterobacteriaceen, Salmonellen und Pseudomonaden (Deitch et al., 1987; Trevors, 1987; s. auch 4.2). Wie auch andere Schwermetallresistenzen scheint die Silberresistenz R-Plasmid-codiert zu sein. Diese Plasmide können zum Teil auch Antibiotikaresistenzen tragen (Rani & Mahadevan, 1989; Nakahara et al., 1987; Choudhury, 1996; McManus et al., 1983). Die Entstehung der Schwermetallresistenzen wird im allgemeinen auf den Selektionsdruck durch die Kontamination der Umwelt mit diesen Substanzen zurückgeführt, wobei die resistenten Spezies gegenüber den sensitiven einen Überlebensvorteil besitzen (Trevors, 1987). Dieser Annahme widersprechend konnten schwermetallresistente Spezies auch schon aus Umgebungen mit geringer Kontamination isoliert werden (Rani & Mahadevan, 1989). Die von den resistenten Organismen tolerierte maximale Silberkonzentration liegt bis zu einem Faktor 500 höher (bis 10 g Ag⁺/l) als bei den sensitiven Stämmen. Analog zu anderen Metallresistenzen wird angenommen, daß die Silberresistenz durch silberbindende extrazelluläre Proteine oder andere reduzierende Substanzen, ausschleusende Ionenpumpen, enzymatische Detoxifikation, Bindung der Silberanionen an die Zelloberfläche, Akkumulation im Innern der Zelle in unterschiedlichen Formen, Beseitigung durch Ausfällen oder ähnliches bewirkt wird. Die exakten Mechanismen sind allerdings weitgehend ungeklärt (Nakahara et al., 1989; Rani & Mahadevan, 1989; Ji & Silver, 1995; Kaur & Vadehra, 1986).

➤ **Isothiazolinon**

Die Isothiazolinone gehören zu den elektrophilen Wirkstoffen. Durch Angriff des elektronenarmen Schwefelatoms des Isothiazolinons an Nucleophilen (elektronenreichen Gruppen), z. B. von Zellproteinen, Aminosäuren und Enzymen, wird der Isothiazolinonring geöffnet. Diese Reaktion ist irreversibel, der Wirkstoff wird also inaktiviert. Es gibt verschiedene Isothiazolinonderivate, die unterschiedliche Wirksamkeit und Stabilität aufweisen (Hasenmeier, 1997). Isothiazolinone werden in der Regel zur Konservierung von Lösungen in der metallverarbeitenden Industrie,

sowie zur Konservierung von Kosmetika eingesetzt (Sondossi et al., 1999). In der KTL-Anlage Sindelfingen 34 wird zur Stoßdesinfektion das Biozid „Chemfil“, eine 1,2 %-Lösung einer chlorierten (Chlor-Methyl-Isothiazolinon) und einer methylierten Komponente (Methyl-Isothiazolinon) des Isothiazolinons, eingesetzt. Die stärker bakterizid wirkende, chlorierte Komponente ist weniger stabil als Methyl-Isothiazolinon (Gillat, 1993) und ist in Abbildung 8 dargestellt. Bis vor kurzen waren keine Resistenzbildungen gegenüber Isothiazolinonen bekannt. Eine Desinfektion von Wasserbasislacken mit Isothiazolinonen ist inzwischen nicht mehr selten (Brunt, 1996), wobei durch den Einsatz von Chlor-methyl/Methyl-Isothiazolinon ein Wachstum von Bakterien und Pilzen unterbunden werden soll (Gillatt, 1993). Dabei muß beachtet werden, daß die eingesetzten Biozide sich nicht negativ auf die Beschichtung auswirken. Ein Nachteil sind Haut-irritierende und allergene Eigenschaften, die diese Substanzen besitzen (Brunt, 1996; Gillatt, 1993). Auch gegenüber Isothiazolinonen wurden inzwischen in Laborversuchen Resistenzbildungen durch Biozidbehandlung bei *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben (Sondossi et al., 1999), nachdem bis vor kurzer Zeit noch keine Resistenzen bekannt waren. Dabei wurden im Laborversuch eine um den Faktor 10 höhere Biozidkonzentration von 200 ppm Handelsprodukt toleriert, was einer Wirkstoffkonzentration von ca. 22 ppm (chlorierte Komponente) entsprach. Auf die Ausgangskultur wirkte dagegen eine Konzentration von 30 ppm Handelsprodukt (2,5 ppm Wirksubstanz) letal (Sondossi, 1999). Der Mechanismus dieser Resistenz ist bisher noch nicht hinreichend geklärt. Mikroorganismen, die den Pseudomonaden angehören, sind im allgemeinen unempfindlicher gegenüber chemischen antimikrobiellen Wirkstoffen, als Bakterien anderer Gattungen (Eagon, 1984).

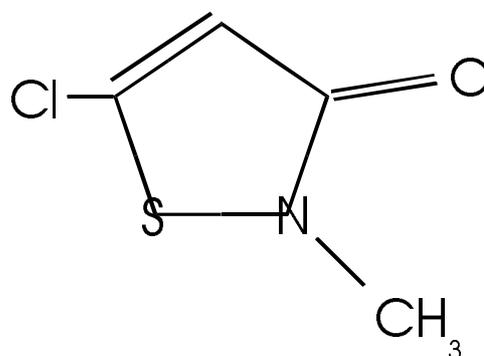


Abb. 8: Chlorierte Komponente 5-Chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on des in der KTL-Anlage Sindelfingen 34 eingesetzten Biozids „Chemfil“

1.2.5 Mikrobieller Befall von KT-Lack

Im Laufe der Entwicklung des Elektrotauchlacks wurden vom Hersteller hinsichtlich der Umweltverträglichkeit Veränderungen an den Lackformulierungen vorgenommen. So wurde z. B. von Lösemittellacken auf Wasserbasislacke umgestellt und der Gehalt an Schwermetallen reduziert. Nach diesen Änderungen traten vermehrt Bakterien in KT-Lacken auf. In einem Fall mußte aufgrund von aufgetretenen Beschichtungsstörungen eine KTL-Anlage komplett abgelassen, die alte Füllung unter erheblichem Kostenaufwand entsorgt und die Anlage neu befüllt werden. Zeitgleich wurde das Vorhandensein von Bakterien festgestellt und *Burkholderia cepacia* konnte aus dem Elektrotauchlack isoliert werden (BASF, Limburgerhof). Zu diesem Zeitpunkt war noch nicht geklärt, ob die fehlerhafte Beschichtung auf Mikroorganismen, oder auf chemische Faktoren zurückzuführen waren. Bei der Weiterentwicklung des Elektrotauchlacks wurde vom Hersteller daraufhin präventiv ab Werk Silbernitrat (5 ppm Ag⁺) in das Bindemittel zudosiert. Doch trotz der biozid wirkenden Silberkationen konnte wiederum *B. cepacia* aus dem KT-Lack mehrerer Werke der DaimlerChrysler AG isoliert werden.

1.3 Eigenschaften von *Burkholderia cepacia*

1992 wurde aufgrund von 16S rRNA-Analysen, DNA-DNA-Homologien, Lipid- und Fettsäuregehalt der Zellen und phenotypischen Charakteristiken ein neues Genus für die RNA Gruppe II Pseudomonas definiert. Unter anderem wurde auch *Pseudomonas cepacia* diesem neuen Genus zugeordnet und wird seither als *Burkholderia cepacia* bezeichnet (Yabuuchi et al., 1992). Diese ubiquitären Bakterien sind gramnegative, ca. 0,5-0,8 µm x 1-3 µm große, peritrich begeißelte Stäbchen (beweglich), die strikt aerob wachsen, Oxidase- und Katalase-positiv sind und keine Sporen bilden (Balows et al., 1992). Die Energiegewinnung erfolgt chemoorganotroph durch aerobe Atmung mit Sauerstoff als letzten Elektronenakzeptor, nie durch Gärung, wobei Hexosen durch den ENTNER-DOUDOROFF-Weg abgebaut werden (Krieg et al., 1984). Organische Wachstumsstoffe werden nicht benötigt (Balows et al., 1992). *B. cepacia* fällt unter anderem dadurch auf, daß ein sehr großes Substratspektrum als Kohlenstoffquelle genutzt werden kann. Dabei konnten von 130 getesteten Substraten 120 verwertet werden, darunter

auch einige Lösemittel wie Benzol, Toluol, Xylol (BTX; Massol-Deya et al., 1997), sowie Malonat, Benzoat, Adipat (Palleroni & Holmes, 1981) und das in KT-Lack eingesetzte Lactat und Acetat. Im allgemeinen werden Lactat und Acetat über den Tricarbonsäurecyclus in den Stoffwechsel eingeschleust. Das Wachstum auf Lactat erfolgt über dieselben Intermediate der Glykolyse durch die Gluconeogenese, das Wachstum auf Acetat durch den anaplerotischen Glyoxylsäure-Cyclus (Schlegel, 1992, s. Abb. 9). Die Keime sind in der Lage, Fett zu hydrolysieren und bei 41°C noch zu wachsen. Zur Indolproduktion, Stärkehydrolyse, Denitrifikation, Argininhydrolase-Aktivität und Wachstum bei 4°C ist *B. cepacia* dagegen nicht in der Lage (Carson et al., 1972). In der Literatur werden die Verwertung von Salicylat (Tocaj et al., 1993), 2-Chlorbenzoat (Fetzner et al. 1991), Phthalat (Chang & Zylstra, 1998), dem Herbizid 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure (Kilbane et al., 1982; Hubner et al., 1998; Xia et al., 1998; Martin et al., 1999), Trichlorethylen (Radway et al., 1998; Luu et al., 1995), 2, 4-Dichlorphenoxyessigsäure (Daugherty & Karel, 1994; Greer et al., 1990), die Umsetzung von Benzylalkohol zu Salicylalkohol (Horuchi et al., 1993), der Abbau von Phenylether (Pfeifer et al., 1993, Pfeifer et al., 1989), p-Nitrophenol (Prakash et al., 1996), Phenol (Folsom et al., 1990), Pentachlorphenol (Banderji-Shankha & Bajpai-Rakesh, 1994) 3-Chlor-4-Methylanilin (Stockinger et al., 1992) und die Verwertung weiterer Xenobiotika in den angegebenen Literaturstellen beschrieben. *B. cepacia* ist pflanzenpathogen (für gewöhnlich bei Zwiebeln) und besitzt pectinolytische Enzyme und Cellulasen (Krieg et al., 1984; Balows et al., 1992). *B. cepacia* gilt als opportunistisch pathogen für immungeschwächte Patienten (Balows et al., 1992) und wurde häufig aus Schleim der Atemwege von Patienten mit „Cystischer Fibrose“ isoliert (Livesley et al., 1998; Flanagan & Paull, 1998; Pathol, 1998; LiPuma, 1998; Johansen et al., 1998; Darling et al., 1998). Bei Isolaten, die aus Patienten mit cystischer Fibrose stammen, wurde die Biosynthese der Siderophore Ornibactin, Cepabactin und Pyochelin beobachtet (Darling et al., 1998; Sokol, 1999; Meyer et al., 1989). Auch wurde bei solchen Isolaten die Sekretion einer Protease, Lipase und Phospholipase C festgestellt (Weingart & Hooke, 1999; Bornscheuer et al., 1994; Quyen et al., 1999). Craven et al. beschrieben 1981 die Isolierung von *B. cepacia* aus Desinfektionsmitteln in Krankenhäusern, z. B. aus einer 10 %-igen Jodlösung (Pyle et al., 1994). Auch wurden lebende Zellen aus destilliertem Wasser isoliert, welches ultravioletter Strahlung ausgesetzt war (Carson & Peterson, 1975, 1972).

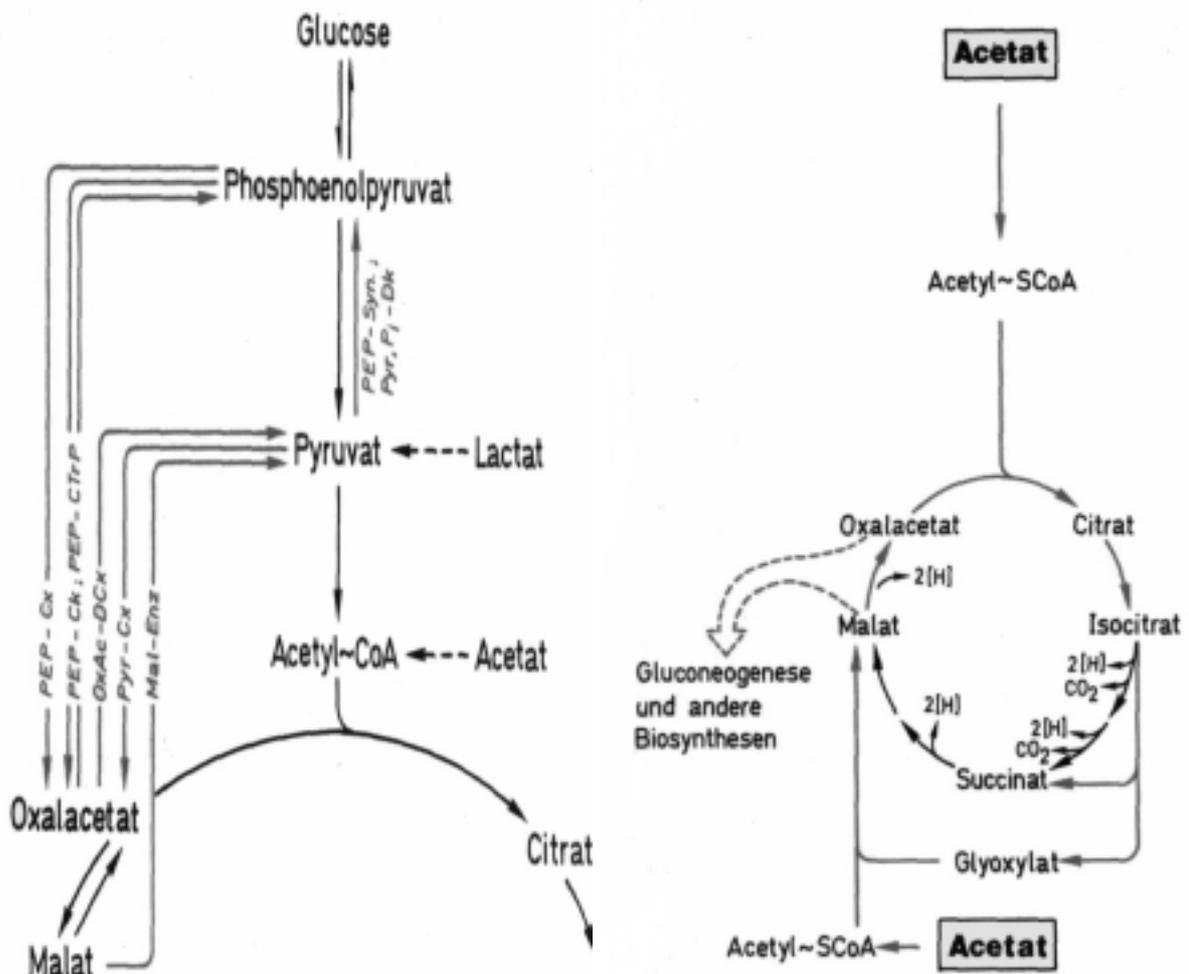


Abb. 9: Einschleusen von Acetat und Lactat in den mikrobiellen Stoffwechsel über den Tricarbonsäurecyclus durch den Glyoxylat-Cyclus, bzw. die Gluconeogenese (Schlegel, 1992)

Prieto et al. beschrieben 1994 eine Plasmid codierte Quecksilberresistenz, die durch Konjugation von Enterobakterien auf *B. cepacia* übertragen wurde.

Vor allem in Stickstoff limitiertem Medium kann die Biosynthese und Akkumulation von poly-beta-Hydroxybutyrat (PHB) als Kohlenstoffreserve beobachtet werden (Palleroni & Holmes, 1981; Ballard et al., 1970; Mitomo et al., 1999). Von klinischem Material isolierte Keime produzierten eine extrazelluläre Lipase, Protease und Lecithinase (Teruko et al., 1986). Kang et al. konnten zeigen, daß *B. cepacia* in der Lage ist fungizide Lipopeptide, sowie Pyrrolnitrin und Phenazin (el-Banna & Winkelmann, 1998; Cartwright et al., 1995) auszuscheiden. Pyrrolnitrin ist aktiv gegen Streptomyceten, Hefen und grampositive Bakterien. Aoki et al. entdeckten 1991 die Ausscheidung der antimikrobiell wirkenden 2-Keto-Gluconsäure.

Die Zellen besitzen vielfältige Antibiotikaresistenzen, z. B. gegen Ampicillin und Carbenicillin. Penicillin G kann sogar als C- und N-Quelle verwertet werden (Beckmann & Lessie, 1979; Balows, 1992; Trepanier et al., 1997). Auch sind Resistenzen gegen Polymycin B, Colistimetat, und Gentamicin bekannt (Sorrell & White, 1953; Hardy et al., 1970). Eine Resistenz gegen Ciprofloxacin und Ceftazidim wurde 1998 von Desai et al. beschrieben. Im allgemeinen besitzen die von klinischem Material isolierten *B. cepacia* mehr Antibiotikaresistenzen als die aus Abwasser stammenden Keime. Fast alle Isolate sind gegen Aminoglycoside, Polymyxin und β -Lactame (Ticarcillin) resistent (Jacobi & Sutton, 1981; Moore & Hancock, 1986), sowie gegen Chloramphenicol (Burns et al., 1989) und besitzen eine um den Faktor 10 niedrigere Membranpermeabilität für β -Lactame, als z. B. *Escherichia coli* (Aronoff, 1988, Parr et al., 1986).

1.4 Aufgabenstellung

Nach Umstellung auf umweltfreundlichere Lackmaterialien traten bei Anlagen der DaimlerChrysler AG vermehrt Verkeimungen in Lackiersystemen auf. Während einem Bakterienbefall wurden derart fehlerhafte Beschichtungen erzeugt, daß der Inhalt der gesamten Anlage abgelassen, die Füllung als Sondermüll entsorgt und die KTL-Anlage neu befüllt werden mußte. Allein das Entsorgen des verkeimten Lacks und die Neubefüllung der Anlage waren ohne Berücksichtigung des Produktionsausfalls (ca. 2000 lackierte Fahrzeuge/Tag) mit Kosten von ca. 2 Millionen DM verbunden. Daraus ergab sich das vorrangige Ziel dieser Arbeit, den Zusammenhang zwischen den in KTL-Anlagen vorgefundenen Mikroorganismen und den gleichzeitig auftretenden Beschichtungsstörungen herauszufinden. Hierbei stellten sich folgende Aufgaben:

- **Klärung der Ursachen der Beschichtungsstörungen. Sind mikrobielle oder chemische Faktoren für die aufgetretenen Lackerschäden verantwortlich?**
 - ☞ Einfluß der Biomasse
 - ☞ Einfluß des Wachstums von *B. cepacia* in Elektrotauchlack
 - ☞ Einfluß der Stoffwechselprodukte

➤ **Reproduzierung der Verkeimbarkeit des Elektrotauchlacks**

- ☞ Ermittlung von chemischen und mikrobiologischen Parametern, welche die Verkeimbarkeit von KT-Lack begünstigen

➤ **Wachstums- und Hemmversuche mit *Burkholderia cepacia* in Reinkultur**

- ☞ Wachstumsversuche mit organischen Säuren, die als alternatives Neutralisationsmittel in Frage kommen können
- ☞ Hemmversuche mit den zu ermittelnden Lacklösemitteln
- ☞ Ermittlung der toxischen Konzentration an Silber
- ☞ Ermittlung der toxischen Konzentration von Chlormethylisothiazolinon, einer Wirksubstanz des Biozids „Chemfil“

➤ **Monitoring der KTL-Anlagen**

- ☞ Routinemäßige Überwachung der Elektrotauchanlage Sindelfingen 34-II
- ☞ Untersuchung von KTL-Material anderer Werke der DaimlerChrysler AG im Fall von Verkeimungen
- ☞ Identifizierung der relevanten Mikroorganismen

➤ **Lösungsvorschläge zur Vermeidung der Keimentwicklung**

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Reagenzien und Medien

Die verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Agarnährböden stammten von der Fa. Merck (Darmstadt), Fluka und DIFCO. Die Chemikalien waren, wenn keine anderen Angaben gemacht werden, von p. A. Qualität. Bestandteile (Bindemittel, Pigmentpaste) des Elektrotauchlacks stammten von der Firma BASF Coatings (Münster). Surfynol 104 wurde von der Firma Air Products (NL-Utrecht) bezogen.

2.2 Kultivierung der Bakterien

Die aus der KTL-Anlage isolierten Mikroorganismen wurden auf SGM-, NAR-, DSM-Medium 1, DSM-Medium 220 abwechselnd im Verdünnungsausstrich ausgestrichen. Die Platten wurden bei 30°C im Brutschrank inkubiert und alle 2 Wochen im Wechsel auf die verschiedenen Agars überimpft.

2.2.1 Zusammensetzung der Medien

Bei allen Medien wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt und, wenn keine anderen Angaben gemacht werden, 20 Minuten im Dampfsterilisator bei 121°C autoklaviert.

➤ **Spurenelementlösung (nach Schlegel, 1992, 1000-fach konzentriert, 1 ml/l Medium)**

| | |
|---|------------|
| ZnCl ₂ | 70 mg |
| MnCl ₂ x 4H ₂ O | 100 mg |
| CoCl ₂ x 6 H ₂ O | 200 mg |
| NiCl ₂ x 6H ₂ O | 100 mg |
| CuCl ₂ x 2H ₂ O | 20 mg |
| Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O | 50 mg |
| Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O | 26 mg |
| NaVO ₃ x H ₂ O | 10 mg |
| Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O | 30 mg |
| HCl (25 %) | 1 ml |
| VE- H ₂ O | ad 1000 ml |

➤ **Vitaminlösung (nach Schlegel, 1992, 500-fach konzentriert, 2-3 ml/l Medium)**

| | |
|----------------------|-----------|
| Biotin | 0,2 mg |
| Nicotinsäure | 2,0 mg |
| Thiamin | 1,0 mg |
| 4-Aminobenzoat | 1,0 mg |
| Pantothenat | 0,5 mg |
| Pyridoxamin | 5,0 mg |
| Cyanocobalamin | 2,0 mg |
| VE- H ₂ O | ad 100 ml |

Die Vitaminlösung wurde sterilfiltriert (Ø 0,2 µm).

➤ **Synthetische Nährlösungen**

nach Schlegel (1992)

| | | |
|--|---------|----|
| K ₂ HPO ₄ | 0,5 | mg |
| NH ₄ NO ₃ | 1,0 | mg |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,2 | mg |
| FeSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,01 | mg |
| CaCl ₂ x 2 H ₂ O | 0,01 | mg |
| D-/L-Lactat | 10,0 | g |
| Spurenelementlösung | 1 | ml |
| VE- H ₂ O | ad 1000 | ml |
| Vitaminlösung | 3 | ml |

Medium 1

| | | |
|--|---------|----|
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,2 | g |
| (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 0,5 | g |
| FeSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,01 | g |
| D-/L-Lactat | 5 | g |
| Acetat | 1 | g |
| Spurenelementlösung | 1 | ml |
| VE-H ₂ O | ad 1000 | ml |
| Vitaminlösung | 3 | ml |

➤ **Vollmedien**

HD-Boullion

| | | |
|---------------------|---------|----|
| Pepton aus Casein | 10 | g |
| Hefeextrakt | 5 | g |
| Glucose | 5 | g |
| NaCl | 5 | g |
| VE-H ₂ O | ad 1000 | ml |

DSM-Medium 1 (Agar- und Flüssigmedium)

Von der DSMZ empfohlenes Medium zur Kultivierung von *Burkholderia cepacia* (Lehrstamm, DSM # 7288).

| | | |
|---------------------|------|----|
| Pepton | 5,0 | g |
| Fleischextrakt | 3,0 | g |
| Agar Agar | 15,0 | g |
| VE-H ₂ O | 1000 | ml |

DSM-Medium 220 (Agar- und Flüssigmedium)

Von der DSMZ empfohlenes Medium zur Kultivierung von lösemittelverwertendem *Burkholderia cepacia* (DSM # 11737).

| | | |
|---------------------|------|----|
| Pepton aus Casein | 15,0 | g |
| Pepton aus Sojamehl | 5,0 | g |
| NaCl | 5,0 | g |
| Agar Agar | 15,0 | g |
| VE-H ₂ O | 1000 | ml |

➤ **NAR-Agar (Nutrient Agar Reinforced)**

| | | |
|--|-----|---|
| Natriumacetat x 3 H ₂ O | 0,5 | g |
| NaCl | 1,0 | g |
| Pepton aus Casein | 2,0 | g |
| Proteose-Pepton | 1,0 | g |
| Fleischextrakt | 1,0 | g |
| Malzextrakt | 0,5 | g |
| Hefeextrakt | 0,5 | g |
| Ammoniumcitrat | 0,2 | g |
| Glucose | 1,0 | g |
| K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O | 2,0 | g |
| KH ₂ PO ₄ | 1,0 | g |

Fortsetzung NAR-Agar

| | | |
|--|---------|----|
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,1 | g |
| VE-H ₂ O | ad 1000 | ml |
| Tween 80 | 0,5 | ml |
| Agar Agar | 15 | g |

➤ **R2A-Agar (DIFCO Laboratories, Detroit, USA)**

Zur Züchtung von heterotrophen Organismen in behandeltem Trinkwasser.

| | | |
|--------------------------|---------|----|
| Hefeextrakt | 0,5 | g |
| Pepton | 0,5 | g |
| Casamino Säuren | 0,5 | g |
| Dextrose | 0,5 | g |
| Stärke | 0,5 | g |
| Natriumpyruvat | 0,3 | g |
| Dikaliumhydrogenphosphat | 0,3 | g |
| Magnesiumsulfat | 0,05 | g |
| Agar Agar | 15,0 | g |
| VE-H ₂ O | ad 1000 | ml |

➤ **SGM-Agar (Sabouraud-1%-Glucose-1%-Maltose-Agar)**

Zur Züchtung von Schimmelpilzen und Hefen, vor allem aus Packmaterialien und Packmitteln, sowie zur Prüfung auf antimykotische Substanzen.

| | | |
|---------------------|------|----|
| Pepton aus Casein | 5,0 | g |
| Pepton aus Fleisch | 8,0 | g |
| D(+)-Glucose | 10,0 | g |
| Maltose | 10,0 | g |
| Agar Agar | 15 | g |
| VE-H ₂ O | 1000 | ml |

➤ **DEV-Agar:**

Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl im Wasser nach den Deutschen Einheitsverfahren und der Trinkwasserverordnung (1990) sowie nach den Untersuchungsvorschriften zur Untersuchung von Lebensmitteln.

| | | |
|---------------------|------|----|
| Pepton aus Fleisch | 10,0 | g |
| Fleischextrakt | 10,0 | g |
| NaCl | 5,0 | g |
| Agar Agar | 18,0 | g |
| VE-H ₂ O | 1000 | ml |

➤ **GSP-Agar**

Pseudomonaden-Aeromonaden-Selektivagar nach Kielwein; zum Nachweis von Pseudomonas und Aeromonas in allen Arten von Nahrungsmitteln sowie Geräten und im Brauchwasser.

| | | |
|--|------|----|
| Natrium-L(+)-Glutamat | 10,0 | g |
| Stärke, löslich | 20,0 | g |
| KH ₂ PO ₄ | 2,0 | g |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,5 | g |
| Phenolrot | 0,36 | g |
| Agar Agar | 12,0 | g |
| VE-H ₂ O | 1000 | ml |

➤ **KTL-Agar**

Zur gezielten Isolierung von an Elektrotauchlack adaptierte Mikroorganismen.

| | | |
|----------------------------|-----|----|
| KT-Lack, bzw. Rezirkulat 2 | 250 | ml |
| VE-H ₂ O | 750 | ml |
| Agar (R2A) | 18 | g |

KT-Lack, bzw. Rezirkulat wurden nach dem Autoklavieren zudosiert.

2.4 Analytische Methoden

2.4.1 Chemische Parameter

Die chemischen Parameter wurden, wenn keine anderen Angaben gemacht werden, mit Küvettenschnelltests der Firma WTW (Weilheim) bestimmt. Diese Küvettentests ermöglichten eine schnelle Bestimmung unterschiedlichster Parameter (Kationen, Anionen, CSB, Metallionen, usw.). Die verwendeten Glasküvetten enthielten jeweils ein Reagenz, das nach Zugabe der Probe selektiv mit den zu bestimmenden Substanzen eine Farbreaktion einging. Die Extinktion der gefärbten Analysenlösung wurde mit einem Photometer (MPM 3000, Firma WTW, Weilheim) bestimmt.

➤ Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB)

Als chemischen Sauerstoffbedarf (CSB-Wert) bezeichnet man die Menge an Sauerstoff, die auf chemischem Wege zur vollständigen Oxidation einer organischen Verbindung zu Kohlendioxid und Wasser benötigt wird (Schwedt und Schnepel, 1981).

Bei der Bestimmung des CSB wird die Oxidationsfähigkeit der Probeninhaltsstoffe ermittelt, z. B. werden die in einer bestimmten Wassermenge enthaltenen oxidierbaren Stoffe quantitativ bestimmt. Dabei werden sowohl biologisch leicht, als auch schwer abbaubare und persistente Stoffe erfaßt (Klee, 1990). Die CSB-Bestimmung erfolgte nach DIN 38 409-H 43.

➤ Ammonium-Stickstoff ($\text{NH}_4^+\text{-N}$)

Die Bestimmung des Ammonium-Stickstoffes erfolgte nach DIN 38 406 - E5 - 1.

➤ Nitrit-Stickstoff ($\text{NO}_2^-\text{-N}$)

Die Ermittlung des Nitrit-Stickstoffes erfolgte nach DIN 38 405-D 10.

➤ **Nitrat-Stickstoff (NO_3^- -N)**

Die Konzentration des Nitrat-Stickstoffes wurde durch 2 verschiedene Methoden ermittelt. Bei Nitrit-Konzentrationen unter 1 mg/l wurde die Bestimmung des Nitrat-Stickstoff mit Küvettenschnelltests der Firma WTW (Weilheim) durchgeführt. Die Nitrat-Konzentration in 0,5 ml Wasserprobe wird dabei mit Hilfe von 2,6-Dimethylphenol in einer Schwefelsäure/Phosphorsäure-Mischung nach 10 Minuten Reaktionszeit photometrisch ermittelt. Da sich Nitrit-Stickstoff-Konzentrationen größer 1 mg/l störend auf diese Art der Nitrat-Bestimmung auswirken, wurde der Nitrat-Stickstoff in der Abteilung VWT der DaimlerChrysler AG gaschromatographisch bestimmt. Die Konzentration der Nitrat-Ionen wird in [mg/l] als NO_3^- -N angegeben.

➤ **Gesamter organischer Kohlenstoff (TOC)**

Gesamtkohlenstoff (TC) und gesamter anorganischer Kohlenstoff (TIC) werden durch Oxidation (TC) oder durch Ansäuern (TIC) in Kohlendioxid (CO_2) überführt und als solches gemessen. Der TOC wird aus der Differenz der TC- und TIC-Werte bestimmt. Die Bestimmung des TOC (Shimadzu Total Carbon Analysator 5000) erfolgte in der Abteilung VWT der DaimlerChrysler AG in Sindelfingen nach DIN 38 409 -H3 über den Gesamtkohlenstoff-Gehalt (TC) und den Gehalt an anorganischem Kohlenstoff (TIC).

➤ **Bestimmung der Mineralsalzgehalte und Schwermetalle**

Die Mineralsalzgehalte wurden in der Abteilung VWT der DaimlerChrysler AG mittels Ionenchromatographie (IC) nach DIN EN ISO 10304-2 bestimmt. Zur Ermittlung der Schwermetalle in KTL-Medium wurden die Proben aufgeschüttelt und mit $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ aufgeschlossen.

➤ **Bestimmung der Lösemittel**

Die qualitative Bestimmung der im KTL-Material enthaltenen Lösemittel wurden mittels GC/MSD bestimmt (GC: HP 5890 Serie II; MSD: HP 5970; Autosampler: HP 7673; Säule: Ultra 2 (5 % Phenyl, Fa. HP); Säulenvordruck 70 kPa; Trägergas:

Helium; Temperaturprogramm: Initialtemperatur 50°C, 3 K/min auf 90°C, 5 K/min auf 150°C, 8 K/min auf 280°C; Injektortemperatur: 280°C, Transferline zum MS: 300°C). Erfasst wurden die Massen 10-300 im Scan mode (2,1 scans /sec).

Zur Ermittlung der Lösemittelbestandteile wurden 0,5 ml KTL in 1,5 ml Headspacegläschen abgefüllt und mit teflonisierten Septen gasdicht verschlossen. Die Proben wurden bei 105°C 1 Stunde inkubiert, anschließend mit einer gasdichten Hamilton-Glasspritze 200 µl Probe aus der Gasphase entnommen, in den GC eingespritzt und die Massenspektren am MSD identifiziert.

➤ **MEQ_{Säure}-Bestimmung**

Die Bestimmung der Säure-, bzw. Baseanteile im Elektrotauchlack erfolgte durch Neutralisationstitation mit KOH, bzw. HCl. Die Indikation des Äquivalenzpunktes erfolgte potentiometrisch nach Meß- und Prüfmethode der Fa. BASF (Differenzpotentiometrie; Dreielektrodenteknik).

➤ **Bestimmung von Isothiazolinonen**

In den KTL-Becken wird bei Befall mit Mikroorganismen das Biozid „Chemfil“ (Fa. BASF, Münster) eingesetzt. Es handelt sich um eine 1,2%-ige Lösung von 5-Chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on (Molmasse 149 g/mol, s. Abb. 10) und eine 0,4%-ige Lösung von 2-Methyl-isothiazolin-3-on (Molmasse 115 g/mol, ohne Abbildung) in Wasser. Diese Bestandteile wurden quantitativ mittels GC/MSD im SIM (**S**elected **I**on **M**ode) bestimmt (GC: HP 5890 Serie II; MSD: HP 5970; Autosampler: HP 7673; Säule: Ultra 2 (5 % Phenyl, Fa. HP); Vordruck: 0,75 kPa; Durchflußrate: 1 ml/min; Trägergas: Helium; Temperaturprogramm: Injektortemperatur 280°C, Initialtemperatur 50°C, 3 K/min bis 92°C, dann 8 K/min bis 200°C). Zur Bestimmung der Wirksubstanz werden 10 ml wässrige Probe mit 2 ml Ethylacetat versetzt und geschüttelt. Nach der Phasentrennung wurde 1 µl der Ethylacetatphase in den GC injiziert. Entsprechend erfolgte die Erstellung der Eichgerade. Quantifiziert wurde nur das 5-Chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on, da die Konzentration von 2-Methyl-isothiazolin-3-on unter der Nachweisgrenze lag. Die Retentionszeit der zu bestimmenden Komponente liegt bei 22,3 min.

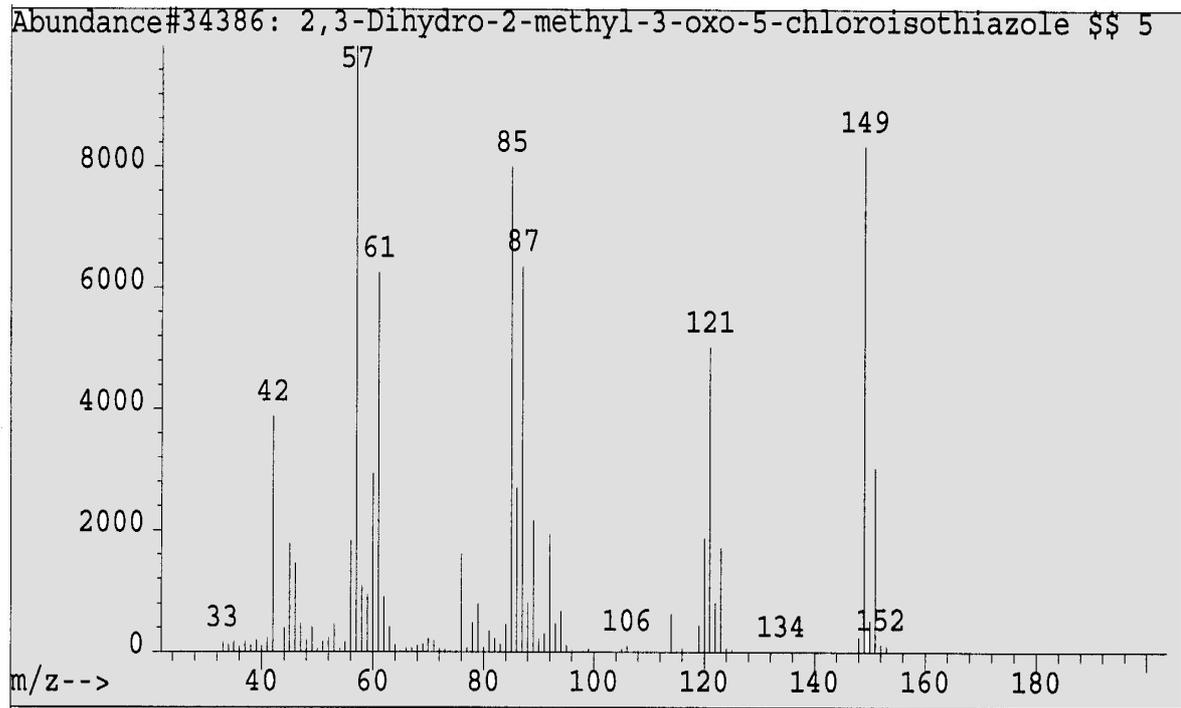


Abb. 10: Massenspektrum der chlorierten Komponente des Biozids „Chemfil“ von 5-Chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on

➤ Bestimmung der Silberkonzentration

Die Bestimmung des Gehaltes an Silber in ETL-Materialien erfolgte durch induktiv gekoppelte Plasma-Atom-Emissionsspektrometrie (ICP-AES) nach Meß- und Prüfmethoden der Fa. BASF (MICP006A). Die Proben wurden nach Homogenisieren und Verdünnung genau in einen 50 ml Meßkolben eingewogen, mit Verdünnungsgemisch (90 % VE-Wasser, 5 % Essigsäure (99,5 %-ig), 5 % 1-Methoxy-2-propanol) auf 50 ml aufgefüllt, vermischt und gemessen (Zerstäuber: Cross Flow; Programm „Ag/Sc“). Die Fremdionenkonzentration wird in ppm (mg/kg) angegeben. Die Bestimmung der Konzentration an Silberionen im Vollmedium (HD-Boullion) erfolgte mittels ICP-AES nach DIN EN ISO 11885 (europäische Norm) mit Matrixanpassung.

2.4.2 Physikalische Parameter

➤ Messung des pH-Werts

Die Messung des pH-Werts der Nährmedien erfolgte mit einem Mikroprozessor pH-Meter 196 (WTW, Weilheim) und einer Einstabmesskette Sen Tix 50 mit einer Ag/AgCl-Elektrode. Für die pH-Messung im Elektrotauchlack wurde eine Einstabmesskette S-301-3 Sp0-70°/1-11 pH/3 mol/l KCl verwendet. Die Tonfritte wurde durch Abdecken mit einer Dialysemembran (Nadir®-Dialysierschläuche, ø 44 mm; Porengröße 25-30 Å; Fa. Roth, Karlsruhe) vor Verkleben mit Pigmenten geschützt. Das Gerät wurde regelmäßig mit Standard-Pufferlösungen (pH 6,9 und pH 4,0) durch Zweipunktmessung kalibriert.

➤ Messung der Leitfähigkeit

Die Leitfähigkeit wurde mit einem Conductometer LF 610 E der Firma WTW (Weilheim) gemessen.

➤ Bestimmung des Trockenrückstandes

Die Festkörperbestimmung wurde nach DIN 53216, Teil 1.6 durchgeführt.

➤ Asche-Gehalt

In einen Porzellantiegel wurden 1-2 g Elektrotauchlack eingewogen und im Schnellverascher bis zum nahezu kohlefreien Zustand bei steigender Temperatur langsam geglüht. Anschließend wurde die Probe 1 Stunde bei 700°C im Muffelofen ausgeglüht, im Exsikkator bis auf die Raumtemperatur abgekühlt und ausgewogen.

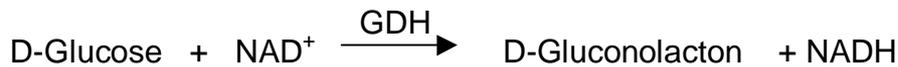
➤ Viskosität

Die Viskosität des KTL-Materials wurde mit Hilfe des Viskosimeters (Viscotester VT501, Fa. Haake) ermittelt. Dazu wurden 9 ml gut homogenisierte Probe eingefüllt und die Viskosität in mPa gemessen (DIN 53019).

2.4.3 Biochemische Methoden

➤ Glucose-Bestimmung

Prinzip:



Die Konzentration der Glucose im KTL-Medium wurde mit dem Testkit Granutest 250 der Firma Diagnostika, Merck, Darmstadt bestimmt. Der Inhalt einer Kapsel Enzymgemisch (GDH = Glucosedehydrogenase) wurde mit 250 ml Glucosediluent gelöst (Glucosebestimmungslösung). Zur Bestimmung der Glucosekonzentration konnten zwei modifizierte Methoden angewandt werden:

1. Abzentrifugieren der Probe (15 min, 17.000 rpm)
Zugabe von 100 µl des Überstandes in 1000 µl Glucosebestimmungslösung
Messung der E_{340} nach 10 min Inkubation bei 37°C
2. Direkte Zugabe von 100 µl unzentrifugierter Probe in 1 ml Glucosebestimmungslösung, 10 min Inkubation bei 37°C, Abzentrifugieren (15 min, 17.000 rpm) und Messen der E_{340}

Als Referenz wurde anstelle der Probe 100 µl VE-Wasser eingesetzt. Die Extinktion des bei der Umsetzung entstandenen NADH (Nicotinamidadenindinucleotid, reduzierte Form) wurde bei 340 nm gemessen. Der lineare Meßbereich lag bei 340 nm zwischen 20 und 200 mg/l (Photometer Perkin Elmer UV/VIS Spektrometer). Die Konzentration der Glucose konnte mit folgender Gleichung errechnet werden:

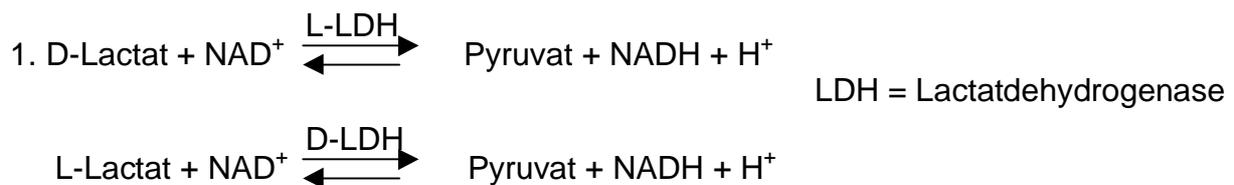
$$c_{\text{Glc}} [\text{g/l}] = E_{\text{Probe}} - E_{\text{Ref.}} \cdot V \cdot F \cdot \text{MG} / \varepsilon \cdot d \cdot v$$

| | | | |
|---------------|--|---|--------------------------|
| E | = Extinktion bei 340 nm | V | = Gesamtvolumen (1,1 ml) |
| MG | = Molekulargewicht ($M_{\text{Glc.}}=180 \text{ g/mol}$) | F | = Verdünnungsfaktor |
| d | = Schichtdicke der Küvette (1 cm) | v | = Probevolumen (100 µl) |
| ε | = molarer Extinktionskoeffizient ($6320 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) | | |

➤ Milchsäure-Bestimmung

Die Bestimmung der D-, bzw. L-Lactat-Konzentrationen erfolgte mit einem Enzymkit der Firma Boehringer Mannheim (#1112821) und mußte für die Anwendbarkeit in Elektrotauchlack wie beschrieben modifiziert werden (s. Tab. 1).

Prinzip:



Das Gleichgewicht dieser Reaktion wird mit Hilfe der nachgeschalteten Reaktion mittels dem Enzym Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) in Gegenwart von L-Glutamat auf die Seite des Pyruvats verschoben.



Die gebildete Menge an NADH ist der D-, bzw. L-Milchsäurekonzentration äquivalent und dient aufgrund seiner Absorption bei 340 nm als Meßgröße (Photometer Perkin Elmer UV/VIS Spektrometer, Tab. 1).

Die Berechnung der Milchsäurekonzentration erfolgt nach folgender Gleichung:

$$c = (V \cdot MG / \varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000) \cdot \Delta E \quad [\text{g/l}]$$

| | | | |
|--|----|--|---|
| | V | = Testvolumen | [ml] |
| $\Delta E_{\text{D-Lactat}} = E_2 - E_1$ | v | = Probevolumen | [ml] |
| $\Delta E_{\text{L-Lactat}} = E_3 - E_2$ | MG | = Molekulargewicht _{Lactat} | [g/mol] |
| | d | = Schichtdicke | [cm] |
| | ε | = Extinktionskoeffizient _{NADH} | |
| | | bei 340 nm = 6,3 | [l*mmol ⁻¹ *cm ⁻¹] |

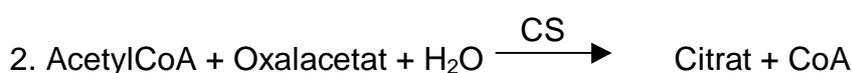
Tab. 1: Modifiziertes Pipettierschema in Zentrifugenröhrchen zur Milchsäurebestimmung

| In Zentrifugenröhrchen pipettieren | |
|---|---------|
| Lösung 1 (Glycerinpuffer, L-Glutaminsäure) | 1000 µl |
| Lösung 2 (NAD-Lyophilisat) | 200 µl |
| vorverdünnte Probe | 100 µl |
| VE-H ₂ O | 900 µl |
| mischen, Niederschlag abzentrifugieren (Heraeus Megafuge 1.0, 10.000 g, 30') | |
| Überstand quantitativ in Reaktionsküvetten überführen | |
| Lösung 3 (Glutamat-Pyruvat-Transaminase) | 20 µl |
| mischen, Messung der E ₃₄₀ nach 5' bei Raumtemperatur = E ₁ | |
| Reaktion starten durch Zugabe von | |
| Lösung 4 (D-Lactat-Dehydrogenase) | 20 µl |
| Mischen, nach Ablauf der Reaktion (ca. 30') Messung der E ₂ | |
| anschließend Zugabe von | |
| Lösung 5 (L-Lactat-Dehydrogenase) | 20 µl |
| Mischen, nach Ablauf der Reaktion (ca. 30') Messung der E ₃ | |

➤ Essigsäure-Bestimmung

Die Bestimmung der Essigsäure-Konzentrationen erfolgte mit einem Enzymkit der Firma Boehringer Mannheim (#178261) und mußte für die Anwendung in KTL-Medien wie folgt modifiziert werden (s. Tab. 2).

Prinzip:



ACS = Acetyl-CoA-Synthetase

CS = Citratsynthase

ATP = Adenosin-5'-triphosphat

L-MDH = L-Malat-Dehydrogenase

CoA = Coenzym A

NAD = Nicotinamid-adenin-dinucleotid

Tab. 2: Modifiziertes Pipettierschema in Zentrifugenröhrchen zur Essigsäurebestimmung

| In Zentrifugenröhrchen pipettieren | |
|---|---------|
| Lösung 1 (Triethanolamin-Puffer, L-Äpfelsäure, MgCl ₂) | 1000 µl |
| Lösung 2 (ATP-, CoA-, NAD-Lyophilisat) | 200 µl |
| vorverdünnte Probe | 100 µl |
| VE-H ₂ O | 900 µl |
| mischen, Niederschlag abzentrifugieren (Heraeus Megafuge 1.0, 10.000 g, 30') | |
| Überstand quantitativ in Reaktionsküvetten überführen | |
| Messen der Extinktionen = E ₀ | |
| Lösung 3 (L-Malat-Dehydrogenase, Citratsynthase) | 10 µl |
| mischen, Messung der E ₃₄₀ nach 3' bei Raumtemperatur = E ₂ | |
| Reaktion starten durch Zugabe von | |
| Lösung 4 (Acetyl-CoA-Synthetase) | 20 µl |
| Mischen, nach Ablauf der Reaktion (ca. 30') Messung der E ₃ | |

Die Gleichung zur Berechnung der Acetat-Konzentration entspricht der Gleichung zur Milchsäurebestimmung. $\Delta E_{\text{Essigsäure}}$ wurde dabei folgendermaßen berechnet.

$$\Delta E_{\text{Essigsäure}} = [(E_2 - E_0)_{\text{Probe}} - [(E_1 - E_0)_{\text{Probe}}^2 / (E_2 - E_0)_{\text{Probe}}]] - [(E_2 - E_0)_{\text{Leerwert}} - [(E_1 - E_0)_{\text{Leerwert}}^2 / (E_2 - E_0)_{\text{Leerwert}}]]$$

2.5 Mikrobiologische Methoden

2.5.1 Biologische Parameter

➤ **Bestimmung des biochemischen Sauerstoffbedarfs (BSB₅)**

Die Bestimmung des biochemischen Sauerstoffbedarfs (BSB₅) wurde im Institut für Siedlungswasserbau Abfall- und Wassergütewirtschaft der Universität Stuttgart in Bösingen nach DIN 38 409 Teil 51 durchgeführt. Der BSB₅ ist die Sauerstoffmenge, die bei der mikrobiellen Oxidation einer wässrigen Probe verbraucht wird und stellt somit ein Maß für die biologische Abbaubarkeit der Inhaltsstoffe dar.

➤ **Bestimmung der Lebendkeimzahlen (K/ml)**

Um genauere Aussagen über die Lebendzellzahlen in den Vorbehandlungszonen und der KTL-Anlage machen zu können, wurde das Spatelverfahren angewandt (Süßmuth et al., 1987). Dabei wurden von den zu untersuchenden wässrigen Proben logarithmische Verdünnungsreihen in physiologischer Kochsalzlösung (0,85 %-ige NaCl-Lösung) hergestellt und davon 0,1 ml auf NAR-, SGM-, DEV-, DSM-Medium 1, DSM-Medium 220, bzw. R2A-Agar-Platten mit einem Drigalski-Spatel ausplattiert. Diese Platten wurden bei 30°C im Brutschrank inkubiert und nach 5 – 7 Tagen ausgezählt. Die Angabe erfolgte in [K/ml]. Die Erstellung von logarithmischen Verdünnungsreihen von KTL-Proben erfolgte mit sterilem VE-Wasser, da in verkeimtem Elektrotauchlack die Zugabe von Natriumchlorid Koagulierungen bewirkte.

➤ **Messung der optischen Dichte (OD)**

Als Maß für das Bakterienwachstum wurde die optische Dichte (OD) von Kulturbrühen bei einer Wellenlänge von 546 Nanometern (OD₅₄₆) gegen unbewachsenes Medium gemessen (Photometer Perkin Elmer UV/VIS Spektrometer Lambda 2).

2.5.2 Identifizierung der Mikroorganismen

➤ **Api 20 NE-System**

Api 20 NE (bioMérieux, F-Lyon) ist ein standardisiertes System mit 8 konventionellen und 12 Assimilations-Reaktionen zur Identifizierung von gramnegativen Bakterien, die nicht zur Familie der Enterobacteriaceae oder zu den inaktiven Keimen gehören. Dazu wurden auf einer Isolationsplatte nach Mikroskopie (Olympus B071) einige Kolonien gleichen Aussehens herangezogen und zusätzlich den im folgenden beschriebenen Tests (Cytochrom-Oxidase-Reaktion, Katalase-Test, Gram-Färbung, KOH-Test, mikroskopische Untersuchung) unterzogen.

Zur Identifizierung der Mikroorganismen wurden 3 bis 4 gut isolierte Kolonien in 0,85 %-iger NaCl-Lösung suspendiert und damit die Röhren für die konventionellen Tests (Nitratreduktion, Indol-Nachweis, Glucosefermentation, Arginindihydrolase, Urease, Glucosidase, Protease, Galactosidase) angeimpft, welche die Substrate in dehydratisierter Form enthalten. Die Reaktionen können anhand von Farbumschlägen, die spontan während 24 stündiger Inkubation bei 30°C oder nach Zugabe von Reagenzien erfolgen, mit Hilfe der mitgelieferten Ablesetabelle ausgewertet werden. Zur Überprüfung der Assimilationsreaktionen (Glucose, Arabinose, Mannose, Mannitol, N-acetyl-glucosamin, Maltose, Gluconat, Caprat, Adipat, Malat, Citrat, Phenylacetat) wird die Bakteriensuspension in Minimalmedium (AUX-Medium) gegeben, mit welchem die Inkubationsröhren befüllt werden. Die Mikroorganismen wachsen nur dann, wenn sie das entsprechende Substrat verwerten können. Die Identifizierung erhält man anhand des APILAB-Computerprogrammes, wobei in dieser Arbeit nur Bakterien aufgeführt werden, deren statistische Absicherung über 90 % liegt.

➤ **API 50 CHB-System**

Zur Identifizierung sporenbildender, aerober grampositiver Stäbchen wird das API 50 CHB Medium zusammen mit dem API 50 CH System verwendet. Im Medium wird eine Bakteriensuspension hergestellt und die Mikroröhren damit beimpft. Während der Inkubation entstehen durch die Fermentation der 49 Kohlenhydrate organische

Säuren, was durch einen Indikator angezeigt wird. Das biochemische Profil wird zur Identifizierung und Typisierung der zu bestimmenden Mikroorganismen verwendet. Zur Identifizierung der Keime wurden die gesamten auf R2A-Agar gewachsenen Mikroorganismen mit einem Wattetupfer abgenommen und in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert (Suspension 1). In 5 ml 0,85 %-iger Natriumchloridlösung wurde damit eine Bakteriensuspension (Suspension 2) hergestellt, die einer optischen Dichte von McFarland 2,0 entsprachen. Dabei wurden die Tropfen (n) der Suspension 1 gezählt, die nötig waren, um diese Zelldichte zu erreichen. Danach wurde die zweifache Anzahl Tropfen (2n) der Suspension 1 in eine Ampulle API 50 CHB Medium pipettiert und gut gemischt. Zur Beimpfung des Streifens wurde der untere Teil der Mikroröhrchen mit der Keimsuspension beimpft und die Inkubationswannen bei 37°C 48 Stunden inkubiert. Die Ablesung und Interpretation des Streifens erfolgte nach 24 und nach 48 Stunden.

➤ **Gram-Färbung**

Für die von GRAM 1884 eingeführte Färbemethode ist die unterschiedliche Beschaffenheit der Zellwände von grampositiven und gramnegativen Bakterien verantwortlich. Die Gram-Färbung ermöglicht die Unterscheidung dieser verschiedenen Zellwände. Manche sporenbildende Keime (*Bacillus subtilis*) verhalten sich gram-variabel, d. h. sie zeigen je nach Alter unterschiedliche Gram-Färbung. Zur Gram-Färbung wird junges Material (logarithmische Wachstumsphase) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach der bekannten Vorschrift (Süßmuth et al., 1987). Das Ergebnis der Färbung wurde unter dem Lichtmikroskop (Olympus B 071) ausgewertet.

➤ **Schnellverfahren zur Gram-Differenzierung: KOH-Test**

Parallel zur Gram-Färbung wurde zu deren Bestätigung eine Methode angewandt, bei der die schnelle Zerstörung der Zellwand gramnegativer Bakterien durch 3 %-ige Kalilauge (KOH) genutzt wird. Die Zellwand grampositiver Keime wird von diesem Reagenz nicht angegriffen. Zur Durchführung gibt man einen Tropfen 3 %-iger KOH auf einen Objektträger, mit einem sterilen Zahnstocher werden einige gut isolierte Bakterienkolonien von der Agarplatte abgenommen und in dem KOH-Tropfen mit

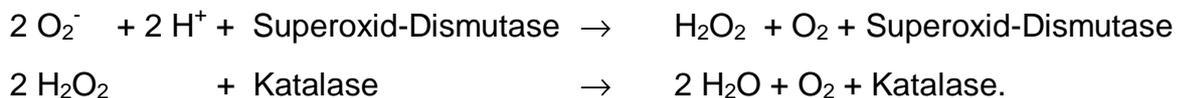
kreisförmigen Bewegungen ca. 5-10 Sekunden lang verrieben. Durch die Lyse der Zellwände gramnegativer Mikroorganismen wird DNA freigesetzt. Durch vorsichtiges Anheben der Zahnstocher vom Objektträger zeigt sich bei gramnegativen Keimen ein viskoser DNA-Faden, bei grampositiven nicht (Süßmuth et al., 1987).

➤ **Cytochrom-Oxidase-Reaktion**

Für die Identifizierung von Mikroorganismen durch das Api 20 NE System spielt auch das Vorhandensein der Cytochrom-Oxidase eine Rolle. Die Cytochrom-Oxidase ist das terminale Enzym der Atmungskette, welches die Reduktionsäquivalente auf Sauerstoff überträgt und in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Zum Nachweis des Enzyms wird ein Tropfen des fertig gelieferten Oxidase-Reagenz (1 g Tetramethyl-*p*-phenylendiamin in 100 ml Isoamylalkohol) der Firma bioMérieux auf eine junge Agarkultur gegeben. Eine Blaufärbung der zu untersuchenden Kolonien innerhalb einer Minute läßt auf das Vorhandensein der Cytochrom-Oxidase schließen.

➤ **Katalase-Reaktion**

Sauerstoff ist der terminale Elektronen-Akzeptor bei der aeroben Atmung und wirkt auf strikt anaerobe Organismen toxisch. Durch Reaktion von O₂ mit Flavinen können in der Bakterienzelle Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale oder das Superoxid-Anion entstehen. Diese Verbindungen haben auch auf aerobe Mikroorganismen eine toxische Wirkung, werden aber durch Katalase und Superoxid-Dismutase zu harmlosem Sauerstoff und Wasser umgesetzt (Schlegel, 1992).



Zum Katalase-Nachweis werden junge Agarkulturen mit 3 %-iger, wäßriger Wasserstoffperoxid-Lösung betropft. Das Vorhandensein des Enzyms wird durch sofort einsetzende Gasbläschenbildung des entweichenden Sauerstoffs sichtbar.

2.5.3 Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung nach der Färbemethode von Bradford wurde eine 1:5 mit VE-Wasser verdünnte Farblösung der Fa. Bio-Rad (München) verwendet. Zu 2,5 ml dieser Lösung wurden 50 µl Probe pipettiert, gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm. Als Referenz wurde anstatt der Probe steriles Medium eingesetzt. Die Eichgerade wurde mit Rinderserumalbumin im Meßbereich von 0,05 – 0,3 g/l erstellt.

2.5.4 Bestimmung von Siderophoren

Der Siderophornachweis erfolgte nach der Chromazurol-Methode (Schwyn & Neilands, 1986) in Zusammenarbeit mit dem biologischen Institut der Universität Tübingen.

2.6 Versuche zur Ermittlung der Ursachen von Beschichtungsstörungen und der Verkeimbarkeit des Elektrotauchlacks

Beim ersten Auftreten von extremen Beschichtungsstörungen 1992, mußte eine Elektrotauchanlage abgelassen, das KTL-Material entsorgt und das Becken neu befüllt werden. Bei dieser Gelegenheit wurde das Vorhandensein von Bakterien im Lack festgestellt, welche als *Burkholderia cepacia* identifiziert wurden. Ob die Oberflächenstörungen durch die Mikroorganismen hervorgerufen wurden oder chemisch, bzw. physikalisch bedingt waren, war zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt. Weiterhin sollte geklärt werden, was zur Verkeimbarkeit des Elektrotauchlacks führt (Frischmaterial ist nicht verkeimbar).

➤ **Verwendete Lackmaterialien:**

☞ **Cathoprime:**

| | |
|---|--------|
| VE-H ₂ O | 1869 g |
| Bindemittel Cathoguard farblos FT80-0640, ohne AgNO ₃ | 1656 g |
| Essigsäure (10 %), bzw. D-/L-Lactat | 55 g |
| Pigmentpaste FT81-7629-0401 | 420 g |

Beschichtungszeit 120 s, Spannung 280 V, Lacktemperatur 30°C, Vorwiderstand 100 Ohm für 1 Blech (Typ Bonder 26S W42 OC), Drehzahl 500 rpm

☞ **Cathoguard 400 (= CG 400):**

| | |
|------------------------|--------|
| VE-H ₂ O | 1552 g |
| Bindemittel FT80-0650 | 1925 g |
| Essigsäure (10 %) | 12 g |
| Pigmentpaste FT81-7650 | 270 g |

Abscheidung: Beschichtungszeit 120 s, Spannung 280 V, Lacktemperatur 28°C, Vorwiderstand 100 Ohm für 1 Blech Bonder 26S W42 OC, Drehzahl 500 rpm;

Nach dem Abscheiden wurden die Bleche mit VE-H₂O abgespült, bei 175°C 20 Minuten eingebrannt und nach dem Abkühlen der Bleche die Schichtdicke gemessen (Dualscope MP4C, Helmut Fischer GmbH). Das Steuergerät für die Elektrotauchlackierung wurde in einer bei der DaimlerChrysler AG durchgeführten Diplomarbeit (Heim, 1984) entwickelt und gebaut.

2.6.1 Ursachen der Beschichtungsstörungen

Nach Umstellung auf umweltverträglichere Lackmaterialien bei KTL-Bädern traten vermehrt Beschichtungsstörungen bei Karossen auf. Gleichzeitig wurde eine erhöhte

Anzahl von Mikroorganismen im Bad nachgewiesen. Die in diesem Abschnitt beschriebenen Versuche dienen dazu festzustellen, ob die entstandenen Schäden durch mikrobielle Einflüsse hervorgerufen worden sind.

2.6.1.1 Einfluß der Biomasse

Dieses Experiment sollte den Einfluß von Biomasse auf das Abscheideverhalten testen. Es sollte überprüft werden, ob das alleinige Vorhandensein der Bakterien ausreicht, Beschichtungsstörungen hervorzurufen. Die Mikroorganismen könnten z. B. aufgrund ihrer negativen Nettoladung mit den negativ geladenen Karossen um die insgesamt positiv geladenen Lackteilchen konkurrieren (Gannon & Hunt, 1997). Auf diese Weise stünden weniger Lackpartikel zur Beschichtung der Karossen zur Verfügung, was eine geringere Schichtdicke zur Folge hätte.

B. cepacia wurde bei 2 verschiedenen pH-Werten (pH 7, pH 5,9) in HD-Boullion angereichert (48 h, LKZ: 4×10^{12} K/ml), abzentrifugiert (3.000 g, 18°C, Heraeus Sepatech Biofuge 22 R) und das Zellpellet vorsichtig in VE-Wasser resuspendiert (s. Tab. 3). Der Anreicherungs-pH-Wert von 5,8 entspricht dem des KTL-Materials. Er wurde gewählt, um zu überprüfen, ob die Mikroorganismen bei diesem pH-Wert eine negativere Oberflächenladung entwickeln (Änderung des isoelektrischen Punktes) als bei pH 7. Die Bakterien würden in diesem Fall Bestandteile des Badmaterials an sich binden und bei der KTL mit an die Karosse gebunden werden, was einen Schichtdickenanstieg zur Folge hätte. Das Entweichen der Hydrathülle der Mikroorganismen könnte dann für die Kraterbildung auf der Lackoberfläche nach dem Einbrennen verantwortlich sein.

Tab. 3: Zusammensetzung der Versuchsansätze zur Verkeimung des KTL-Badmaterials mit bei pH 5,8 und pH 7 angereichertem, adaptiertem *B. cepacia*

| VA | KTL-Badmaterial | AgNO ₃ im Bindemittel | Anreicherung bei pH-Wert |
|------|-----------------|----------------------------------|--------------------------|
| 55.1 | Cathoguard 400 | + | pH 7,0 |
| 55.2 | Cathoguard 400 | + | pH 5,8 |

Tab. 4: Zusammensetzung des Versuchsansatzes 32 (VA 32) zur Verkeimung von KTL-Material (ohne Silbernitrat im Bindemittel) mit adaptierten Keimen von *B. cepacia*, Arbeitsvolumen (AV) = 4 l

| VA 32 | AV | Inokulum | Start-LKZ [K/ml] | Start-pH-Wert |
|-------|---|--|-----------------------|---------------|
| | 4 l KTL ohne AgNO ₃ im Bindemittel | 50 ml mit <i>B. cepacia</i> verkeimter KTL | 3,3 x 10 ⁴ | 5,7 |

Die Zellsuspensionen (ZS) wurden je einem 4 l-Ansatz CG 400 (s. 2.6, VA 55, LKZ 2,8 x 10¹¹ K/ml) zudosiert, unter den beschriebenen Bedingungen vor und nach den Biomassezugaben abgeschieden und die Oberflächen und Schichtdicken verglichen.

2.6.1.2 Einfluß des Wachstums von *Burkholderia cepacia* in KT-Lack

In diesem Versuch sollten schrittweise die Faktoren bestimmt werden, die dafür verantwortlich sind, daß *B. cepacia* in dem KTL-Material überleben und wachsen kann, und daß der mikrobielle Befall für die aufgetretenen Lackierschäden an den Karossen verantwortlich ist (Biomasse, Stoffwechselprodukte, Oberflächenbewuchs, Verbrauch von Badinhaltstoffen durch die Mikroorganismen).

➤ Verkeimbarkeit von scherbelaastetem, silbernitratfreiem KTL-Material

In 4 l unverdünntes, von der Fa. BASF scherbelaastetes KTL-Material (ohne Silbernitrat im Bindemittel) wurden als Inokulum 50 ml des genannten Badmaterials mit nachweisbar lebenden Keimen von *B. cepacia* zugegeben. Vor dem Animpfen wurde die LKZ des Inokulums durch Ausplattieren einer logarithmischen Verdünnungsreihe auf NAR-Agar bestimmt (1,2 x 10⁶ K/ml). Unmittelbar nach Zugabe des Inokulums (ca. 5 min Rühren) wurde erneut auf NAR-Agar ausplattiert, um die LKZ zum Zeitpunkt t = 0 im Versuchsansatz (VA 32, s. Tab. 4) zu bestimmen (3,3 x 10⁴ K/ml). Dabei entstanden bei Verdünnung in 0,85 % NaCl homogene Suspensionen. Nach 1 h, 1 d, 1 w, 2 w, usw. Rühren bei 30°C wurde die LKZ erneut ermittelt. Zusätzlich wurde der pH-Wert gemessen und Abscheideversuche

durchgeführt. Da nach zweiwöchigem Wachstum der Zellen der Elektrotauchlack bei Zugabe von 0,85 % NaCl-Lösung koagulierte, wurden ab diesem Zeitpunkt die Verdünnungen zur Lebendkeimzahlbestimmung mit VE-Wasser angesetzt.

➤ **Verkeimung von silbernitratfreiem KTL mit *B. cepacia*, Einfluß des pH-Wertes und der Materialalterung auf das Abscheideverhalten**

In vorhergehenden Versuchen (s. 2.6.1.2 Tab. 4; 2.6.2.1) korrelierte mit Bakterienwachstum in KTL-Material ein pH-Anstieg, eine Abnahme der Milchsäure- und Essigsäurekonzentration und starke Beschichtungsstörungen. Das Wachstum des Keimes *B. cepacia* bewirkte einen pH-Anstieg im Elektrotauchlack (ETL) und somit eine Koagulierung des Bindemittels. Es wurden daher Ansätze erstellt, bei denen der pH-Wert durch Zugabe von D-/L-Lactat (9 %, racemisches Gemisch), bzw. Acetat (10 %) reguliert, und zusätzlich das Beschichtungsverhalten überprüft wurde. Auf diese Weise sollte herausgefunden werden, auf welche von den Mikroorganismen veränderten Einflußfaktoren (u. a. pH-Anstieg, Fehlen der Neutralisationsmittel Lactat, Acetat, usw.) das schlechte Abscheideverhalten zurückzuführen ist. Durch die Zugabe von Silbernitrat wurde ein Bakterienwachstum verhindert. So konnte der Einfluß der Scherbelastung und die Materialalterung auf das Abscheideverhalten überprüft werden: die entstandene Beschichtung mit dem verkeimten Lack wurde mit der Oberfläche der Bleche verglichen, die durch Abscheiden mit gleichartig gealtertem, unverkeimtem, silberhaltigem Material entstand.

Es wurden 20 l gealtertes KTL-Material ohne AgNO_3 im Bindemittel mit VA 32 (KT-Lack mit *B. cepacia*) beimpft und die in Tabelle 5 beschriebenen Ansätze erstellt. Da nach einmaligem Animpfen die Mikroorganismen wieder abstarben, wurden die Versuchsansätze insgesamt drei mal nachgeimpft, bis die Mikroorganismen in allen Versuchsansätzen überlebten (Start LKZ in den VA ca. 10^3 - 10^4 K/ml, pH-Wert_{start} 5,7; c_0 [Acetat] 0,7 g/l, c_0 [L-Lactat] 2,7 g/l, c_0 [D-Lactat] 0,028 g/l). Die Versuchsansätze rührten bei 300 rpm und 30°C mit Alufolie abgedeckt (zur Verminderung von Verdunstungsverlusten) auf dem Heizrührer.

Tab. 5: Zusammensetzung der Versuchsansätze zur Verkeimung von KTL-Material mit adaptiertem *B. cepacia* und der Ermittlung des Einflusses von Zudosierung von Acetat, Lactat, Scherbelastung, Materialalterung, AgNO₃ und pH-Regelung auf das Abscheideverhalten

| VA | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 54 |
|---|----------------|------------------------|------------|----------------------------|------------------------------------|------------|
| AV KTL _{AgNO₃-frei} [ml] | 3.800 | 3.800 | 3.800 | 3.800 | 3.800 | 400 |
| Inokulum (VA 32) [ml] | 255 | 255 | 255 | 255 | 255 | - |
| AgNO ₃ [mg/l] Ag ⁺ [ppm] | - | - | 7,88 5 | - | - | - |
| Start-Konz. Acetat [mg/l] L-Lactat [mg/l] | 0,7 2,7 | 0,7 2,7 | 0,7 2,7 | 0,7 2,7 | 0,7 2,7 | 0,7 2,7 |
| pH- Regulierung | Acetat 10 % | D-/L- Lactat 9 % | - | einmalig Acetat 10 % | einmalig D-/L- Lactat 9 % | - |

2.6.1.3 Einfluß der Stoffwechselprodukte

Dieses Experiment diene zur Klärung des Schadmechanismus bei mikrobiellem Befall von KT-Lack auf das Abscheideverhalten. Essigsäure und Milchsäure sind als Neutralisationsmittel in KTL-Material enthalten und werden von *Burkholderia cepacia* als Kohlenstoffquelle verwertet. *B. cepacia* wurde in einem modifizierten Minimalmedium mit Milchsäure, bzw. Essigsäure (in den im KT-Lack entsprechenden Konzentrationen, VA 260.1, Medium 1, s. 2.2.1) als Kohlenstoffquelle angezüchtet und nach 5 Tagen Inkubationsdauer abzentrifugiert (20 min, 11.000 g, Heraeus Sepatech Megafuge 1.0, OD₅₄₆ = 2,7). Danach wurden Proteingehalt, TOC- und CSB-Wert des unbewachsenen, bzw. bewachsenen Mediums bestimmt. Zur Herstellung eines 4 l-Ansatzes CG 400 wurde ein Teil des VE-Wassers durch diesen Kulturüberstand (459 g) ersetzt. Nach 60 Minuten Rühren wurde das Beschichtungsverhalten überprüft (28°C, 100 Ohm Vorwiderstand, 280 V). Als Kontrolle diene entsprechend ein KTL-Ansatz mit unbewachsenem Medium (VA

260.2), der ebenfalls abgeschieden wurde (Blech Bonder 26S W 42 OC). Der für diesen Versuch eingesetzte Elektrotauchlack setzte sich wie folgt zusammen:

| | |
|---|----------|
| Kulturüberstand (bewachsen = VA 260.1, bzw. unbewachsen = 260.2) | je 459 g |
| VE-H ₂ O | 1093 g |
| Bindemittel | 1925 g |
| Essigsäure (10 %) | 12 g |
| Pigmentpaste | 270 g |

2.6.2 Ursachen der Verkeimbarkeit des Elektrotauchlacks

2.6.2.1 Wachstumsversuch mit lebenden Zellen, bzw. Zellaufschluß von *Burkholderia cepacia* in KTL-Flüssigmedium und Zugabe einer leicht verwertbaren Kohlenstoffquelle

Durch Zugabe einer leicht verfügbaren Kohlenstoffquelle (Glucose) in KTL-Flüssigmedium (mit AgNO₃ im Bindemittel) wurde überprüft, ob das Wachstum von *Burkholderia cepacia* durch anfängliches Fehlen einer C-Quelle in der KTL Anlage limitiert ist. Durch die Zugabe mittels Ultraschall (Bandelin SONOREX RK 100 SH) aufgeschlossener Zellen (ZA = Zellaufschluß von einer auf Vollmedium gewachsenen Kultur von *B. cepacia*) sollte untersucht werden, ob das Vorhandensein von lysierter Biomasse das Wachstum der Mikroorganismen fördert, bzw. ob dadurch Veränderungen des Lackmaterials auftreten. Die Versuchsansätze (CG 400, frisch angesetzt, bzw. aus der KTL-Anlage Sindelfingen 34-II, s. Tab. 6) wurden mit aus KTL-Material isolierten Mikroorganismen (*B. cepacia* angereichert in HD-Boullion, 48 h, 30°C, 2,5 x 10¹² K/ml) angeimpft und bei 30°C mit 100 rpm auf dem Schüttler (Braun, Certomat BS-1) inkubiert. Vor dem Start des Versuchs wurde die Identität von *B. cepacia* mittels API 20 NE überprüft und bestätigt (99 %). Die Keimzahlen wurden durch Ausplattieren verschiedener Verdünnungsstufen vor dem Abzentrifugieren (18°C, 3000 g, Heraeus Sepatech Biofuge 22 R) auf NAR-Agar

bestimmt. Zusätzlich wurden die Parameter pH-Wert, Glucose- und Lactat-Gehalt gemessen.

| | | |
|--------------------------|--------------------------------------|---------------------------|
| Inokulum Zellaufschluß: | 145 ml Vorkultur abzentrifugiert: | $3,6 \times 10^{14}$ K |
| | resuspendiert in 0,85 % NaCl: 4 ml | 9×10^{13} K/ml |
| | im VA: 1 ml Zellsuspension/300 ml | 3×10^{11} K/ml |
| Inokulum lebende Zellen: | 295 ml Vorkultur abzentrifugiert: | $7,3 \times 10^{14}$ K |
| | resuspendiert in 0,85 % NaCl: 7,6 ml | $9,6 \times 10^{13}$ K/ml |
| | im VA: 1 ml Zellsuspension/300 ml | $3,8 \times 10^{11}$ K/ml |

Tab. 6: Zusammensetzung der Versuchsansätze des Wachstumsversuchs von *Burkholderia cepacia* mit, bzw. ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle, ZA = Zellaufschluß

| VA | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 |
|---|--------------------|-----|-----|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| AV [ml] | 300 | 300 | 300 | 300 | 300 | 300 | 300 | 300 | 300 | 300 | 300 | 300 |
| C-Quelle | 5 g/l Glc. | - | - | 5 g/l Glc. | - | 5 g/l Glc. | - | 5 g/l Glc. | - | 5 g/l Glc. | - | 5 g/l Glc. |
| Vol. [%] CG400 in VE-H ₂ O | 25 aus 34-II | 25 | 100 | 25 | 25 | 25 | 25 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 aus 34-II |
| ZA [K/ml] | - | - | - | - | - | 3×10^{11} | 3×10^{11} | - | - | 3×10^{11} | 3×10^{11} | - |
| LKZ _{start} [K/ml] | 4×10^{11} | - | - | 4×10^{11} | 4×10^{11} | - | - | 4×10^{11} | 4×10^{11} | - | - | 4×10^{11} |

2.6.2.2 KTL-Alterung im MINICOATER

Frisch angesetzter Elektrotauchlack ist im Gegensatz zu gealtertem Material nicht verkeimbar. Zur Reproduzierung der Verkeimbarkeit wurde frisches KTL-Material (ohne Silbernitrat, s. 2.6) im MINICOATER (Fa. Saxon Research Systems, Inc., Saxonburg, s. Abb. 11), eine Elektrotauchanlage im Labormaßstab, gealtert. Der Minicoater entspricht einer KTL-Anlage im Labormaßstab, die den Anolyt-Kreislauf und die Ultrafiltration mit einbezieht. Dazu wurde das Material kontinuierlich durch 2 Pumpen umgewälzt und über eine Ultrafiltrationseinheit geleitet (Fa. Sartorius, Sartocon II Modules, Typ 302 146 6906 W). Mit Hilfe eines Kryostaten wurde die

Lacktemperatur konstant bei 30°C gehalten. Um die Veränderungen chemisch definieren zu können, die der Elektrotauchlack durch die Alterung erfuhr, wurden zu Versuchsbeginn und nach Eintreten der Verkeimbarkeit folgende Messungen durchgeführt:

- D-Lactat-, L-Lactat-Bestimmung
- Acetat-Bestimmung
- pH-Wert
- Verkeimbarkeit
- GC/MSD, Headspace: qualitativ: DC VWT, Sindelfingen
quantitativ: DC, Ottobrunn
- MEQ_{Säure}, MEQ_{Base}, Festkörpergehalt, Asche
- Viskosität
- Abscheideverhalten
- VE-Wasser Untersuchung
- Überprüfung des Silbergehalts

Zur Überprüfung der Verkeimbarkeit wurden wöchentlich 2 ml des Lackmaterials mit 200 µl Bakteriensuspension (*Burkholderia cepacia* aus VA 51 (s. 2.6.1.2 Tab. 5), 1 mal auf NAR subkultiviert) angeimpft und im verschlossenen Reagenzglas (Plastikstopfen mit Löcher) bei 35°C auf dem Schüttler (150 rpm) inkubiert. Das Überleben der Keime wurde durch einen Verdünnungsausstrich auf NAR-Agar nach 2 Tagen überprüft. Bei negativem Ergebnis wurden die Proben wiederholt mit aus KTL isolierten Mikroorganismen belastet und das Keimwachstum nach jeder weiteren Belastung erneut überprüft.

2.6.2.3 Verkeimung von Proben aus der KTL-Anlage Sindelfingen 34-I mit aus 34-II isolierten Mikroorganismen

Ende Juni 1999 trat eine starke Verkeimung der Spülzonen und des KTL-Tauchbeckens der Anlage 34-II in Sindelfingen auf. Nach erneuter Probenahme wurden nochmals Lebendkeimzahlen $\gg 10^3$ K/ml gemessen.

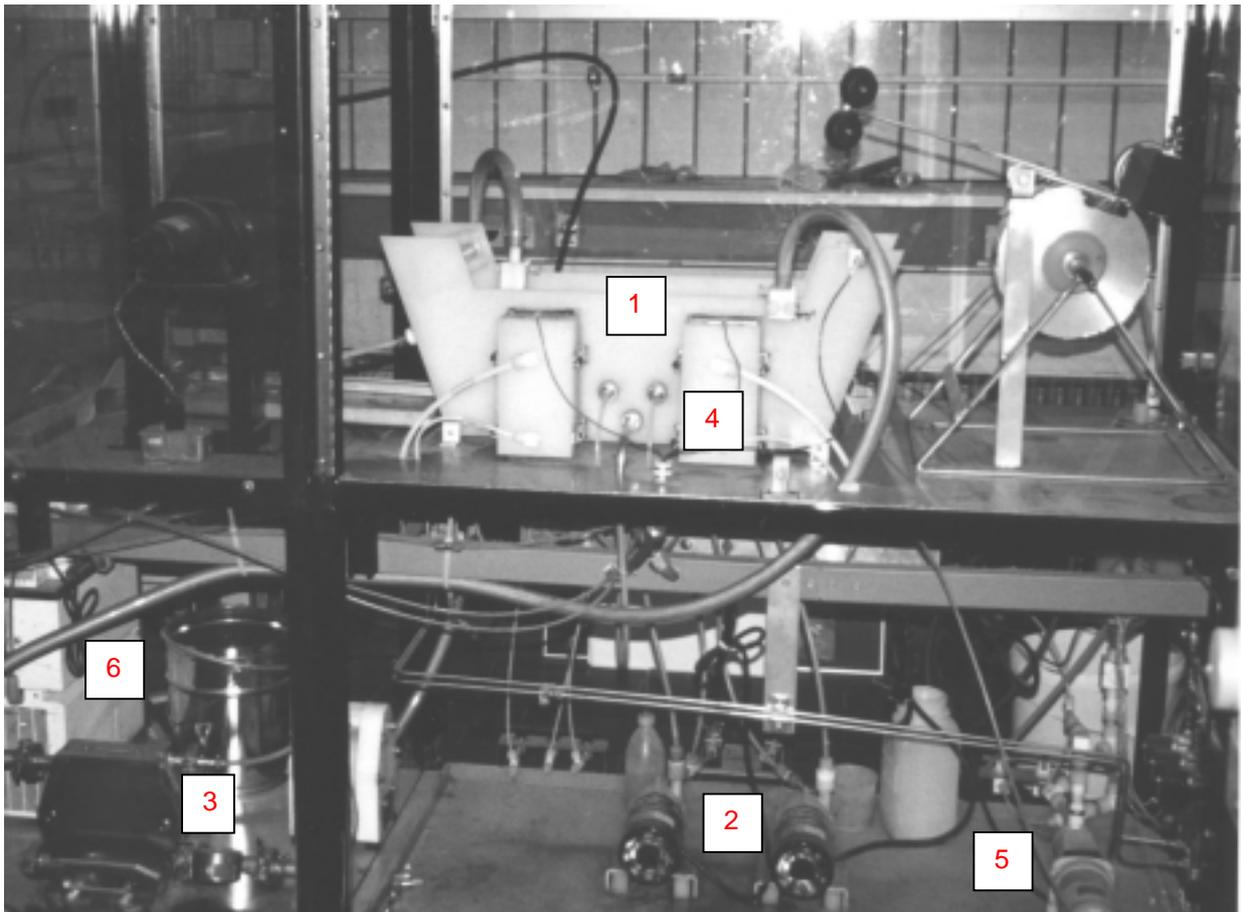


Abb. 11: Zur Lackalterung eingesetzte KTL-Anlage im Labormaßstab, Minicoater (1), Umwälzung durch 2 Pumpen (2), unter Miteinbeziehung einer Ultrafiltrationseinheit (3) und Anolyt-Dialysemembranen (4) und Anolytpumpe (5); Konstanthaltung der Lacktemperatur mittels Kryostat (6)

Daraufhin wurden am Anfang Juli 1999 20 kg des Biozids „Chemfil“ in die Spülzone der Linie 2 zudosiert. Zu diesem Zeitpunkt waren weder pH-Wert-Verschiebungen noch Beschichtungsstörungen festzustellen. Trotz gleicher Fahrweise wurde in der Anlage 34-I keine Verkeimung festgestellt. Um zu überprüfen, ob das Material verkeimbar ist, wurden Proben aus Linie 1 mit Keimen angeimpft, die aus den Proben der Linie 2 isoliert werden konnten. Es sollte so festgestellt werden, ob in Linie 1 nicht nur die adaptierten Keime (*B. cepacia*) zum Auftreten einer Verkeimung fehlten.

Bei diesem Versuch wurden 20 ml Probe der entsprechenden Zonen in Erlenmeyerkolben gefüllt und angeimpft (s. Tab. 7). Dazu wurde mit aus Lack der

Linie 34-II isolierten Mikroorganismen (MO) eine dichte Zellsuspension (ZS) erstellt (3 Impfösen in sterilem VE-H₂O resuspendiert) und den Versuchsansätzen davon je 2 ml als Inokulum zugesetzt. Die Ansätze inkubierten bei 30°C und 130 rpm auf dem Schüttler. Das Überleben der Bakterien wurde durch Ausplattieren auf NAR-Agar überprüft.

2.6.2.4 Empfindlichkeit der aus Elektrotauchlack isolierten Mikroorganismen gegenüber Silberkationen

Nach dem erstmaligen Auftreten von Verkeimungen eines KT-Lacks, wurde als Biozid Silbernitrat zur Konservierung eingesetzt. Trotz des Vorhandenseins der Silberkationen wurden Bakterien in KTL-Material aus Hamburg, Bremen und Sindelfingen festgestellt. Es galt zu prüfen, ob eine Unempfindlichkeit der Bakterien gegenüber Silberionen vorliegt, oder ob das Silber ausgefallen ist, bzw. ausgewaschen wurde. Die Abteilung VWT der DaimlerChrysler AG hat mittels ICP-AES (s. 2.4.1) den Silbergehalt verkeimter KTL-Proben aus Hamburg und Bremen, sowie den eines unverkeimten frischen Materials und als Negativ-Kontrolle den einer silberfreien KTL-Probe bestimmt.

Tab. 7: Zusammensetzung der Versuchsansätze zur Verkeimung der Proben aus der KTL-Anlage Sindelfingen 34-I mit einer Zellsuspension (ZS) von aus 34-II isolierten Mikroorganismen (MO)

| VA | 203 | 204 | 205 | 206 |
|---------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| Probe | Zone 1, Lack, Linie 1 | Zone 2; Rezirkulat 1, Linie 1 | Zone 3, Rezirkulat 2, Linie 1 | Zone 4, Reinfiltrat, Linie 1 |
| AV [ml] | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Inokulum, [ml] | ZS MO Linie 2, 2 | ZS MO Linie 2, 2 | ZS MO Linie 2, 2 | ZS MO Linie 2, 2 |

2.6.2.5 Einfluß des KTL-Anteils im Ultrafiltrat auf die Verkeimbarkeit mit *Burkholderia cepacia*

Im Ultrafiltrat der KTL-Anlagen aller Werke konnten bei aufgetretenen Verkeimungen des KT-Lacks und den Rezirkulaten bisher nie lebende Keime nachgewiesen werden. In diesem Experiment wurde daher überprüft, ob für das Wachstum von *Burkholderia cepacia* ein gewisser Anteil von KTL-Material im Ultrafiltrat vorhanden sein muß, wie es in den Rezirkulaten der Fall ist. Dazu wurden Proben eines Ultrafiltrates, zum Zeitpunkt einer aufgetretenen Verkeimung (Werk Rastatt) entnommen und den Rezirkulaten entsprechende Mengen Festkörper zudosiert. Die Versuchsansätze wurden mit aus KT-Lack reisolierten *B. cepacia* angeimpft (3 Impfösen, auf NAR 30 h gewachsen, s. Tab. 8). Die Versuchsansätze inkubierten bei 30°C und 100 rpm auf dem Schüttler (Braun, Certomat BS-1). Die Lebendkeimzahlen wurden durch Ausstreichen auf NAR-Agar nach 24, 48 und 72 h überprüft. Da nach 3 Tagen Inkubation nach täglicher Beprobung kein Überleben der Mikroorganismen festgestellt werden konnte, wurden die Versuchsansätze nach weiteren 4 Wochen auf dem Schüttler erneut mit den aus dem Lack isolierten Keimen nachgeimpft und das Überleben der Bakterien nach 24 h entsprechend untersucht.

Tab. 8: Zusammensetzung der Versuchsansätze zur Ermittlung des Einflusses des Festkörperanteils in Ultrafiltrat auf die Verkeimbarkeit durch *B. cepacia* in Injektionsflaschen (30°C, 100 rpm auf dem Schüttler)

| VA | Ultrafiltrat [ml] | Festkörper Vol. [%] | KTL-Anteil Vol. [%] |
|-----|-------------------|---------------------|---------------------|
| 284 | 99,5 | 0,1 | 0,5 |
| 285 | 98,5 | 0,3 | 1,5 |
| 286 | 97 | 0,6 | 3 |
| 287 | 95 | 1 | 5 |
| 288 | 90 | 2 | 10 |

2.6.2.6 Verkeimung von Ultrafiltrat und Rezirkulat

In Ultrafiltrat konnten nie lebende Keime nachgewiesen werden. In diesem Versuch sollte überprüft werden, ob in Ultrafiltrat noch zusätzlich bisher unbekannte, toxisch wirkende Substanzen enthalten sind, die ein Keimwachstum verhindern, oder ob es lediglich durch Fehlen einer C-Quelle limitiert wird. Dazu wurden die in Tabelle 9 aufgelisteten Versuchsansätze hergestellt. Eine Ultrafiltratprobe (entnommen zum Zeitpunkt einer Verkeimung im DaimlerChrysler Werk Rastatt), sowie eine Rezirkulatprobe (entnommen im Werk Sindelfingen zum Zeitpunkt einer Verkeimung) wurde im Verhältnis 1:4 mit VE-Wasser versetzt, um eventuell vorhandene toxisch wirkende Substanzen zu verdünnen und so eine Verkeimung zu ermöglichen. Da durch diese Verdünnung neben den antimikrobiell wirkenden Stoffen auch die Kohlenstoffquelle verringert vorlag, wurde je einem Versuchsansatz D-/L-Lactat als Kohlenstoffquelle zudosiert, der pH-Wert auf 7,0 eingestellt und mit aus dem Minicoater isoliertem *B. cepacia* angeimpft (Inokulum: Vorkultur *B. cepacia* auf HD-Boullion 48 h angereichert, abzentrifugiert und in VE-Wasser resuspendiert, AV = 50 ml im Schikanekolben). Das Überleben der Mikroorganismen wurde durch Ausplattieren auf NAR-Agar nach einer Inkubationsdauer von 1, 2 und 30 Tagen überprüft.

Tab. 9: Überleben der Zellen von *B. cepacia* in Ultrafiltrat- (UF) und Rezirkulat- (RZ) Proben mit, bzw. ohne Lactat-Dosierung bei verschiedenen Verdünnungen

| VA | Medium | Verdünnung | 5 g/l Lactat |
|-----|-----------------------------|------------|--------------|
| 313 | UF, Werk Rastatt | 1:1 | - |
| 314 | UF, Werk Rastatt | 1:4 | - |
| 315 | UF, Werk Rastatt | 1:4 | + |
| 319 | RZ, Werk Sindelfingen 34-II | 1:1 | - |
| 320 | RZ, Werk Sindelfingen 34-II | 1:4 | - |
| 321 | RZ, Werk Sindelfingen 34-II | 1:4 | + |

2.7 Wachstums- und Hemmversuche in Reinkulturen

In frisch angesetzttem Elektrotauchlack konnten bisher noch keine Mikroorganismen zum Wachstum gebracht werden. Bislang konnten die Ursachen, die zur Verkeimbarkeit des KTL-Materials führten, weder definiert noch reproduziert werden. Bekannt ist, daß *Burkholderia cepacia* unter anderem das im KTL-Material als Neutralisationsmittel eingesetzte L-Lactat und Acetat, sowie einige Lacklösemittel als Kohlenstoffquelle nutzen kann. Zur Reproduzierbarkeit der Verkeimbarkeit des Elektrotauchlacks wurde mit einigen im KTL-Material vorkommenden Substanzen und *B. cepacia* in Reinkultur verschiedene Wachstumsversuche, bzw. Hemmversuche durchgeführt. Dadurch sollte geklärt werden, wie sich die vorhandenen Substanzen auf das Wachstum, bzw. Überleben der Mikroorganismen auswirken. Darüber hinaus wurden einige organische und anorganische Säuren auf ihre Verwertbarkeit durch *B. cepacia* getestet, auch im Hinblick auf den Einsatz als alternatives Neutralisationsmittel. Die Angaben bedeuten Volumenprozent. Die Zusammensetzung aller Versuchsansätze werden in den Tabellen in Abschnitt 3.2 aufgeführt.

2.7.1 Wachstumsversuche im Minimalmedium

In diesen Wachstumsversuchen wurden einige, laut Literaturangaben von *Burkholderia cepacia* nicht verwertbare organische Säuren auf ihre Verwertbarkeit und ihren Einfluß auf das Wachstum von *B. cepacia* getestet. Dazu wurde einem Minimalmedium (AV = 200 ml) je 5, 1 und 0,1 g/l dieser Substanzen als einzige Kohlenstoffquelle zugesetzt und mit einer Suspension von *Burkholderia cepacia* angeimpft. Die Versuchsansätze inkubierten im 500 ml Schikanekolben bei 32°C und 100 rpm während einer Inkubationsdauer von 7 d auf dem Schüttler. Zusätzlich wurde unter entsprechenden Bedingungen als Positivkontrolle eine Wachstumskurve von *B. cepacia* mit D-/L-Lactat als C-Quelle erstellt. Während der Inkubationsdauer wurden die Parameter OD₅₄₆, LKZ und pH-Wert überprüft. In den Schaubildern wurden nur die Werte der optischen Dichte dargestellt.

2.7.2 Hemmversuche im Minimalmedium mit D-/L-Lactat als C-Quelle und verschiedenen Lacklösemitteln

Die in CG 400 vorkommenden Lacklösemittel, bestimmt mittels GC/MSD (s. 2.4.1), wurden in verschiedenen Konzentrationen als Hemmstoff einem Minimalmedium mit D-/L-Lactat als Kohlenstoffquelle zugesetzt. Die Hemmversuche wurden im geschlossenen System (mit Teflonsepten gasdicht verschlossene 200 ml Injektionsflaschen, AV = 100 ml) durchgeführt. Nach Hemmstoffdosierung und Animpfen mit *Burkholderia cepacia* wurden die Versuchsansätze mit Sauerstoff über Sterilfilter mit Hilfe von Luerlock-Kanülen unter Druck (0,5 bar) gesetzt, um eine Sauerstofflimitierung zu vermeiden. Die Ansätze inkubierten bei 32°C und 100 rpm auf dem Schüttler für eine Inkubationsdauer 7–10 d. Bei den Prozentangaben handelt es sich um Volumenprozent. Im Laufe der Versuchsdauer wurden die Parameter OD₅₄₆, Überleben der MO und pH-Wert gemessen. In den Schaubildern wurden nur die Werte der optischen Dichte bei 546 nm dargestellt.

2.7.3 Bestimmung der toxischen Konzentration von Silbernitrat

Bei diesem Versuch wurde die hemmende Konzentration von Silbernitrat in verkeimtem KTL-Material (ohne AgNO₃), bzw. in einem Vollmedium (HD-Boullion) für die an KTL-Material adaptierte Spezies von *Burkholderia cepacia* bestimmt. Dazu wurde eine sterile Stammlösung einer Silbernitratlösung hergestellt (50 g/l, sterilfiltriert) und den Medien nach dem Autoklavieren verschiedene Konzentrationen zudosiert. Die genaue Konzentration an Silberionen wurde zusätzlich in der Abteilung VWT der DaimlerChrysler AG mittels ICP-AES (s. 2.4.1) ermittelt. Als Inokulum der Versuchsansätze dienten 2 verschiedene Isolate von *B. cepacia* (aus VA 51 (Tab. 5.), bzw. aus Minicoater (s. 2.6.2.2)). Nach Animpfen und Hemmstoffdosierung wurden die Ansätze auf dem Schüttler bei 32°C und 100 rpm inkubiert und die Empfindlichkeit der verschiedenen Isolate gegenüber Ag⁺-Kationen verglichen. Zusätzlich wurde die Wirksamkeit der Zugabe von Silbernitrat in bereits verkeimtem (ab Werk silberfreiem) Elektrotacklack überprüft. Während der Versuchsdauer wurden Lebendkeimzahl, OD₅₄₆ (Photometer Perkin Elmer UV/VIS Spektrometer Lamda 2) und pH-Wert kontrolliert.

2.7.4 Bestimmung der toxischen Konzentration von Isothiazolinon

Die Versuchsansätze im Minimalmedium wurden mit an KTL adaptierten Keimen von *Burkholderia cepacia*, bzw. *Pseudomonas fluorescens* angeimpft, die entweder als logarithmisch wachsende Kultur (Vorkultur in HD-Boullion; VK) oder als Zellsuspension (1 mal auf NAR aus KTL ohne AgNO₃ subkultiviert, in NaCl resuspendiert; ZS = Zellsuspension) zugesetzt wurden. Das Überleben der Bakterien wurde durch Ausplattieren auf NAR-Agar, die Zunahme der Zelldichte durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 546 nm (OD₅₄₆) überprüft. So wurde die Empfindlichkeit von *B. cepacia* und *P. fluorescens* in Minimalmedium, bzw. in verkeimtem KTL-Material gegenüber dem Isothiazolinon verglichen.

In verkeimtes KTL-Material aus dem Minicoater (ohne AgNO₃, s. 2.6.2.2) und Minimalmedium (D-/L-Lactat als C-Quelle) wurden verschiedene Konzentrationen Chemfil zudosiert, um die untere hemmende Konzentrationsgrenze des Biozides festzustellen. Vor der Hemmstoffdosierung wurde die Lebendkeimzahl der im Lack vorhandenen Mikroorganismen durch Ausplattieren einer logarithmischen Verdünnungsreihe ermittelt. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde das KTL-Material erneut mit Keimen belastet. Dazu wurde eine Bakteriensuspension von *B. cepacia* (reisoliert aus Minicoater) in sterilem VE-H₂O hergestellt, die Lebendkeimzahl bestimmt und die Versuchsansätze erneut mit den Mikroorganismen nachgeimpft. Das Überleben der Mikroorganismen wurde durch Ausplattieren auf NAR-Agar nach 24, 48 und 72 Stunden überprüft. Die in den Versuchsansätzen enthaltenen Konzentrationen von 5-Chlor-2-methyl-4-isothiazolin-3-on wurden mittels GC/MSD überprüft.

2.8 Monitoring der KTL-Anlage

Aus der KTL-Anlage 34-II in Sindelfingen wurden regelmäßig Proben aus der Flüssigphase zur Analyse entnommen. Dadurch sollte festgestellt werden, ob, und wenn ja, welcher Anlagenteil von welchen Mikroorganismen befallen wird (s. Tab. 10). Bei Bedarf wurden auch die Anlagenteile der Linie 1 (34-I) und KTL-Anlagen anderer Werke der DaimlerChrysler AG untersucht. Die entnommenen Proben wurden in einer logarithmischen Verdünnungsreihe auf unterschiedliche Nährböden

(NAR, R2A, SGM, KTL 1, RZ 2, s. 2.2.1) ausplattiert und mindestens eine Woche bei 30°C im Brutschrank inkubiert. Am selben Tag wurden die Proben mikroskopisch, chemisch-physikalisch untersucht und mikrobiologisch aufgearbeitet (s Tab. 11). Zusätzliche zur Identifizierung der Mikroorganismen verwendete Agars: GSP, DEV (s. 2.2.1)

Tab. 10: Bezeichnung der Proben und der verschiedenen Probenahmeorte des Monitoring-Versuches der KTL-Anlage (s. Abb. 7 und 12) Sindelfingen 34-II

| Probe | Ort | Bezeichnung | Bemerkung |
|------------|--------------------------------------|---|--|
| A | Anolyttank | | Überwachung des Pilzwachstums |
| 1 | VBH, EW-Tauchspülen | 132 B 100, Zone 10, Hahn am Vorbau | Aussage über Tropfwasser, gelangt in KTL-Bad |
| 2 | VBH, EW-Spritzring | Zone 10, Hahn am Filtergehäuse | Fremdwasserzulauf, Filter 10 µm |
| 2 a | VBH, Tauchaktivierung | Zone 6, Hahn am Vorbau | |
| 3 a | VE-H ₂ O-Zulauf in Zone 1 | | LKZ-Kontrolle |
| 3 | KTL-Badmaterial | B 10, Hahn am Filtergehäuse | |
| 4 | KTL- Ultrafiltrat | 562 F 57, aus Ultrafiltrat-Behälter | Zulauf über Zone 4 (Tauchspüle) in KTL-Bad |
| 5 | KTL- Reinfiltrat=Tauchspüle | B 40, Zone 4, Hahn am Filtergehäuse, | |
| 6 | KTL-Rezirkulat 1 Spritzspüle | Umwälzfiltrat 1 B20, Zone 2, Hahn am Filter | |
| 7 | KTL-Rezirkulat 2 Spritzspüle | Umwälzfiltrat 2 B30, Zone 3, Hahn am Filter | |

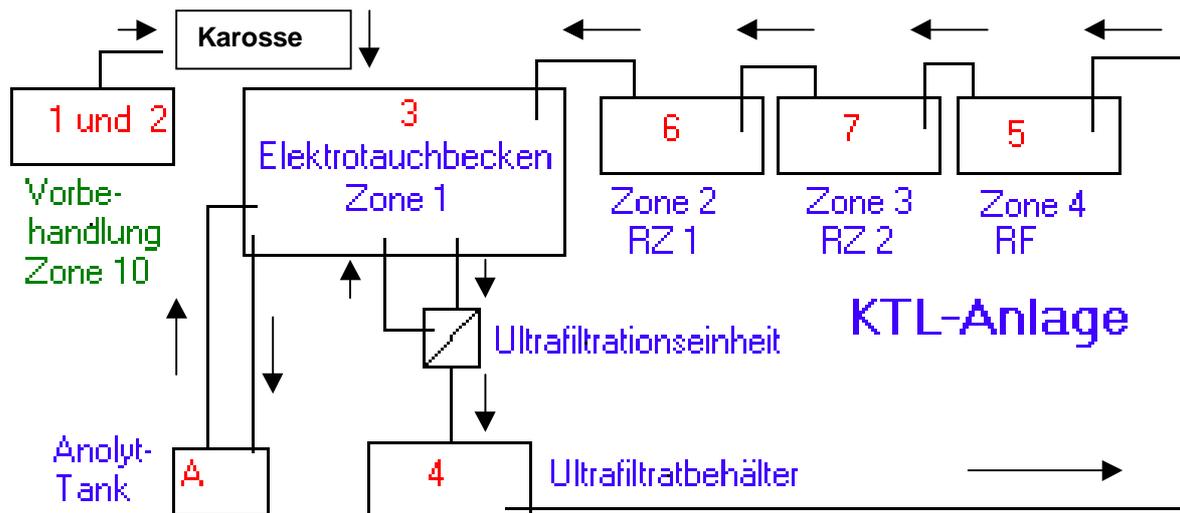


Abb. 12: Schematische Darstellung der für die routinemäßige Beprobung relevanten Anlagenteile, der Probenahmestellen (rot) in der Vorbehandlung (grün) und KTL-Anlage (blau), sowie die Fließrichtung des beprobten Materials (schwarze Pfeile)

Tab. 11: Auflistung der gemessenen Parameter im Zuge des Monitorings der KTL-Anlagen in Sindelfingen (Bau 34)

| Durchgeführte Untersuchungen an KTL-Material (Bau 34, Anlage II) | | |
|--|-----------------------------|---|
| regelmäßig | Lebendkeimzahl [K/ml] | NAR-, SGM-, R2A-, DSM-220-, DEV-Agar |
| bei Bedarf | Mikroskopie | Lichtmikroskopie |
| | | Acridinorange-Färbung (ab 10^6 K/ml) |
| | GC/MSD | Inhaltstoffe des KTL (v. a. Lösemittel) |
| | chem.-physik. | pH-Wert |
| | | Leitfähigkeit (LF) [mS/cm] |
| einmalig | | BSB ₅ [mg/l] |
| | | TOC [mg/l] |
| | | CSB [mg/l] |
| | Wochenprofil der LKZ [K/ml] | Vorbehandlung Zone 6 (Tauchaktivierung) VE-Wasser-Zulauf in das KTL-Becken |
| | | Untersuchung auf Mineralsalze |

Tab. 12: Zusammensetzung der Versuchsansätze zur Nachstellung der KTL-Anlage und Überprüfung der sich entwickelnden Mikroorganismen bei 30°C auf dem Schüttler (300 ml im Schikanekolben, 100 rpm)

| VA | 16 a, b | 17 a, b | 18 a, b | 19 a, b |
|------------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Flüssigmedium | KTL-Badmaterial (Zone 1) | Rezirkulat 1 (Zone 2) | Rezirkulat 2 (Zone 3) | Reinfiltrat (Zone 4) |
| Mineralsalz- lösung | 1 ml/l | 1 ml/l | 1 ml/l | 1 ml/l |

2.8.1 Nachstellung der KTL-Anlage

Zur Kontrolle der Entwicklung der Mikroflora, die sich ohne jegliche Zusätze im KTL-Bad, entwickeln würde, wurden im Doppelansatz 300 ml der jeweiligen Zonen (Anlage Sindelfingen 34-II, Zone 1-4, s. Abb. 12) in Schikanekolben gefüllt und bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (Braun Certomat U, 100 rpm) inkubiert (s. Tab. 12). Dabei wurde vorerst die Lebendkeimzahl (LKZ) überwacht, wobei auf NAR- und auf Rezirkulat 2-Agar verschiedene Verdünnungsstufen ausplattiert wurden. Da nach 4 Wochen Inkubationszeit kein Wachstum von Mikroorganismen festgestellt werden konnte, wurde den Versuchsansätzen eine konzentrierte Mineralsalzlösung (s. 2.2.1) zugegeben und die Lebendkeimzahlen weiterhin überprüft. Die Versuchsansätze inkubierten anschließend bei 30°C im Wasserbad mit 100 rpm auf dem Schüttler. Nach 6 Monaten Inkubationszeit wurden die Ansätze für den in Abschnitt 2.8.2 beschriebenen Versuch verwendet.

2.8.2 Verkeimung gealterter Proben aus der KTL-Anlage

In die in Abschnitt 2.8.2 beschriebenen Versuchsansätze wurde nach ca. 6 Monaten im Schüttelwasserbad eine angereicherte Mischkultur (isoliert aus der Vorbehandlung, Zone 10-II, Tauchspülen, Verschleppung über Karossen, s. Abb. 12) den VA 16 b – 19 b zugesetzt, die Entwicklung der LKZ beobachtet und überprüft, welche aus der Vorbehandlung stammenden Keime das Umsetzen in KTL-Medien überleben (s. Tab. 13).

Tab. 13: Zusammensetzung der Versuchsansätze zur Verkeimung der 4 Zonen der KTL-Anlage mit einer angereicherten Mischkultur aus der VBH-Z10-II und Überprüfung der überlebenden Mikroorganismen

| VA | 16 b | 17 b | 18 b | 19 b |
|---------------------------|--------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| Anlage Sindelfingen 34-II | Zone 1 KT-Lack | Zone 2 Rezirkulat 1 | Zone 3 Rezirkulat 2 | Zone 4 Reinfiltrat |
| Start-LKZ im VA | 3×10^{10} | $3,5 \times 10^{10}$ | 1×10^9 | 4×10^9 |

Die entsprechenden Mikroorganismen sollten identifiziert und deren Einfluß auf das Abscheideverhalten getestet werden. Pro Karosse (100 m²) werden aus der Vorbehandlung ca. 5 l E-Wasser ins Lackierbad eingeschleppt, was bei ca. 1.000 Karossen/Tag täglich ein Volumen von ca. 5.000 l ausmacht.

In 200 ml HD-Boullion wurden 5 ml aus der VBH-Z10-II (Probe 1, Tauchspülen, s. Tab. 10) pipettiert. Die LKZ der Probe 1 wurde auf NAR- und R2A-Agar bestimmt (7×10^4 K/ml) und die Vorkultur 48 h im Wasserbad bei 30 °C inkubiert. Nach Bestimmung der LKZ (NAR-, R2A-, SGM-Agar: ca. 10^{12} K/ml) und Abzentrifugieren der Vorkultur (18 °C, 11.000 g, 12 min) wurde das Pellet in 4 ml 0,85 % NaCl resuspendiert, den VA 16 b – 19 b je 1 ml der Bakteriensuspension zugesetzt und sofort die Anfangs-LKZ (ca. 10^{10} K/ml) in den Versuchsansätzen bestimmt (R2A-, NAR-, SGM-Agar).

2.8.3 Fed Batch mit aus der Vorbehandlung isolierten Mikroorganismen in KTL-Medium im Labormaßstab

Im Zuge der Monitoring-Beprobung der KTL-Anlage Sindelfingen 34-II wurden verschiedene Mikroorganismen aus der Vorbehandlungsstufe „EW-Tauchspülen“ (Zone 10) isoliert (s. 2.8.1). Diese Keime werden über das Abtropfwasser in die KTL-Anlage mit den Karossen eingetragen. Bei dem beschriebenen Versuch wurde untersucht, ob für die beobachteten Lackerschäden Bakterien aus der Vorbehandlung verantwortlich sind. Deshalb wurde überprüft, welche aus der

Vorbehandlung stammenden Mikroorganismen in dem in der KTL-Anlage eingesetzten Material lebensfähig, oder sogar zur Vermehrung fähig sind. Um den Keimen die Adaptation zu ermöglichen, wurde mit einer niedrigen KTL-Konzentration (mit VE-Wasser verdünnt) begonnen und dann der Anteil an Elektrotauchlack durch Fed Batch Prozeßführung sukzessive erhöht. In Abbildung 13 ist das Schema des Versuchsaufbaus der Fed Batch Prozeßführung, in Abbildung 14 ein Foto des eingesetzten Glasfermenters dargestellt.

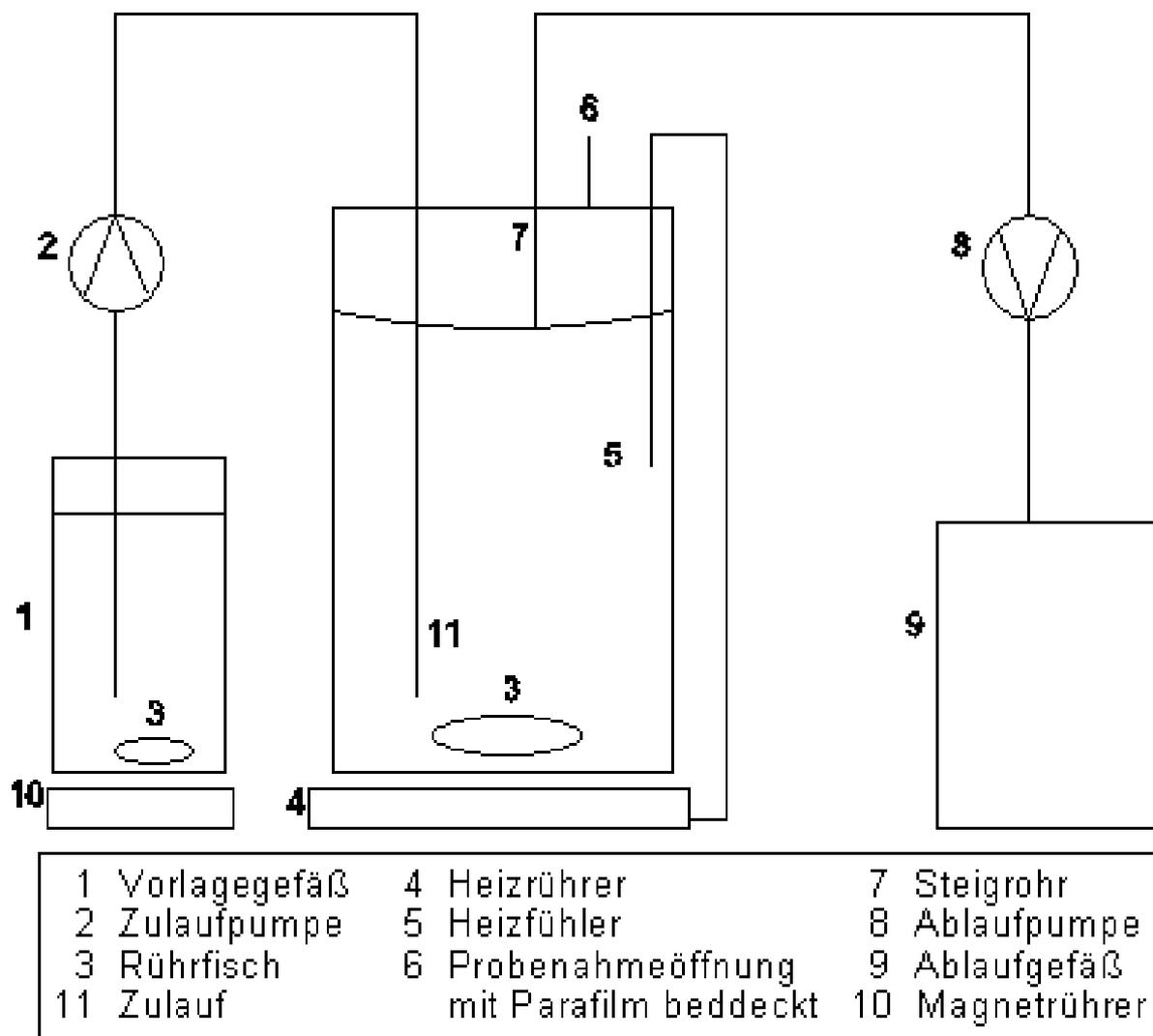


Abb. 13: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Fed Batch Prozessführung mit aus der Vorbehandlung isolierten Mikroorganismen in KTL-Medium im 1 l-Glasfermenter (30°C, 300 rpm)



Abb. 14: Versuchsaufbau der Fed Batch Prozeßführung im 1,3 l Glasfermenter mit aus der Vorbehandlung isolierten Mikroorganismen. Überprüfung einer möglichen Adaptation an silberhaltigen Elektrotauchlack, sukzessive Erhöhung des Lackanteils ($AV = 1 \text{ l}$, $D = 0,0041 \text{ h}^{-1}$, 30°C , 250 rpm auf dem Heizrührer)

Als Inokulum dienten die bisher aus der Vorbehandlung isolierten Bakterien, wobei je zwei bis drei gut isolierte Kolonien in sterilem $\text{VE-H}_2\text{O}$ resuspendiert und dem Ansatz zugesetzt wurden. Der Fermenterinhalt ($AV = 1 \text{ l}$) wurde auf einem Heizrührer bei 30°C und 300 rpm inkubiert. Bei Erreichen der stationären Phase, wurde der KTL-Anteil erhöht ($D = 0,0041 \text{ h}^{-1}$). Der pH-Wert (5,6) wurde durch Zugabe von Acetat (10 %) konstant gehalten. Die Lebendkeimzahlen wurden durch Ausplattieren einer logarithmischen Verdünnungsreihe (in $\text{VE-H}_2\text{O}_{\text{steril}}$) auf R2A-Agar ermittelt und die bei 95-100 % KTL-Anteil überlebenden Mikroorganismen mittels API-Identifizierungssystem identifiziert. Die Ergebnisse wurden durch das BIOLOG-Identifizierungssystem (DaimlerChrysler Forschungszentrum Ulm) überprüft und bestätigt.

2.8.4 Vergleich der Plasmid-DNA von aus verschiedenen Quellen isolierten *B. cepacia* mittels Pulsed Field Gelelektrophorese (PFGE)

Im Zuge des Monitorings der KTL-Anlage 34-II in Sindelfingen und Untersuchungen von KTL-Material anderer Werke der DaimlerChrysler AG konnten Mikroorganismen aus den verschiedenen Lackmaterialien isoliert werden. Die Bakterien wurden mittels Puls Field Gelelektrophorese auf das Vorhandensein und auf Unterschiede von Plasmid-DNA hin untersucht. Dabei sollte geprüft werden, ob die aus dem KTL-Material isolierten Keime durch den Selektionsdruck starke genetische Unterschiede gegenüber dem DSM-Lehrstamm zeigten und ob zwischen den einzelnen Isolaten Unterschiede, bzw. Gemeinsamkeiten bestanden. Die Anzahl und Größen der Plasmide wurden mit Hilfe der ImageMaster VDS Software ermittelt. Die untersuchten Mikroorganismen sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Für die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Molekülen über 10 kb ist die herkömmliche DNA-Gelelektrophorese nicht geeignet. Dagegen ermöglicht die Pulsed Field Gelelektrophorese (PFGE) die Trennung von Molekülen mit einer Größe von ca. 10 bis über 2000 kb. Das Prinzip der PFGE beruht auf einem periodischen Richtungswechsel im elektrischen Feld. Die linearen DNA-Moleküle orientieren sich entlang des elektrischen Feldes und werden zudem durch die Gelmatrix nach Größe aufgetrennt. Die Trennung erfolgt in pulsierenden, orthogonal gerichteten Feldern. Ein langes, nach dem bestehenden elektrischen Feld ausgerichtetes Molekül kann erst dann im neuen, räumlich geänderten elektrischen Feld weiterwandern, wenn es sich entlang dessen Achse in der Gelmatrix ebenfalls neu orientiert hat. Die Neuorientierung der kürzeren DNA-Moleküle erfolgt schneller, als die der längeren. DNA-Moleküle, deren Zeit für die Neuorientierung geringer ist als die Periode des elektrischen Pulses, können daher entsprechend ihrer Größe im „Zick-Zack-Kurs“ elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Schwierigkeit bei der Anwendung dieser Technik liegt vor allem in der Isolation der riesigen DNA-Moleküle in intakter Form, da sie extremen Scherkräften unterliegen. Das Problem wird dadurch gelöst, daß ganze Zellen in Agaroseblöcke eingegossen werden und die Zellen erst nach dem Aushärten der Agarose aufgeschlossen werden. Die DNA bleibt also ständig im molekularen Agarose-Netzwerk eingebettet und muß nicht separat gehandhabt werden.

Tab. 14: Aufstellung der in der PFGE untersuchten Isolate: Marker und aus CG 400 (Ag⁺-haltig) isolierte Mikroorganismen (*Burkholderia cepacia*)

| VA | Bahn | Nr. | MO | Herkunft |
|-----|------|--------|---|--|
| 210 | 1 | Marker | λ Hin d III Fragmente und λ Konkatemeren | - |
| 211 | 2 | 1 | Lehrstamm, DSM # 7288 | DSM |
| 212 | 3 | 2 | Lösemittelverwerter, DSM # 11737 | DSM |
| 213 | 4 | 3 | Sifi 3.1 aus Lack mit AgNO ₃ | Sindelfingen, KTL-Anlage 34-II |
| 214 | 5 | 4 | HB 2.1 aus Lack mit AgNO ₃ | Bremen, Halle 1 |
| 215 | 6 | 5 | HH 156.3 aus Lack mit AgNO ₃ | Hamburg, MCC-KTL |
| 216 | 7 | 6 | VA 51 aus Lack ohne AgNO ₃ | Düsseldorf |
| 217 | 8 | 7 | 81-19 aus Lack ohne AgNO ₃ (Minicoater) | durch VE-Wasser in Minicoater eingetragen |
| 218 | 9 | 8 | F-9, aus Lack mit AgNO ₃ (Fermenter) | MO aus Vorbehandlung Z10 |
| 219 | 10 | 1 | Lehrstamm, DSM # 7288 | DSM |

Die in Tabelle 14 aufgelisteten Mikroorganismen wurden in 40 ml Medium über Nacht auf einem Schüttler bei 30°C und 100 rpm inkubiert und eine Gesamt-OD₆₀₀ von 2-3 abzentrifugiert (5 min, 4500 rpm, Fa. Heraeus Sepatech Megafuge 1.0). Die von der DSM stammenden Keime (lyophilisiert) mußten zuvor in den jeweiligen DSM-Medien rehydriert werden. Die Zellen wurden in Waschpuffer (1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,5) resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 0,5 ml EC-Lösung (1 M NaCl, 100 mM EDTA pH 7,5, 6 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,5 % Brij 58, 0,2 % Na-Desoxycholat, 0,5 % Lauroylsarcosinal) mit 1 mg/ml Lysozym und

20 µg/ml RNase resuspendiert. Lysozym und RNase mußten der EC-Lösung vor Gebrauch frisch zugesetzt werden. Zu den resuspendierten Zellen wurde 0,5 ml einer 1 % InCert Agarose–EC-Lösung gegeben, die ebenso kurz vor Gebrauch aufgekocht wurde und vor Zugabe wieder auf 55-60°C abkühlen mußte. Von dieser Mischung wurden 200 µl in Blöcke gegossen, die dann auf Eis gestellt wurden. Die ausgehärteten Blöcke wurden in 2 ml-Eppendorf-Cups gegeben und in 1 ml EC-Lösung, die ebenfalls 20 µg/ml RNase und 1 mg/ml Lysozym enthielt, bei 37°C im Wasserbad eine Stunde inkubiert. Die EC-Lösung wurde anschließend abdekantiert und statt dessen 1 ml ESP-Lösung (0,5 M EDTA, 1 % Lauroylsarcosinal, 1 mg/ml Proteinase K, vor Gebrauch frisch ansetzten und bei 37°C 2 Stunden vorinkubieren) zugegeben, in der die Agaroseblöcke über Nacht bei 50°C inkubiert wurden. Nach Entfernen der ESP-Lösung wurde die Proteinase K durch zweimalige Inkubation der Blöcke in 1 mM PMSF-Lösung (100 mM PMSF Stammlösung in Isopropanol mit TE 10.1 pH 7,5 verdünnen) bei 37°C für jeweils 2 Stunden inaktiviert. Anschließend wurden die Blöcke zweimal 1 Stunde mit je 1 ml TE 10.1 pH 7,5 bei 37°C gewaschen. Die Blöcke können in TE 10.1 pH 7,5 bei Bedarf bei 4°C aufbewahrt werden. Für die PFGE wurde von diesen Blöcken mit einem Skalpell vorsichtig ca. 2 mm breite Streifen abgeschnitten und diese mit S 1 Nuclease behandelt. Dafür wurden die Streifen zunächst noch zweimal mit 200 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,5 für jeweils 15 Minuten bei 37°C gewaschen. Danach wurden die Streifen in je 200 µl S 1 Nuclease Puffer überführt, dazu je 1 Unit S 1 Nuclease gegeben und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die S 1 Nuclease wurde nach dieser Inkubation sofort mit der Pipette abgezogen und 100 µl eiskaltes ES (0,5 M EDTA, 1 % Lauroylsarcosinal) je Ansatz zugegeben und Proben für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Gelstreifen wurden dann auf einem Kamm plaziert und in ein 1 % Agarosegel eingegossen. Als DNA-Längenstandard wurde der Low Range PFG Marker (New England Biolabs) eingegossen. Er enthält eine Mischung aus λ DNA-*Hin* d III Fragmenten und λ Konkatemeren. Das λ Monomer (48,5 kb) kann als Referenzpunkt genutzt werden, da sie die hellste Bande im Gel darstellt. Für das Gel wurde Seakem GTG Agarose in 0,5 x TBE-Puffer (10 x TBE-Stammlösung: 1 M Tris, 1 M Borat, 2 mM EDTA) verwendet, die auf 55-60°C abkühlen mußte, bevor das Gel gegossen wurde. Für die PFGE wurden 1,4 l 0,5 x TBE-Puffer in die Puls Field Kammer („contour clamped homogeneous electric field“ System, CHEF Mapper System, BioRad Laboratories, Richmond, California) gefüllt, das erstarrte Gel eingelegt und die PFGE gestartet

(Kühlung auf 14°C, Spannung 6 V/cm, Elektrophoresedauer 26,75 h, ramped pulse times zwischen 2,02 s und 26,32 s). Nach dem Gellauf wurde die DNA mit Ethidiumbromid gefärbt. Dazu wurde das Gel in 1 x TAE-Puffer mit 0,5 µg Ethidiumbromid 30 Minuten lang geschwenkt. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert und ausgewertet. Für eventuell nachfolgende Versuche wurde die DNA aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (Southern Blot).

2.9 Versuche zur Problemlösung

2.9.1 Teilneutralisierung von Elektrotacklack mit Salpetersäure

In Bindemittel und Pigmentpaste der in Sindelfingen (Anlage 34-I, -II) eingesetzten KTL-Materialien wird als Neutralisationsmittel L-Lactat und Acetat eingesetzt, um diese in eine wasserdispergierbare Form zu bringen. In einigen vorhergehenden Versuchen stellte sich heraus, daß der in KTL-Material wachsende und Beschichtungsstörungen verursachende *Burkholderia cepacia* L-, D-Lactat und Acetat als Kohlenstoffquelle verwerten kann (s. 2.7.1). Durch den Anolytkreislauf werden in den KTL-Anlagen die bei der Beschichtung entstehenden Säuren abgetrennt. Die Teilneutralisierung des Lackmaterials könnte auch mit einer anorganischen Säure, beispielsweise Salpetersäure, durchgeführt werden. Dadurch könnte die Dosierung von Essigsäure ins KTL-Becken, die von *B. cepacia* als Kohlenstoffquelle verwertet werden kann, gegen eine nicht verwertbare Säure ersetzt werden. So könnte durch Limitierung der Kohlenstoffquelle ein Wachstum der Mikroorganismen erschwert werden. Bei diesem Versuch wurde überprüft, ob ein Einsatz von Salpetersäure als Neutralisationsmittel überhaupt durchführbar ist. Dazu wurden 10 Bleche (Bonder 26 S W 42 OC, 44 cm²) mit dem in Tabelle 15 beschriebenen KTL-Material beschichtet (28°C, 120 s; 280 V, 100 Ohm) und bei 175°C eingebrannt. Es wurden Abscheideverhalten, Schichtdicke, Oberfläche und Umgriff kontrolliert und die beschichteten Bleche einem Korrosionswechseltest ausgesetzt.

Tab. 15: Zusammensetzung des Versuchsansatzes 123: CG 400 mit HNO₃ teilneutralisiert

| VA 123 (Ansatz: 4.000 g) | |
|---------------------------------|---------|
| Bindemittel | 1.925 g |
| Pigmentpaste | 270 g |
| VE-H ₂ O | 1.562 g |
| HNO ₃ 1,625 % | 200 ml |

2.9.2 Effekte der Zugabe von Ethylbenzol, bzw. Xylol in verkeimtes KTL-Material

Die in KTL enthaltenen Lacklösemittel Ethylbenzol und Xylol (Isomerengemisch) stellten sich in vorangegangenen Versuchen als hemmend für das Wachstum von *Burkholderia cepacia* heraus (s. 2.7.2). Bei GC/MSD-Untersuchungen wurde festgestellt, daß diese Lösemittel nach Passieren der Ultrafiltration im Permeat, bzw. in den Rezirkulaten im Gegensatz zum Lackmaterial nicht mehr enthalten sind. Es sollte nun festgestellt werden, ob durch das Verlorengehen der genannten Aromaten das Wachstum der Mikroorganismen gefördert wird, bzw. eine Konstanthaltung der Ausgangskonzentrationen eine Verkeimung erschweren oder sogar verhindern kann.

Von verkeimtem KTL-Material aus Rastatt (ca. 10³K/ml, mit Silbernitrat), bzw. aus dem Minicoater (ca. 5 x 10⁹ K/ml, ohne Silbernitrat) stammend, wurden je 50 ml in 200 ml Injektionsflaschen abgefüllt und je 0,03 % der Lacklösemittel Ethylbenzol, bzw. Xylol (Isomerengemisch) zudosiert (s. Tab. 16). Die Gefäße wurden mit Alufolie verschlossen (offenes System) und bei 30°C auf dem Schüttler (100 rpm) inkubiert. Nach 24 und 72 Stunden Inkubation wurde das Überleben der Mikroorganismen durch Ausplattieren auf SGM- und NAR-Agar überprüft.

Tab. 16: Zusammensetzung der Versuchsansätze zur Überprüfung der Auswirkung von Ethylbenzol- und Xylol-Dosierung in verkeimte KTL-Proben

| VA | Lösemittel, Vol. [%] | Probe |
|--------|------------------------------|---------------------------------------|
| RA 231 | - | CG 400, Rastatt vom 06.09.99 |
| RA 232 | - | Rezirkulat 1, Rastatt vom 06.09.99 |
| RA 233 | - | Rezirkulat 2, Rastatt vom 06.09.99 |
| RA 234 | - | Reinfiltrat, Rastatt vom 06.09.99 |
| RA 236 | Ethylbenzol, 0,03 | CG 400, Rastatt vom 06.09.99 |
| RA 237 | dito | Rezirkulat 1, Rastatt vom 06.09.99 |
| RA 238 | dito | Rezirkulat 2, Rastatt vom 06.09.99 |
| RA 239 | dito | Reinfiltrat, Rastatt vom 06.09.99 |
| RA 240 | Xylol, 0,03 | CG 400, Rastatt vom 06.09.99 |
| RA 241 | dito | Rezirkulat 1, Rastatt vom 06.09.99 |
| RA 242 | dito | Rezirkulat 2, Rastatt vom 06.09.99 |
| RA 243 | dito | Reinfiltrat, Rastatt vom 06.09.99 |
| RA 244 | Ethylbenzol + Xylol, je 0,03 | CG 400, Rastatt vom 06.09.99 |
| RA 245 | dito | Rezirkulat 1, Rastatt vom 06.09.99 |
| RA 246 | dito | Rezirkulat 2, Rastatt vom 06.09.99 |
| RA 247 | dito | Reinfiltrat, Rastatt vom 06.09.99 |
| 252 | Ethylbenzol, 0,03 | verkeimter Lack aus Minicoater, VA 81 |
| 253 | Xylol, 0,03 | dito |
| 254 | Ethylbenzol + Xylol, je 0,03 | dito |
| 255 | - | dito |

2.9.3 Einfluß der Dosierung von Phenoxypropanol in verkeimtes KTL-Material und Einfluß der Kühlung bei 4°C auf das Überleben der Bakterien

Um den Einfluß der Zudosierung von Phenoxypropanol in verkeimtes KTL-Material (Sifi 34-I vom 12.11.99) und dessen Kühlung auf 4°C zu ermitteln, wurden die in Tabelle 17 aufgeführten Versuchsansätze erstellt. Dabei wurden in 100 ml Probe

eines verkeimten Elektrotauchlacks (CG 400 aus KTL-Anlage Sindelfingen 34-I vom 12.11.1999) 0,5 Vol. % Phenoxypropanol (entspricht Ausgangskonzentration im Lack) nachdosiert und bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert (100 rpm). Ein entsprechender Versuchsansatz wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert, als Positivkontrolle wurde ein Versuchsansatz ohne Hemmstoffdosierung auf dem Schüttler mitinkubiert (30°C, 100 rpm). Das Überleben der Mikroorganismen wurde durch Ausplattieren auf NAR-, SGM- und R2A-Agar nach 24 und 72 Stunden, bzw. 30 Tagen Inkubationsdauer überprüft.

Tab. 17: Zusammensetzung der Versuchsansätze zur Überprüfung des Einflusses von Phenoxypropanol (PPH) und einer Kühlung (4°C) auf nachweislich verkeimtes KTL-Material

| VA | 322 | 323 | 324 |
|--------------------------|--|--|--|
| Versuchsbedingung | 30°C, 100 rpm | 30°C, 100 rpm | Kühlschrank, 4°C |
| Probe | verkeimter Lack, Sindelfingen 34-I v. 12.11.99 | verkeimter Lack, Sindelfingen 34-I v. 12.11.99 | verkeimter Lack, Sindelfingen 34-I v. 12.11.99 |
| AV [ml] | 100 | 100 | 100 |
| PPH Vol. [%] | 0,5 | - | - |

3. Ergebnisse

3.1 Ursachen der Beschichtungsstörungen und Verkeimbarkeit des Elektrotauchlacks

Bei der erstmaligen Neubefüllung einer KTL-Anlage aufgrund von extremen Beschichtungsstörungen wurden bei der DaimlerChrysler AG zeitgleich im KTL-Material Bakterien der Spezies *Burkholderia cepacia* festgestellt. Die Lackerschäden äußerten sich durch einen schnellen pH-Anstieg des Lackmaterials von pH 5,9 auf 6,3, Schichtdickenanstieg um bis zu 10 µm, teilweise Abblättern des Lacks („Striptease“ Effekt) in den Spülzonen, Oberflächenstörungen (Pusteln, Blasen, Krater), schlechteren Umgriff, Bildung von Lackschlamm und geringerem Schichtwiderstand. Die Ursachen für die fehlerhafte Beschichtung waren zu diesem Zeitpunkt jedoch noch völlig ungeklärt und Ausgangspunkt dieser Arbeit. Bei den im folgendem aufgeführten Untersuchungen sollten die Ursachen der Beschichtungsstörungen und die Faktoren, die eine Verkeimbarkeit des Elektrotauchlacks fördern, näher beschrieben werden.

3.1.1 Ursachen der Beschichtungsstörungen

In den im folgenden Abschnitt beschriebenen Versuchen sollte zunächst geklärt werden, ob die beobachteten Oberflächenstörungen durch chemische oder mikrobielle Faktoren bedingt waren.

3.1.1.1 Einfluß der Biomasse

Bei diesem Versuch wurde überprüft, ob das alleinige Vorhandensein von Biomasse Beschichtungsstörungen verursachen kann (s. 2.6.1.1). Die Mikroorganismen könnten z. B. aufgrund ihrer negativen Nettoladung mit den negativ geladenen Karossen um die insgesamt positiv geladenen Lackteilchen konkurrieren (Gannon & Hunt, 1997), so daß zur Beschichtung der Karossen weniger Lackpartikel zur Verfügung stehen, was eine geringere Schichtdicke zur Folge hätte.

Es wurde festgestellt, daß die bloße Anwesenheit von Bakterien (bei verschiedenen pH-Werten in Vollmedium angereichert, abzentrifugiert und den Ansätzen zudosiert, s. 2.6.1.1) keinen Einfluß auf das Abscheideverhalten hatte. Bei dem Vergleich der Oberflächen, die bei der Beschichtung (mit den KTL-Ansätzen CG 400 ohne Bakterien, CG 400 mit Mikroorganismen angereichert bei pH 7 und CG 400 mit Keimen angereichert bei pH 5,9) entstanden, waren weder wesentliche Abweichungen in den Schichtdicken, noch Pusteln oder ähnliche Oberflächenstörungen zu beobachten. Die gemessene Schichtdicke und die Oberfläche des Blechs vor den Biomassezugaben entsprachen denen nach den Keimdosierungen (LKZ ca. 3×10^6 K/ml) nach einer Stunde. Die Schichtdicken der jeweiligen Ansätze sind in Tabelle 18 aufgeführt.

3.1.1.2 Einfluß des Wachstums von *Burkholderia cepacia* in KT-Lack

Frisch angesetztes KTL-Material, Rezirkulat und Ultrafiltrat sind selbst nach mehrmaligen Animpfen mit *B. cepacia* (isoliert aus KTL) nicht nachweislich verkeimbar. In diesem Abschnitt werden schrittweise die Faktoren beschrieben, die zur Verkeimbarkeit des Elektrotauchlacks beitragen und der Einfluß, den die Verkeimung des Lacks auf das Abscheideverhalten hat.

Tab. 18: Vergleich der Schichtdicken und Oberflächen der mit Mikroorganismen (angereichert bei verschiedenen pH-Werten) versetzten KTL-Materialien (* = wurde nicht durchgeführt)

| VA | Anreicherung bei pH-Wert | Schichtdicke [μm] | | Oberflächenstörung |
|--------|--------------------------|--------------------------------|---------------------|--------------------|
| | | vor Biomassezugabe | nach Biomassezugabe | |
| Pos. K | * | 20,2 | * | - |
| 55.1 | 7,0 | 19 | 20 | - |
| 55.1 | 5,8 | 19 | 19,5 | - |

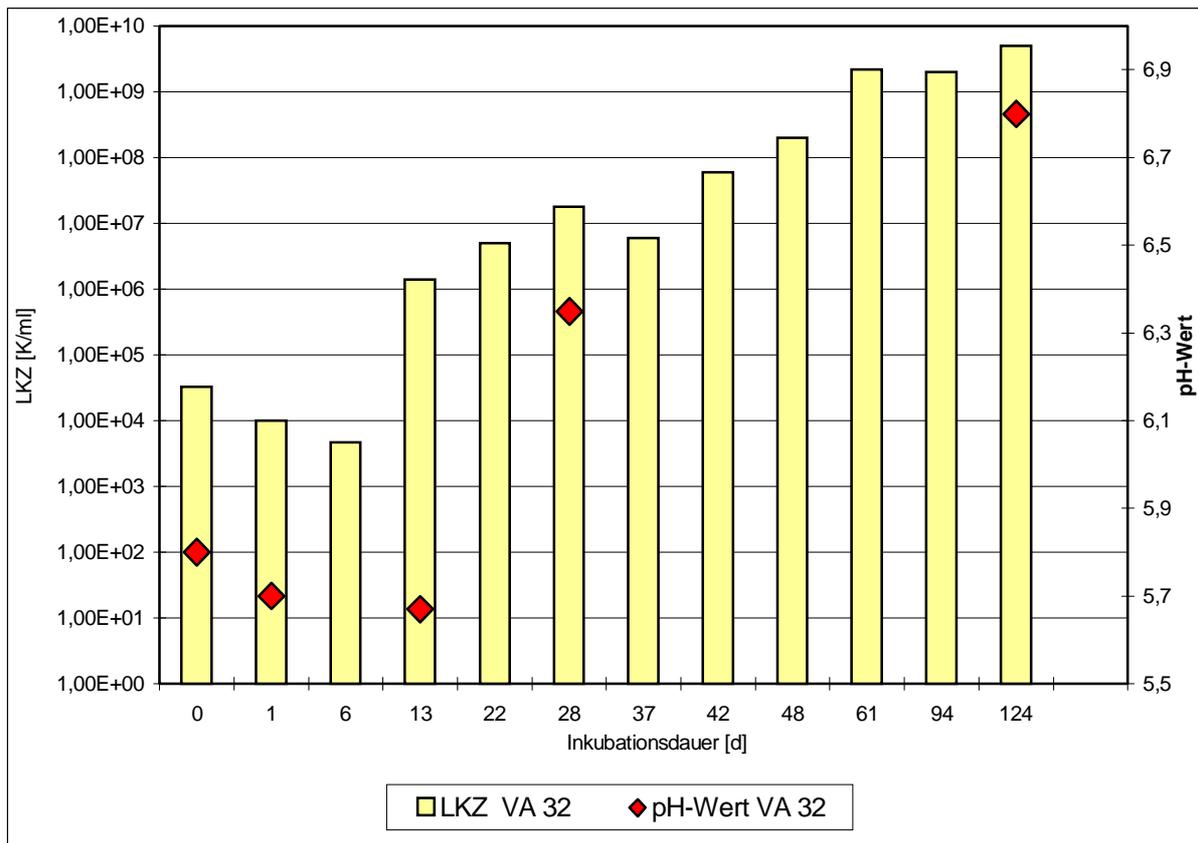


Abb. 14: Verlauf der Lebendkeimzahlen von *B. cepacia* in Elektrotauchlack ohne Silbernitrat (Cathoprime) und des pH-Werts, VA 32 (30°C, 250 rpm)

➤ Verkeimbarkeit von scherbelastetem, silbernitratfreiem Elektrotauchlack

Bei der Verkeimung von der Fa. BASF gealtertem, scherbelastetem Elektrotauchlack mit *Burkholderia cepacia* konnten die Mikroorganismen in der ersten Inkubationswoche zwar überleben, es wurde jedoch kein Keimwachstum festgestellt. Die Lebendkeimzahl betrug in dieser Zeit ca. 10^4 K/ml, der pH-Wert blieb bei ca. 5,7 - 5,9. Nach einer Versuchsdauer von 13 Tagen wurde ein Anwachsen der Keime auf ca. 10^6 K/ml und nach 4 Wochen ein pH-Anstieg auf 6,4 gemessen. Nach einer Inkubationsdauer von insgesamt 124 Tagen wurde eine Lebendkeimzahl von 7×10^9 K/ml und ein pH-Wert von 7,0 erreicht (s. Abb. 14). Nach einer Inkubationsdauer von 22 Tagen wurden erstmals Beschichtungsstörungen (Schichtdickenanstieg über 30 μm , Pustelbildung) festgestellt. Bei der Erstellung der logarithmischen Verdünnungsreihen zur LKZ-Bestimmung in 0,85 % NaCl wurden nach dieser Inkubationsdauer auch eine sofortige Koagulierung des KTL-Materials

festgestellt, wohingegen die zuvor erstellten Verdünnungen homogene Suspensionen waren (s. Tab. 19). Die Koagulate wurden mittels IR (Abt. VWT der DaimlerChrysler AG) als Bindemittelbestandteil (Epoxidharz auf Bisphenol-A-Basis) identifiziert. Auch waren nach 22-tägiger Versuchsdauer beginnende Ablagerungen an der Innenseite des Becherglases zu beobachten. Die Beobachtungen bei den Probenahmen sind in Tabelle 19 aufgelistet. Das Wachstum von *B. cepacia* hat nach einer ca. 3-wöchigen Wachstumsdauer Einfluß auf das Abscheideverhalten des Elektrotauchlacks. Als Ursachen kamen sowohl der pH-Anstieg, der Verbrauch einiger der Badinhaltsstoffe, als auch die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten in Frage.

Tab. 19: Beobachtungen bei der Probenaufarbeitung des scherbelastrten, mit *B. cepacia* verkeimten Versuchansatzes (VA 32)

| | Beobachtungen: beim Ansetzen der Verdünnungsreihe in steriler 0,85 % NaCl an der Becherglaswand Änderungen des pH-Werts Abscheideverhalten |
|-----------------|--|
| LKZ Inokulum | starke Koagulierung des KTL-Materials, Pelletbildung (Epoxidharz auf Bisphenol-A-Basis), klarer Überstand entsteht |
| Inkubationszeit | |
| t = 0 | homogene Suspensionen, keine Ablagerungen am Becherglas, pH-Wert 5,7 |
| t = 1 h | homogene Suspensionen, keine Ablagerungen am Becherglas |
| t = 1 d | homogene Suspensionen, keine Ablagerungen am Becherglas |
| t = 6 d | allmähliche Koagulierung des KTL-Materials, keine Ablagerung am Becherglas |
| t = 13 d | Koagulierung des KTL-Materials, keine Ablagerungen am Becherglas |
| t = 22 d | sofortige starke Koagulierung bei Verdünnung, anfängliche Verkrustungen am Becherglas, Störungen beim Abscheideverhalten, Schichtwiderstand sinkt, Pustelbildung |
| t = 28 d | sofortige starke Koagulierung bei Verdünnung mit NaCl-Lösung, starke Verkrustungen am Becherglas, keine Abscheidung mehr möglich: unruhige Oberfläche, Verklumpungen, pH-Wert-Anstieg von 5,7 auf 6,35 |

➤ **Verkeimung von silbernitratfreiem KTL mit *B. cepacia*, Einfluß des pH-Wertes und der Materialalterung auf das Abscheideverhalten**

Bei vorangegangenen Versuchen (s. 3.1.1.2, 3.1.2.1), korrelierten das Bakterienwachstum in gealtertem Elektrotauchlack zeitlich mit Beschichtungsstörungen, pH-Anstieg und Abnahme der Neutralisationsmittelkonzentrationen (Lactat, Acetat). Ziel dieses Versuchs war es, zu bestimmen, welcher dieser Faktoren welchen Einfluß auf das Abscheideverhalten hat (s. 2.6.1.2). In den Ansätzen ohne pH-Regulierung (VA 51, 52) wurden u. a. aufgrund des pH-Anstieges von 5,8 auf 7,5 durch das Bakterienwachstums extreme Beschichtungsstörungen beobachtet. Dabei wurde ein Schichtdickenanstieg (~ Ladung) von 21 µm bis zu über 1 cm gemessen (s. Abb. 15, VA 51 nicht dargestellt).

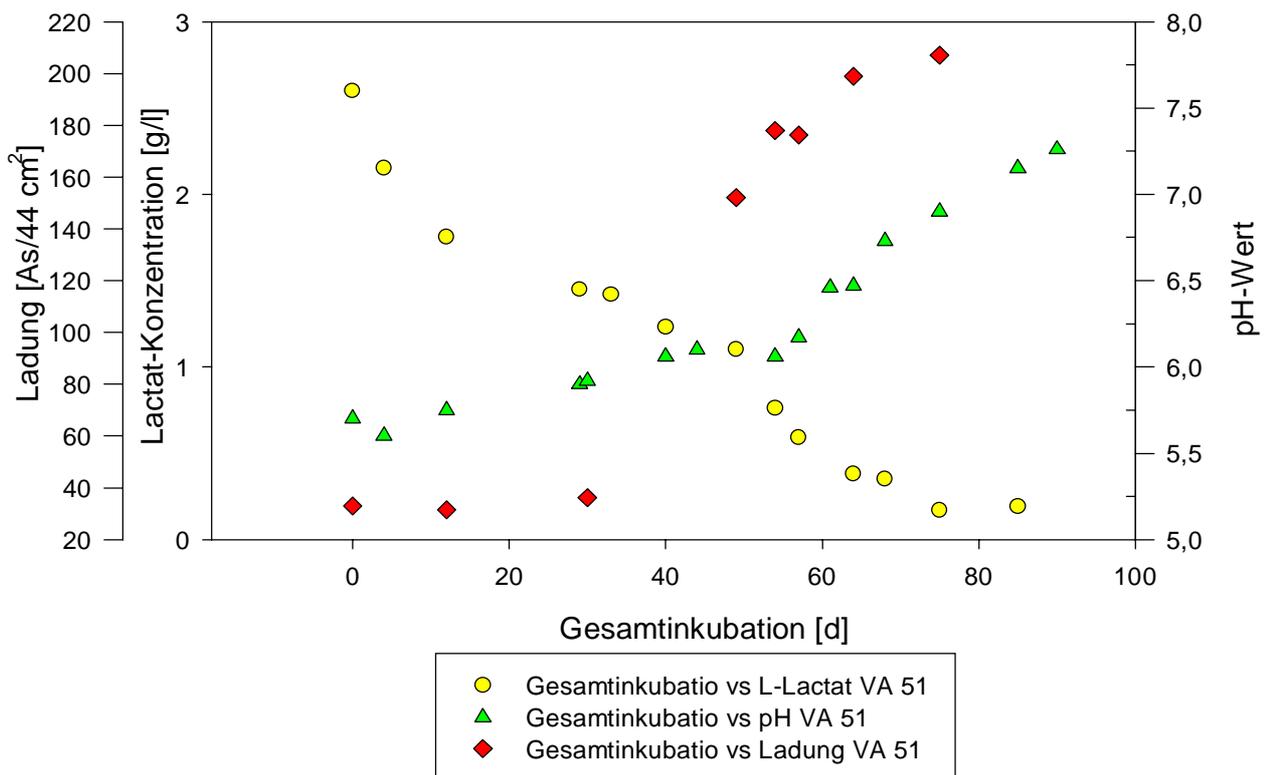


Abb. 15: Einfluß des Wachstums von *B. cepacia* in ETL und der pH-Regulierung mit D-/L-Lactat auf das Abscheideverhalten: Verlauf des pH-Werts, der L-Lactat-Konzentration und der Ladung (~ Schichtdicke) ohne pH-Regulierung (VA 52)

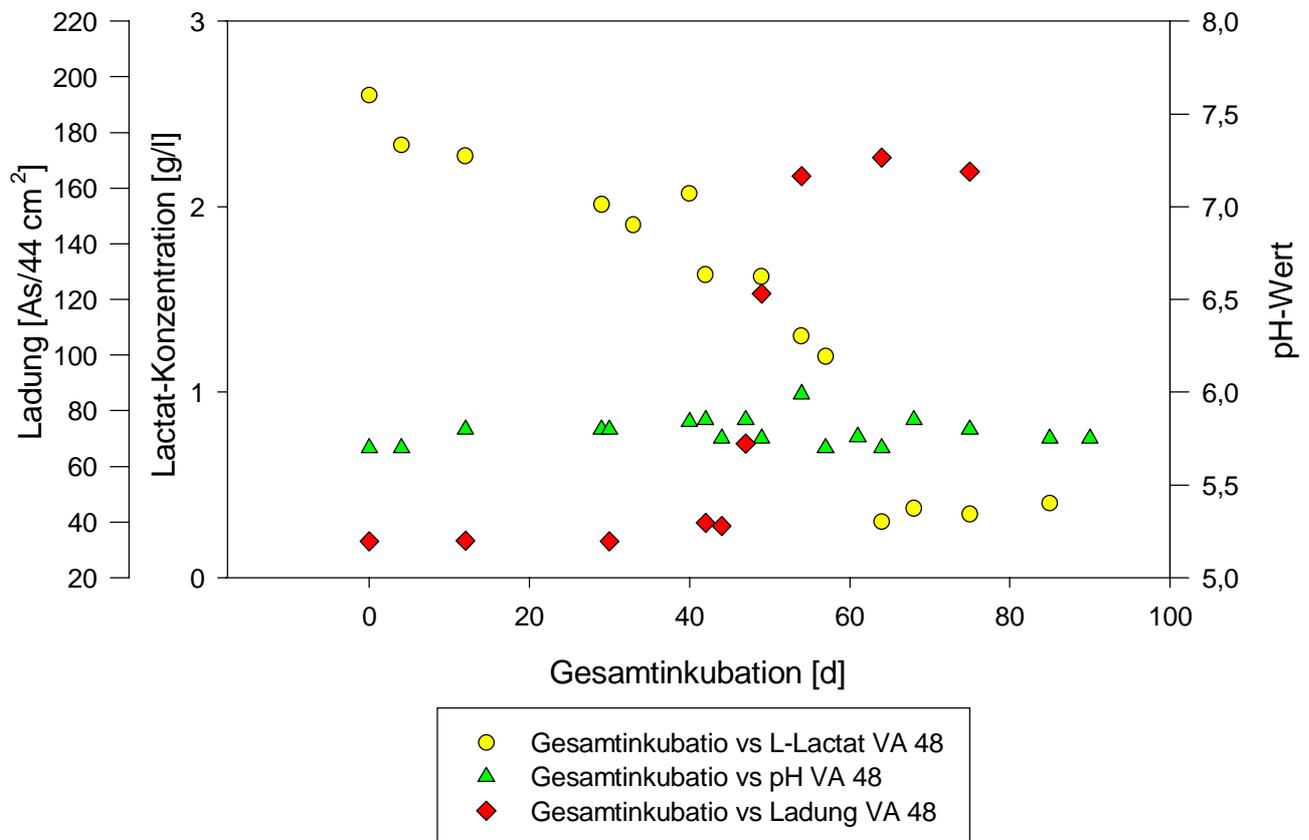


Abb. 16: Einfluß des Wachstums von *B. cepacia* in ETL und der pH-Regulierung mit D-/L-Lactat auf das Abscheideverhalten: Verlauf des pH-Werts, der L-Lactat-Konzentration und der Ladung (~ Schichtdicke) mit pH-Regulierung (VA 48)

Auch bei den Versuchsansätzen mit pH-Regulierung (Acetat-, Lactat-Dosierung, VA 48, 49) wurden starke Beschichtungsstörungen festgestellt, allerdings verlief das Einsetzen der Störungen langsamer (s. Abb. 16, VA 49 nicht dargestellt). Bei der Positivkontrolle (VA 50) mit Silbernitrat wuchsen keine Bakterien. Trotz der selben Materialalterung konnten bei diesem Ansatz keine wesentlichen Lackschäden beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigten, daß die Beschichtungsstörungen eindeutig durch den Stoffwechsel der wachsenden Zellen hervorgerufen wurden. Durch den Verlauf der Beschichtungsstörungen der Ansätze mit pH-Regulierung (VA 48, 49) wurde deutlich, daß nicht nur der pH-Anstieg, sondern auch der Verbrauch

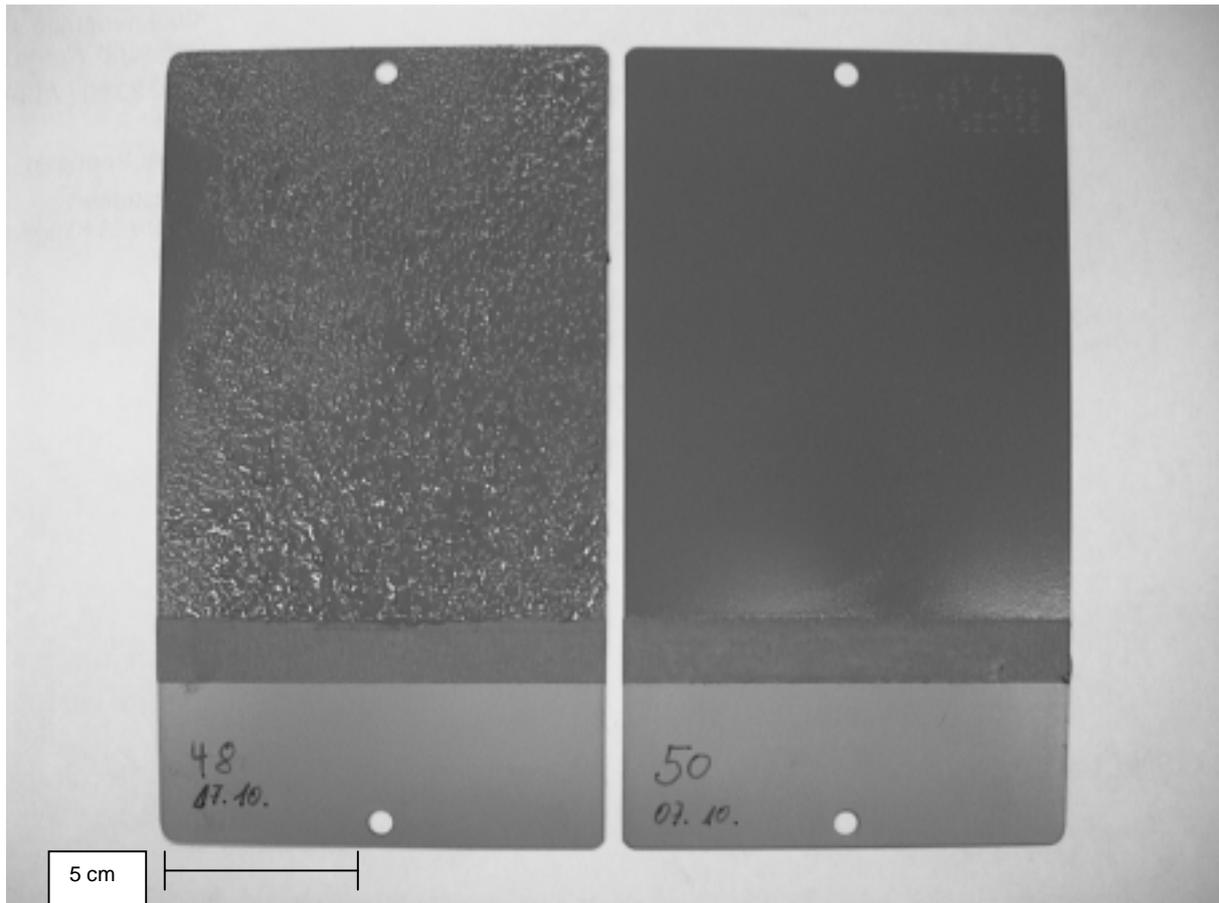


Abb. 17: Vergleich der abgeschiedenen Bleche mit pH-Regulierung (VA 48) und der Positivkontrolle (mit Silbernitrat, VA 50, kein Keimwachstum) nach dem Einbrennen

einiger anderer Badinhaltsstoffe die Lackschäden hervorrief. Die altersbedingten chemischen, bzw. physikalischen Veränderungen des Elektrotauchlacks hatten keinen wesentlichen Einfluß auf das Abscheideverhalten (VA 50). Auch das Nachdosieren der Neutralisationsmittel, bzw. die pH-Regulierung konnten die Beschichtungsstörungen nicht verhindern (s. Abb. 17, 18).

3.1.1.3 Einfluß der Stoffwechselprodukte

Wachstumsversuche in KTL-Material haben gezeigt, daß wachsende, stoffwechselnde Zellen von *B. cepacia* Beschichtungsstörungen hervorriefen (s. 3.1.1.2). Der folgende Versuch sollte zur Klärung dienen, ob nur der Verbrauch einiger Badinhaltsstoffe, oder ob auch das Ausscheiden von Stoffwechselprodukten für die beobachteten Lackierschäden verantwortlich ist (s. 2.6.1.3).

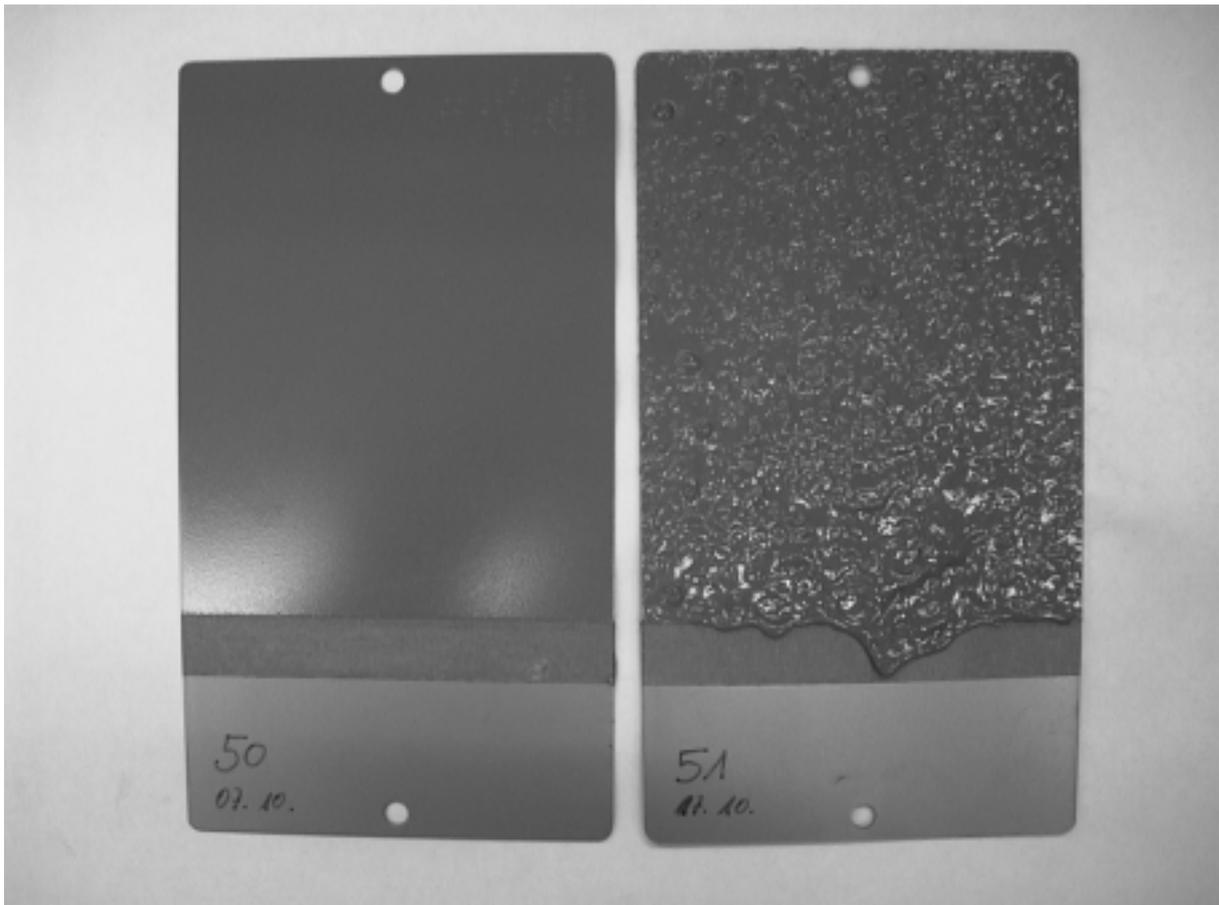


Abb. 18: Vergleich der abgeschiedenen Bleche ohne pH-Regulierung (VA 51) und der Positivkontrolle (mit Silbernitrat, VA 50, kein Keimwachstum) nach dem Einbrennen

Der Kulturüberstand von auf Minimalmedium (Lactat, Acetat als C-Quelle) gewachsenen *B. cepacia* rief deutliche Beschichtungsstörungen hervor (VA 260.1). Der TOC-Wert und der CSB-Wert betragen dabei jeweils ca. 1/5 der Ausgangswerte. Der CSB-Gehalt lag bei ca. 1300 mg/l, der TOC-Wert bei ca. 400 mg/l. Der CSB-Wert des unbewachsenen Mediums lag bei 6430 mg/l, der TOC-Gehalt betrug ca. 2160 mg/l. Im Gegensatz dazu wurden durch Zugabe des selben unbewachsenen Mediums kaum Lackschäden beobachtet (VA 260.2). Die Schichtdicke des Bleches, welches mit den Stoffwechselprodukten aus dem Lactat-, bzw. Acetat-Stoffwechsel abgeschieden wurde, betrug 43 μm , was einem Anstieg der Schichtdicke von über 115 % entspricht. Das Blech, das mit KT-Lack ohne Stoffwechselprodukte beschichtet wurde, hatte eine Schichtdicke von 23 μm . Dieser leichte Schichtdickenanstieg um 15 % und unwesentliche Pustelbildung wurde durch die im Minimalmedium enthaltenen Salze verursacht. Die beschriebenen Bleche sind in

Abbildung 19 dargestellt. Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, daß die beobachteten Beschichtungsstörungen u. a. durch Stoffwechselprodukte von *B. cepacia* bei Wachstum auf Lactat und Acetat hervorgerufen wurden.

3.1.2 Ursachen der Verkeimbarkeit des Elektrotauchlacks

3.1.2.1 Wachstumsversuch mit lebenden Zellen, bzw. Zellaufschluß von *Burkholderia cepacia* in KTL-Flüssigmedium und Zugabe einer leicht verwertbaren Kohlenstoffquelle

In frisch hergestellten Ansätzen von CG 400 (s. 2.6) konnten an Elektrotauchlack adaptierte Zellen von *B. cepacia* nicht überleben, bzw. zum Wachstum gebracht werden.

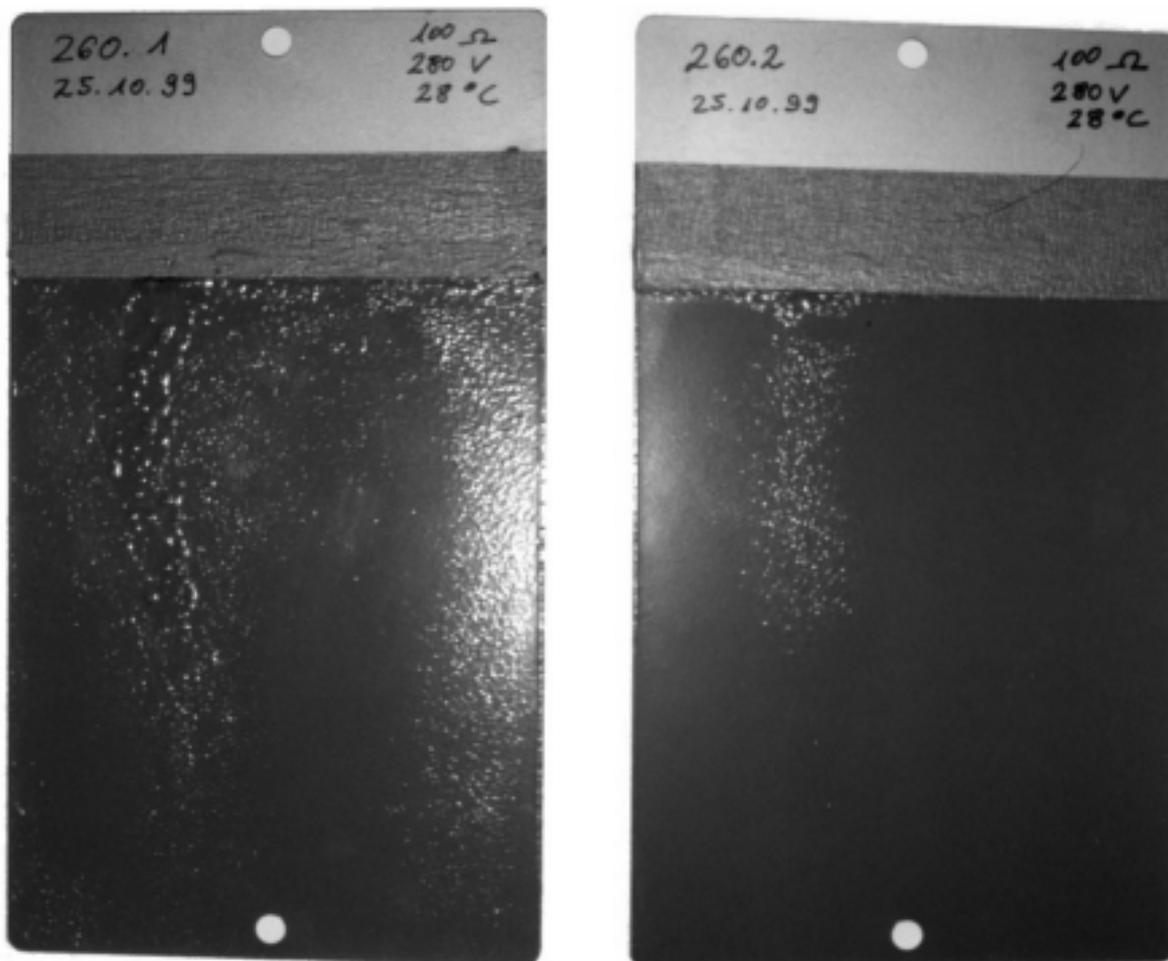


Abb. 19: Vergleich der Bleche 260.1, bzw. 260.2, die mit KTL mit (links), bzw. ohne Stoffwechselprodukte (rechts) von *B. cepacia* aus dem Lactat-, bzw. Acetat-Stoffwechsel beschichtet worden waren

Durch Zugabe der leicht verwertbaren C-Quelle Glucose in KTL-Flüssigmedium (s. 2.6.2.1) wurde überprüft, ob das Keimwachstum durch das anfängliche Fehlen einer Kohlenstoffquelle in der Lackieranlage limitiert wurde. Zusätzlich wurde bei diesem Versuch untersucht, ob durch das Vorhandensein abgestorbener, lysierter Biomasse Lackveränderungen auftreten, die an den Beschichtungsstörungen beteiligt sein könnten.

Bei den 1:4 verdünnten Versuchsansätzen, die mit lebenden Zellen beimpft worden waren (VA 20, 23, 24), konnte zwar ein Überleben der Mikroorganismen, aber kein Keimwachstum beobachtet werden. Dabei wurden sowohl Glucose, als auch das Neutralisationsmittel L-Lactat von den Zellen verwertet (s. Abb. 20). In den Kontrollen ohne Biomassezugabe (VA 21, 25) konnte keine Abnahme von Glucose, bzw. Milchsäure beobachtet werden. Da die Zellen sowohl mit als auch ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle überleben konnten, ist also nicht ein Fehlen der C-Quelle für das Absterben der Mikroorganismen im frischen Elektrotauchlack verantwortlich. In den 3 Ansätzen, in denen lebende Keime nachgewiesen werden konnten, bildeten sich starke Lack-Koagulierungen an der Innenseite der Schikanekolben. Außerdem war nach einer 15-tägigen Inkubationsdauer eine Koagulierung der verkeimten Proben, die zur Lebendkeimzahlbestimmung mit 0,85 % NaCl-Lösung versetzt wurden, zu beobachten. Das Überleben der Mikroorganismen hatte einen pH-Anstieg von 5,8 auf ca. 8,0 zur Folge, die Ansätze ohne lebende Bakterien blieben in ihrem pH-Wert konstant (pH-Werte nicht abgebildet).

Die Proben ohne lebende Mikroorganismen blieben homogene Suspensionen. Die verschiedenen Beobachtungen bei den Probenahmen sind in Tabelle 20 zusammengefaßt. Außer bei VA 20, 23 und 24 konnte weder MO-Wachstum, noch Koagulierung des KTL-Materials beobachtet werden. Auch durch Zugabe der aufgeschlossenen, inaktivierten Biomasse konnte kein Schadbild erzeugt werden. Das Wachstum der Mikroorganismen in der KTL-Anlage ist also nicht durch das anfängliche Fehlen einer Kohlenstoffquelle limitiert. Es kann davon ausgegangen werden, daß das Keimwachstum durch das Vorhandensein toxisch wirkender Substanzen unterbunden wird (s. auch 3.1.2.5, 3.1.2.6).

Tab. 20: Beobachtungen bei der Probenaufarbeitung (Versuchsansätze s. 2.6.2.1)

| Inkubation [d] | Beobachtungen: beim Ansetzen der Verdünnungsreihe in steriler 0,85 % NaCl an der Innenseite des Schikanekolbens (SK) Änderungen des pH-Werts |
|----------------|--|
| 0 | homogene Suspensionen bei allen Versuchsansätzen, keine Ablagerungen an Innenseite der Schikanekolben |
| 6 | homogene Suspensionen bei allen Versuchsansätzen, keine Ablagerungen an den Wänden der Schikanekolben |
| 15 | VA 20, 23 sofortige starke Koagulierung des KTL-Materials bei Verdünnung in 0,85 % NaCl-Lösung, klarer Überstand; an den Wänden der Schikanekolben starke Verkrustungen, Pusteln übrige VA: homogene Suspension bei Verdünnung, keine Ablagerungen an den Wänden der SK; VA 20 pH-Anstieg von 3,7 auf 7,5, kein Lactat mehr messbar |
| 22 | dito |

3.1.2.2 KTL-Alterung im Minicoater

Die chemisch-physikalischen Unterschiede zwischen frisch angesetzttem, nicht verkeimbarem und gealtertem, verkeimbarem KTL-Material, waren bisher noch nicht hinreichend geklärt. Um die Faktoren, welche die Verkeimbarkeit des Elektrotauchlacks begünstigen, näher zu bestimmen, wurde Lack ohne Silbernitrat (s. 2.6) in einer KTL-Anlage im Labormaßstab (Minicoater) reproduzierbar gealtert. Dabei wurde der Anolytkreislauf und die Ultrafiltrationseinheit mit einbezogen (s. 2.6.2.2) und die gemessenen Parameter vor und nach der Verkeimbarkeit des Elektrotauchlacks miteinander verglichen (s. Tab. 21). Nach 155 Tagen Umwälzung im Minicoater und ca. 190 Stunden Ultrafiltrierung des KTL-Materials konnte eine Verkeimbarkeit des Materials erreicht werden. Insgesamt wurden zum Verdunstungsausgleich ca. 300 l VE-Wasser dem Versuchsansatz zugeführt. Das VE-Wasser wurde in der Abteilung VWT der DaimlerChrysler AG auf mögliche Inhaltstoffe (TOC, Mineralsalze, Schwermetalle) untersucht, wobei alle gemessenen Parameter unter der Nachweisgrenze lagen und vernachlässigt werden können. In einem Parallelversuch (DaimlerChrysler Forschungszentrum, Ulm) konnte durch

alleiniges Rühren auf dem Heizrührer (30°C) in 8 Monaten keine Verkeimbarkeit erreicht werden. Der pH-Wert im Minicoater ist in Folge des Anolytkreislaufes von 5,85 auf 5,2 abgesunken. Der Lösemittelgehalt des verkeimbaren Materials ist im Vergleich zu dem nicht verkeimbaren stark reduziert und ist um insgesamt 75 % abgesunken (s. GC/MSD-Ausdruck, Abb. 21). Auffallend ist, daß die aromatischen Lösemittel Ethylbenzol und Xylol (Isomergemisch) nicht mehr im Lack enthalten waren. Diese Lösemittel erwiesen sich in den in Abschnitt 2.7.2 beschriebenen Hemmversuchen für *B. cepacia* als toxisch.

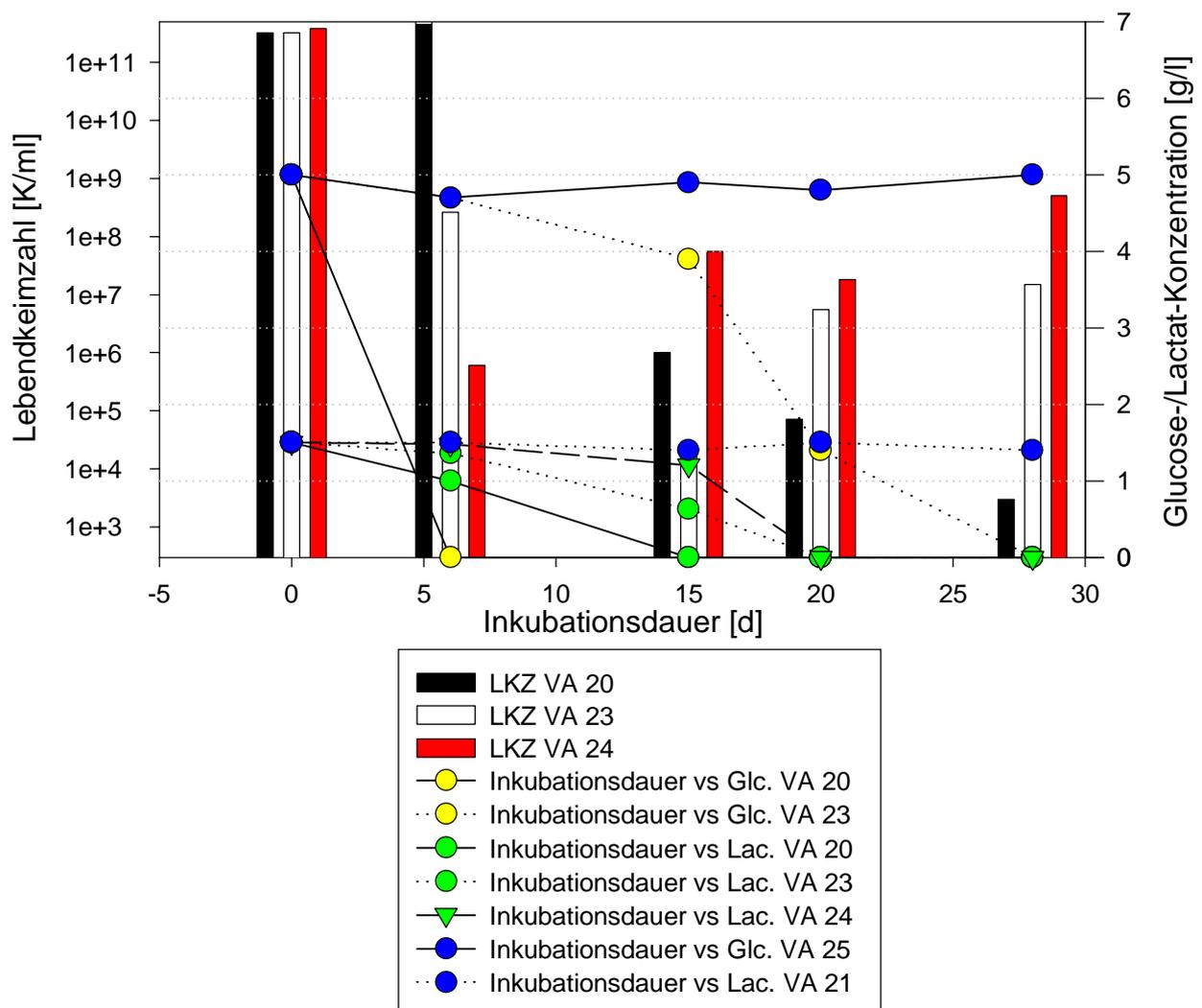


Abb. 20: Verlauf der Lebendkeimzahlen in verdünnten KTL-Medien mit, bzw. ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle im Schikanekolben (30°C, 100 rpm)

Auch war das anfänglich enthaltene iso-Butanol zum Zeitpunkt der Verkeimbarkeit nicht mehr im Lack nachweisbar. Das Absinken des Festkörpers und der damit verbundene Viskositätsverlust ist auf die Auswaschung bei der Spülung der Ultrafiltrationseinheit zurückzuführen. In den vor der Verkeimbarkeit wöchentlich entnommenen Lackproben (s. 2.6.2.2), konnten trotz regelmäßigem Nachimpfen mit *B. cepacia* keine lebenden Keime festgestellt werden. Da der Leitwert des Analyts mit D-/L-Lactat eingestellt wurde, stieg die D-Lactat-Konzentration von 0,2 auf ca. 2 g/l an. Die Verkeimung im Minicoater wurde ausschließlich durch die im VE-Wasser enthaltenen Keime verursacht, die wiederum mittels API 20 NE als *B. cepacia* identifiziert wurden. Nach einer 2 Wochen andauernden Verkeimung des im Minicoater gealterten Materials wurden Abscheideversuche durchgeführt. Dabei wurde ein Schichtdickenanstieg um 8 µm auf 27 µm und anfangende Beschichtungsstörungen (Pustelbildung) festgestellt (s. Tab. 21).

Tab. 21: Gemessene Parameter zur Ermittlung der Ursachen der Verkeimbarkeit im Minicoater mit Lack ohne Silbernitrat im Bindemittel

| VA 81, Minicoater | Ausgangsmaterial | Verkeimbare Material |
|-------------------------------------|--|--|
| pH-Wert | 5,85 | 5,2 |
| Acetat [g/l] | 0,95 | 0,065 |
| D-Lactat [g/l] | 0,2 | 2,03 |
| L-Lactat [g/l] | 3,88 | 2,83 |
| Festkörper, Trockenrückstand [%] | 19,51 | 10,55 |
| Asche, Glührückstand [%] | 5,1 | 1,53 |
| MEQ _{Säure} [mmol] | 30,5 | 46,8 |
| MEQ _{Base} [mmol] | 49,6 | 40,1 |
| Viskosität [mPas] | 3,23 | 2,5 |
| GC/MSD | Aromaten Ethylbenzol und Xylol enthalten; Iso-Butanol enthalten | Keine Aromaten (Ethylbenzol, Xylol) mehr enthalten; kein Iso-Butanol enthalten; insgesamt Abnahme des Lösemittelgehaltes um 75 % |
| Beschichtungsstörung | - | + |
| Ag ⁺ -Gehalt [mg/l] | - | - |

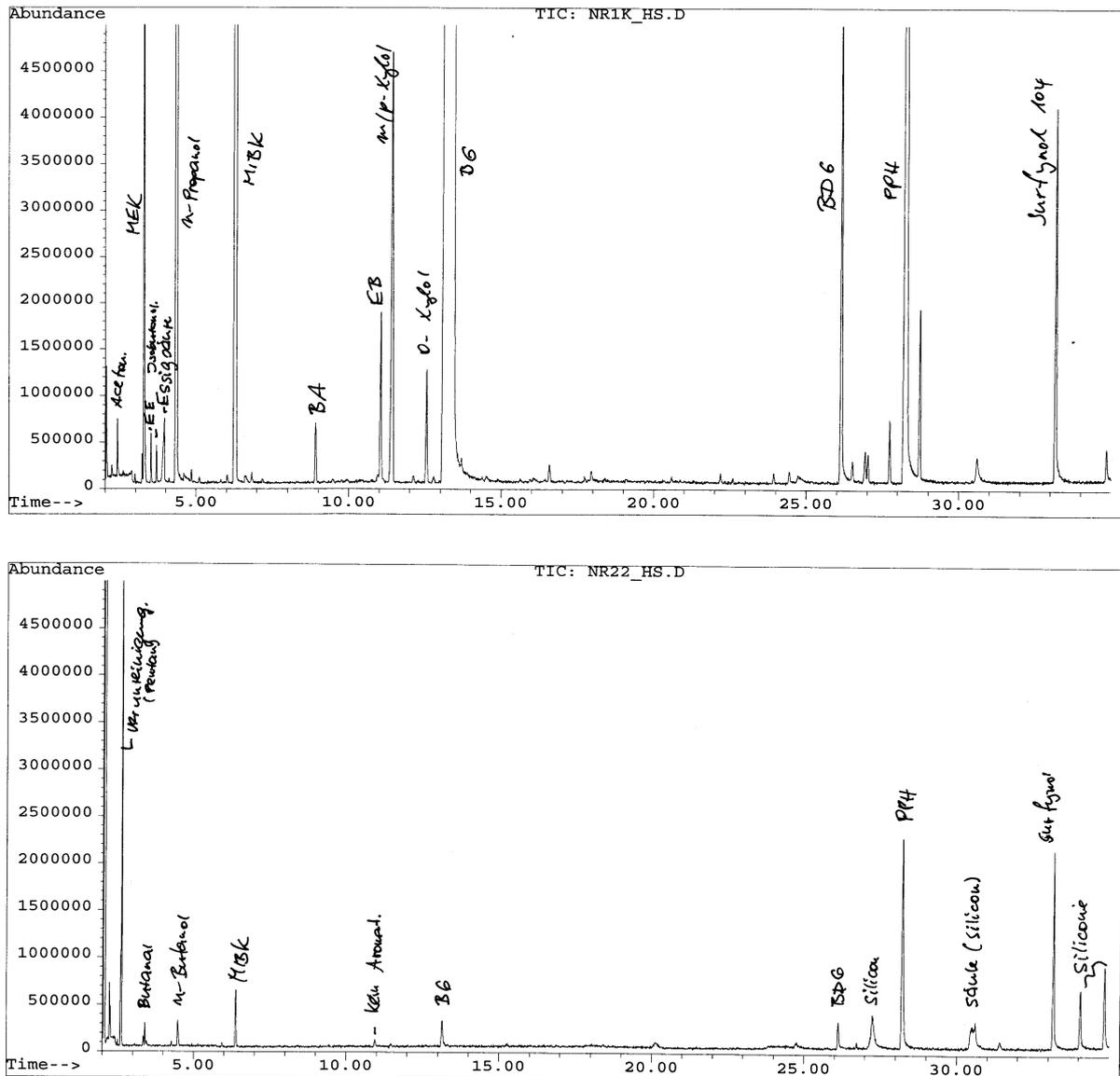


Abb. 21: Vergleich der GC/MSD-Ausdrucke von frischem, nicht verkeimbarem (oben) und gealtertem, verkeimbarem KTL-Material (unten) aus dem Minicoater

3.1.2.3 Verkeimung von Proben aus der KTL-Anlage Sindelfingen 34-I mit aus 34-II isolierten Mikroorganismen

Mitte Juni 1999 trat in der KTL-Anlage Sindelfingen 34-I eine starke Verkeimung durch *B. cepacia* im Tauchbecken und den Rezirkulationszonen auf, wogegen in Linie 2, trotz gleicher Fahrweise, keine lebenden Keime nachgewiesen werden konnten. Bei diesem Versuch sollte ermittelt werden, ob zwischen den beiden Linien chemische Unterschiede bestanden, welche die Verkeimung der Linie 1 förderten (s. 2.6.2.3), oder ob nur das geeignete Inokulum fehlte. Beim Vergleich von Proben der Linien 1

und 2 mittels GC/MSD konnten qualitativ keine Unterschiede im Lösemittelgehalt festgestellt werden. Auch quantitativ konnten bei den untersuchten Lösemitteln (Methylethylketon, iso-Butanol, n-Butanol, Methylisobutylketon, Ethylbenzol, Xylol und Butylglykol) keine wesentlichen Unterschiede gemessen werden, wobei die Bestimmung des Phenoxypropanolgehaltes nicht durchgeführt werden konnte (Aussage DaimlerChrysler Forschung, Ottobrunn). In keinem der angeimpften Versuchsansätze konnten lebende Zellen von *Burkholderia cepacia* gemessen werden. Daraus läßt sich schließen, daß die Proben der Linie 2 zum Zeitpunkt der Verkeimung der Linie 1 nicht verkeimbar waren, und eine oder mehrere bisher unbekannte toxische Substanzen enthielten.

3.1.2.4 Empfindlichkeit der aus Elektrotauchlack isolierten Mikroorganismen gegenüber Silberkationen

In KTL-Materialien, die zur Konservierung ab Werk Silbernitrat enthielten, traten in mehreren Werken der DaimlerChrysler AG trotz der Silberkationen immer wieder Mikroorganismen auf (s. 2.8). Dieser Versuch diente zur Überprüfung der tatsächlich vorhandenen Silberionenkonzentration in den KTL-Materialien. Dabei wurde einerseits kontrolliert, ob der Silbergehalt z. B. durch Ausfällungen mit Fremdionen (Chloride) erniedrigt und so eine Verkeimung begünstigt worden war. Andererseits wurde überprüft, ob die Mikroorganismen gegenüber den Silberkationen weniger empfindlich reagierten. Dies könnte die Folge einer allmählichen Adaptation der Keime durch eine ständig vorhandene, niedrige Ag^+ -Konzentration sein, die bis zur Resistenz der Bakterien führen kann. Tatsächlich wurden in allen gemessenen Proben etwa die erwarteten Silbergehalte wiedergefunden (s. Tab. 22). Das bedeutet, daß eine Verringerung der Empfindlichkeit der Mikroorganismen gegenüber den Silberkationen vorlag. Bei den aus den verkeimten Proben isolierten Keimen handelte es sich um *B. cepacia*.

3.1.2.5 Einfluß des KTL-Anteils im Ultrafiltrat auf die Verkeimbarkeit mit *Burkholderia cepacia*

Bei diesem Versuch wurde getestet, ob der Anteil des Elektrotauchlacks in Ultrafiltrat einen Einfluß auf die Verkeimbarkeit der Rezirkulationszonen hat. Durch die Ultrafiltration

gehen Lackbestandteile verloren, die sowohl toxisch auf die Keime wirken als auch von ihnen als C-Quelle genutzt werden könnten, so daß ein Wachstum in Ultrafiltrat durch eine Limitierung der Kohlenstoffquelle verhindert werden könnte. Andererseits könnte bei einem bestimmten Anteil an KT-Lack ein günstigeres Verhältnis zwischen den für *B. cepacia* toxischen Substanzen und verwertbaren Kohlenstoffquellen entstehen, welches ein Wachstum der Mikroorganismen ermöglicht. Bei den mit Ultrafiltrat und verschiedenen KTL-Anteilen erstellten Ansätzen (s. 2.6.2.5) konnte jedoch trotz mehrmaligem Animpfen mit *B. cepacia* kein Überleben der Bakterien festgestellt werden. Dies bekräftigt wiederum die Vermutung, daß das Keimwachstum durch das Vorhandensein von noch unbekanntem toxisch wirkenden Verbindungen verhindert werden könnte (s. auch 3.1.2.1, 3.1.2.3, 3.1.2.6) und der KTL-Anteil im Ultrafiltrat nicht alleine für die Verkeimbarkeit maßgeblich ist.

3.1.2.6 Verkeimung von Ultrafiltrat und Rezirkulat

In Ultrafiltrat verkeimter Anlagen konnten bisher nie lebende Mikroorganismen nachgewiesen werden. Um zu überprüfen, ob bisher noch nicht bekannte toxische Substanzen im Elektrotauchlack enthalten sind, wurden die in 2.6.2.6 beschriebenen Ansätze erstellt. Da durch die Verdünnung der Proben auch die Kohlenstoffquellen reduziert wurden, erfolgte eine Dosierung von Lactat als C-Quelle. Dabei konnten, unabhängig von der Lactat-Dosierung, nur in den verdünnten Versuchsansätzen (VA 314, 315, 320, 321, s. Tab. 23) nach 1 Tag Inkubationsdauer lebende Mikroorganismen nachgewiesen werden. In den unverdünnten Ansätzen konnten zunächst keine lebenden Keime festgestellt werden. Nach 30 Tagen Inkubation wurden in den Ultrafiltrat-Versuchsansätzen jedoch noch lebende Zellen nachgewiesen, auch in der unverdünnten Probe konnten noch 10 K/ml gemessen werden. In den ausgetrichenen Rezirkulat-Proben waren nach einer Versuchsdauer von 30 Tagen keine Bakterien mehr gewachsen. Dies weist wiederholt darauf hin, daß durch die Verdünnung einer oder mehrerer bisher unbekannter Substanzen ein Keimwachstum ermöglicht und dieses nicht durch das Fehlen einer C-Quelle limitiert ist (s. auch 3.1.2.1, 3.1.2.3, 3.1.2.5). Das Absterben der Zellen in der unverdünnten Rezirkulatprobe weist darauf hin, daß durch den enthaltenen KTL-Anteil ein Mikroorganismenwachstum beeinflusst wird (s. 3.1.2.5).

Tab. 22: Gemessene Silberkonzentrationen in mit *Burkholderia cepacia* verkeimten Proben verschiedener Werke

| Probenbezeichnung | verkeimt | Silbergehalt [mg/l] | |
|------------------------------------|----------|---------------------|----------|
| | | eingesetzt | gemessen |
| CG 400, Sindelfingen 34-II | - | 5 | 4,3 |
| MCC-KTL (CG 400, schwarz), Hamburg | + | 3 | 3,2 |
| KTL, Hamburg | + | 3 | 3,2 |
| Cathoprime, Neg. Kontrolle | - | 0 | 0 |

Tab. 23: Überleben der Zellen von *B. cepacia* in Ultrafiltrat- (UF) und Rezirkulat- (RZ) Proben (entnommen zum Zeitpunkt einer Verkeimung) mit, bzw. ohne Lactat-Dosierung bei verschiedenen Verdünnungen

| VA | Medium | Verdünnung | 5 g/l Lactat | Verkeimbar |
|-----|-----------------------------|------------|--------------|------------|
| 313 | UF, Werk Rastatt | 1:1 | - | (+) |
| 314 | UF, Werk Rastatt | 1:4 | - | + |
| 315 | UF, Werk Rastatt | 1:4 | + | + |
| 319 | RZ, Werk Sindelfingen 34-II | 1:1 | - | - |
| 320 | RZ, Werk Sindelfingen 34-II | 1:4 | - | + |
| 321 | RZ, Werk Sindelfingen 34-II | 1:4 | + | + |

3.2 Wachstums- und Hemmversuche in Reinkulturen

Um herauszufinden, welche im Elektrotauchlack enthaltenen Substanzen von *B. cepacia* verwertet werden können, bzw. einen hemmenden Einfluß auf die Mikroorganismen haben, wurden die mittels GC/MSD ermittelten Lösemittel getestet. Zusätzlich wurden laut Literatur für *B. cepacia* nicht verwertbare organische Säuren und verschiedene anorganische Säuren auf ihre Verwertbarkeit, bzw. Toxizität auf die Bakterien überprüft.

Tab. 24: Zusammensetzung der Vorversuch (s. 2.7.1) mit einer Reinkultur von *B. cepacia* in Minimalmedium und Butylglycol, bzw. Xylol als einziger Kohlenstoffquelle; rote Schrift = Zellen abgetötet

| VA | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 |
|---|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| LKZ_{Start} [K/ml] | 6,5*10 ⁹ | 6,5*10 ⁹ | 6,5*10 ⁹ | 6,5*10 ⁹ | 6,5*10 ⁹ | 6,5*10 ⁹ | 6,5*10 ⁹ |
| C | 7,6 mM | 30,5 mM | 76 mM | 041 µM | 81 µM | 81 mM | 56 mM |
| C-Quelle | 0,1 % Butylglycol | 0,4 % Butylglycol | 1 % Butylglycol | 0,005 % Xylol | 0,01 % Xylol | 0,1 % Xylol | 10 g/l Glucose |
| Inkubation [d] | Keimwachstum | | | | | | |
| 2 | +++ | - | - | ++++ | +++ | - | + |
| 3 | +++ | - | - | ++++ | +++ | - | + |
| 7 | - | - | - | ++++ | - | - | ++++ |

3.2.1 Wachstumsversuche im Minimalmedium

Bei diesen Versuchen wurde die Verwertbarkeit der genannten organischen Säuren (s. 2.7.1) und ihr Einfluß auf das Wachstum von *Burkholderia cepacia* geprüft. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen eingesetzt, um eine Substratüberschußhemmung zu vermeiden. Die Untersuchung der Substanzen ergab, daß keine der untersuchten Stoffe eine toxische Wirkung auf die Mikroorganismen hatte. Mit Itaconat (s. Abb. 22), Acetat und Maleat konnte sogar ein Wachstum der Keime beobachtet werden, wobei 5 g/l Itaconat eine Substratüberschußhemmung bewirkten. Mit 1 g/l Itaconat wurde eine OD₅₄₆ von ca. 1 erreicht, wogegen die Keime mit 5 g/l Substrat mit einer langen lag-Phase nur auf eine OD₅₄₆ von ca. 0,5 anwuchsen. Bei den übrigen getesteten Säuren (Na-Formiat, D-Tartrat, D-Mandelat, Na₂-Oxalat, Phthalat) konnte kein Wachstum festgestellt werden, wobei beispielhaft nur der Verlauf des Wachstumsversuchs mit Oxalat dargestellt ist (s. Abb. 23). Als Positivkontrolle wurde ein Ansatz mit 10 g/l D-/L-Lactat als C-Quelle, als Negativkontrolle beimpftes Minimalmedium ohne C-Quelle eingesetzt. Mit 10 g/l D-/L-Lactat wuchsen die Zellen auf eine OD₅₄₆ von ca. 9-10 an. *B. cepacia* ist in der Lage sowohl L-Lactat, als auch D-Lactat zu verwerten (s. Abb. 24, 25).

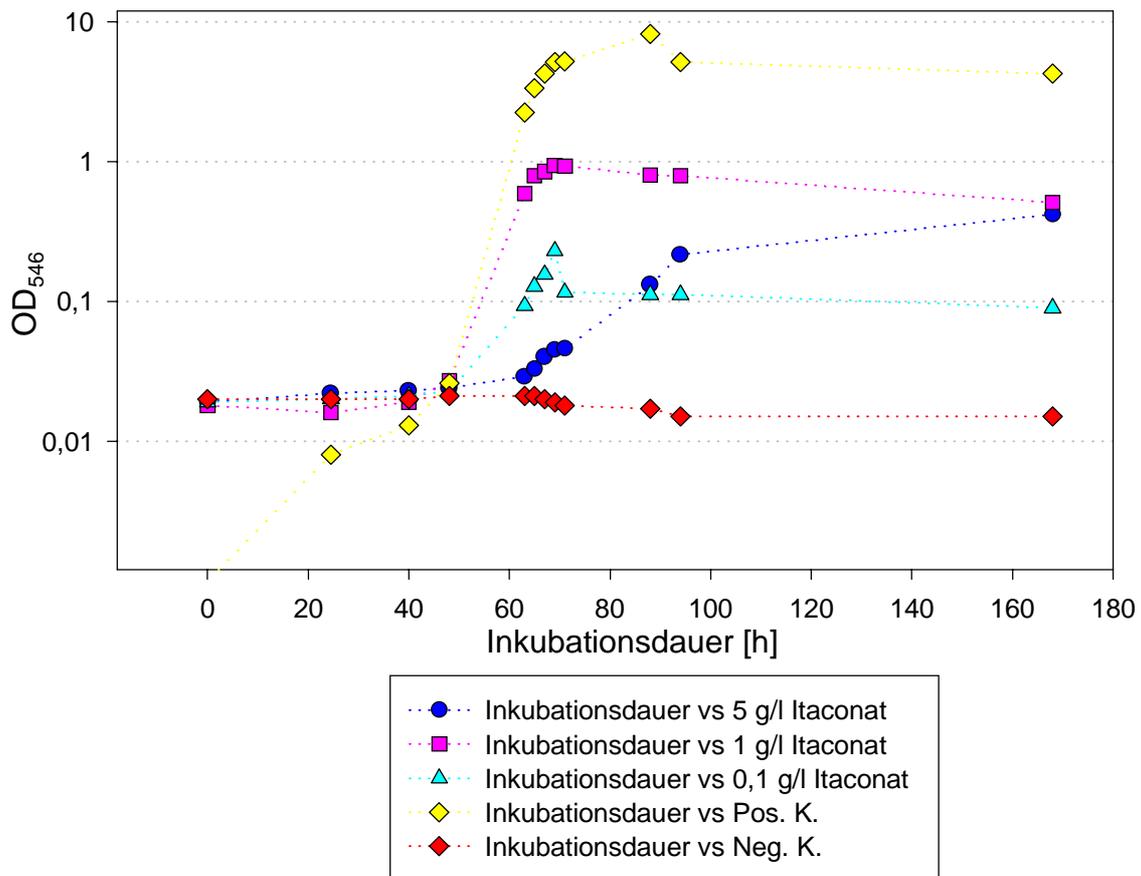


Abb. 22: Verlauf der Wachstumskurve von *B. cepacia* mit Itaconat als Substrat in Minimalmedium (30°C, 100 rpm) mit Substratüberschußhemmung

Durch eine getrennte Bereitstellung von Na-D-, bzw. Na-L-Lactat konnte gezeigt werden, daß in *B. cepacia* keine Racemase induziert wird. Beide Enantiomere wurden nach derselben lag-Phase, bzw. Induktionsphase abgebaut. Wurde D-Lactat als C-Quelle zur Verfügung gestellt, konnte keine Umsetzung zu L-Lactat beobachtet werden, und umgekehrt. Es ist also naheliegend, daß in Zellen sowohl die D-LDH, als auch die L-LDH konstitutiv vorhanden ist. Der Verlauf der Wachstumskurve von *B. cepacia* mit D-/L-Lactat als C-Quelle im Minimalmedium (Positivkontrolle) ist in Abbildung 26 dargestellt. Die Ergebnisse aller getesteten Substrate sind in Tabelle 25 zusammengefaßt, die der Vorversuche in Tabelle 24, wobei eine rote Beschriftung auf ein Abtöten der Zellen verweist.

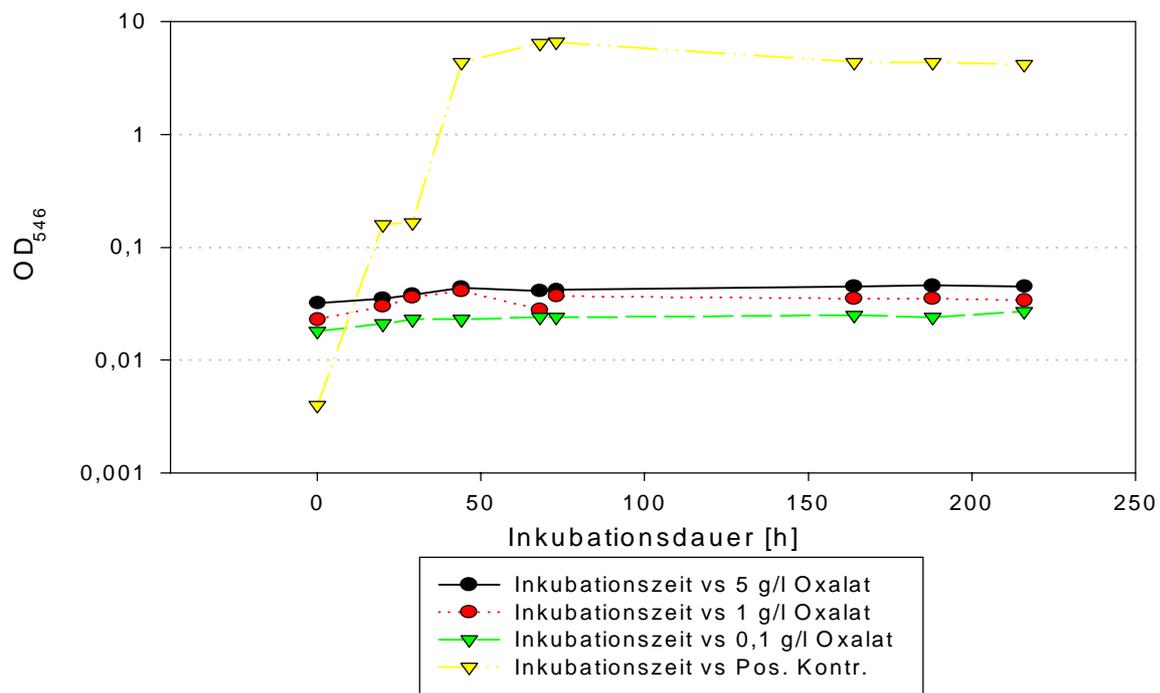


Abb. 23: Verlauf der Wachstumskurve von *B. cepacia* mit Oxalat als Substrat in Minimalmedium (30°C, 100 rpm)

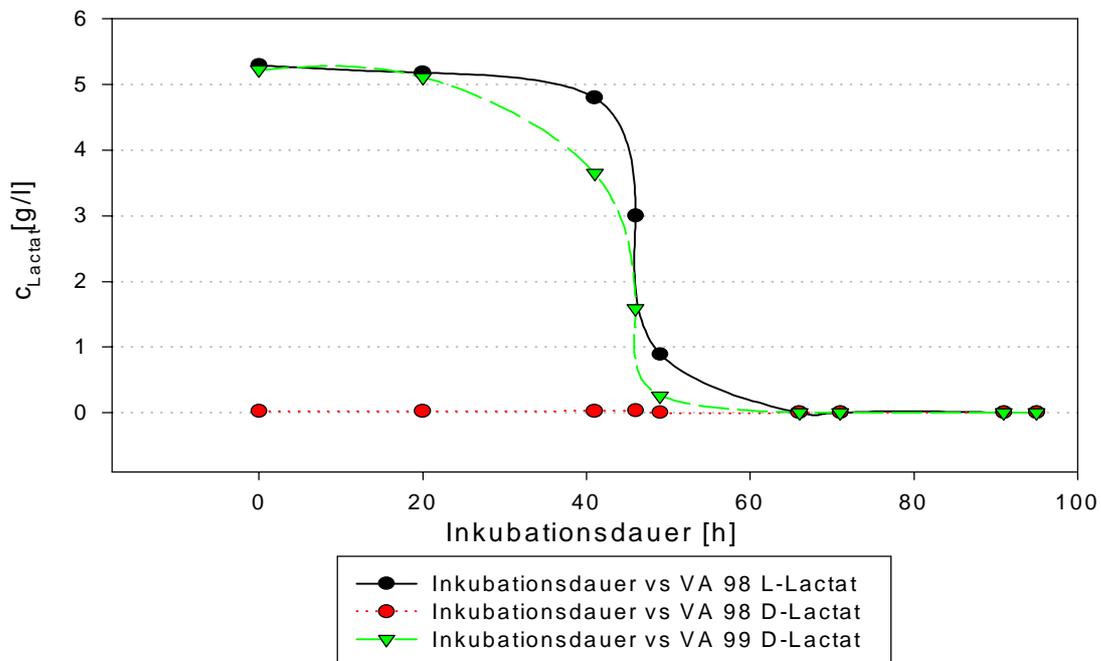


Abb. 24: Verlauf der Substratkonzentrationen von D-, bzw. L-Lactat mit einer Reinkultur von *B. cepacia* in Minimalmedium (30°, 100 rpm)

Tab. 25: Zusammensetzung der Versuchsansätze der Wachstumsversuche im Minimalmedium (200 ml im Schikanekolben) und verschiedenen organischen Säuren als C-Quelle (Inokulum 200 µl Zellsuspension (ZS) *B. cepacia* aus VA 51, Inkubation bei 32°C, 150 rpm), blau = Wachstum, lila = Substratüberschußhemmung

| VA | C-Quelle | c [g/l] | MO- Wachstum | MO- Überleben |
|-------------|-------------------------|------------|-----------------|------------------|
| 260.3 | Acetat | 5 | +++++ | + |
| 98 | Na-L-Lactat | 5 | +++++ | + |
| 99 | Na-D-Lactat | 5 | +++++ | + |
| 100 | Na-Formiat | 5 | - | + |
| 101 | dito. | 1 | - | + |
| 102 | dito | 0,1 | - | + |
| 103 | D-Tartrat | 5 | - | + |
| 104 | dito. | 1 | - | + |
| 105 | dito. | 0,1 | - | + |
| 106 | D-Mandelat | 5 | - | + |
| 107 | dito. | 1 | - | + |
| 108 | dito. | 0,1 | - | + |
| 109 | Itaconat | 5 | - | + |
| 110 | dito. | 1 | +++++ | + |
| 111 | dito. | 0,1 | ++ | + |
| 112 | Maleat | 5 | ++ | + |
| 113 | dito. | 1 | ++ | + |
| 114 | dito. | 0,1 | ++ | + |
| 115 | Na ₂ -Oxalat | 5 | - | + |
| 116 | dito. | 1 | - | + |
| 117 | dito. | 0,1 | - | + |
| 118 | Phthalat | 5 | - | + |
| 119 | dito. | 1 | - | + |
| 120 | dito. | 0,1 | - | + |
| 121 Pos. K. | D-/L-Lactat | 10 | +++++ | + |
| 122 Neg. K. | -- | -- | - | + |

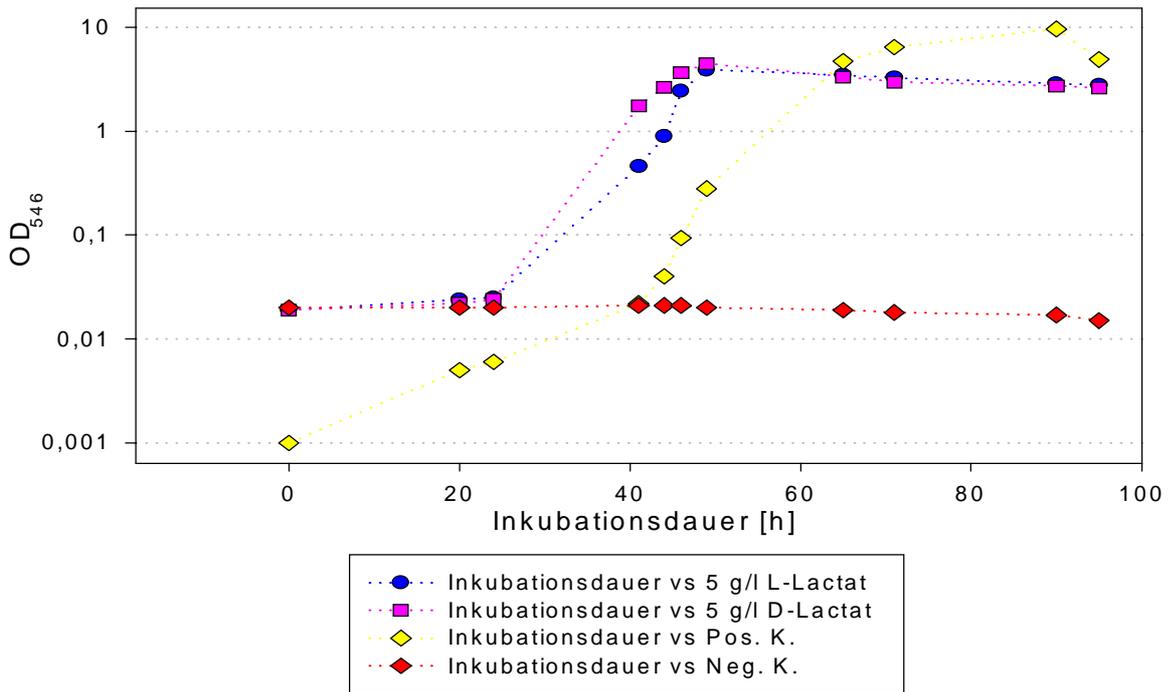


Abb. 25: Verlauf der Wachstumskurve von *B. cepacia* mit D-, bzw. L-Lactat als Substrat in Minimalmedium (30°, 100 rpm)

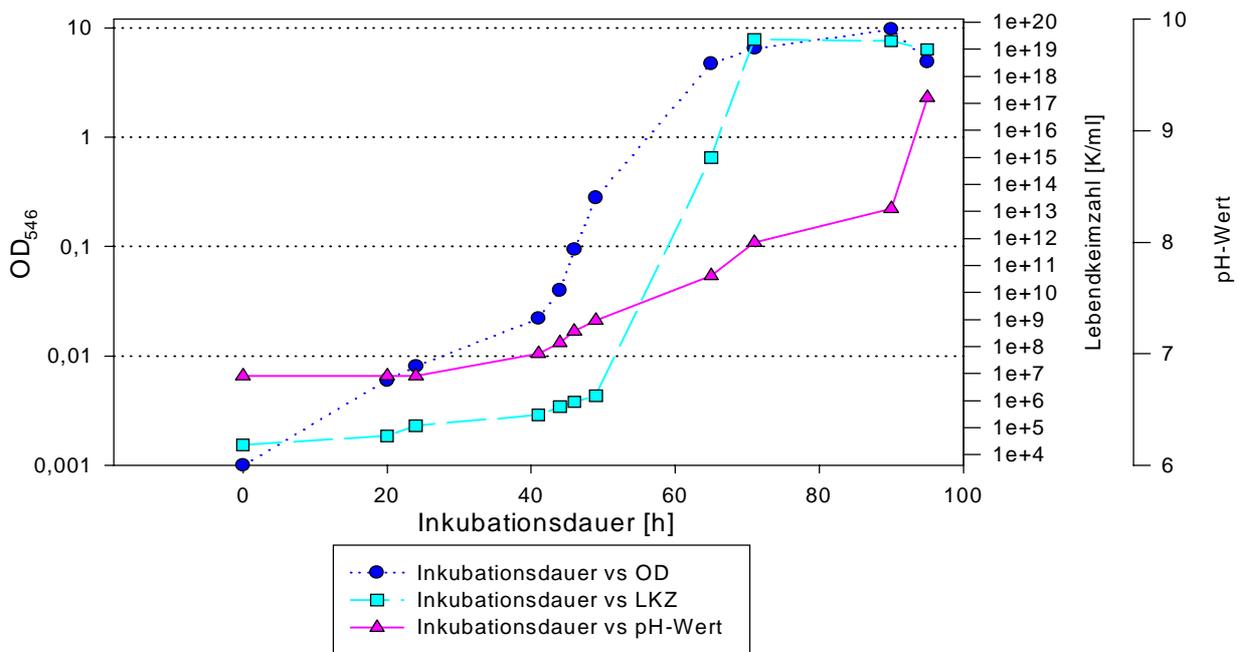


Abb. 26: Verlauf der Wachstumskurve von *B. cepacia* mit D-/L-Lactat als Substrat in Minimalmedium (30°, 100 rpm)

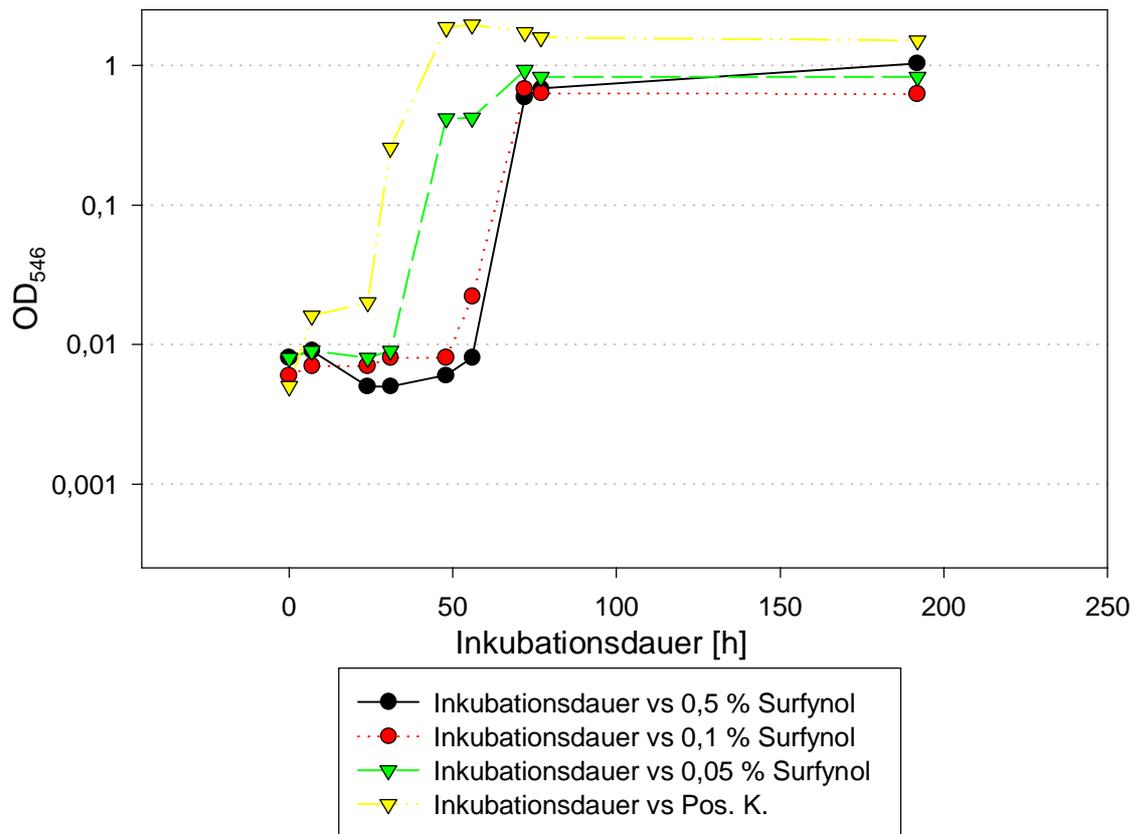


Abb. 27: Verlauf der Wachstumskurven von *B. cepacia* in Minimalmedium, mit D-/L-Lactat als C-Quelle und Surfynol als Hemmstoff

3.2.2 Hemmversuche im Minimalmedium mit D-/L-Lactat als C-Quelle und verschiedenen Lacklösemitteln

In diesem Versuch wurde die toxische Wirkung der in CG 400 enthaltenen und mittels GC/MSD ermittelten Lacklösemittel, sowie zweier anorganischer Säuren auf *Burkholderia cepacia* untersucht (s. 2.7.2). Als Positivkontrolle diente ein Ansatz mit 5 g/l D-/L-Lactat (ohne Hemmstoffzusatz), wobei durch das Keimwachstum eine OD₅₄₆ von ca. 1 erreicht wurde. Der vergleichsweise niedrige OD-Wert ist durch eine Sauerstofflimitierung zu erklären, da die Versuchsansätze gasdicht verschlossen waren und den Keimen nur eine begrenzte Menge O₂ zur Verfügung stand (s. 2.7.2). Mit den getesteten Konzentrationen der als Hemmstoff eingesetzten Lösemittel Butylglycol, n-Butanol, Isobutanol, Methylisobutylketon, Butyldiglycol, Surfynol, Methyläthylketon und den anorganischen Säuren Amidosulfon- (H₂NSO₃H), bzw.

Salpetersäure (HNO_3) wurde das Wachstum der Mikroorganismen nicht gehemmt (s. Abb. 27, 28; 29, die restlichen Abbildungen verlaufen entsprechend und sind nicht dargestellt). Bei einer Konzentration von 1 % Butylglycol wurden die Keime allerdings abgetötet und ab 0,4 % erreichte die OD_{546} nach einer längeren lag-Phase einen Wert von ca. 0,2. In den Konzentrationen, wie sie in der KTL-Anlage zu finden sind, erwiesen sich in Vorversuchen Ethylbenzol, Xylol (Isomerengemisch) und Phenoxypropanol (PPH) für *B. cepacia* als toxisch. Daraufhin wurden die genauen unteren Konzentrationsgrenzen ermittelt, die im Elektrotauchlack enthalten sein müssten, um eine Verkeimung des Lackmaterials zu unterbinden (s. Tab. 27). Diese Grenzen lagen für Ethylbenzol und Xylol bei 0,03 % und für Phenoxypropanol bei 0,3 % (jeweils 3-fach-Bestimmung, s. Abb. 30, 31, 32). Dabei erreichten die Mikroorganismen bei Anwesenheit von 0,2 % PPH nach einer langen lag-Phase noch eine OD_{546} von ca. 0,8. Die Ergebnisse aller getesteten Substanzen sind in Tabelle 26 zusammengefasst.

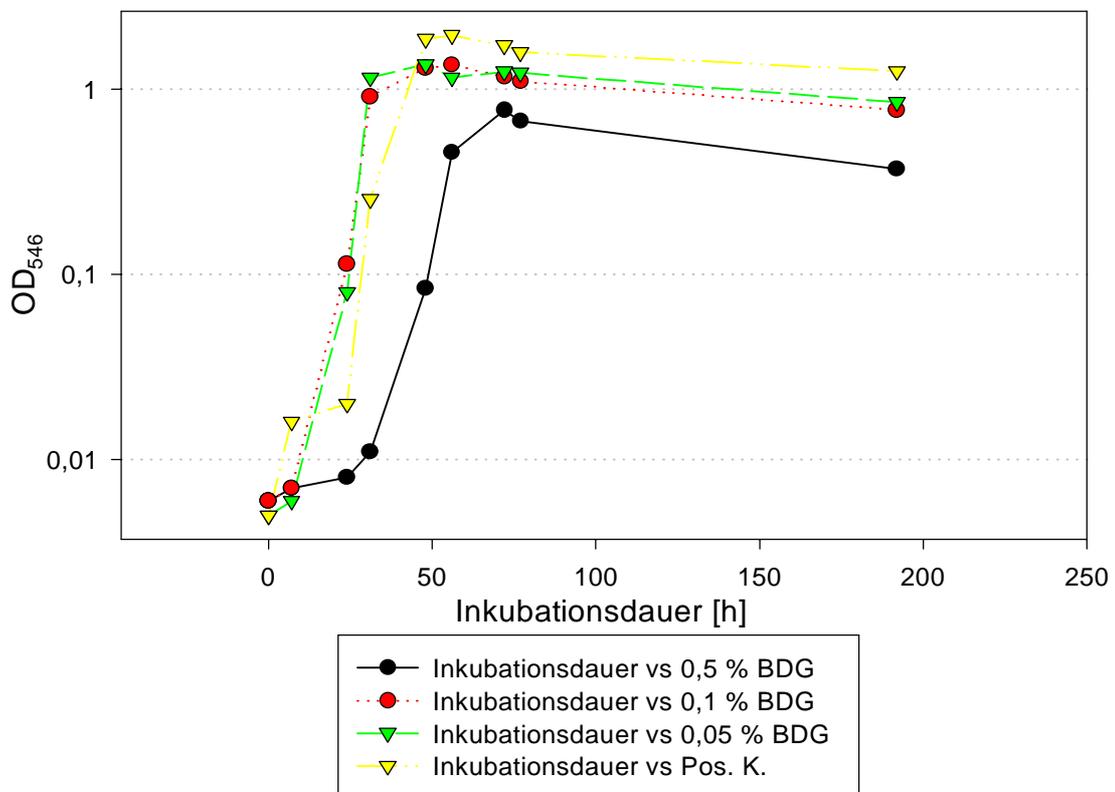


Abb. 28: Verlauf der Wachstumskurven von *B. cepacia* in Minimalmedium, mit D-/L-Lactat als C-Quelle und Butyldiglycol als Hemmstoff

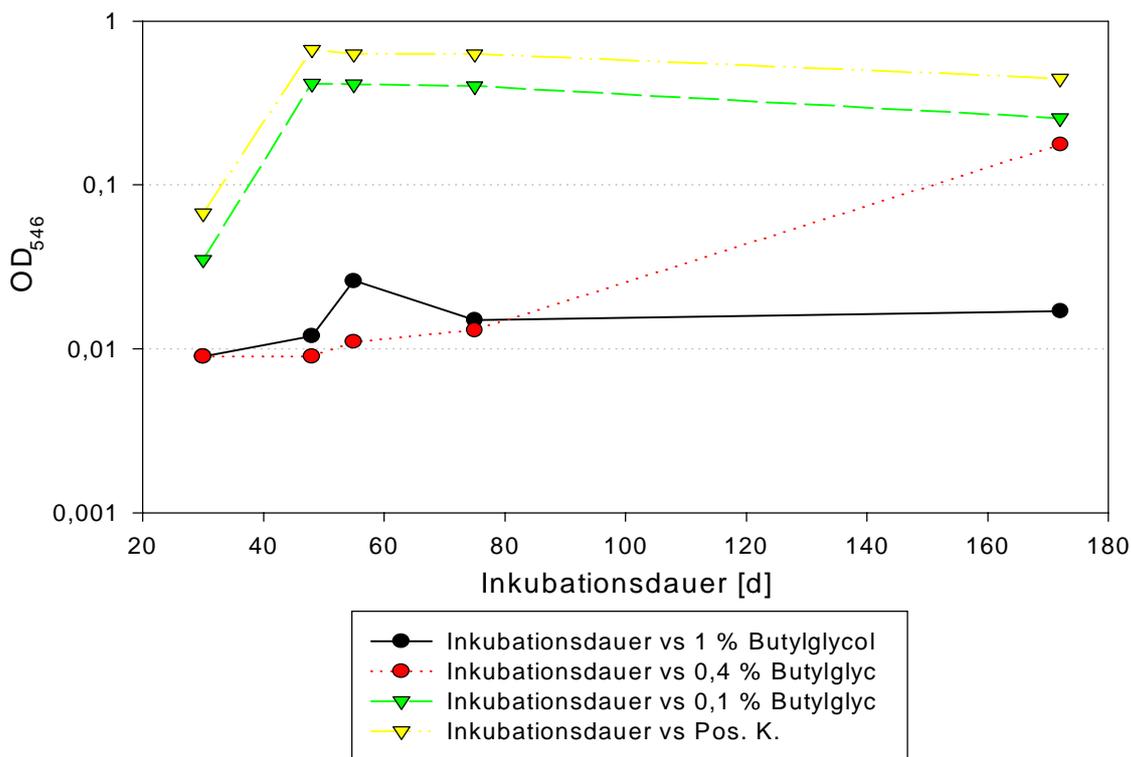


Abb. 29: Verlauf der Wachstumskurven von *B. cepacia* in Minimalmedium, mit D-/L-Lactat als C-Quelle und Butylglycol als Hemmstoff

Tab. 26: Zusammensetzung der Versuchsansätze der Hemmversuche im Minimalmedium mit D-/L-Lactat als C-Quelle (100 ml in Injektionsflaschen) und verschiedenen Lacklösemitteln und anorganischen Säuren als Hemmstoff; (Inokulum 200 µl ZS *B. cepacia*, Inkubation bei 32°C, 150 rpm auf dem Schüttler), rote Schrift = Zellen abgetötet, lila = Wachstum gehemmt

| VA | Hemmstoff | Anteil [%] | MO-Wachstum | MO-Überleben |
|-----|------------------------|------------|-------------|--------------|
| 121 | ohne Hemmstoff, Pos.K. | - | + | + |
| 124 | Butylglycol | 1 | - | - |
| 125 | dito. | 0,4 | gehemmt | + |
| 126 | dito. | 0,1 | + | + |
| 127 | Xylol | 0,1 | - | - |
| 128 | dito. | 0,01 | + | + |
| 129 | dito. | 0,005 | + | + |

Fortsetzung Tab. 26

| VA | Hemmstoff | Anteil [%] | MO-Wachstum | MO-Überleben |
|-----|---------------------|------------|-------------|--------------|
| 130 | n-Butanol | 0,1 | +++ | + |
| 131 | dito. | 0,01 | +++ | + |
| 132 | dito. | 0,005 | +++ | + |
| 133 | Isobutanol | 0,1 | +++ | + |
| 134 | dito. | 0,01 | +++ | + |
| 135 | dito. | 0,005 | +++ | + |
| 136 | Methylisobutylketon | 0,1 | ++ | + |
| 137 | dito. | 0,01 | +++ | + |
| 138 | dito. | 0,005 | +++ | + |
| 139 | Phenoxypropanol | 1 | - | - |
| 140 | dito. | 0,5 | - | - |
| 141 | dito. | 0,1 | - | + |
| 142 | Butyldiglycol | 0,5 | + | + |
| 143 | dito. | 0,1 | + | + |
| 144 | dito. | 0,05 | + | + |
| 145 | Ethylbenzol | 0,5 | - | - |
| 146 | dito. | 0,1 | - | - |
| 147 | dito. | 0,05 | - | - |
| 148 | Surfynol | 0,5 | + | + |
| 149 | dito. | 0,1 | + | + |
| 150 | dito. | 0,05 | + | + |
| 151 | Methylethylketon | 0,5 | + | + |
| 152 | dito. | 0,1 | + | + |
| 153 | dito. | 0,05 | + | + |
| 180 | HNO ₃ | 0,08 | + | + |
| 181 | Amidosulfonsäure | 3 | + | + |

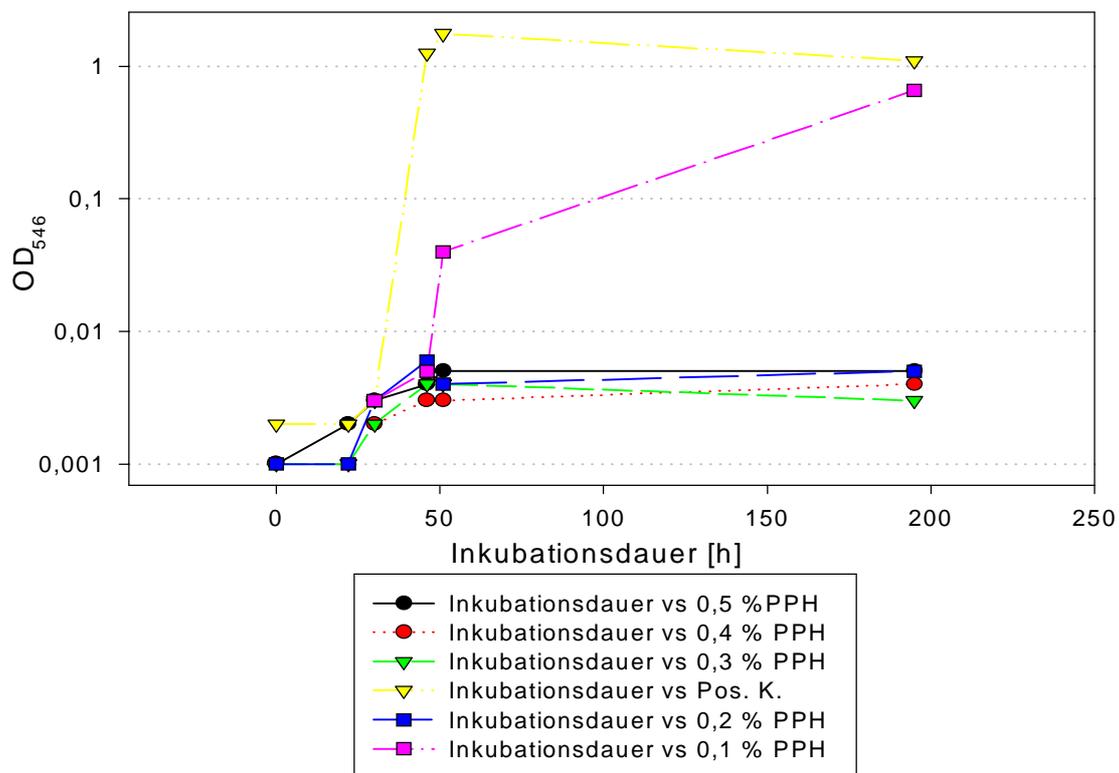


Abb. 30 : Verlauf der Wachstumskurven von *B. cepacia* in Minimalmedium, mit D-/L-Lactat als C-Quelle und Phenoxypropanol als Hemmstoff

Tab. 27: Ermittlung der toxischen Konzentrationen der Lacklösemittel Phenoxypropanol, Xylol-Isomerengemisch und Ethylbenzol in Minimalmedium mit D-/L-Lactat als C-Quelle (100 ml in Injektionsflaschen, Inokulum 200 μ l ZS *B. cepacia*, Inkubation bei 32°C, 150 rpm auf dem Schüttler), rote Schrift = Zellen abgetötet

| VA | Hemmstoff | Anteil [%] | MO-Wachstum | MO-Überleben |
|-----|-----------------------|------------|-------------|--------------|
| 139 | Phenoxypropanol | 1 | - | - |
| 140 | dito | 0,5 | - | - |
| 166 | dito | 0,4 | - | - |
| 167 | dito | 0,3 | - | - |
| 168 | dito | 0,2 | + | + |
| 169 | dito | 0,1 | + | + |
| 170 | Xylol Isomerengemisch | 0,1 | - | - |

Fortsetzung Tab. 27

| VA | Hemmstoff | Anteil [%] | MO-Wachstum | MO-Überleben |
|-----|-----------------------|------------|-------------|--------------|
| 171 | Xylol Isomerengemisch | 0,08 | - | - |
| 172 | dito | 0,06 | - | - |
| 173 | dito | 0,04 | - | - |
| 292 | dito | 0,03 | - | - |
| 293 | dito | 0,02 | + | + |
| 294 | dito | 0,01 | + | + |
| 129 | dito | 0,005 | + | + |
| 145 | Ethylbenzol | 0,5 | - | - |
| 146 | dito | 0,1 | - | - |
| 147 | dito | 0,05 | - | - |
| 295 | dito | 0,03 | - | - |
| 296 | dito | 0,02 | + | + |
| 297 | dito | 0,01 | + | + |

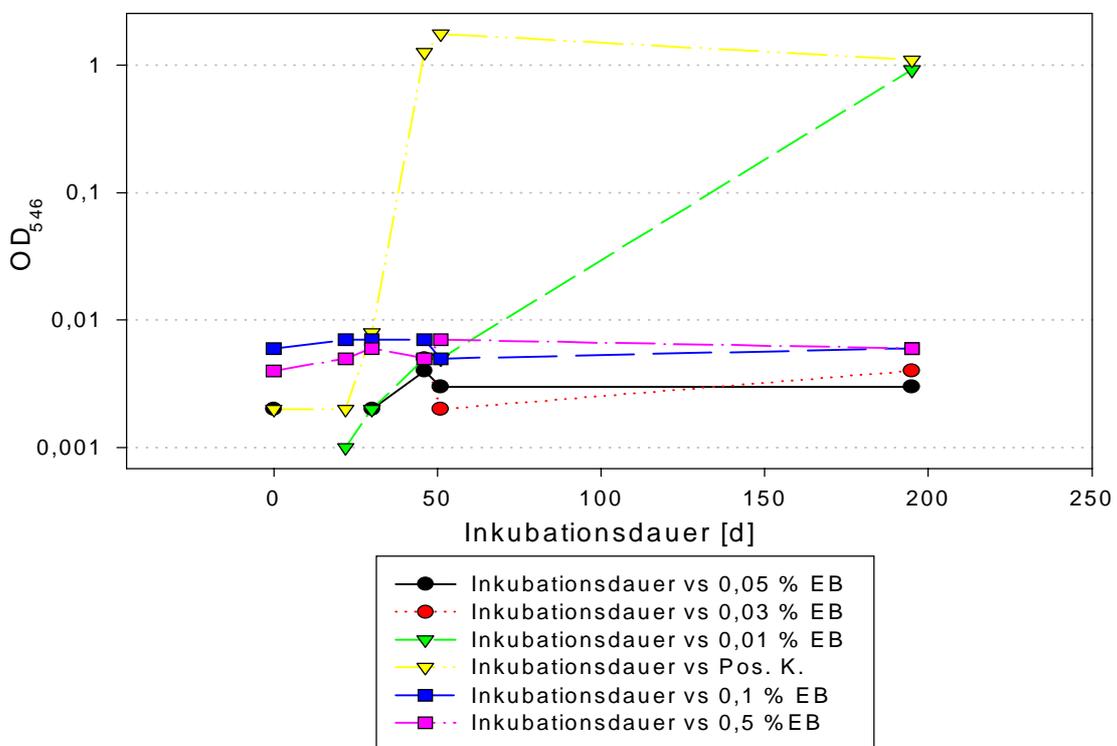


Abb. 31: Verlauf der Wachstumskurven von *B. cepacia* in Minimalmedium, D-/L-Lactat als C-Quelle und als Hemmstoff Ethylbenzol

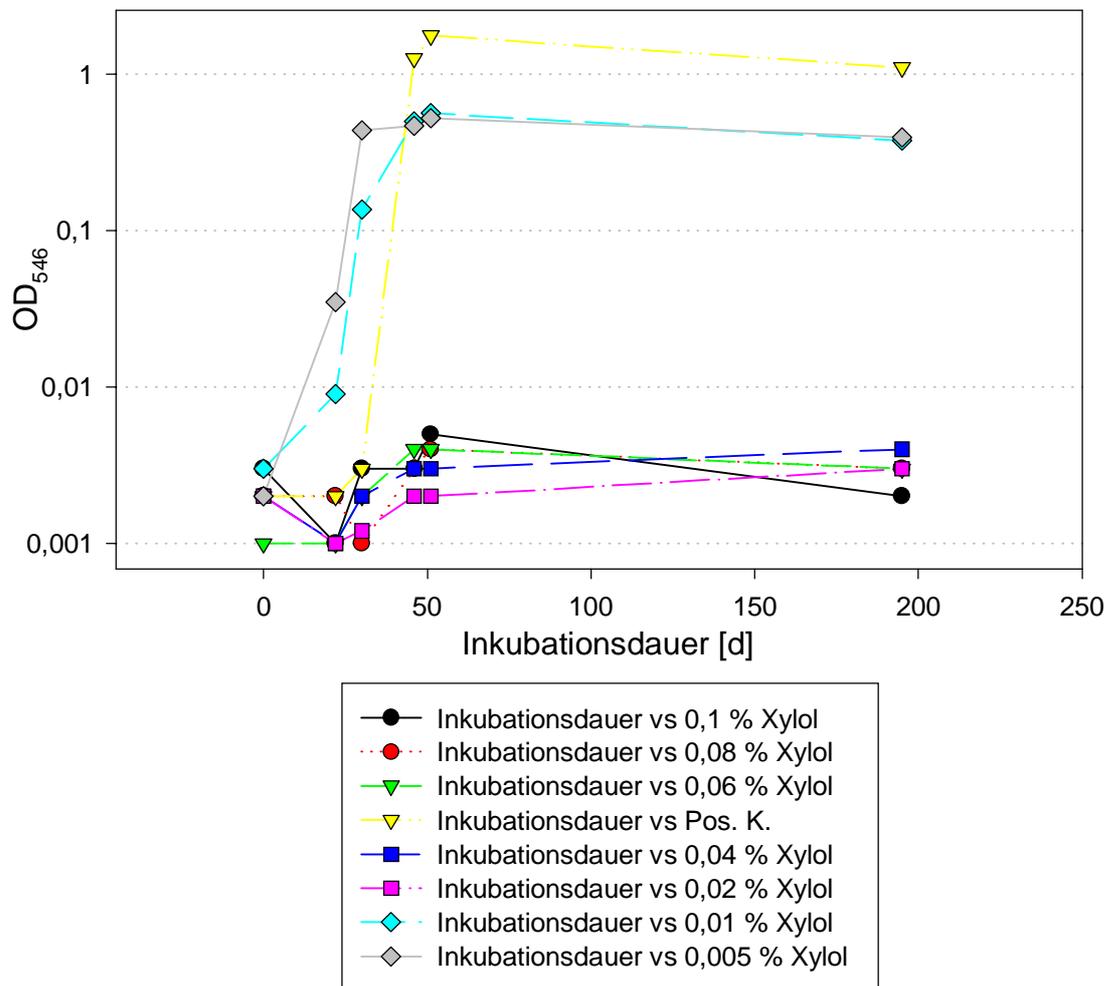


Abb. 32: Verlauf der Wachstumskurven von *B. cepacia* in Minimalmedium, mit D-/L-Lactat als C-Quelle und Xylol (Isomerengemisch) als Hemmstoff

3.2.3 Bestimmung der für *B. cepacia* toxischen Konzentration von Silbernitrat

Die Bestimmung der Hemmkonzentration von Silbernitrat erfolgte zum einen in Vollmedium mit *Burkholderia cepacia* in Reinkultur, zum anderen in mit diesen Bakterien verkeimtem Elektrotauchlack. Zusätzlich wurde die Empfindlichkeit gegenüber den Silberkationen zweier zu verschiedenen Zeitpunkten isolierten *B. cepacia* verglichen (s. 2.7.3). In der angeimpften HD-Boullion ohne AgNO_3 (Positivkontrolle) wuchsen die Zellen auf einen OD_{546} -Wert von ca. 10 an. Es stellte

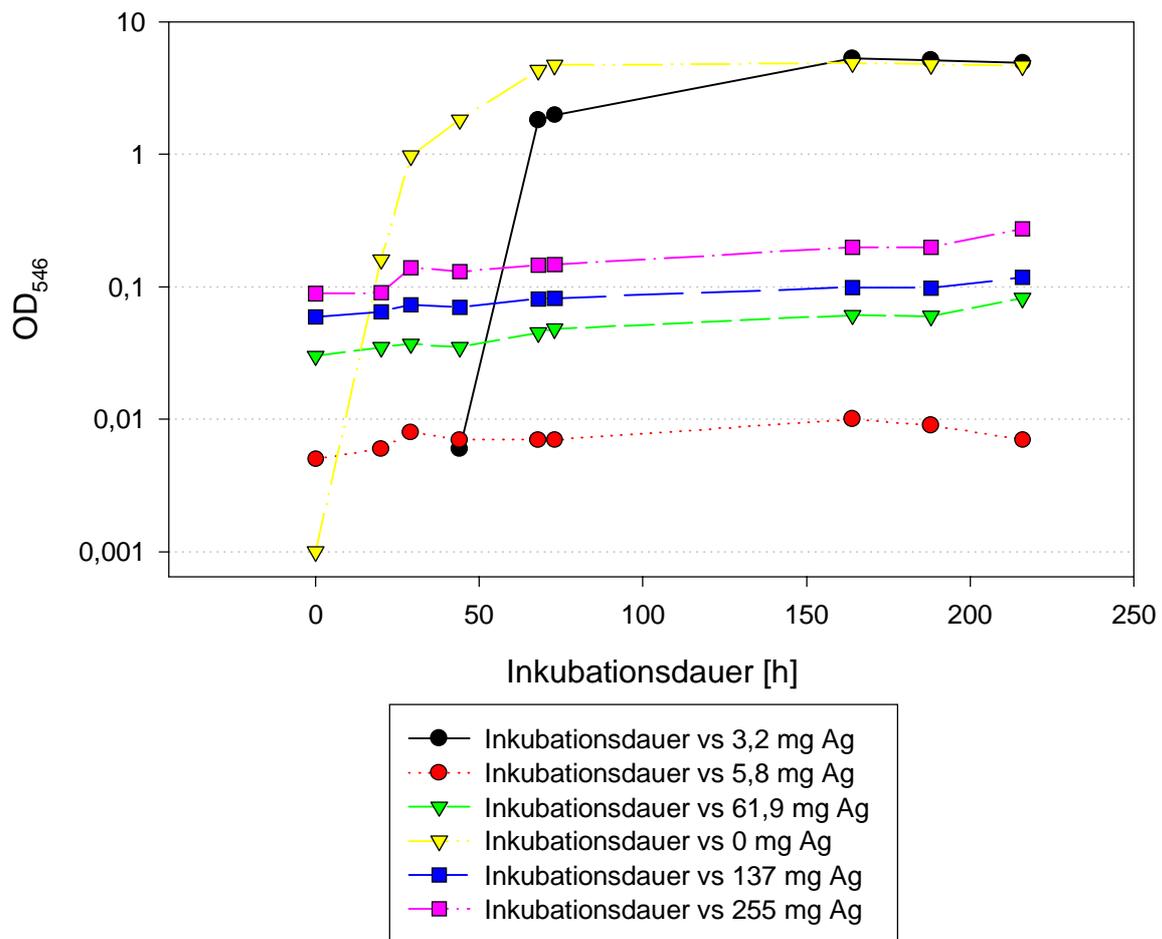


Abb. 33: Verlauf der Wachstumskurven von *B. cepacia* (1994 isoliert, VA 51) in HD-Boullion und Silbernitrat als Hemmstoff (Schikanekolben, 32 C, 150 rpm)

sich heraus, daß der 1992 aus KTL-Material isolierte Keim (aus VA 51) schon bei einem Silbergehalt von 6 ppm im Vollmedium abstarb (s. Abb. 33). Bei ca. 3 ppm Silberkationen wurde nach verlängerter lag-Phase eine OD₅₄₆ von ca. 4 erreicht. Auf den aus dem Minicoater stammenden Organismus (*B. cepacia*, 1999 isoliert) wirkte erst die ungefähr doppelte Ag⁺-Konzentration von ca. 12 ppm toxisch (s. Abb. 34). Im verkeimten Lack-Material genügte ein Silber-Gehalt von 5 ppm, um die Mikroorganismen unter die Nachweisgrenze abzutöten (s. Tab. 28). Je mehr Silbernitrat den Ansätzen zudosiert worden war, desto längere lag-Phasen waren zu beobachten (s. Abb. 34). Die Ergebnisse dieser Versuche zeigten, daß die Silbernitratkonzentration im ETL etwas unter der für *B. cepacia* toxischen

Konzentration liegt. Eine Erhöhung des Silberionengehaltes zur Konservierung des Elektrotauchlacks ist empfehlenswert, da die Empfindlichkeit der Mikroorganismen gegenüber Silber offensichtlich abgenommen hat. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 29 und 30 zusammengefaßt.

Tab. 28: Zusammensetzung der Versuchsansätze der Hemmversuche mit einer Reinkultur von *B. cepacia* in KTL-Material (VA 51) mit Silbernitrat; 200 ml im Schikanekolben, Inkubation bei 32°C, 150 rpm auf dem Schüttler, rote Schrift = Zellen abgetötet

| VA | 88 | 89 | 90 |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| AV [ml] | 200 | 200 | 200 |
| Medium | KTL VA 51 | KTL VA 51 | KTL VA 51 |
| Start _{LKZ} [K/ml] | 1*10 ⁶ | 1*10 ⁶ | 1*10 ⁶ |
| c _{Ag+} [mg/l] | 5 | 10 | 100 |
| [mg/l] AgNO ₃ | 8 | 16 | 160 |
| Inkubation [d] | Keimwachstum | | |
| 1 | - | - | - |
| 2 | - | - | - |
| 3 | - | - | - |
| 4 | - | - | - |

Tab. 29: Zusammensetzung der Versuchsansätze der Hemmversuche mit Silbernitrat in Minimalmedium mit D-/L-Lactat als C-Quelle, bzw. in HD-Boullion (200 ml im Schikanekolben, Inokulum 200 µl ZS *B. cepacia* aus VA 51, Inkubation bei 32°C, 150 rpm auf dem Schüttler, rote Schrift = Zellen abgetötet

| VA | Hemmstoff | c _{Ag+} [mg/l] gemessen | c _{Ag+} [mg/l] Einwaage | MO-Überleben |
|-----|--------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------|
| 187 | Silbernitrat | 3,2 | 5 | + |
| 188 | dito | 5,8 | 10 | - |
| 189 | dito | 61,9 | 100 | - |
| 190 | dito | 137 | 200 | - |
| 191 | dito | 255 | 400 | - |
| 192 | --- | --- | --- | + |

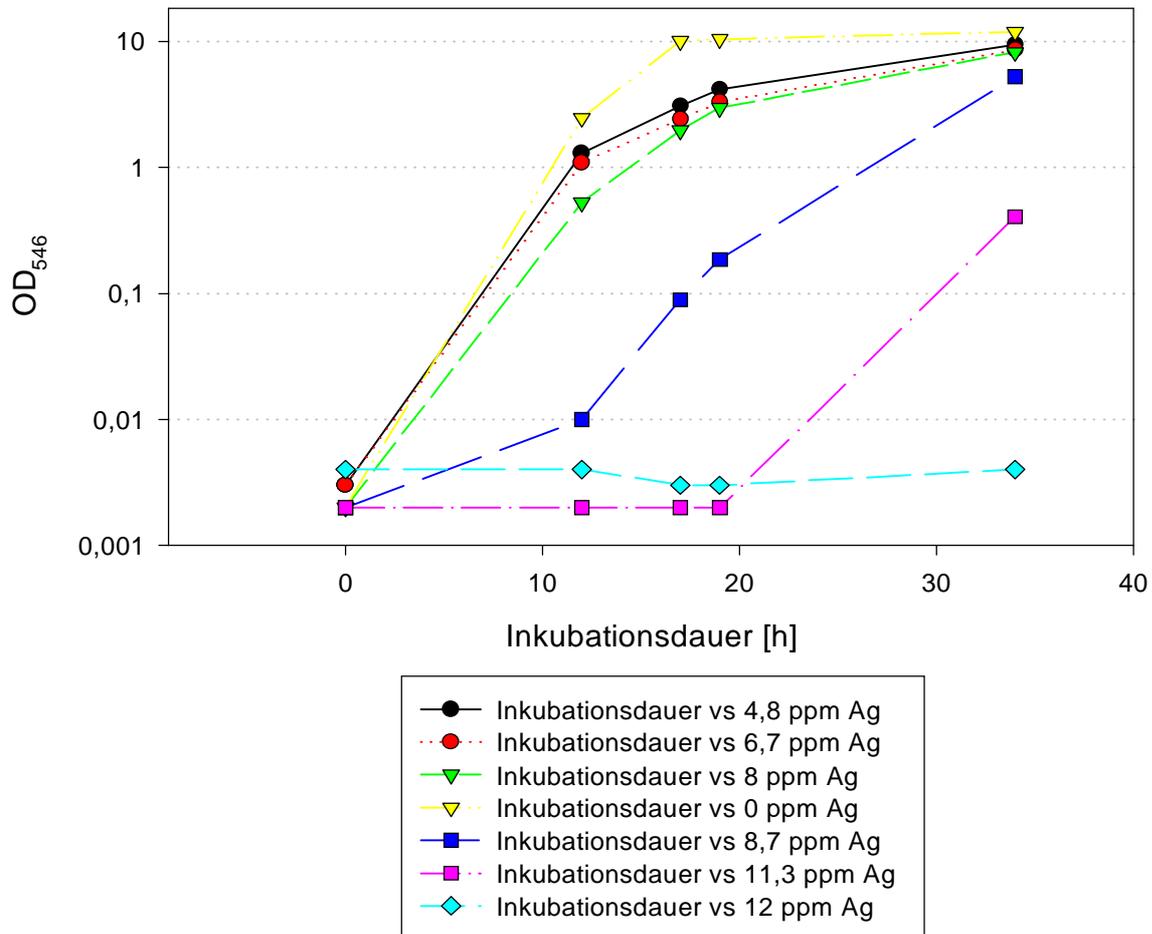


Abb. 34: Verlauf des Keimwachstums einer Reinkultur von aus dem Minicoater isolierten *B. cepacia* in HD-Boullion und Silbernitrat als Hemmstoff (Schikanekolben, 32°C, 150 rpm)

3.2.4 Bestimmung der für *B. cepacia* toxischen Konzentration von Isothiazolinon

Dieser Versuch wurde mit 2 verschiedenen Isolaten (*Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*) in Minimalmedium (MM), bzw. in verkeimtem KTL-Material durchgeführt (s. 2.7.4). Das Biozid Chemfil, welches als Wirksubstanz Isothiazolinon enthält, wird neben Silbernitrat unter anderem bei KTL-Material zur Konservierung eingesetzt. Trotz gelegentlicher Stoßdesinfizierung mit diesem Biozid traten in verschiedenen Werken immer wieder Verkeimungen des Elektrotauchlacks in Lackieranlagen auf.

Tab. 30: Zusammensetzung der Versuchsansätze der Hemmsversuche mit Silbernitrat in HD-Boullion; 200 ml im Schikanekolben, Inokulum 200 µl ZS *B. cepacia* (aus Minicoater), Inkubation bei 32°C, 150 rpm auf dem Schüttler, rote Schrift = Zellen abgetötet

| VA | Hemmstoff Silbernitrat c _{Ag+} [mg/l] | | MO-Überleben |
|-----|--|----------|--------------|
| | gemessen | Einwaage | |
| 261 | 0 | 0 | + |
| 262 | 4,8 | 5 | + |
| 263 | 6,7 | 6 | + |
| 264 | 8,0 | 7 | + |
| 265 | 8,7 | 8 | + |
| 266 | 11,3 | 9 | + |
| 267 | 12 | 10 | - |
| 189 | 61,9 | 100 | - |
| 190 | 137 | 200 | - |
| 191 | 255 | 400 | - |
| 192 | --- | --- | + |

In diesem Versuch wurden *B. cepacia* (aus dem Minicoater isoliert, s. 3.1.2.2) und *P. fluorescens* (isoliert aus der KTL-Anlage Sindelfingen 34-II, Dezember 1999) hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber „Chemfil“ untersucht und miteinander verglichen. Auch wurde die Wirksamkeit des Isothiazolinons in bereits verkeimtem KTL-Material ermittelt. In der Positivkontrolle ohne Hemmstoff erreichten die Mikroorganismen im Minimalmedium mit 5 g/l D-/L-Lactat eine OD₅₄₆ von ca. 5. Dabei wurde festgestellt, daß *B. cepacia* in Minimalmedium wesentlich empfindlicher auf geringe Konzentrationen des Isothiazolinons reagierte als *P. fluorescens* (s. Tab. 32). Für *B. cepacia* war bei einem Chemfil-Gehalt von 14,5 ppm (entspricht 0,174 ppm Wirkstoff) ein Absterben der Bakterien zu beobachten, wogegen *P. fluorescens* selbst bei Anwesenheit von 18,33 ppm Chemfil (entspricht 0,220 ppm Wirksubstanz) nach ca. 50 stündiger lag-Phase noch auf einen OD₅₄₆-Wert von ca. 4-5 anwuchs (s. Abb. 35).

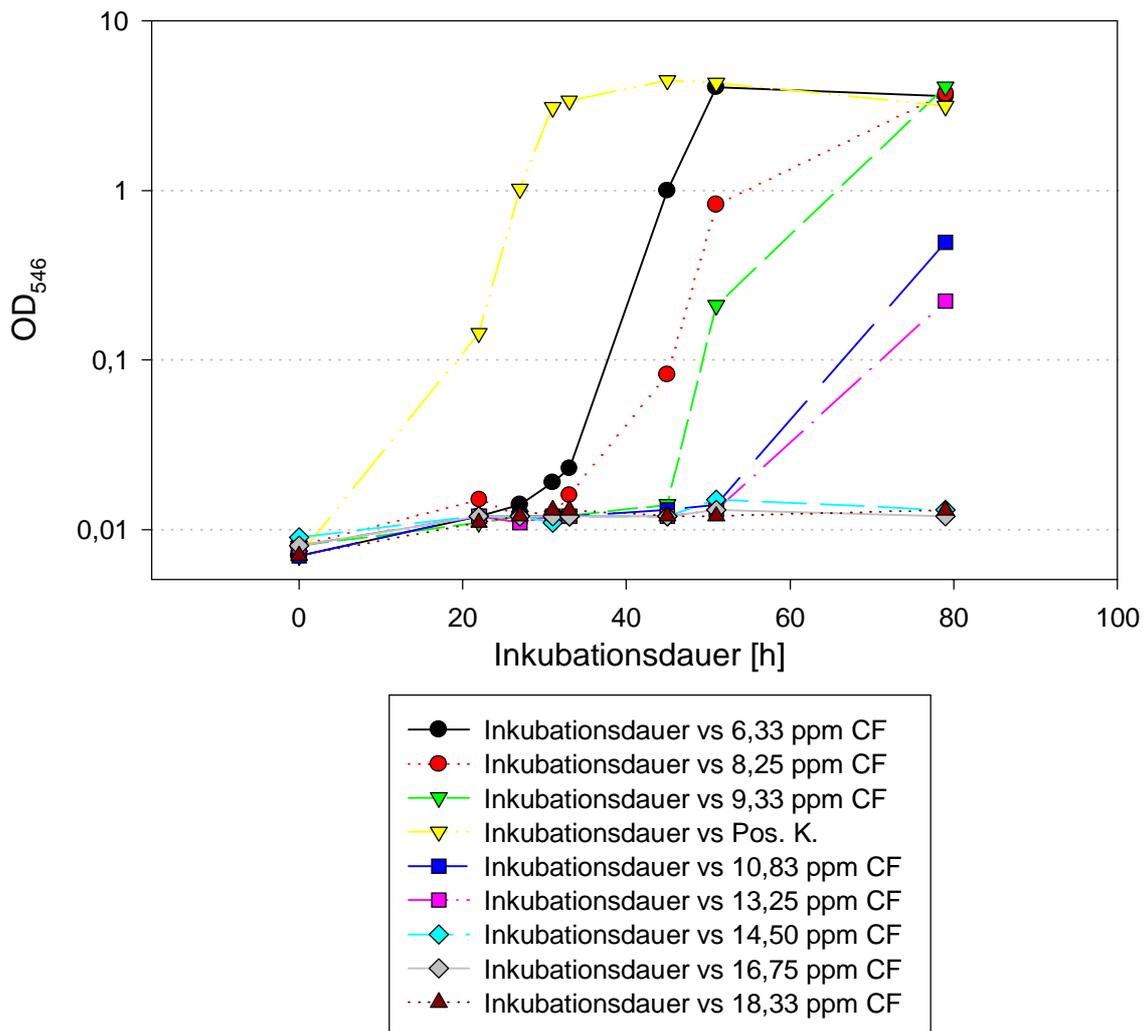


Abb. 35: Verlauf der Wachstumskurven von *B. cepacia* (aus Minicoater isoliert) in Minimalmedium (30°C, 100 rpm), mit D-/L-Lactat als C-Quelle und verschiedenen Konzentrationen von Chemfil (CF)

Nach einer Anlaufphase von ca. 27 Stunden wuchs *B. cepacia* bei ca. 6 ppm Chemfil auf einen OD_{546} -Wert von ungefähr 8 an. Bei 8,25, bzw. 9,33 ppm war eine lag-Phase von 30, bzw. 42 Stunden notwendig, um diesen Wert zu erreichen. Bei Chemfil-Konzentrationen von 10,8 und 13,25 war nach ca. 50 Stunden lag-Phase noch ein Anwachsen der Bakterien auf eine OD_{546} von 0,8, bzw. 0,5 zu messen (s. Abb. 36). Bei Konzentrationen über 0,001 % Chemfil wurde kein Überleben dieser Mikroorganismen mehr festgestellt (ohne Abbildung, s. Tab. 32). Mit steigender Chemfil-Konzentration waren auch bei *P. fluorescens* verlängerte lag-Phasen bis auf 52 Stunden zu beobachten. Trotzdem war ein Anwachsen dieser Keime auf eine

OD₅₄₆ von ca. 5 zu beobachten. In verkeimtem KTL-Material aus dem Minicoater (*B. cepacia*, 5×10^5 K/ml) genügten 8 ppm Chemfil (entspricht 0,099 ppm Wirksubstanz), um ein Absterben der Mikroorganismen unter die Nachweisgrenze zu bewirken (s. Tab. 31). In den Versuchsansätzen ohne Chemfil war keine Abnahme der Lebendkeimzahl festzustellen. Die Ergebnisse aller Versuchsansätze sind in den Tabellen 31 und 32 zusammengefasst.

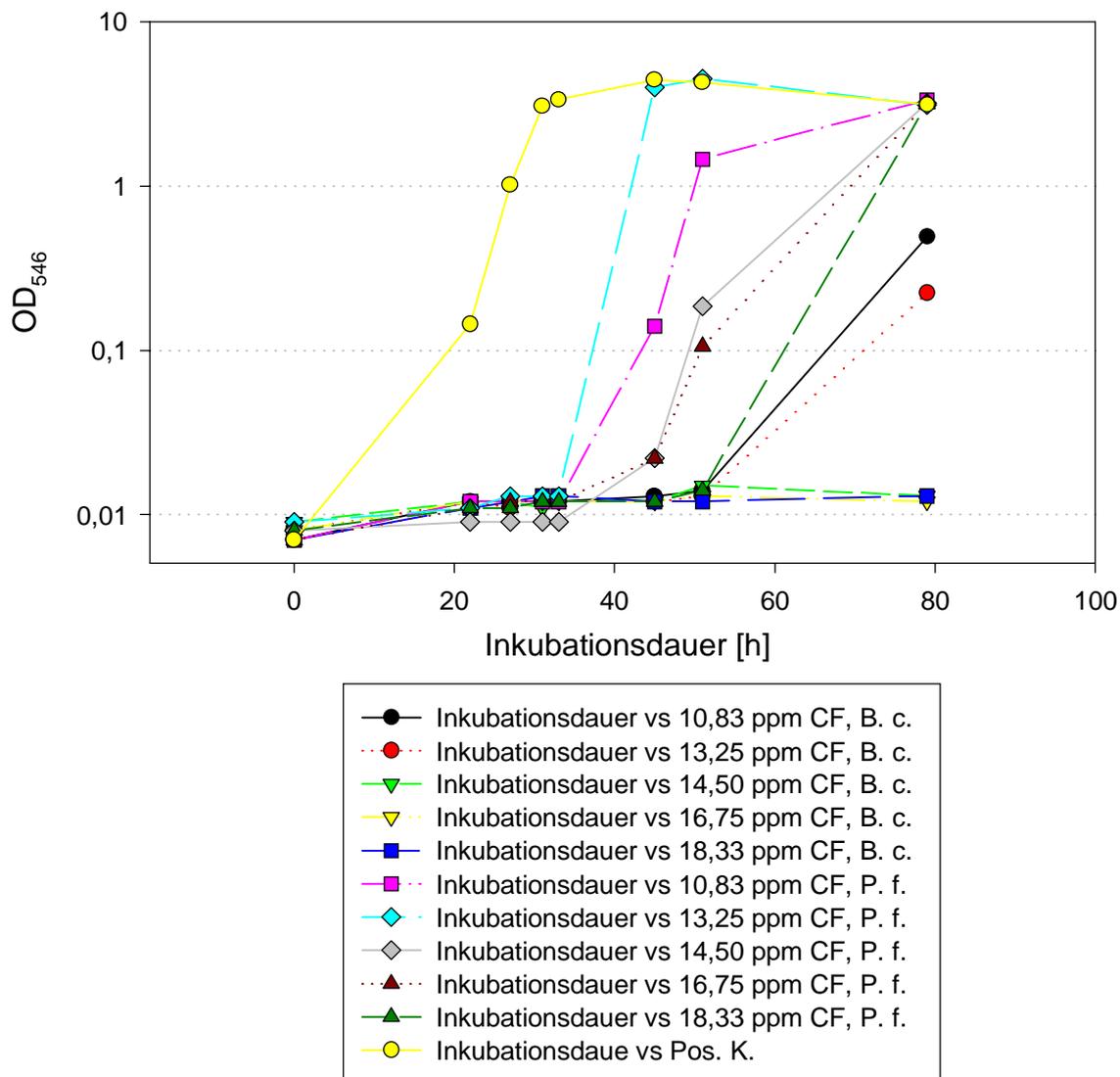


Abb. 36: Vergleich der Wachstumskurven von *B. cepacia* (B. c.) und *P. fluorescens* (P. f.) in Minimalmedium (30°C, 100 rpm), mit D-/L-Lactat als C-Quelle und verschiedenen Konzentrationen von Chemfil (CF)

Tab. 31: Vorversuch für die Hemmversuche mit Chemfil (CF) in Minimalmedium (MM) mit D-/L-Lactat als C-Quelle und die Biozidwirkung in verkeimtem KTL-Material; 200 ml (Schikanekolben, 32°C, 150 rpm), rot = Zellen abgetötet

| VA | Hemmstoff | C _{Chemfil} Vol. [%] | Medium | MO-Überleben <i>B. cepacia</i> |
|-----|-----------|----------------------------------|---------|-----------------------------------|
| 198 | Chemfil | 0,001 | MM | - |
| 199 | dito | 0,002 | MM | - |
| 200 | dito | 0,004 | MM | - |
| 201 | dito | 0,008 | MM | - |
| 202 | dito | 0,012 | MM | - |
| 203 | dito | 0,02 | MM | - |
| 255 | Chemfil | --- | KT-Lack | + |
| 256 | dito | 0,001 | KT-Lack | - |
| 257 | dito | 0,002 | KT-Lack | - |
| 258 | dito | 0,004 | KT-Lack | - |
| 259 | dito | 0,008 | KT-Lack | - |

3.3 Monitoring der KTL-Anlage

Die KTL-Anlage 34-II und Teile der Karossen-Vorbehandlung (VBH) in Sindelfingen wurden routinemäßig mikrobiologisch untersucht. Bei Bedarf wurden auch Anlage 34-I, andere Anlagenteile der Vorbehandlung und Proben anderer Werke der DaimlerChrysler AG in den Beprobungsplan mit aufgenommen (s. 2.8). Die im folgenden aufgeführten Ereignisse trugen sich im Laufe dieser Arbeit an der KTL-Anlage 34 in Sindelfingen zu und müssen bei der Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigt werden:

- Erste Probenahme: 17.12.1997 (1 Monat eingefroren), jedoch ohne Probe 7
- Auf DEV-Agar wurde am 16.07.1998 erstmals im Rezirkulat 1-II eine geringe Verkeimung gemessen, auf den restlichen Nährböden (s. 2.3) konnte bei dieser Probe keine Verkeimung festgestellt werden
- Verkeimung am Jahresende 1998 der 3 Spülzonen der Anlage 34-II, daraufhin Zugabe von 20 kg Chemfil in das Reinfiltrat beider Linien am 23.12.1998

Tab. 32: Hemmversuche mit Chemfil in Minimalmedium (MM) mit D-/L-Lactat als C-Quelle und *B. cepacia*, bzw. *P. fluorescens*, sowie in verkeimtem (*B. cepacia*) KTL-Material aus dem Minicoater (200 ml im Schikanekolben, 30°C, 100 rpm); WS 1 = Wirksubstanz 1 = chlorierte Komponente von Chemfil, rot = Zellen abgetötet, blau = Überleben von *P. fluorescens*, * = nicht gemessen

| VA | C _{Chemfil} [ppm] | C _{WS 1} [ppm] | C _{Chemfil} [ppm] | Medium | MO-Überleben | |
|----------|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------|---------|-----------------------|-------------------|
| | Einwaage | gemessen | berechnet | | <i>P. fluorescens</i> | <i>B. cepacia</i> |
| 268 | 10 | * | * | KT-Lack | * | - |
| 269 | 8 | * | * | KT-Lack | * | - |
| 270 | 6 | * | * | KT-Lack | * | + |
| 271 | 4 | * | * | KT-Lack | * | + |
| 272 | 2 | * | * | KT-Lack | * | ++ |
| 273 | 1 | * | * | KT-Lack | * | +++ |
| 274 | 0,5 | * | * | KT-Lack | * | ++++ |
| 275 | 0 | * | * | KT-Lack | * | +++++ |
| 276 | 10 | 0,122 | 9,33 | MM | * | + |
| 277 | 8 | 0,099 | 8,25 | MM | * | + |
| 278 | 6 | 0,076 | 6,33 | MM | * | + |
| 279 | 4 | * | * | MM | * | + |
| 280 | 2 | * | * | MM | * | + |
| 281 | 1 | * | * | MM | * | + |
| 282 | 0,5 | * | * | MM | * | + |
| 283 | 0 | 0 | 0 | MM | + | + |
| 299, 308 | 12 | 0,130 | 10,83 | MM | + | + |
| 300, 309 | 14 | 0,159 | 13,25 | MM | + | + |
| 301, 310 | 16 | 0,174 | 14,5 | MM | + | - |
| 302, 311 | 18 | 0,201 | 16,75 | MM | + | - |
| 303, 312 | 20 | 0,220 | 18,33 | MM | + | - |

- Im März 1999 wurde nach starkem Auftreten von Pilzen der Anolyt in den Beprobungsplan aufgenommen.
- Stichproben-Untersuchung des VE-H₂O-Zulaufes ins KTL-Bad; Sterilfilter wurde im Juni 1999 außer Betrieb genommen
- Zugabe von 0,2 % Parmetol T 94 in den Anolyt beider Linien am 17.04.1999 und am 22.05.1999
- Am 24.06.1999 Verkeimung der Anlage 34-II mit *Burkholderia cepacia*: Verkeimung im Lack und den Spülzonen, nicht im Ultrafiltrat
- Probenahme beider Linien (34-I nicht verkeimbar ↔ 34-II verkeimbar) zur Durchführung einer GC/MSD-Analyse zur Feststellung des noch verbliebenen Chemfilgehaltes und eventueller chemischer Unterschiede
- Biozid-Zugabe (1 x 20 kg Chemfil) in die Spülzonen der KTL-Anlage 34-II
- Von Juli bis September 1999 wurde aufgrund von Pilzbefall wöchentlich Chemfil in den Anolyt beider Anlagen zudosiert (0,5 l in 3 m³). Chemfil ist laut Aussage der BASF Anolytmembran-gängig
- am 08.10.1999 Wechsel des Biozids für den Anolyt von Chemfil zu Parmetol T 94 ab diesem Zeitpunkt nur noch Zugabe bei Bedarf
- Test eines neuen Bindemittels in Anlage 34-I ab 28.08.1999; es enthält laut Aussage der Fa. BASF kein Phenoxypropanol (für *B. cepacia* toxisch, s. 3.2.2) mehr, sondern stattdessen einen Polyether. Der Lösemittelgehalt des neuen Bindemittels liegt um ca. 22 % niedriger, als der des zuvor eingesetzten Bindemittels. Sollten sich durch den Einsatz des neuen Bindemittels keine Verschlechterung ergeben, sollen auch die Anlagen der anderen Werke auf das neue Bindemittel umgestellt werden.
- Einsatz des neuen Bindemittels auch in 34-II: ein Austausch (Umkompensierung) des Badinhaltes ist nach ca. 2-3 turnover erfolgt. Dies war nach ca. 2 Monaten erreicht.
- nach Umkompensation auf das neue Bindemittel trat eine Verkeimung beider Linien, am 08. November 1999 und am 12.11.1999 nur der Linie 1 auf, die mit Beschichtungsstörungen einherging; der Beginn der Verkeimungen erfolgte erstmals im Lack selbst; bei den identifizierten Keimen handelte es sich zum ersten Mal um *Pseudomonas fluorescens* (API 20 NE; 99,99 %); auch *B. cepacia* konnte wieder isoliert werden

Tab. 33: Ermittelte Substanzen in den Proben zum Monitoring der KTL-Anlage in Sindelfingen, Bau 34; * = Messung nicht möglich

| Probe | 1 | 2 | 3 | 6 | 7 | 5 | 4 |
|-----------------------------|--------------------|----------------------|----------|-------|-------|-------|------|
| | VBHZ10 Tauchbad | VBHZ10 Spritzring | KT-Lack | RZ 1 | RZ 2 | RF | UF |
| Parameter | | | | | | | |
| pH-Wert | 3,8-4,8 | ca. 5,5 | 5,7-5,9 | | | | |
| LF [μ S/cm] | 100-500 | ca. 20 | 900-1400 | | | | |
| MEQ _{Säure} [mmol] | * | * | ca. 30 | * | | | |
| MEQ _{Base} [mmol] | * | * | ca. 50 | * | | | |
| Festkörper [%] | * | * | 18-20 | * | | | |
| Asche [%] | * | * | ca. 15 | * | | | |
| Ethylbenzol | * | * | + | - | - | - | - |
| Xylol | * | * | + | - | - | - | - |
| TC [mg/l] | <10 | <10 | * | 13260 | 9780 | 9430 | 7800 |
| TOC [mg/l] | <10 | <10 | * | 13200 | 9720 | 9300 | 7800 |
| BSB ₅ [mg/l] | <3,0 | <3,0 | 12100 | 9780 | 11100 | 11500 | 9000 |
| Lactat [g/l] | * | * | 3-4 | 1,1 | 0,8 | 0,95 | 1,5 |
| Acetat [g/l] | * | * | 1 | * | * | * | * |
| Ag ⁺ [ppm] | * | * | 5 | <5 | <5 | <5 | <5 |
| Chlorid [mg/l] | 19 | <3,0 | * | 8,3 | 3,8 | 4,8 | 5,5 |
| Nitrit [mg/l] | <3,0 | <3,0 | * | <3,0 | <3,0 | <3,0 | 6,9 |
| Nitrat [mg/l] | 4,0 | 19,8 | * | 3,6 | <3,0 | <3,0 | <3,0 |
| Phosphat [mg/l] | 32 | 90 | * | <3,0 | <3,0 | <3,0 | <3,0 |
| Sulfat [mg/l] | 1,1 | 4,2 | * | <2,0 | <2,0 | <2,0 | 1,4 |
| Natrium [mg/l] | <10 | 19,6 | * | 14,8 | 12,4 | 12,9 | <10 |
| Kalium [mg/l] | 13 | <10 | * | <10 | <10 | <10 | <10 |
| Calcium [mg/l] | 1,5 | 4,8 | 462 | 9,2 | 8,6 | 8,2 | 5,4 |
| Mangan [mg/l] | 0,8 | 2,6 | * | 0,28 | 0,29 | 0,28 | 0,29 |
| Magnesium [mg/l] | <0,5 | 1,2 | 83 | 1,3 | 1,2 | 1,4 | <0,5 |
| Eisen [mg/l] | 4,1 | 5,1 | 60 | 1,9 | 0,84 | 0,71 | <0,1 |
| Molybdän [mg/l] | <0,1 | <0,1 | * | <0,1 | <0,1 | <0,1 | <0,1 |

Der Wert der Leitfähigkeit ist abhängig von der Fahrweise des Anolytsystems. Je höher die Leitfähigkeit des Anolytverwurfs, desto höher der Leitwert im KTL-Tauchbad. Die Werte in der KTL-Anlage in Sindelfingen schwankten demzufolge zwischen 800-1.300 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Der pH-Wert wurde dagegen relativ konstant bei 5,7-5,9 gehalten. Bei der im Dezember 1999 aufgetretenen Verkeimung der Anlagen 34-I und -II war ein pH-Anstieg zu beobachten, dem durch sofortige Zugabe von 10 %-iger Essigsäure entgegengewirkt wurde (ohne Abbildung). Zur Konservierung des Elektrotauchlacks wird vom Hersteller ab Werk Silbernitrat eingesetzt. Die Konzentration von 5 ppm Ag^+ liegt allerdings deutlich unterhalb der für *B. cepacia* toxischen Minimalkonzentration von 12 ppm Silber (s. 3.2.3).

3.3.2 Bestimmung der Lebendkeimzahlen

Zum schnelleren Monitoring der Lackieranlage und zum Herabsetzen der unteren Nachweisgrenze der Lebendkeimzahlbestimmung wurden verschiedene Vorgehensweisen (Lichtmikroskopie, Acridinorange-Färbung) getestet. Diese Methoden waren in KTL-Material erfolglos, da die Mikroorganismen von den Pigmentpartikeln überdeckt wurden und nicht, bzw. erst ab sehr hohen Lebendkeimzahlen (5×10^6 K/ml) zu erkennen waren. Daher wird die Überwachung der KTL-Anlagen zur Zeit weiterhin mittels Lebendkeimzahlbestimmung durch Ausplattieren durchgeführt.

➤ Lebendkeimzahlen in der KTL-Anlage

In der KTL-Anlage 34-II in Sindelfingen wurde seit Dezember 1997 die Entwicklung der Mikroflora beobachtet. Dabei wurden die Lebendkeimzahlen der letzten Spülzone der Vorbehandlung (VBH Zone 10; entsalztes Wasser = EW), Tauch- und Spülzonen der KTL-Anlage, Ultrafiltrat, VE-Wasser-Zulauf ins Lackierbecken und die Anolytssysteme (nicht dargestellt) überwacht.

Die Keimzahlen der Proben des Spritzringes und des Tauchbeckens der Vorbehandlung schwankten zwischen 10^4 und 10^6 K/ml, die über das Abtropfwasser der Karossen in die KTL-Anlage verschleppt wurden (ca. 5 l/Karossee, s. Abb. 12, 2.8). Dabei lagen die Keimzahlen des Tauchbeckens in der Regel höher (10^5 - 10^6

K/ml) als die des Spritzringes (10^4 - 10^5 K/ml). Am Sterilfilter des VE-Wasser-Zulaufes schwankten die Werte zwischen 0 und 10^5 K/ml, wobei kurz nach der wöchentlichen Sterilisation des Filters mit Wasserstoffperoxid die besten Ergebnisse gemessen werden konnten (s. Abb. 37). Am 16.07.1998 trat im Rezirkulat 1 (Zone 2) erstmals eine geringe Verkeimung mit *B. cepacia* (10^2 K/ml) auf, wobei keine Beschichtungsstörungen folgten. Am Jahresende 1998 wurden aus den 3 Spülzonen der Linie 2 *Burkholderia cepacia*, *Bacillus cereus* und *Bacillus mycoides* isoliert. *B. cereus* und *B. mycoides* sind Sporenbildner, die in Elektrotauchlack überleben können. Ein Wachstum dieser Mikroorganismen und damit verbundene Beschichtungsstörungen konnten bisher noch nicht beobachtet werden. Im Juni 1999 trat erstmals eine Verkeimung direkt im Elektrotauchlack auf (ca. 10^3 K/ml), wobei auch aus den 3 Spülzonen (10^3 - 10^4 K/ml) ausschließlich *B. cepacia* isoliert werden konnte. Das Vorhandensein der Bakterien wurde zuerst in den Spülzonen festgestellt. Die Verkeimung des reinen KTL-Materials weist auf eine verringerte Empfindlichkeit der Mikroorganismen gegenüber Ag^+ -Ionen hin. Trotz gleicher Fahrweise konnten in der parallel geführten Anlage 34-I keine Mikroorganismen nachgewiesen werden. Nach Zugabe von 20 kg des Biozids Chemfil (Wirkstoff Isothiazolinon) konnten in der Elektrotauchanlage bis November 1999 keine Bakterien mehr nachgewiesen werden.

Nach der Umkompensierung auf ein neues Bindemittel wurde am 08.11.1999 erstmalig der sofortige Beginn einer starken Verkeimung im Lackierbecken beobachtet, wogegen in allen vorher bekannten Fällen die Mikroorganismen zuerst in den Spülzonen in niedrigen LKZ auftraten. Dieser Verkeimungsvorfall brachte einen pH- und Schichtdickenanstieg mit sich. Die ermittelten LKZ von bis zu 10^7 K/ml lagen wesentlich höher als die bisher gemessenen. Zu diesem Zeitpunkt war auch im VE-Wasser-Zulauf eine erheblich höhere LKZ von ca. 10^8 K/ml gemessen worden. Zum Abtöten der Keime war eine deutlich erhöhte Biozidmenge und mehrmalige Biozid-Zugabe von 180 kg, anstatt wie zuvor 20 kg Chemfil, notwendig. Erst nach Dosierung dieser hohen Biozidmenge unterblieb bis zum 07.12.1999 ein erneutes Anwachsen der Bakterien. Aus den am 08.11.1999 entnommenen Proben konnten *P. fluorescens* und *B. cepacia* (s. 3.3.3) isoliert und identifiziert werden. Nach wiederholter präventiver Zugabe des Isothiazolinons am 23.12.1999 traten bis zum 29.01.2000 keine Mikroorganismen mehr auf.

➤ Lebendkeimzahlen am Sterilfilter

An der KTL-Anlage 34-II in Sindelfingen wurde zu Beginn der Inbetriebnahme ein Sterilfilter am VE-Wasser-Zulauf installiert. Das Filter wurde einmal wöchentlich mit Wasserstoffperoxid desinfiziert. Da die Lebendkeimzahlen im VE-Wasser stark vom Zeitpunkt der Probenahme abhingen, wurde 2 Mal ein Wochenprofil der Keimzahlen erstellt. Dabei zeigte sich, daß der VE-Wasser-Zulauf nur unmittelbar nach dem Desinfizieren des Filters steril war und danach die Keimzahlen bis auf 10^3 - 10^4 K/ml anstiegen (ohne Abbildung). Da auch bei den routinemäßigen Monitoring-Proben des VE-Wassers meist Keimzahlen von ca. 10^3 K/ml gemessen werden konnten (s. Abb. 37), wurde das Sterilfilter im Juni 1999 außer Betrieb genommen.

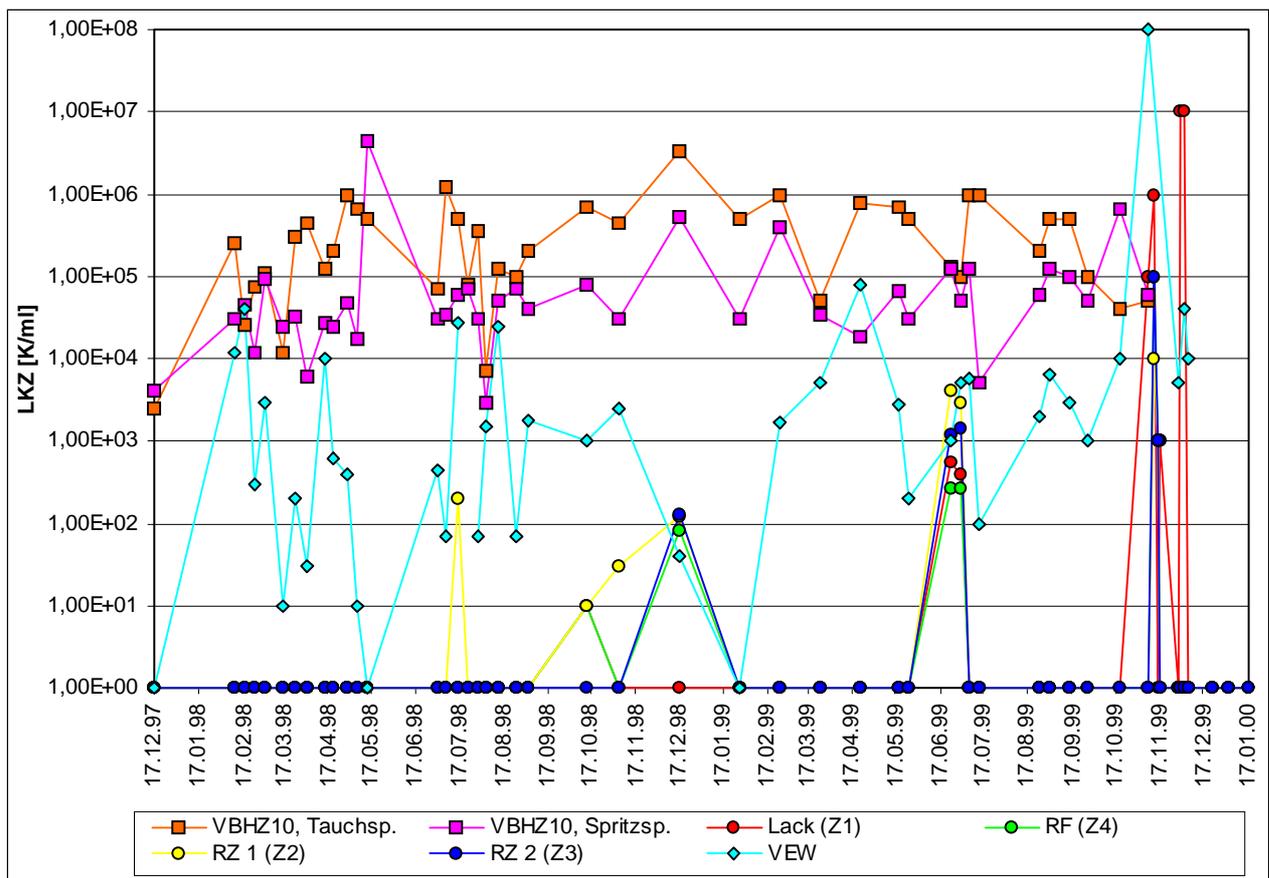


Abb. 37: Verlauf der Lebendkeimzahlen verschiedener Anlagenteile der KTL-Anlage 34-II in Sindelfingen vom 17.12.1999 bis zum 17.01.2000; Z = Zone, VBH = Vorbehandlung, RZ = Rezirkulat, RF = Reinfltrat, VEW = vollentsalztes Wasser

3.3.3 Identifizierung der Mikroorganismen

➤ Untersuchung des VE-Wassers

Im Zuge des Monitorings der KTL-Anlagen wurden die letzte EW-Spülzone der Vorbehandlung, das VE-Wasser der ZABA (zentrale Abwasseraufbereitungsanlage) direkt am Ablauf des Ionenaustauschers, und das VE-Wasser an der KTL-Anlage auf das Vorhandensein von *Burkholderia cepacia* hin untersucht. Aus allen genannten Proben konnte *B. cepacia* isoliert und mittels des API 20 NE-Identifizierungssystem bestimmt werden. Diese Ergebnisse wurden durch das BIOLOG-Identifizierungssystem bestätigt (DaimlerChrysler Forschungszentrum, Ulm). Aufgrund dieser Ergebnisse liegt es nahe, daß eine Infizierung der Lackieranlage durch den VE-Wasser-Zulauf in das Badmaterial, bzw. durch Verschleppung der Keime aus der Vorbehandlung über die Karossen (ca. 5 l EW/Karosse) erfolgt. Diese Aussage wird dadurch unterstützt, daß bei der KTL-Alterung im Minicoater eine Verkeimung ausschließlich durch den Verdunstungsausgleich mit VE-Wasser verursacht wurde (s. 3.1.2.2).

➤ Mikroorganismen aus KTL-Anlagen

Bei den aus KTL-Materialien, auch anderer Werke der DaimlerChrysler AG, isolierten Mikroorganismen handelte es sich hauptsächlich um *B. cepacia* (s. Tab. 34). Aus den Elektrotauchanlagen der DaimlerChrysler AG in Bremen, Hamburg, Wörth und Rastatt wurde ausschließlich *B. cepacia* identifiziert. *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Burkholderia cepacia* und *Pseudomonas fluorescens* konnten aus der Anlage in Sindelfingen 34-I und 34-II isoliert werden. Mit Ausnahme der Anlage in Wörth wurde in allen Lackieranlagen CG 400 zur Elektrotauchlackierung eingesetzt.

Tab. 34: Identifizierte Mikroorganismen, isoliert aus der KTL-Anlage in Sindelfingen und anderer Werke der DaimlerChrysler AG, rot = aus Lack isoliert

| Probennummer | Anlage | Bezeichnung | Datum | Keim |
|--------------|----------------------|-------------|----------|---|
| Sifi-6 | Sindelfingen, 34-II | RZ 1, Z2 | 98-07-16 | <i>B. cepacia</i> |
| Sifi-5 | Sindelfingen, 34-II | RF, Z4 | 98-12-17 | <i>B. cepacia</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus mycoides</i> |
| Sifi-6 | Sindelfingen, 34-II | RZ 1, Z2 | 98-12-17 | <i>B. cepacia</i> |
| Sifi-7 | Sindelfingen, 34-II | RZ 2, Z3 | 98-12-17 | <i>B. cepacia</i> |
| Sifi-3.1 | Sindelfingen, 34-II | Lack, Z1 | 99-06-24 | <i>B. cepacia</i> |
| Sifi-5 | Sindelfingen, 34-II | RF, Z4 | 99-06-24 | <i>B. cepacia</i> |
| Sifi-6 | Sindelfingen, 34-II | RZ 1, Z2 | 99-06-24 | <i>B. cepacia</i> |
| Sifi-7 | Sindelfingen, 34-II | RZ 2, Z3 | 99-06-24 | <i>B. cepacia</i> |
| HB-1 | Bremen, Halle 1 | RZ 2 | 99-06-14 | <i>dito</i> |
| HB-2 | Bremen, Halle 1 | Lack | 99-06-17 | <i>B. cepacia</i> |
| HB-3 | Bremen, Halle 1 | RZ 1 | 99-06-17 | <i>dito</i> |
| HB-4 | Bremen, Halle 1 | RZ 2 | 99-06-17 | <i>B. cepacia</i> |
| HB-5 | Bremen, Halle 1 | RF | 99-06-17 | <i>dito</i> |
| HH-154 | HH, MCC KTL | RZ 1 | 99-04-06 | <i>dito</i> |
| HH-155 | HH, MCC KTL | RZ 2 | 99-04-06 | <i>dito</i> |
| HH-156 | HH, MCC KTL | Lack | 99-04-12 | <i>B. cepacia</i> |
| HH-157 | HH, MCC KTL | RZ 1 | 99-04-12 | <i>dito</i> |
| HH-158 | HH, MCC KTL | RZ 2 | 99-04-12 | <i>dito</i> |
| HH-159 | HH, MCC KTL | RF | 99-04-12 | <i>dito</i> |
| HH-160 | HH, alte KTL | Lack | 99-04-12 | <i>dito</i> |
| HH-161 | HH, alte KTL | RZ | 99-04-12 | <i>dito</i> |
| HH-162 | HH, alte KTL | Lack | 99-04-19 | <i>B. cepacia</i> |
| HH-163 | HH, alte KTL | RZ | 99-04-19 | <i>dito</i> |
| HH-164 | HH, alte KTL | RF | 99-04-19 | <i>dito</i> |
| W 220 | Wörth, Südanlage | Lack, PPG | 99-08-13 | <i>B. cepacia</i> |
| W221 | Wörth, Südanlage | RZ | 99-08-13 | <i>dito</i> |
| W222 | Wörth, Südanlage | RF | 99-08-13 | <i>dito</i> |
| W223 | Wörth, Nordanlage | Lack, PPG | 99-08-13 | <i>B. cepacia</i> |

Fortsetzung Tab. 34

| Probennummer | Anlage | Bezeichnung | Datum | Keim |
|--------------|----------------------|--------------|----------|-----------------------|
| W224 | Wörth, Nordanlage | RZ | 99-08-13 | <i>dito</i> |
| W225 | Wörth, Nordanlage | RF | 99-08-13 | <i>dito</i> |
| HB 226 | Bremen, Halle 8 | RZ 2 | 99-08-23 | - |
| HB 227 | Bremen, Halle 8 | Lack | 99-08-25 | - |
| HB 228 | Bremen, Halle 8 | RZ 1 | 99-08-25 | - |
| HB 229 | Bremen, Halle 8 | RZ 2 | 99-08-25 | - |
| HB 230 | Bremen, Halle 8 | RF TB | 99-08-25 | - |
| RA 231 | Rastatt | CG 400, Lack | 99-09-06 | <i>B. cepacia</i> |
| RA 232 | Rastatt | RZ 1 | 99-09-06 | <i>dito</i> |
| RA 233 | Rastatt | RZ 2 | 99-09-06 | <i>dito</i> |
| RA 234 | Rastatt | RF | 99-09-06 | <i>dito</i> |
| RA 235 | Rastatt | UF | 99-09-06 | - |
| Sifi 3.2 | Sindelfingen 34-II | Lack, Zone 1 | 99-11-08 | <i>P. fluorescens</i> |
| Sifi 3.3 | Sindelfingen 34-II | <i>dito</i> | 99-11-08 | <i>P. fluorescens</i> |
| Sifi 3.4 | Sindelfingen 34-II | <i>dito</i> | 99-11-08 | <i>B. cepacia</i> |

3.3.4 Nachstellung der KTL-Anlage

In KTL-Anlagen wird bei Auftreten von Verkeimungen in der Praxis das Biozid Chemfil zudosiert. Um zu überprüfen, welches mikrobielle Potential grundsätzlich vorhanden ist, wurde getestet, welche Mikroflora sich ohne jegliche Zusätze entwickeln würde. Dazu wurde je eine Probe aus jeder Zone bei Raumtemperatur inkubiert (s. 2.8.1). Es sollte so überprüft werden, ob eine nicht nachweisbare Anzahl von Mikroorganismen im KTL-Material enthalten ist, die nach einer Adaptationsphase auf eine nachweisbare Keimzahl anwachsen könnte. Nach 4 Wochen Inkubationsdauer war kein Keimwachstum zu beobachten, woraufhin den Versuchsansätzen eine konzentrierte Mineralsalzlösung zugegeben wurde. Als nach weiteren 6 Monaten Versuchsdauer keine Lebendkeimzahlen gemessen werden konnten, wurde der Versuch abgebrochen und die Ansätze für den in Abschnitt 3.3.5 beschriebenen Versuch verwendet.

3.3.5 Verkeimung gealterter Proben aus der KTL-Anlage

Die in 3.3.4 beschriebenen Versuchsansätze wurden mit Mikroorganismen angeimpft, die aus der letzten EW-Spülzone der Vorbehandlung isoliert und angereichert wurden. Dadurch wurde überprüft, welche aus der Vorbehandlung stammenden und über die Karossen in die KTL-Anlage eingeschleppten Mikroorganismen fähig sind, in gealtertem KTL-Material zu überleben, bzw. zu wachsen. Aus der Probe des Rezirkulats 2 (VA 18 b, s. 2.8.2) wurde mittels API 50 CHB *Bacillus cereus* identifiziert. Bei diesem Keim handelt es sich um einen Sporenbildner, der in der Lage war, in Rezirkulat zu überleben. Es konnten jedoch kein Wachstum und keine Veränderung des Materials beobachtet werden. Es kann also davon ausgegangen werden, daß *B. cereus* bisher keinen Einfluß auf das Abscheideverhalten des Elektrotauchlacks hatte.

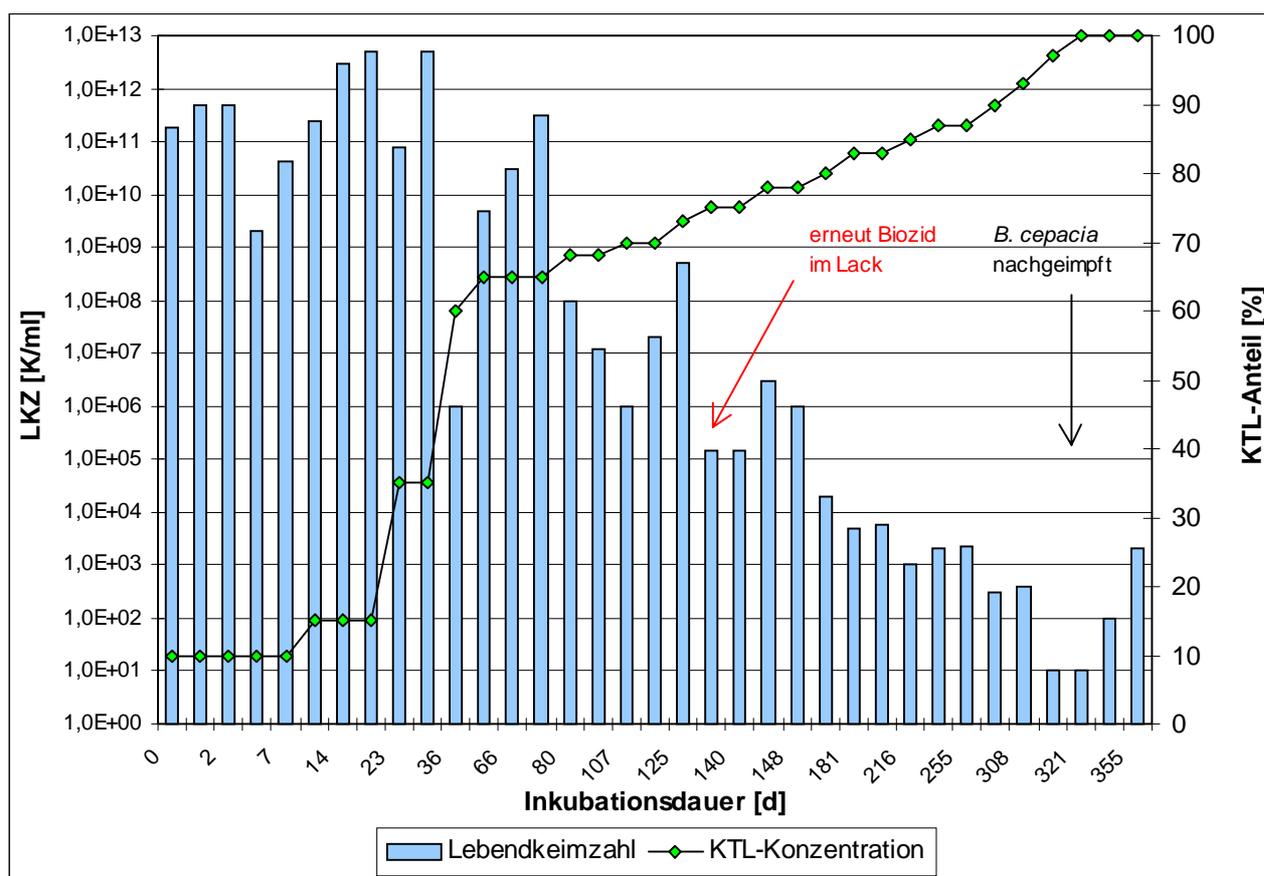


Abb. 38: Verlauf der LKZ und des KT-Lack-Anteils im Fed Batch mit aus der Vorbehandlung isolierten Mikroorganismen im 1 l-Fermenter auf dem Heizrührer (30°C, 300 rpm)

3.3.6 Fed Batch mit aus der Vorbehandlung isolierten Mikroorganismen in KTL-Medium im Labormaßstab

Aus der letzten EW-Spülzone der Vorbehandlung (Zone 10) wurden verschiedene Mikroorganismen isoliert, die durch eine Verschleppung über das Abtropfwasser der Karossen in die KTL-Anlage eingetragen werden. Dieser Versuch diente der Überprüfung, welche aus der Vorbehandlung stammenden Keime im Elektrottauchlack überleben, bzw. wachsen und somit auch für die beobachteten Lackerschäden verantwortlich sein können, wenn man eine sukzessive Adaptation an den Lack ermöglicht. Da in dem aus der KTL-Anlage Sindelfingen 34-II stammenden Elektrottauchlack (CG 400 mit Ag⁺) laut Aussage des Herstellers noch Spuren von Biozid vorhanden waren, wurde mit verdünntem Medium gestartet und im Fed Batch Verfahren die KTL-Konzentration sukzessive erhöht. Dies sollte den Mikroorganismen die Adaptationsphase erleichtern.

Ab einer KTL-Konzentration von 60 % sind im KTL-Medium nur noch *Burkholderia cepacia* (10⁶ K/ml) und *Bacillus cereus* (10¹ K/ml) nachzuweisen. Diese beiden Keime hielten sich bis 93 %. Bei einer Konzentration von 97 % Elektrottauchlack wurde erneut mit aus dem Fermenter isolierten *B. cepacia* nachgeimpft, da nur noch *Bacillus cereus* nachzuweisen war. Danach konnten nach insgesamt 350 Tagen Inkubationsdauer wieder Lebendkeimzahlen von *B. cepacia* (2x10³ K/ml) und *Bacillus cereus* (1x10¹ K/ml) bis zu 100 % (s. Abb. 38) KTL-Anteil gemessen werden. Diese Ergebnisse zeigten, daß durch die sukzessive Erhöhung des Anteils an Elektrottauchlack, und damit einer Zunahme der für die Mikroorganismen toxischen Substanzen, eine Adaptation der Bakterien an unverdünntes KTL-Material (mit Ag⁺) zu erreichen ist.

3.3.7 Vergleich der Plasmid-DNA von aus verschiedenen Quellen isolierten *B. cepacia* mittels Pulsed Field Gelelektrophorese (PFGE)

Aus Elektrottauchlack verschiedener Werke der DaimlerChrysler AG konnte jeweils *Burkholderia cepacia* isoliert und identifiziert werden (s. 2.8.5). Bei den verschiedenen Keimen wurde mittels Pulsed Field Gelelektrophorese untersucht, ob sich die Genome dieser Bakterien durch den Selektionsdruck gegenüber dem der

Tab. 35: Aufstellung der Mikroorganismen (*Burkholderia cepacia*) für die PFGE,
blau = entsprechende Herkunft, bzw. Plasmidgrößen

| VA | Bahn | Nr. | MO | Plasmid [kb] |
|-----|------|--------|--|---|
| 210 | 1 | Marker | λ <i>Hin</i> d III Fragmente und λ Konkatemeren | 339,5; 291; 242,5; 194; 145,5; 97; 48,5; 23,1; 9,42 |
| 211 | 2 | 1 | Lehrstamm, DSM # 7288 | 192 |
| 212 | 3 | 2 | Lösemittelverwerter, DSM # 11737 | 313, 246, 210, 90, 68 |
| 213 | 4 | 3 | Sindelfingen 3.1 aus Lack mit AgNO ₃ | 76 |
| 214 | 5 | 4 | Bremen 2.1 aus Lack mit AgNO ₃ | 47 |
| 215 | 6 | 5 | Hamburg 156.3 aus Lack mit AgNO ₃ | 34 |
| 216 | 7 | 6 | 51 aus Lack (Düsseldorf) ohne AgNO ₃ | - |
| 217 | 8 | 7 | 81-19 aus Lack ohne AgNO ₃ (Minicoater, Sindelfingen) | 76 |
| 218 | 9 | 8 | F-9, aus Lack mit AgNO ₃ (Fermenter, Vorbehandlung Sindelfingen) | 70 |
| 219 | 10 | 1 | Lehrstamm, DSM # 7288 | 187 |

DSM-Stämme verändert haben. Die getesteten Mikroorganismen und die gefundenen Plasmide sind in Tabelle 35 zusammengefaßt. In allen Bahnen, mit Ausnahme von Bahn 7, der untersuchten Mikroorganismen sind Plasmide deutlich erkennbar (s. Abb. 39). Der DSM-Lehrstamm 7288 (Bahn 2) besitzt ein Plasmid in der Größe von 192 kb. Bei dem Lösemittel verwertenden DSM-Stamm 11737 (Bahn 3) sind 5 Plasmide von ca. 313, 246, 210, 90 und 68 kb zu lokalisieren. In Bahn 4, dem aus Sindelfingen (CG 400, mit Silbernitrat) isolierten Keim, ist ein Plasmid mit der Größe von ca. 76 kb, bei dem aus Bremen stammende Mikroorganismus (Bahn 5) ist eines von 47 kb und bei dem aus MCC-KTL (Mini Compact Car KTL, CG 400 schwarz, mit Silbernitrat) isolierten Stamm aus Hamburg (Bahn 6) ist ein Plasmid mit der Größe von ca. 34 kb zu sehen. Der aus dem silbernitratfreien KTL-Material (Düsseldorf) stammende Keim ist der einzige Stamm, bei dem kein Plasmid zu erkennen war (Bahn 7). Der aus der Vorbehandlung isolierte *B. cepacia* (im Fed Batch mit CG 400 als Inokulum verwendet und aus dem

Lackmaterial bei 90 % reisoliert (s. 2.8.3) und das aus verkeimtem Lack aus dem Minicoater stammende Isolat (s. 2.6.2.2), besitzen beide ein Plasmid in der Größe von ca. 76, bzw. 70 kb (Bahn 8 und 9). Zur Kontrolle wurde in Bahn 10 nochmals der DSM-Lehrstamm aufgetragen. Auch hier wurde wieder das Plasmid mit einer Größe von 187 kb festgestellt. Die aus unterschiedlichen Werken stammenden Isolate unterscheiden sich also alle in ihrer Plasmid-DNA. Dabei fällt auf, daß bei dem aus silbernitratfreiem Material stammende Keim (Bahn 7) kein Plasmid zu erkennen ist und die aus denselben Werken isolierten Mikroorganismen (Bahn 4, 8 und 9) sich in ihrer Plasmidgröße nicht unterscheiden.

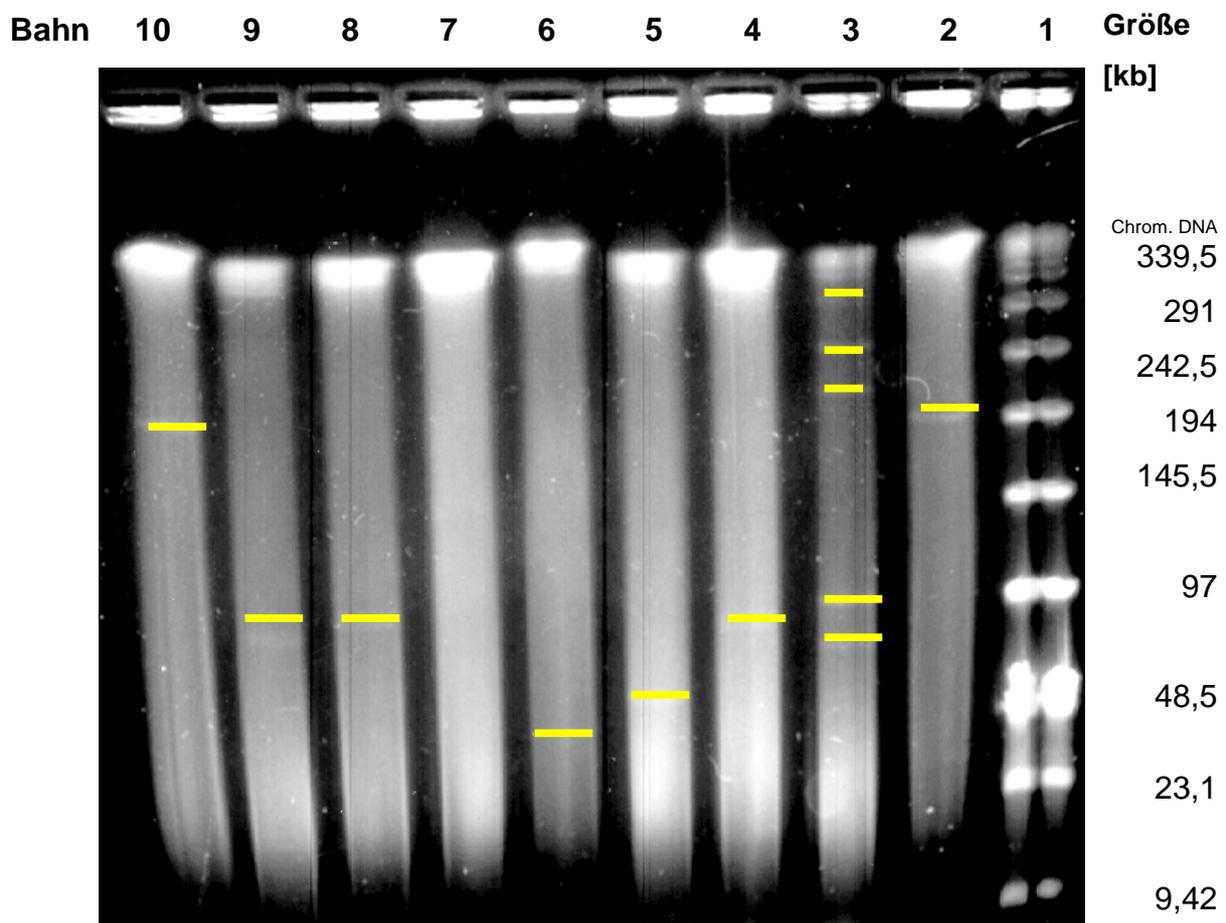


Abb. 39: Vergleich der Plasmid-DNA durch Pulsed Field Gelelektrophorese von *Burkholderia cepacia* isoliert aus Elektrotauchlacken verschiedener Herkunft; die mit Hilfe der ImageMaster VDS Software ermittelten Banden wurden gelb markiert

3.4 Versuche zur Problemlösung

Aufgrund der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, konnten einige Faktoren ermittelt werden, die zur Verkeimbarkeit von KT-Lack beitragen. Dabei spielte unter anderem die Verwertung der Neutralisationsmittel (Milchsäure, Essigsäure) durch *B. cepacia* und der Verlust einiger für diese Mikroorganismen toxischen Lacklösemittel (Phenoxypropanol, Xylol, Ethylbenzol) eine Rolle (s. 3.2).

3.4.1 Teilneutralisierung von Elektrotauchlack mit Salpetersäure

Die in CG 400 eingesetzten Neutralisationsmittel Milchsäure und Essigsäure können von *Burkholderia cepacia* als Kohlenstoffquelle verwertet werden. Um durch Limitierung der C-Quelle ein Verkeimen des Elektrotauchlacks zu erschweren, könnten zur Neutralisierung (Dispergierbarkeit des Bindemittels in Wasser) des Lackmaterials alternative Neutralisationsmittel eingesetzt werden. Dabei wäre es von Vorteil, wenn die verwendete Säure nicht als C-Quelle für *B. cepacia* dienen kann und dadurch möglicherweise ein Wachstum verhindert werden könnte. Dabei ist auch der Einsatz von anorganischen Säuren möglich. In diesem Versuch wurde Salpetersäure zur Teilneutralisierung des Elektrotauchlacks getestet. Anschließend wurde das Abscheideverhalten überprüft und die 10 Bleche ganzjährig einem Korrosionswechseltest unterzogen (s. 2.9.1). Dabei stellte sich heraus, daß durch die Teilneutralisierung mit HNO_3 zwar gute Oberflächen und normale Schichtdicken (alle 10 Bleche zw. 19 und 21 μm) gemessen, jedoch nach dem Korrosionswechseltest viele kleine Rostflecken auf den Testblechen gefunden werden konnten. Ein Einsatz von Salpetersäure ist daher unter dem Gesichtspunkt des Korrosionsschutzes nicht möglich.

3.4.2 Effekte der Zugabe von Ethylbenzol, bzw. Xylol in verkeimtes KTL-Material

Aus vorangegangenen Versuchen ging hervor, daß sich unter anderem die Lacklösemittel Ethylbenzol und Xylol (Isomerengemisch) wachstumshemmend auf *B. cepacia* auswirken (s. 3.2.2).

Tab. 36: Zusammensetzung der Versuchsansätze zur Überprüfung der Auswirkung von Ethylbenzol- und Xylol-Dosierung in verkeimte KTL-Proben; * = nicht gemessen

| VA | Lösemittel [%] | Probe | MO-Überleben | | |
|------------|---------------------------------|-----------------------------------|--------------|------|------|
| | | | 0 h | 24 h | 72 h |
| RA 231 | - | CG 400, 06.09.99 | + | - | * |
| RA 232 | - | RZ 1, 06.09.99 | + | - | * |
| RA 233 | - | RZ 2, 06.09.99 | + | + | * |
| RA 234 | - | RF, 06.09.99 | + | + | * |
| RA 236 | Ethylbenzol 0,03 | CG 400, 06.09.99 | + | - | * |
| RA 237 | dito | RZ 1, 06.09.99 | + | - | * |
| RA 238 | dito | RZ 2, 06.09.99 | + | - | * |
| RA 239 | dito | RF, 06.09.99 | + | - | * |
| RA 240 | Xylol 0,03 | CG 400, 06.09.99 | + | - | * |
| RA 241 | dito | RZ 1, 06.09.99 | + | - | * |
| RA 242 | dito | RZ 2, 06.09.99 | + | - | * |
| RA 243 | dito | RF, 06.09.99 | + | - | * |
| RA 244 | Ethylbenzol + Xylol, je 0,03 | CG 400, 06.09.99 | + | - | * |
| RA 245 | dito | RZ 1, 06.09.99 | + | - | * |
| RA 246 | dito | RZ 2, 06.09.99 | + | - | * |
| RA 247 | dito | RF, 06.09.99 | + | - | * |
| 252 | Ethylbenzol 0,03 | verkeimter Lack aus Minicoater | + | + | + |
| 253 | Xylol 0,03 | dito | + | + | + |
| 254 | Ethylbenzol + Xylol, je 0,03 | dito | + | + | + |
| 255 | - | dito | + | + | + |

Bei diesen Versuchen wurde überprüft, ob eine nachträgliche Dosierung dieser Lösemittel einen hemmenden Einfluß auf das Wachstum der Mikroorganismen hat und durch Konstanthaltung der ursprünglich eingesetzten Lösemittelgehalte eine Verkeimung des Lacks erschwert werden kann (s. 2.9.2). In verkeimtes KTL-Material

aus dem Minicoater (ca. 5×10^9 K/ml, ohne Silbernitrat, s. 2.6.2.2) und aus Rastatt stammend (ca. 10^3 K/ml, mit Silbernitrat) wurden nachträglich die Anfangskonzentrationen der Lösemittel Ethylbenzol und Xylol zudosiert (s. Tab. 36).

In den aus Rastatt stammenden Proben (CG 400, s. 2.9.2) konnten durch die Zugabe von je 0,03 % Lösemittel ein Absterben der Mikroorganismen (*B. cepacia*) erreicht werden. In den aus dem Minicoater stammenden Versuchsansätzen dagegen konnte durch die Zugabe der Substanzen kein Absterben der Keime bewirkt werden. Dabei muß jedoch beachtet werden, daß die ermittelte Lebendkeimzahl zu Beginn des Versuchs in den VA 231-247 (aus dem DaimlerChrysler Werk Rastatt) sehr viel niedriger liegt, als die der VA 252-255 (aus Minicoater, s. 2.9.2). Bei den aus Rastatt stammenden Proben war auch ohne Hemmstoffdosierung ein Absterben der Mikroorganismen im Lack und im Rezirkulat 1 zu beobachten (VA 231, 232). Zudem muß in Betracht gezogen werden, daß in Rastatt silberhaltiges Material eingesetzt wird. In den aus dem Minicoater stammenden Versuchsansätzen reichte die Zugabe der Lösemittel nicht aus, um diese hohe Lebendkeimzahl abzutöten. Dazu kam, daß es sich bei diesen Ansätzen um ein offenes System handelte, d. h. daß die Lösemittel zu schnell abdampften, um auf diese große Menge an Biomasse einwirken zu können.

3.4.3 Einfluß der Dosierung von Phenoxypropanol in verkeimten KT-Lack und Einfluß der Kühlung bei 4°C auf das Überleben der Bakterien

Neben Ethylbenzol und Xylol wurden auch der Einfluß der nachträglichen Dosierung von Phenoxypropanol und der Kühlung bei 4°C auf verkeimtes KTL-Material (Anlage Sindelfingen 34-I vom 12.11.99, ca. 10^7 K/ml, s. 2.9.3) untersucht (s. Tab. 37). Dabei wurde festgestellt, daß nach Hemmstoffdosierung, bzw. 24 Stunden Kühlung des stark bewachsenen Elektrotauchlacks immer noch dieselben Lebendkeimzahlen zu messen waren. Auch die Ergebnisse dieser Versuchsansätze weisen darauf hin, daß bei einer nachweislich hohen Lebendkeimzahl durch die nachträgliche Hemmstoffdosierung kein Absterben der Bakterien erreicht werden kann.

Nach 30 Tagen Inkubationsdauer konnten nur noch in VA 323 lebende Keime nachgewiesen werden. Die Mikroorganismen in dem mit 0,5 % PPH versetzten und dem gekühlten Ansatz waren bis unter die Nachweisgrenze abgestorben. Ein Grund dafür könnte sein, daß PPH sich bei nachträglicher Dosierung in Elektrotauchlack nicht sofort löste, sondern einige Tage Einschütteln notwendig waren, um Phenoxypropanol zu dispergieren. Eine Kühlung auf 4°C und die nachträgliche Dosierung konnten nach längerer Versuchsdauer (30 Tage) ein Absterben der Mikroorganismen bewirken.

Tab. 37: Zusammensetzung der Versuchsansätze zur Überprüfung des Einflusses von Phenoxypropanol und einer Kühlung auf nachweislich verkeimtes KTL-Material; rot = Zellen abgestorben

| VA | | 322 | 323 | 324 |
|--------------------------|-----------------|---------------|---------------|------------------|
| Versuchsbedingung | | 30°C, 100 rpm | 30°C, 100 rpm | Kühlschrank, 4°C |
| PPH [%] | | 0,5 | - | - |
| Versuchsergebnis | | | | |
| MO-Überleben | t = 0 | + | + | + |
| | t = 1 d | + | + | + |
| | t = 30 d | - | + | - |

4. Diskussion und Ausblick

Diese Arbeit befaßte sich mit dem mikrobiellen Befall von KTL-Anlagen in der Automobilindustrie. Die Verkeimung von Elektrotauchlack mit *B. cepacia* führt zu Beschichtungsstörungen, was in der Folge zur Neubefüllung eines Tauchbeckens unter erheblichem Kostenaufwand führen kann. Allein die Kosten für eine anfallende Entsorgung des alten Materials und Neubefüllung der Lackieranlage belaufen sich auf ca. 2 Millionen DM, wobei der eventuell entstehende Produktionsausfall (ca. 2.000 Karossen/Tag in Sindelfingen) nicht mit eingerechnet wurde. In dieser Arbeit wurde eindeutig gezeigt, daß die Lackierschäden tatsächlich auf den mikrobiellen Befall des KT-Lacks zurückzuführen sind und nicht durch chemische Faktoren hervorgerufen wurden.

4.1 Beschichtungsstörungen

Gannon und Hunt (1997) beschrieben, wie Bakterien Probleme in der Elektrotauchlackierung verursachen können. Sie setzten dabei voraus, daß bei der kathodischen Tauchlackierung die negative Nettoladung der Mikroorganismen mit den negativ geladenen Karossen um die kationischen Lackpartikel konkurrieren. Dies würde zu einer Abnahme der Leitfähigkeit des Elektrotauchlacks führen, da einige positiv geladenen Lackbestandteile von der negativen Nettoladung der Keime neutralisiert würden. Weiterhin wurde beschrieben, daß als Resultat weniger Lack zur Abscheidung an die Karossen zur Verfügung stehen würde, was eine geringere Schichtdicke zur Folge hätte. Die in 3.1.1.1 beschriebenen Ergebnisse zeigten jedoch, daß das alleinige Vorhandensein von Biomasse nicht zu Beschichtungsstörungen führt, sondern daß ein Wachsen und Stoffwechseln der Zellen stattfinden muß. Dabei wurden in dieser Arbeit einige der Faktoren untersucht, die zu den Beschichtungsstörungen führten. Zu Beginn des Projekts wurde geprüft, ob die Lackierschäden durch Ausscheidung von durch *B. cepacia* produzierten gelblich grünen Pigmenten, die als Siderophore dienen (Meyer et al., 1989), hervorgerufen wird. Allerdings konnten in verkeimten Versuchsansätzen mittels Chromazurol-Methode (Schwyn & Neilands, 1986) keine Siderophore nachgewiesen werden. Es konnte dagegen eindeutig gezeigt werden, daß durch den Verbrauch der

Neutralisationsmittel Milch- und Essigsäure ein pH-Anstieg erfolgte und so ein Funktionieren des Abscheidemechanismus nicht mehr möglich war. Doch auch durch Konstanthaltung des pH-Wertes konnten Beschichtungsstörungen nicht verhindert werden (s. 3.1.1.2). Durch Anreicherung von *B. cepacia* auf Minimalmedium mit den dem Lack entsprechenden Konzentrationen an D-/L-Lactat und Acetat als C-Quelle, und anschließender Zugabe des Kulturüberstandes in Elektrotauchlack entstanden deutliche Beschichtungsstörungen. Es wurde damit nachgewiesen, daß die Stoffwechselprodukte aus dem Wachstum von *B. cepacia* mit D-/L-Lactat und Acetat als C-Quelle Lackierschäden verursachten (verbleibender TOC ca. 400 mg/l, ca. 1/5 des Ausgangswertes, s. 3.1.1.3). Es wurde jedoch nicht untersucht, um welche Stoffwechselprodukte es sich dabei handelte und was ihre Ausscheidung im Elektrotauchlack bewirkt.

Damit ist nicht eindeutig geklärt, ob die fehlerhafte Applikation nicht auch noch durch andere Parameter, wie z. B. den Verbrauch weiterer Lackinhaltsstoffe, hervorgerufen wurde. In den in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Wachstumsversuchen konnte bisher keine organische Säure ermittelt werden, die auf *B. cepacia* toxisch wirkt. Es wurden jedoch einige Substanzen überprüft, die laut Literaturangaben (Palleroni and Holmes, 1981; Krieg et al., 1984; Ballard et al., 1969) nicht von *B. cepacia* verwertet werden können und mit denen in Minimalmedium kein Keimwachstum beobachtet wurde (s. Tab. 25, Abschnitt 3.2.1). Der Einsatz eines alternativen Neutralisationsmittels, welches von den in Elektrotauchlack lebensfähigen Mikroorganismen nicht als Kohlenstoffquelle genutzt werden kann, ist sicherlich empfehlenswert.

4.2 Verkeimbarkeit des Elektrotauchlacks

Frisch angesetzter Elektrotauchlack (mit und ohne Silbernitrat) ist bislang nicht mit Mikroorganismen verkeimbar. Eine Verkeimung des KTL-Materials war erst immer nach einer bisher unbestimmten Materialalterung möglich. Ziel dieser Arbeit war es unter anderem, die Faktoren, die zur Verkeimbarkeit des Lacks führen, näher zu bestimmen.

➤ **Limitierung durch das Fehlen einer Kohlenstoffquelle**

Zu Beginn dieser Arbeit wurde untersucht, ob das Wachstum der Bakterien durch das anfängliche Fehlen einer Kohlenstoffquelle limitiert wurde. Nach Zugabe einer leicht verwertbaren C-Quelle (Glucose), aufgeschlossenen Zellen von *Burkholderia cepacia* und Verdünnung einiger Versuchsansätze wurde beobachtet, daß für ein Wachstum der Mikroorganismen nicht das Vorhandensein der Glucose, sondern offenbar die Verdünnung der KTL-Medien ausschlaggebend war (s. 3.1.2.1). Daraus wurde gefolgert, daß das Wachstum von *B. cepacia* neben toxischen Silberkationen zusätzlich durch das Vorhandensein anderer, bis dahin nicht bekannter Hemmstoffe verhindert wurde. Aus diesem Grund wurde eine reproduzierbare Alterung eines silberfreien Lackmaterials in einer Elektrotauchanlage im Technikumsmaßstab mit Einbeziehung einer Ultrafiltrationseinheit (Minicoater) vorgenommen, um chemische und physikalische Parameter vor und nach Verkeimbarkeit des ETLs bestimmen zu können (s. 3.1.2.2).

➤ **Chemische Unterschiede**

Da von Seiten des Herstellers nur wenige Angaben im Bezug auf die Lackzusammensetzung gemacht wurden, mußten die zum Vergleich herangezogenen Parameter selbst bestimmt werden, was leider sicher zu Lücken in der Gesamtbetrachtung führt.

Von dem im Minicoater gealterten Material wurden mittels GC/MSD zu Versuchsbeginn die im Elektrotauchlack enthaltenen Lacklösemittel bestimmt und die Werte mit denen am Versuchsende verglichen (s. 3.1.2.2). Die angegebene Abnahme um ca. 75 % des Gesamtlösemittel-Gehalts bezieht sich dabei nur auf die ermittelten Lösemittel. Sollten im Lack andere, biozid wirkende Substanzen enthalten sein, so konnte man sie mit Hilfe der GC/MSD-Analyse jedoch nicht identifizieren, und sie entzogen sich somit einer weiteren Untersuchung. Bei einem parallel laufenden Versuch im Forschungszentrum Ulm der DaimlerChrysler AG konnte während 8 monatigem Rühren von KTL-Material (ohne Ag^+) auf dem Heizrührer (30°C) keine Verkeimbarkeit erreicht werden. Wäre dafür nur das Abdampfen der hemmend wirkenden Lacklösemittel (Ethylbenzol, Xylol, Phenoxypropanol) unter eine kritische Konzentration allein verantwortlich, müßte das bei diesen Ansätzen der Fall

gewesen sein. Daraus läßt sich schließen, daß im Elektrotauchlack noch weitere Substanzen vorhanden sein müssen, die eine hemmende Wirkung auf das Wachstum von *B. cepacia* haben und bisher aber nicht bekannt sind. Im Gegensatz zu den gerührten Versuchsansätzen konnte im Minicoater (Anolyt-, Ultrafiltrat-, Lackkreislauf, 30°C) eine Verkeimbarkeit erreicht werden. Ob und - wenn ja - welchen Einfluß dabei die Veränderung des Elektrotauchlacks durch Scherkräfte in der Ultrafiltration hat, ist bislang nicht geklärt.

➤ **Keimquellen**

Bei dem in Abschnitt 3.1.2.2 beschriebenen Versuch im Minicoater erfolgte die Verkeimung des gealterten KTL-Materials ausschließlich durch das zum Verdunstungsausgleich verwendete VE-Wasser. *B. cepacia* wurde außerdem aus dem Ionenaustauscherharz der zentralen Abwasser Aufbereitungsanlage (ZABA), dem VE-Wasser-Zulauf der KTL-Anlage, sowie aus dem entsalzten Wasser (E-Wasser) der letzten Spülzone der Vorbehandlung (Zone 10) isoliert. Daraus läßt sich schließen, daß die in den Elektrotauchanlagen aufgetretenen Keime durch den VE-Wasser-Zulauf ins KTL-Becken, bzw. das E-Wasser der Vorbehandlung (wird über Karossen eingetragen), eingeschleppt wurden. Auch der in Abschnitt 3.3.6 beschriebene Versuch im Glasfermenter (Fed batch Prozeßführung) zeigte, daß eine stufenweise Adaptation der aus der Vorbehandlung (Zone 10) stammenden Zellen (*B. cepacia*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus cereus*) an reinen Elektrotauchlack möglich ist. Eine Sterilisierung des VE-Wassers, bzw. des Tauchbeckens der Vorbehandlung Zone 10, z. B. durch UV-Bestrahlung oder Ozonbehandlung, wäre sicher sinnvoll. Auch eine regelmäßige Desinfizierung des zur Aufbereitung des VE-Wassers eingesetzten Kiesbettfilters, z. B. durch Rückspülung mit Wasserstoffperoxid, ist empfehlenswert.

➤ **Empfindlichkeit der Mikroorganismen gegenüber Bioziden: Gefahr der Resistenzbildung**

Im Bindemittel wird zur Konservierung der Elektrotauchlacke vom Hersteller ab Werk Silbernitrat eingesetzt. Sollten dennoch in der Elektrotauchanlage Mikroorganismen auftreten, wird mit dem Isothiazolinon „Chemfil“ eine Stoßdesinfektion durchgeführt.

In den in Abschnitt 3.2 beschriebenen Versuchen wurden die unteren Grenzen der Hemmkonzentration von Silbernitrat und Chemfil ermittelt. Dabei wurde festgestellt, daß die Empfindlichkeit der getesteten Organismen unterschiedlich war. Die Hemmkonzentration von Silbernitrat lag bei dem aus Düsseldorf stammenden *B. cepacia* (1992 isoliert aus KTL ohne AgNO_3) bei ca. 6 ppm Ag^+ . Der 1999 aus dem Minicoater (s. 2.6.2.2) isolierte *B. cepacia* wurde dagegen erst ab einem Silbergehalt von ca. 12 ppm abgetötet. Dies ist dadurch zu erklären, daß es sich bei den getesteten Reinkulturen um 2 Isolate unterschiedlicher Herkunft handelte. Im Gegensatz dazu wurden die in der HD-Boullion eingesetzten Zellen aus dem verkeimten KTL-Material (VA 51, s. 2.7.3) reisoliert. In diesem Fall waren jeweils ca. 5 ppm (VA 51, verkeimter ETL), bzw. 6 ppm Silberkationen (Inokulum für HD-Boullion aus VA 51 reisoliert, VA 88-90) notwendig, um ein Absterben von *B. cepacia* unter die Nachweisgrenze zu bewirken. Die in Elektrotauchlack benötigte Hemmkonzentration entspricht annähernd der in der HD-Boullion gemessenen. Die im Lackmaterial eingesetzten 5 ppm Silberkationen ab Werk liegen sehr nah an der untersten Hemmkonzentration. Durch eine dauerhafte Anwesenheit einer toxischen Substanz in niedrigen Konzentrationen besteht jedoch die Gefahr von Resistenzbildungen. Einige Plasmid-codierte Resistenzen gegenüber Silberionen wurden bereits unter anderem bei *Salmonella typhimurium* (Gupta et al., 1999), *E. coli* (Gupta et al., 1998; Starodub & Trevors, 1990, 1989; Grigor'eva et al., 1988; Savluk et al., 1988), *Acinetobacter baumannii* (Deshpande, 1994), *Pseudomonas stutzeri* (Slawson et al., 1994; Haefeli, et al., 1984), *Pseudomonas aeruginosa* (Vasishta, 1991), usw. beschrieben. Man muß also damit rechnen, daß die Empfindlichkeit der Mikroorganismen gegenüber den Ag^+ -Kationen durch den Selektionsdruck abnimmt. Die ab Werk eingesetzte toxische Hemmkonzentration von 5 ppm Ag^+ ist damit zu niedrig angesetzt und offensichtlich bei den aus CG 400 isolierten Keimen wirkungslos. Entsprechend besteht die Gefahr der Resistenzbildung auch gegenüber der zur Stoßdesinfektion eingesetzten Isothiazolinonen. Lange Zeit war keine Unempfindlichkeit hinsichtlich des Einsatzes von Isothiazolinonen bekannt. Erst 1999 wurden von Sondossi et al. Resistenzbildungen bei *Pseudomonas aeruginosa* gegenüber Chlormethylisothiazolinon beschrieben. Bei den in der KTL-Anlage Sindelfingen 34-I und -II aufgetretenen Verkeimungsvorfällen waren immer größere Mengen an Biozid erforderlich, um die Keime abzutöten. Auch bei den aus Elektrotauchlack isolierten

Mikroorganismen war eine Abnahme der Empfindlichkeit im Minimalmedium in Laborversuchen zu beobachten. So genügte bei dem aus dem Minicoater isolierten *B. cepacia* ein Chemfil-Gehalt von ca. 12 ppm, um die Zellen abzutöten. Bei dem im Dezember 1999 aus der Anlage Sindelfingen 34-I isolierten *Pseudomonas fluorescens* war dagegen 20 ppm Chemfil nicht mehr ausreichend, um ein Absterben der Bakterien zu bewirken. Daher empfiehlt es sich, ein alternatives Biozid bereit zu halten. Dabei sollte man eventuell auch den Einsatz von Giften in Erwägung ziehen, welche gezielt die Atmungskettenphosphorylierung bei aeroben Mikroorganismen hemmen (z. B. Natriumacid, Antimycin A), humanmedizinisch und umweltrechtlich jedoch unbedenklich sind. Beim Einsatz eines alternativen Biozids muß in jedem Fall die Materialverträglichkeit (Korrosion, Beschichtung) überprüft werden, sowie deren Einfluß auf die in der KTL-Anlage eingesetzten Membranen und andere Anlagenteile. Die beste Lösung wäre, die noch fehlenden Kenntnisse über die Ursachen der Verkeimbarkeit zu ermitteln, damit schon im Vorfeld eine Verkeimung unterbunden werden kann.

➤ **Hemmwirkung der Lacklösemittel**

Bei *Burkholderia cepacia* handelt es sich um einen Keim, der eine große Lösemitteltoleranz besitzt (Ensley and Kurisko, 1994). Er ist unter anderem in der Lage, Butylglycol, n-Propanol (Krieg et al., 1984), Trichlorethen (Sharp et al., 1998; Nelson et al., 1987, 1988), Toluol (Mars et al., 1996) und Phenol (Folsom et al., 1990) als Kohlenstoffquelle zu nutzen und zu mineralisieren. Bei den in Abschnitt 3.2.2 beschriebenen Versuchsergebnissen wurden die mittels GC/MSD ermittelten Lacklösemittel und 2 anorganische Säuren hinsichtlich ihrer Toxizität für *Burkholderia cepacia* untersucht. Unter den beschriebenen Bedingungen erwiesen sich in Minimalmedium (C-Quelle D-/L-Lactat) Butylglycol, Ethylbenzol, Xylol (Isomerengemisch) und Phenoxypropanol für *B. cepacia* als toxisch. Dabei muß beachtet werden, daß bei den Versuchsansätzen im geschlossenen System gearbeitet wurde. Die Probengefäße (Injektionsflaschen) waren mit teflonisierten Verschlusskappen gasdicht verschlossen und mit Sauerstoff unter Druck (0,5 bar) gesetzt. Im Gegensatz dazu handelte es sich bei der KTL-Anlage um ein offenes System, in dem Lösemittel aus dem Lackmaterial abdampfen können, bzw. durch die Ultrafiltration ausgetragen werden. Es kann somit kein direkter Vergleich gezogen

werden. Um genauere Aussagen über die im Elektrotauchlack erforderlichen Konzentrationen an den hemmenden Lösemittel machen zu können, müßte das Gesamtsystem betrachtet werden. Dabei könnten die Lösemittel, bzw. andere vorhandene, toxisch wirkende Substanzen, eine additive Hemmung des Keimwachstums bewirken. Die Versuchsergebnisse geben nur einen Hinweis darauf, auf welche Lacklösemittel im Elektrotauchlack in diesem Anteil nicht verzichtet werden sollte, um eine Verkeimung des KTL-Materials zu verhindern.

4.3 Monitoring der KTL-Anlage

Die KTL-Anlagen Sindelfingen 34-I und II wurden routinemäßig, die Anlagen anderer Werke der DaimlerChrysler AG bei Bedarf auf Mikroorganismen hin untersucht. Die isolierten Keime wurden mit dem API-Identifizierungssystem identifiziert und die Ergebnisse mittels dem BIOLOG-Identifizierungssystem (DaimlerChrysler Forschungszentrum, Ulm), bzw. 16 S rRNA-Analyse (Universität Hohenheim, Institut für Mikrobiologie) bestätigt.

➤ Analytik im Elektrotauchlack

☞ Chemische und biochemische Parameter

Im Zuge des Monitorings der KTL-Anlagen wurde das Material auf verschiedene Parameter hin untersucht (s. 3.3.1). Die Analytik des KTL Materials erwies sich jedoch als problematisch. Da sich die Pigmente bei den meisten Methoden störend auswirkten und nur schwer vom Bindemittel zu trennen waren, konnten einige davon im Elektrotauchlack selbst nicht bestimmt werden (TC, TOC, einige Mineralsalze und Schwermetalle). In diesem Fall konnten nur Rezirkulat-Proben untersucht werden. HPLC und GC konnten nur mit Ultrafiltrat-Proben durchgeführt werden. Die enzymatischen Glucose-, Lactat-, und Acetat-Bestimmungen konnten soweit modifiziert werden, daß eine Messung direkt im KT-Lack möglich war (s. 2.4.3).

Mikrobiologische Methoden

Eine lichtmikroskopische Untersuchung von den KTL- und Rezirkulat-Proben war nicht möglich, da die Pigmentgröße (0,5-2 µm) der Größe der Mikroorganismen entsprach. Vorhandene Bakterien wurden durch die Pigmentpartikel entweder verdeckt oder konnten nicht von ihnen unterschieden werden. Dasselbe galt auch für die Fluoreszenzmikroskopie. Bei der Acridinorangefärbung waren die Zellen erst ab einer Lebenkeimzahl $>10^6$ K/ml zu erkennen. Eine Quantifizierung war jedoch aus den oben genannten Gründen nicht möglich und für eine qualitative Aussage wäre eine untere Nachweisgrenze von mindestens $\leq 10^3$ K/ml erforderlich gewesen. Auch mit Hilfe verschiedener Zentrifugationsmethoden (Dichtegradientenzentrifugation, Ultrazentrifugation, Fa. BASF, Limburgerhof) waren die Pigmentpartikel nicht von den Mikroorganismen zu trennen. Erprobt wurden auch die Proteinbestimmungsmethoden nach Biuret und Bradford, allerdings ohne Erfolg. Eine Bestimmung von Stoffwechselprodukten zur Früherkennung eines mikrobiellen Befalls der KTL-Anlage schied aus, da selbst in einem seit einigen Monaten stark verkeimten Material keine Metaboliten gefunden werden konnten (Fa. BASF, Münster). Bis heute wird deshalb in allen Werken die Lebendkeimzahl mit Hilfe von „Dipslides“ bestimmt. Das Problem dabei ist, daß auch hier nicht direkt im Lack eingetaucht werden kann. Die Lackprobe muß 1:10 verdünnt werden, um auf dem Teststäbchen eventuell vorhandene Bakterien erkennen zu können. Dadurch erhält man wiederum eine Erhöhung der unteren Nachweisgrenze, was eine Früherkennung verzögert. Ein weiterer Nachteil dieser Dipslides ist es, daß nicht alle Mikroorganismen auf den entsprechenden Nährböden wachsen (in Sindelfingen *Bacillus mycoides*) und so eventuell neu auftretende Keime nicht, oder zu spät bemerkt werden. In dieser Arbeit wurden die Lebendkeimzahlen durch Ausstreichen einer logarithmischen Verdünnungsreihe auf verschiedene Nährböden bestimmt (s. 2.8). Auch hier war nicht sichergestellt, daß alle im Elektrotauchlack vorgekommenen Zellen auf diesen Agars kultivierbar waren. *Burkholderia cepacia* wuchs sowohl auf den von den Anlagenbetreuern eingesetzten Dipslides, als auch auf allen verwendeten Nährböden. Ein gemeinsamer Nachteil beider Methoden ist die notwendige, relativ lange Bebrütungszeit. KTL-Material wirkt sich hemmend auf das Wachstum der Keime aus, so daß eine Auswertung der Proben frühestens nach 2-3 Tagen möglich ist.

Im Falle einer Verkeimung mit den bisher isolierten *B. cepacia* reicht diese Zeit jedoch aus. In Laborversuchen im geschlossenen System waren beginnende Beschichtungsstörungen erst nach ca. zweiwöchigem Wachstum der Zellen im Elektrotauchlack zu beobachten (s. 3.1.1.2). Ein neues Verfahren zum schnelleren Nachweis der Mikroorganismen und Herabsetzen der unteren Nachweisgrenze durch Immunomagnetische Separation wird derzeit im Forschungszentrum Ulm der DaimlerChrysler AG auf seine Durchführbarkeit in KTL-Material getestet.

➤ **Lebendkeimzahlen in den verschiedenen KTL-Anlagenteilen**

In Abschnitt 3.3.2 wurde erläutert, daß die aus den KTL-Anlagen isolierten Mikroorganismen vermutlich durch den VE-Wasser-Zulauf, bzw. durch Abtropfwasser (E-Wasser) der letzten Spülzone der Vorbehandlung in die KTL-Anlage eingeschleppt wurden. Vom Dezember 1997 bis zum November 1999 war der Beginn einer Verkeimung von Elektrotauchanlagen ausnahmslos in den Rezirkulationszonen zu beobachten. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß im Lackmaterial toxisch wirkende Substanzen in den Spülzonen in tolerierbaren Konzentrationen vorliegen. Silbernitrat z. B. ist laut Hersteller nicht Ultrafiltrationsgängig und demnach nur durch Verschleppung über die Karossen aus dem Lackierbecken, in nicht mehr nachweisbaren Mengen, im Rezirkulat enthalten. Auch der Gesamtlösemittelanteil ist in Spülzonen um bis zu 80 % reduziert, wobei nach Ultrafiltrierung die für *B. cepacia* toxisch wirkenden Aromaten nicht mehr im Rezirkulat enthalten sind (s. 3.1.2.2). Bis November 1999 war *B. cepacia* der einzige Keim, der aus allen KTL-Proben isoliert wurde und Beschichtungsstörungen verursachen konnte. Ende August 1999 wurde die KTL-Anlage Sindelfingen 34-I auf ein neues Bindemittel umgestellt, in dem Phenoxypropanol (PPH) durch ein anderes Lösemittel (Polyether) ersetzt worden war. Nach einem beinahe vollständigen Austausch (Umkompensierung, ca. nach 2-3 Turnover) trat im November 1999 eine Verkeimung auf, die erstmals schlagartig im Lack selbst begann und sich dann erst in den Spülzonen ausbreitete. Es ist naheliegend, daß durch das Fehlen des toxisch wirkenden PPH ein Befall des Elektrotauchlacks begünstigt wird. Der PPH-Gehalt lag zum Zeitpunkt der Verkeimung bei 0,12 % (Fa. BASF, Münster) wobei die in den Hemmversuchen (im Minimalmedium) ermittelte toxische Konzentration bei 0,3 % lag (s. 3.2.2). Auch gilt es zu überprüfen, welchen Einfluß das neue Bindemittel auf das

Wachstum von *B. cepacia* hat (Nutzung als C-Quelle, Toxizität). Da nicht alle Änderungen bekannt waren, die vom Hersteller am Bindemittel vorgenommen worden waren, wäre auch eine Untersuchung des Gesamtsystems hinsichtlich Verkeimbarkeit sicher sinnvoll.

Auffällig an diesem Bakterienvorfall war, daß drei mal die ca. 3-fache Menge als bisher nötig (3 mal 60 kg/260 m³) an Biozid eingesetzt werden mußte, um die aufgetretenen Mikroorganismen abzutöten. Der Verdacht, daß die Empfindlichkeit der Keime gegenüber dem Isothiazolinon abnimmt, wurde dadurch noch erhärtet. Neben *Burkholderia cepacia* wurde erstmals *Pseudomonas fluorescens* aus Elektrotauchlack isoliert. Die beiden Spezies sind sich hinsichtlich des verwertbaren, breiten Substratspektrums sehr ähnlich (Krieg et al., 1984). Daher liegt die Vermutung nahe, daß auch dieser Organismus dazu in der Lage ist, Beschichtungsstörungen zu verursachen. Eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Isothiazolinon im Vergleich mit *B. cepacia*, wurde durch die Ergebnisse, die in Abschnitt 3.2.4 beschrieben sind, bestätigt.

➤ **Molekularbiologische Untersuchungen**

Zwischen verschiedenen Isolaten von *Burkholderia cepacia* (isoliert von Patienten mit cystischer Fibrose, bzw. der Umwelt) wurden genotypische und phenotypische Unterschiede festgestellt (Wigley & Burton, 1999). Diese genetischen Unterschiede zwischen den Stämmen scheint charakteristisch für *B. cepacia* zu sein (Lessie, 1996). Mit Hilfe einer Pulsed Field Gelelektrophorese wurde in der vorliegenden Arbeit die Plasmid-DNA einiger Isolate von *B. cepacia*, die aus Elektrotauchlacken und VE-Wasser verschiedener Werke der DaimlerChrysler AG isoliert wurden, untersucht und mit den DSM-Stämmen verglichen. Mit Ausnahme von einem Isolat waren bei allen ein oder mehrere Plasmide zu erkennen (s. 3.3.7). Dabei unterschieden sich die einzelnen Isolate in Anzahl und Größe ihrer Plasmid-DNA. Das deutete darauf hin, daß sich die Mikroorganismen offenbar durch den Selektionsdruck, der in der jeweiligen Anlage herrschte, genetisch ungleich veränderten und sich deshalb in ihrer Plasmidausstattung unterschieden. Wie in Abschnitt 4.2 beschrieben sind einige Silberresistenzen bei Pseudomonaden bekannt, die Plasmid-codiert sind. Der Schritt zur Silberresistenz bei *Burkholderia cepacia* und *Pseudomonas fluorescens* ist damit nicht mehr groß, da Genaustausch

durch natürlich ablaufende Konjugation und Mobilisierung von Genen durch Plasmide bereits bekannt sind (Schlegel, 1992).

4.3 Ausblick

In diesem Abschnitt sollen nochmals die Maßnahmen zusammengefaßt werden, die gegen eine Verkeimung von Elktrotauchlack unternommen werden könnten.

⇒ Lösungsvorschläge zur Vermeidung der Keimentwicklung

➤ VE-Wasser

☞ Zur Minderung des Keimeintrages sollten die VE-Wasser-Zuläufe zum KTL-Becken sterilisiert werden. Dies betrifft die VE-Wasserzuspeisung (ca. 1.000 l/Tag) und die Zone 10 der Vorbehandlung (EW-Tauchspüle). Aus der Vorbehandlung werden täglich ca. 5.000 l E-Wasser über die Karossen in die KTL-Anlage eingeschleppt. Denkbar wäre UV-Bestrahlung oder Ozonbehandlung, bzw. die Dosierung eines Giftes, das gezielt die Atmungskettenphosphorylierung aerober Bakterien inhibiert. Denkbar, aber voraussichtlich nicht praktikabel, wäre z. B. auch eine Zugabe für gramnegative Keime spezifischer, lytischer Phagen.

☞ Eine nachweisliche Keimquelle stellt das Kiesfilter vor den Ionenaustauschern dar. Hier könnte durch häufiges Rückspülen und Desinfizieren mittels Wasserstoffperoxid ein Keimwachstum verringert werden. Eine weitere Keim-Quelle stellt der Ionenaustauscher und der Transportweg des VE-Wassers über das Verteilernetz dar. Vorstellbar wäre eine dezentrale VE-Wasseraufbereitung vor Ort.

➤ Lösemittel

☞ Da Lösemittel im Lackmaterial nachweislich toxische Wirkung auf Bakterien besitzen, sollte auf die für *B. cepacia* letalen Lacklösemittel im Tauchlack nicht verzichtet werden. Die Konzentrationen von Phenoxypropanol, Ethylbenzol und Xylol (Isomergemisch) sollten jeweils einen Anteil von 0,3 %, bzw. je 0,03 % nicht unterschreiten.

➤ Neutralisationsmittel

☞ Da die in der derzeitigen Lackformulierung enthaltenen organischen Säuren (L-Lactat, Acetat) von *B. cepacia* als Nährstoffquelle genutzt werden kann,

sollte ein Austausch gegen nicht verwertbare organische (z. B. Formiat, D-Tartrat, D-Mandelat, Oxalat, usw.) oder aber auch anorganische Säuren in Erwägung gezogen werden.

➤ **Biozid**

- ☞ Um eine allmähliche Adaptation durch Selektionsdruck und Mutation der Bakterien an Biozide zu vermeiden, sollte bei der Bioziddosierung jeweils mit einer großen Menge stoßdesinfiziert werden, anstatt dauerhaft niedrige Konzentrationen im KTL-Bad aufrecht zu erhalten.
- ☞ Der Anteil an im Lackmaterial enthaltenem Silbernitrat sollte erhöht werden, um so eine sicherere Konservierung zu erreichen.
- ☞ Zur Absicherung der Produktion sollte ein alternatives Biozid bereitgestellt werden.

➤ **Durchsatz**

- ☞ Geringere Durchsätze vermindern den Turnover in der Anlage. Damit wird eine Anreicherung der Keime im KTL-Bad, sowie das Abdampfen der toxischen Lacklösemittel möglich. Es ist darauf zu achten, daß die Durchsatzleistung auf gleichbleibend hohem Niveau gehalten wird.

➤ **Anlagenüberwachung**

- ☞ Die derzeit eingesetzte mikrobiologische Überwachungsmethode mit „Dipslides“ ist ungenau, schlecht reproduzierbar und langsam. Es sollte eine verbesserte Überwachungsmethode eingeführt werden. Hierzu laufen zur Zeit Untersuchungen im Forschungszentrum Ulm der DaimlerChrysler AG.

➤ **Ursachenfindung**

- ☞ Die bisher noch unbekanntem toxisch wirkenden Substanzen sollten identifiziert werden, um die Vorgänge, die zur Verkeimbarkeit führen, noch näher bestimmen zu können. Auch sollte der Einfluß, den die Ultrafiltration auf die Konsistenz und die Verkeimbarkeit des KT-Lacks hat, geklärt werden.
- ☞ Der Einfluß des Wachstums von *Pseudomonas fluorescens* in Elektrotauchlack sollte untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Nach Umstellung auf umweltverträglichere Lackmaterialien (Reduzierung der biozid wirkenden Lösemittel, Schwermetalle) in Elektrotauchanlagen traten im Werk Sindelfingen und anderen Werken der DaimlerChrysler AG vermehrt Beschichtungsstörungen bei Karossen auf. Dabei war ein pH-Anstieg des Lackmaterials, Schichtdickenanstieg, Abblättern des Lacks („Striptease“ Effekt), Oberflächenstörungen (Pusteln, Blasen, Krater), schlechter Umgriff, eine Bildung von Lackschlamm und geringerer Schichtwiderstand zu beobachten. Gleichzeitig wurde eine erhöhte Anzahl von Mikroorganismen im Lackbad nachgewiesen. Dies führte unter erheblichem Kostenaufwand teilweise zur Notwendigkeit, die Becken völlig neu mit Elektrotauchlack zu befüllen und das alte Material als Sondermüll zu entsorgen. Es war nicht geklärt, ob die Beschichtungsstörungen durch mikrobiologische oder chemische Faktoren hervorgerufen wurden. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Ursachen der aufgetretenen Beschichtungsstörungen zu ermitteln. Dabei konnte erstmals eindeutig gezeigt werden, daß die entstandenen Lackschäden durch einen mikrobiellen Befall des KT-Lacks hervorgerufen wurden und nicht durch chemische Faktoren bedingt waren. Aus dem Elektrotauchlack konnte bisher hauptsächlich *Burkholderia cepacia* isoliert werden. Mit diesem Keim wurden Wachstums- und Hemmversuche durchgeführt. Darüber hinaus wurde die KTL-Anlage 34-II in Sindelfingen routinemäßig mikrobiologisch untersucht, im Schadensfall auch Anlagen anderer Werke der DaimlerChrysler AG. Die jeweils isolierten Mikroorganismen wurden identifiziert und ihr Einfluß auf den Beschichtungsprozess überprüft. Aus den Untersuchungen ergaben sich folgende Ergebnisse:

- Die bisher beobachteten Lackierschäden wurden durch den mikrobiellen Befall von Elektrotauchlack mit *B. cepacia* verursacht. Dabei hatte das alleinige Vorhandensein von Biomasse (tote, aufgeschlossene und lebende Zellen) keinen Einfluß auf das Abscheideverhalten.
- Frisch angesetzter Elektrotauchlack ist nicht verkeimbar.

- Beschichtungsstörungen traten nachweislich durch in KT-Lack wachsende, stoffwechselnde Zellen von *Burkholderia cepacia* auf. Die Oberflächenstörungen sind dabei einerseits auf den Verbrauch der Neutralisationsmittel L-Lactat und Acetat bei gleichzeitigen pH-Anstieg im Badmaterial, andererseits auf das Ausscheiden von Stoffwechselprodukten zurückzuführen. Nur durch Konstanthaltung des pH-Wertes konnten Störungen bei der Lackabscheidung nicht verhindert werden.
- Von den getesteten, für *B. cepacia* nicht verwertbaren, organischen und anorganischen Säuren wirkte sich keine letal auf *B. cepacia* aus. L-Lactat, D-Lactat, Acetat, Maleat und Itaconat konnte von den Keimen als C-Quelle genutzt werden. Formiat, D-Tartrat, D-Mandelat, Oxalat und Phthalat wurden dagegen nicht verwertet und könnten als alternative Neutralisationsmittel eingesetzt werden. Zur Neutralisation könnten auch anorganische Säuren verwendet werden.
- Die Lacklösemittel Ethylbenzol (toxisch ab 0,03 %), Xylol (Isomerengemisch, toxisch ab 0,03 %), Phenoxypropanol (toxisch ab 0,3 %) und Butylglycol (ab 0,4 % wachstumshemmend, ab 1% toxisch) wirkten in Minimalmedium auf *B. cepacia* toxisch.
- Die Hemmkonzentration von Silberkationen lag bei 12 ppm, die des Biozids Chemfil bei 16 ppm in Minimalmedium. In ETL lag die Hemmkonzentration bei 8 ppm Chemfil. Diese Werte sollten im Lackmaterial eingehalten werden, um eine Verkeimung zu erschweren.
- Aus Elektrotauchlack wurde in der vorliegenden Arbeit von Dezember 1997 bis November 1999 ausschließlich *B. cepacia* isoliert. In den Spülzonen der KTL-Anlage und der Vorbehandlung wurden neben diesem Keim außerdem *Bacillus mycoides* und *Bacillus cereus* nachgewiesen. Aus dem VE-Wasser wurde das Vorhandensein von *B. cepacia* nachgewiesen. Im November 1999 wurde erstmals der Keim *Pseudomonas fluorescens* aus Lack isoliert. Zur Abtötung von *P. fluorescens* war eine Chemfil-Konzentration von ca. 18 ppm nicht ausreichend. Die Empfindlichkeit der Keime gegenüber Isothiazolinon, bzw. Silberkationen nahm ab.

- Bei einem Vergleich der Plasmid-DNA einiger Isolate von *B. cepacia* verschiedener Herkunft wurden mittels PFGE Unterschiede in Plasmidgröße und Anzahl der Plasmide festgestellt. Das macht deutlich, daß möglicherweise eine Adaptation der Keime durch Selektionsdruck im KT-Lack stattfand.
- Mit Hilfe einer Fed Batch Prozeßführung konnte gezeigt werden, daß durch die sukzessive Erhöhung des KTL-Materials eine Adaptation von *B. cepacia* an unverdünnten Elektrotauchlack (mit Silbernitrat) erfolgt.
- Die Ursachen, die zur Verkeimbarkeit des KTL-Materials führen, sind sehr vielfältig. In dieser Arbeit konnten jedoch wichtige Faktoren aufgeklärt werden.
 - ☞ Der Gesamtlösemittelgehalt des verkeimbaren Lacks liegt im Laborversuch (Minicoater) im Vergleich zu frisch angesetztem, nicht verkeimbaren Lacks um ca. 75 % niedriger. Ethylbenzol, Xylol und iso-Butanol sind nicht mehr im KTL-Material enthalten.
 - ☞ Nach Ultrafiltration in der KTL-Anlage können die Lösemittel Ethylbenzol und die Isomeren von Xylol nicht mehr im Permeat nachgewiesen werden. Das Fehlen dieser für *B. cepacia* toxischen Aromaten erleichtert den Beginn der Verkeimung in den Spülzonen.
 - ☞ Die Lackierschäden verursachenden Mikroorganismen werden durch den VE-Wasser-Zulauf, bzw. durch das Abtropfwasser der Karossen aus der Vorbehandlung direkt in das Lackbad eingeschleppt. Bei gealtertem Lackmaterial verursachte im Laborversuch der Verdunstungsausgleich mit VE-Wasser (Dies wird auch in der Praxis handgehabt.) eine Verkeimung.
 - ☞ Durch einen geringen Durchsatz an Karossen wird der Turnover der Elektrotauchanlage erniedrigt. Dadurch wird eine Anreicherung der eingetragenen Keime im KTL-Bad, sowie das Abdampfen der auf die Keime toxisch wirkenden Lösemittel verursacht.
 - ☞ Die Empfindlichkeit der aus KTL-Material isolierten Keime gegenüber Silberkationen aus Lackmaterial, bzw. dem Biozid Chemfil (Wirkstoff Isothiazolinon) sank.

Literaturverzeichnis

Aoki, M., Uehara, K., Koseki, K., Tsuji, K., Iijima, M., Ono, K., Samejima, T.

(1991). An antimicrobial substance produced by *Pseudomonas cepacia* B5 against the bacterial wilt disease pathogen, *Pseudomonas solanacearum*, J. Agric. Biol. Chem., 55, 715-722

Aronoff, S. C. (1988). Outer Membrane Permeability in *Pseudomonas cepacia*:

Diminished Porin content in a β -Lactam-Resistant Mutant and in Resistant Cystic Fibrosis Isolates, Antimicrob. Agents Chemother., 32, 1636-1639

Avakyan, Z. A. (1966). Comparative toxicity of heavy metals for certain microorganisms, Microbiologia, 36, 446-450

Ballard, R. W., Palleroni, N. J., Doudoroff, M., Stanier, R. (1970). Taxonomy of the Aerobic Pseudomonads: *Pseudomonas cepacia*, *P. marginata*, *P. alliiicola* and *P. caryophylli*, J. Gen. Microbiol., 60, 199-214

Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K. H. (1992). The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications, Second Edition, Springer Verlag New York Berlin Heidelberg London Paris Tokyo Hong Kong Barcelona Budapest

Banerij-Shankha, K., Bajpai-Rakesh, K.(1994). Cometabolism of pentachlorophenol by microbial species, J. of Hazardous Materials, 39, 19-31

BASF Broschüre (1994). Elektrotauchlackierung für die industrielle Metallbeschichtung, 1. Grundlagen.

BASF Broschüre (1994). Elektrotauchlackierung für die industrielle Metallbeschichtung, 3. Verfahrenstechnik.

Beckmann, W., Lessie, T. G. (1979). Response of *Pseudomonas cepacia* to β -

- Lactam Antibiotics: Utilisation of Penicillin G as the Carbon Source, J. Bacteriol., 140, 1126-1128
- Bornscheuer, U., Reif, O. W., Lausch, R., Freitag, R., Scheper, T., Kolisis, F. N., Menge, U.** (1994). Lipase of *Pseudomonas cepacia* for biotechnological purposes: purification, crystallisation and characterisation, J. Biochem. Biophys. Acta., 1201, 55-60
- Brunt, K.** (1996). Novel approach to biocontrol in waterborne coatings, Polymers, Paint Colour Journal, 186, 15-18
- Burns, J. L., Hedin, L. A., Lien, D. M.** (1989). Chloramphenicol resistance in *Pseudomonas cepacia* because of decreased permeability, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 33, 136-141
- Cartwright, D. K., Chilton, W. S., Benson, D. M.** (1995). Pyrrolnitrin and phenazine production by *Pseudomonas cepacia*, strain 5.5B, a biocontrol agent of *Rhizoctonia solani*, J. Appl. Microbiol. and Biotechnol., 43, 211-216
- Carson, L. A., Petersen, N. J.** (1975). Photoreactivation of *Pseudomonas cepacia* after Ultraviolet Exposure: a Potential Source of Contamination in Ultraviolet-Treated Waters, J. Clin. Microbiol., 1, 462-464
- Carson, L. A., Favero, M. S., Bond, W. W., Petersen, N. J.** (1972). Morphological, Biochemical and Growth Characteristics of *Pseudomonas cepacia* from Distilled Water, J. Appl. Microbiol., 25, 476-483
- Chang, H. K., Zylstra, G. J.** (1998). Novel organization of the genes for phthalate degradation from *Burkholderia cepacia* DBO1, J. Bacteriol., 180, 6529-6537
- Choudhury, P., Kumar, R.** (1996). Association of metal tolerance with multiple antibiotic resistance of enteropathogenic organisms isolated from coastal region of deltaic Sunderbans, Indian. J. Med. Res., 104, 148-151

- Craven, D., Moody, B., Connolly, M. G., Kollisch, N. R., Stottmeier, K. D., McCabe, W. R.** (1981). Pseudobacteremia caused by povidone-iodine solution contaminated with *Pseudomonas cepacia*, *J. Med.*, 305, 621-623
- Darling, P., Chan, M., Cox, A. D., Sokol, P. A.** (1998). Siderophore production by cystic fibrosis isolates of *Burkholderia cepacia*, *J. Infect. Immun.*, 66, 874-877
- Dalton, D. L.** (1988). Novel non-metallic fungicide for aqueous coatings, *Polymers Paint Colour Journal*, 179, 149-150
- Daugherty, D. D., Karel, S. F.** (1994). Degradation of 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid by *Pseudomonas cepacia* DB01 (pRO101) in dual-substrate chemostat, *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 3261-3267
- Deitch, E. A., Marino, A. A., Malakanok, V., Albright, J. A.** (1987). Silver nylon cloth: in vitro and in vivo evaluation of antimicrobial activity, *J. Trauma*, 27, 301-304
- Derzharin, A. E., Turchaninov, R. O., Ozarianskaia, N. M.** (1987). Problems and prospects for the clinical use of silver preparations, *Vestn. Khir.*, 135, 71-75
- Desai, M., Buhler, T., Weller, P. H., Brown, M. R.** (1998): Increasing resistance of planktonic and biofilm cultures of *Burkholderia cepacia* to ciprofloxacin and ceftazidime during exponential growth, *J. Antimicrob. Chemother.*, 42, 153-160
- Deshpande, L. M., Chopade, B. A.** (1994). Plasmid-mediated silver resistance in *Acinetobacter baumannii*, *J. Biometals*, 7, 49-56
- Dott, W.** (1983). Qualitative und quantitative Bestimmung von Bakterienpopulationen aus aquatischen Biotopen. Wiederverkeimung von Trinkwasser, *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B*, 178, 263-279
- el-Banna, N., Winkelmann, G.** (1998). Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*:

- antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes, J. Appl. Microbiol., 85, 69-78
- Eagon, R. C.** (1984). The resistance characteristics of *Pseudomonas*, Dev. Ind Microbiol., 25, 337-348
- Ensley, B. D., Kurisko, P. R.** (1994). A gas bioreactor for removal of contaminants from the vapor phase, Appl. Environ. Microbiol., 60, 285-290
- Fetzner, S., Mueller, R., Lingens, F.** (1991). Degradation of 2-Chlorobenzoate by *Pseudomonas cepacia* 2CBS, Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 370, 1173-1182
- Flanagan, P. G., Paull, A.** (1998). Isolation of *Burkholderia cepacia* by enrichment, J. Clin. Pathol., 51, 557-558
- Flemming, H.-C.** (1993). Biofilme in der Wassertechnologie und ihre unerwünschten Effekte, Habilitation Univ. Stuttgart
- Folsom, B. R., Chapman, P. J., Pritchard, P. H.** (1990). Phenol and trichloroethylene degradation by *Pseudomonas cepacia* G4: Kinetics and interactions between substrates, J. Appl. Environ. Microbiol., 56, 1279-1285
- Fowler, B. A., Nordbert, G. F.** (1979). Silver, Handbook on the Toxicology of Metals, Biomed. Press, Elsevier/North-Holland, 579-586
- Gannon, J., Hunt, T.** (1997). Why bacteria create Problems in Electrocoat Systems, DuPont Central Research & Development, Wilmington, Delaware; DuPont Automotive Products, Mt. Clements, Michigan, Congress Electrocoat 1997, Orlando, Florida
- Gillatt, J.** (1993). Microbial protection of waterborne paint formulations, Polymers Paint Colour Journal, 183, 222-224
- Geer, C. W., Hawari, J., Samson, R.** (1990). Influence of environmental factors on 2,

- 4-dichlorophenoxyacetic acid degradation by *Pseudomonas cepacia* isolated from peat, J. Arch. of Microbiol., 154, 317-322
- Grigor'eva, L. V., Potapchenko, N. G., Savchuk, O. S., Erusalimskaia, L. F., Rusakova, L. T.** (1988). Resistance of pathogenic *Escherichia coli*, isolated from the environment, to silver and antibiotics, J. Gig Sanit, 8, 22-23
- Gupta, A., Matsui, K., Lo, J. F., Silver, S.** (1999). Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*, J. Nat. Med., 5, 183-188
- Gupta A., Maynes, M., Silver, S.** (1998). Effects of halides on plasmid-mediated silver resistance in *Escherichia coli*, J. Appl. Environ. Microbiol., 64, 5042-5045
- Haefeli, C., Franklin, C., Hardy, K.** (1984). Plasmid-determined silver resistance in *Pseudomonas stutzeri* from a silver mine, J. Bacteriol., 158, 389-392
- Hansen, K.** (1997). Biological discolouration of wood finishes, Polymers Paint Colour Journal, 187, 21-23
- Hardy, P. C., Ederer, G. M., Matsen, J. M.** (1970). Contamination of commercially packed urinary catheter kits with the pseudomonad EO-1, N. Engl. J. Med., 282, 33-35
- Hasenmeier, L.** (1997). Optimierung von Prüfverfahren zur Beurteilung neuer Biozide, wissenschaftliche Arbeit, durchgeführt bei der DaimlerChrysler AG, Werk Untertürkheim, Abt. EP/QWT
- Horuchi, K., Morimoto, K., Ohta, T., Suemitsu, R.** (1993). Biotransformation of benzyl alcohol by *Pseudomonas cepacia*, BioSc., Biotechnol. Biochem., 57, 1346-1347
- Hubner, A., Danganan, C. E., Xun, L., Chakrabarby, A. M., Hendrickson, W.** (1998). Genes for 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid metabolism in *Burkholderia cepacia* AC1100: characterization of the tftC and tftD genes and

- locations of the tft operons on multiple replicons, *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2086-2093
- Jacobi, G. A., Sutton, L.** (1989). *Pseudomonas cepacia* susceptibility to Sulbactam, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33, 583-584
- Ji, G., Silver, S.** (1995). Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern, *J. Ind. Microbiol.*, 14, 61-75
- Johansen, H. K., Kovesi, T. A., Koch, C., Corey, M., Hoiby, N., Levison, H.** (1998). *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* infection in cystic fibrosis patients treated in Toronto and Copenhagen, *J. Pediatr. Pulmnl.*, 26, 89-96
- Kang, Y., Carlson, R., Tharpe, W., Schnell, M. A.** (1998). Characterization of genes involved in biosynthesis of a novel antibiotic from *Burkholderia cepacia* BC11 and their role in biological control of *Rhizoctonia*, *J. Appl. Environ. Microbiol.*, 10, 3939-3947
- Kaur, P., Vadehra, D. V.** (1986). Mechanism of resistance to silver ions in *Klebsiella pneumoniae*, *J. Antimicrob. Agents Chemother.*, 29, 165-167
- Kilbane, J. J., Chatterjee, D. K., Karns, J. S., Kellogg, S. T., Chakrabarty, A. M.** (1982). Biodegradation of 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid by a pure culture of *Pseudomonas cepacia*, *J. Appl. Environm. Microbiol.*, 44, 72-78
- Klee, O.** (1990). Wasser untersuchen. Einfache Analysenmethoden und Beurteilungskriterien, Quelle & Meyer Verlag, Heidelberg/Wiesbaden
- Krieg, R., Holt, G., Murray, R. G. E., Brenner, D. J., Bryant, M. P., Moulder, J. W., Pfennig, N., Sneath, P. H. A., Staley, J. T.** (1984). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 1, Williams & Wilkins, Baltimore, Hong Kong, London, Sydney

- Kunz, P.** (1992). Gezüchtete Mikroorganismen in Abwasser-Reinigungsanlagen. Möglichkeiten und Grenzen, Expert Verlag, Ehningen
- Lessie, T. G.** (1996). Genomic plasticity and catabolic potential of *Pseudomonas cepacia*, J. Appl. Environ. Microbiol., 54, p. 10
- LiPuma, J. J.** (1998). *Burkholderia cepacia*. Management issues and new insights, J. Clin. Chest. Med., 19, 473-486
- Livesley, M. A., Baxter, I. A., Lambert, P. A., Govan, J. R., Weller, P. H., Lacey, K. E., Allison, D. G., Giwercman, B., Hoiby, N.** (1998). Subspecific differentiation of *Burkholderia cepacia* isolates in cystic fibrosis, J. Med. Microbiol., 47, 999-1006
- Luu, P. P., Yung, C. W., Sun, A. K., Wood, T. K.** (1995). Monitoring trichloroethylene mineralization by *Pseudomonas cepacia* G4 PR1, J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 44, 259-264
- Marino, A. A., Deitch, A. A., Albright, J. A.** (1985). Electric silver antisepsis, IEEE Trans. Biomed. Eng., 32, 336-337
- Martin, G., Dijols, S., Capeillere-Blandin, C., Artaud, I.** (1999). Hydroxylation reaction catalyzed by the *Burkholderia cepacia* AC1100 bacterial strain. Involvement of the chlorophenol-4-monooxygenase, Eur. J. Biochem., 261, 533-539
- Mars, A., Houwing, J., Dolfing, J., Janssen, D. B.** (1996). Degradation of toluene and trichloroethylene by *Burkholderia cepacia* G4 in growth-limited fed-batch culture, Appl. Environ. Microbiol., 62, 886-891
- Massol-Deya, A., Weller, R., Rios-Hernandez, L., Zhou, J. Z., Hickey, R. F., Tiedje, J. M.** (1997). Succession and convergence of biofilm communities in fixed-film reactors treating aromatic hydrocarbons in groundwater, J. Appl. Environ. Microbiol., 63, 270-276

- McManus, A. T., Denton, C. L., Mason, A. D., Jr.** (1983). Mechanisms of in vitro sensitivity to sulfadiazine silver, *J. Arch. Surg.*, 118, 161-166
- Meyer, J.-M., Honadel, D., Hallé, F.** (1989). Cepabactin from *Pseudomonas cepacia*, a new type of siderophore, *J. Gen. Microbiol.*, 135, 1479-1487
- Mitomo, H., Takahashi, T., Ito, H., Saito, T.** (1999). Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) produced by *Burkholderia cepacia* D1, *Int. J. Biol. Macromol.*, 24, 311-318
- Modak, S. M., Sampath, L., Fox, C. L., Jr.** (1988). Combined topical use of silver sulfadiazine and antibiotics as a possible solution to bacterial resistance in burn wounds, *J. Burn. Care. Rehabil.*, 9, 359-63
- Moore, R. A., Hancock, E. W.** (1986). Involvement of outer membrane of *Pseudomonas cepacia* in aminoglycoside and polymyxin resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 30, 923-926
- Nakahara, N., Yonekura, L., Sato, A., Moriyama, K., Kobayashi, Y., Mori, T., Chino, M.** (1989). Plasmid-determined resistance to silver in *Enterobacter cloacae* isolated from sewage, *Water Sci. Technol.*, 21, 275-278
- Nakazawa, T., Yamada, Y., Ishibashi, M.** (1986). Characterization of hemolysin in Extracellular Products of *Pseudomonas cepacia*, *J. Clin. Microbiol.*, 2, 195-198
- Nelson, M. J. K., Montgomery, S. O., Mahaffey, W. R., Pritchard, P. H.** (1987). Biodegradation of trichloroethylene and involvement of an aromatic biodegradative pathway, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 949-954
- Nelson, M. J. K., Montgomery, S. O., Pritchard, P. H.** (1988). Trichloroethylene metabolism by microorganisms that degrade aromatic compounds, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 604-604
- Parr, T. R., Moore, R. A., Moore, L. V., Hancock, R. E. W.** (1986). Role of Porins in

- Intrinsic Antibiotic Resistance of *Pseudomonas cepacia*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 31, 121-123
- Pfeifer, F., Schacht, S., Klein, J., Truepper, H. G.** (1989). Degradation of diphenylether by *Pseudomonas cepacia*, J. Arch. Microbiol., 152, 515-519
- Pfeifer, F., Trueper, H. G., Klein, J., Schacht, S.** (1993). Degradation of diphenyl ether by *Pseudomonas cepacia* Et4: enzymic release of phenol from 2, 3-dihydroxydiphenyl ether, Arch. Microbiol., 159, 232-329
- Prakash, D., Chauhan, A., Jain, R. K.** (1996). Plasmid-encoded degradation of p-nitrophenol by *Pseudomonas cepacia*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 224 375-381
- Prieto, M. J., Sabate, J., Villaneuva, A.** (1994). Isolation and characterization of a mercury-resistant broad-host-range plasmid from *Pseudomonas cepacia*, FEMS Microbiol. Letters, 119, 345-350
- Pyle, B. H., Watters, S. K., McFeters, G. A.** (1994). Physiological aspects of disinfection resistance in *Pseudomonas cepacia*, J. Appl. Bacteriol., 76, 142-148
- Palleroni, N. J., Holmes, B.** (1981). *Pseudomonas cepacia* sp. nov., nom. rev., Int. J. Syst. Bacteriol., 31, 479-481
- Quyen, D. T., Schmidt-Dannert, C., Schmid, R. D.** (1999). High-level formation of active *Pseudomonas cepacia* lipase after heterologous expression of the encoding gene and its modified chaperone in *Escherichia coli* and rapid in vitro refolding, J. Appl. Environ. Microbiol., 65, 787-794
- Radway, J. C., Santo Domingo, J. W., Hazen, T. C., Wilde, E. W.** (1998). Evaluation of biodegradation potential of foam embedded *Burkholderia cepacia* G4, Biotechnol. Letters, 20, 663-666

- Rani, D. B. R., Mahadevan, A.** (1989). Plasmid-encoded metal resistance in bacteria, *J. Sci. Ind. Res.*, 48, 338-345
- Savadian, E. S., Me'Inikova, V. M., Belikov, G. P.** (1989). Current trends in using silver-containing antiseptics, *Antibiol. Khimioter.*, 34, 874-878
- Savluk, O. S., Potapchenko, N. G., Selanikova, O. P.** (1988). The development of resistance in *Escherichia coli* to silver, *J. Mikrobiol. Zh.*, 50, 77-82
- Schlegel, H. G.** (1992). *Allgemeine Mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Schwyn, B., Neilands, J. B.** (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores, *Anal. Biochem.*, 160, 47-56
- Sharp, R. R., Bryers, J. D., Jones, W. G., Shields, M. S.** (1998). Activity and stability of a recombinant plasmid-borne TCE degradative pathway in suspended cultures, *Biotechnol. Bioeng.*, 57, 287-296
- Slawson, R. M., Lohmeier-Vogel, E. M., Lee, H., Trevors, J. T.** (1994). Silver resistance in *Pseudomonas stutzeri*, *J. Biometals*, 7, 30-40
- Sokol, P. A., Darling, P., Woods, D. E., Mahenthiralingam, E., Kooi, C.** (1999). Role of ornibacton biosynthesis in the virulence of *Burkholderia cepacia* characterization of pvdA, the gene encoding L-ornithine N(5)-oxygenase, *J. Infect. Immun.*, 67, 4443-4455
- Sondossi, M., Rossmore, H. W., Lashen, E. S.** (1999). Influence of biocide treatment regimen on resistance development to methylchloro-/methylisothiazolone in *Pseudomonas aeruginosa*, *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 43, 85-92
- Starodub, M. E., Trevors, J. T.** (1990). Silveraccumulation and resistance in *Escherichia coli* R1, *J. Inorg. Biochem.*, 39,317-325

- Starodub, M. E., Trevors, J. T.** (1989). Silver resistance in *Escherichia coli* R1, J. Med. Microbiol., 29,101-110
- Stockinger, J., Hinteregger, C., Loidl, M., Ferschl, A., Streichsbier, F.** (1992). Mineralization of 3-chloro-4-methylaniline via an ortho-cleavage pathway by *Pseudomonas cepacia* strain CMA1, J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 38, 421-428
- Süßmuth R., Eberspächer, J., Haag, R., Springer, W.** (1987). Biochemisch-Mikrobiologisches Praktikum, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York
- Thurman, R. B., Gerba, C. P.** (1989). The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses, CRC Crit. Rev. Environ. Control, 18, 295-315
- Tocaj, A., Hof, A., Hagander, P., Holst, O.** (1993). Fed-batch cultivation of *Pseudomonas cepacia* with on-line control of the toxic substrate salicylate, J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 38, 463-466
- Trepanier, S., Prince, A., Huletsky, A.** (1997). Characterization of the penA and penR genes of *Burkholderia cepacia* 249 which encode the chromosomal class A penicillinase and its LysR-type transcriptional regulator, Antimicrob. Agents Chemother., 41, 2399-2405.
- Trevors, J. T.** (1987). Silver resistance and accumulation in bacteria, Enzyme Microb. Technol., 9, 331-333
- Vasishta, R., Saxena, M., Chhibber, S.** (1991). Contribution of silver ion resistance to the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* with special reference to burn wound sepsis, J. Folia Microbiol, 36, 498-501
- Weingart, C. L., Hooke, A. M.** (1999). A nonhemolytic phospholipase C from *Burkholderia cepacia*, J. Curr. Microbiol., 38, 233-238

- Wigley, P., Burton, N. F.** (1999). Genotypic and phenotypic relationships in *Burkholderia cepacia* isolated from cystic fibrosis patients and the environment, *J. Appl. Microbiol.*, 86, 460-468
- Williams, R. L., Doherty, P. J., Patrick, J., Vince, D. G., Grashoff, G. J., Williams, D. F.** (1989). The biocompatibility of silver, *Crit. Rev. Biocompat.*, 5, 221-243
- Wright, J. B., Lam, K., Burrell, R. E.** (1998). Wound management in an era of increasing bacterial antibiotic resistance: a role for topical silver treatment, *Am. J. Infect. Control.*, 26, 572-577
- Xia, X. S., Aathithan, S., Oswiecimska, K., Smith, A. R., Bruce, I. J.** (1998). A novel plasmid pIJB1 possessing a putative 2,4-dichlorophenoxyacetate degradative transposon Tn5530 in *Burkholderia cepacia* strain 2a, *J. Plasmid*, 39, 154-159
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., Arakawa, M.** (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes, 1981) comb. nov., *J. Microbiol. Immunol.*, 36, 1251-75