

# Versuche zur Verringerung des Hemmstoffeintrages bei der Naßholzkonservierung mit Zucker

(Dieser Vortrag wurde auf der dritten Naßholz-Tagung des Landschaftsverbandes Stade in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgemeinschaft der Restauratoren (AdR) am 29. und 30. Oktober 1998 im Schwedenspeicher-Museum in Stade gehalten. Von dieser Tagung sind außerdem die Vorträge von Volker Koesling „Praktische Erfahrungen mit der Erhaltung von Naßholzobjekten am Deutschen Technikmuseum Berlin“ und von Giancarlo Strigazzi und Helmut Preuß „Verwendung von Sirup ohne Verdünnungsstufen in der Naßholzkonservierung, Feststellung der Eindringtiefe des Konservierungsmediums durch Dichtekontrolle mittels Computertomographie“ online verfügbar)

**U.-M. Fritz, K. Petersen**

## 1. Zusammenfassung:

Es werden Maßnahmen angesprochen, die geeignet sind, den Gehalt an Organismen in den Konservierungslösungen schon vor Beginn der eigentlichen Konservierung zu vermindern. Darüber hinaus wird die Entwicklung einer Methode dargestellt, welche die keimtötenden Eigenschaften von UV-Strahlen mit einer Wellenlänge von 257 nm und einer Begasung mit Ozon kombiniert.

Ferner werden Möglichkeiten zur Kontrolle der Lebendkeimzahlen diskutiert, die es ermöglichen sollen, den Erfolg der Entkeimung zu kontrollieren. Diese Maßnahmen sollen der Verringerung des Hemmstoffeintrages in den Saccharoselösungen dienen.

## 2. Einleitung:

Das Konservieren von Nahrungsmitteln ist eine Jahrtausende alte Notwendigkeit, der sich der Mensch gegenüber sah, und die auch heute noch unter hygienischen, ökologischen und ökonomischen Gesichtspunkten von Bedeutung ist. Viele der Techniken, die einen sehr alten Ursprung haben, sind auch heute noch in Gebrauch. Schon lange ist z. B. das Dörren von Fisch oder Fleisch als Konservierungsmethode bekannt. Genauso wirksam läßt sich ein Verderben durch eine entsprechend hohe Salzkonzentration verhindern, oder durch den Zusatz von Zucker, wie es beispielsweise bei kandierten Früchten Anwendung findet. Diesen Methoden ist gemeinsam, daß sie einen mikrobiellen Befall des Lebensmittels verhindern, indem sie die Verfügbarkeit von Wasser für die Mikroorganismen ausschließen, entweder durch direkten Wasserentzug oder durch Veränderung der osmotischen Verhältnisse.

Die Besiedlung zuckerhaltiger Lösungen geringerer Konzentrationen durch Mikroorganismen ist ebenso seit Tausenden von Jahren bekannt und wird durch den Menschen beispielsweise bei der Produktion alkoholischer Getränke zu seinem Vorteil genutzt.

Die Möglichkeiten einer mikrobiellen Besiedlung von Zuckerlösungen ist also neben anderen Faktoren vor allem von der Konzentration und den daraus resultierenden osmotischen Verhältnissen abhängig.

Der biologische Abbau des Zuckers steht der Konservierung der Hölzer entgegen. Zudem wirken sich die Ausscheidung von Enzymen und Sekundärmetaboliten ins Medium, wie z. B. organische Säuren, für den Zustand der Hölzer unter Umständen nachteilig aus. Das ist insbesondere für Objekte, die einen hohen Metallanteil beinhalten in Betracht zu ziehen.

Besonders bedeutsam ist zudem die potentielle gesundheitliche Gefährdung des Restaurators, die von kontaminierten Objekten ausgeht. So ist nicht nur eine Besiedlung durch pathogene Keime denkbar, die direkt eine infektiöse Erkrankung auslösen können. Gerade in jüngerer Zeit sind insbesondere Pilze und ihre Sporen als Auslöser von Allergien angesprochen worden.

Daher ist die Verhinderung einer mikrobiellen Besiedlung angezeigt, oder es muß eine solche Besiedlung wirksam eingedämmt werden können. Von besonderem Interesse ist dabei die Beantwortung besonders der folgenden Fragestellungen

0. Welche Umstände sind vor allem für die mikrobielle Besiedlung verantwortlich zu machen, woher stammen die Organismen, und wie könnte eine Besiedlung vermieden oder vermindert werden?
1. Welche Parameter könnten beeinflußt werden, die geeignet sind die Keimzahl zu vermindern, ohne den Konservierungsprozeß zu stören?

2. Wie könnte eine vorhandene Besiedlung von Mikroorganismen eingedämmt werden?
3. Durch welche Methoden kann eine Überwachung der Keimzahlen in den Konservierungsbecken erfolgen?

Die folgende Aufzählung soll eine kurze Übersicht über die Versuche geben, die zur Beantwortung dieser Fragen und der Entwicklung einer Entkeimungsmethode beigetragen haben:

0. Isolation von Organismen aus Zuckerlösungen und Holzproben, sowie eine grobe Charakterisierung. Besondere Berücksichtigung der Reaktion der Organismen auf sauerstoffhaltige im Gegensatz zu sauerstofffreier Atmosphäre.
1. Vergleich der Entwicklung der mikrobiellen Population zwischen aerob und anaerob inkubierten Proben
2. Verwertungstests mit diesen Organismen in Bezug auf Zellulose, Lignin, Saccharose, Isomalt® und Raffinose.
3. Versuche zur Sterilisation von Naßhölzern durch Dampfdrucksterilisation und durch Mikrowellenbestrahlung.
4. Entwicklung und Test einer UV-Bestahlungseinheit.
5. Tests zur Wirkung einer Ozonbegasung auf Mikroorganismen.
6. Versuche zur Wirksamkeit einer Entkeimung mittels einer kombinierten Anwendung von UV und Ozon. Zudem wurde die Wirkung einer Kaffeinkonzentration von 0,1% im Medium untersucht.
7. Darstellung lebender Zellen in Suspensionen und auf Holzproben durch eine Vitalfärbemethode mit Flouresceindiacetat (FDA) und anschließender Floureszenzmikroskopie.

### 3. Ursprünge der mikrobiellen Besiedlung von zuckerhaltigen Lösungen:

Die Bestandteile in den Konservierungsbecken sind von Anfang an unterschiedlichen Belastungen an Mikroorganismen unterlegen.

Der Zucker, der für die Konservierung Verwendung findet, ist in diesem Zusammenhang wohl zu vernachlässigen, da er keine vegetativen Zellen enthält und allenfalls eine geringe Anzahl von Dauerformen wie z. B. Sporen zu erwarten sind.

Ähnlich verhält es sich mit dem Wasser, sofern Trinkwasser verwendet wird. In Deutschland ist das Trinkwasser strengsten Keimzahlkontrollen unterworfen. Der Lebendkeimzahlgehalt, der durch das Wasser in den Prozeß eingebracht wird, ist mit maximal 100 Keimen/ml als vernachlässigbar klein einzuschätzen.

Die Konservierungsbecken können durch Auswaschen mit 70%igem Ethanol wirkungsvoll dekontaminiert werden.

Genauere Betrachtung verdienen aber die zu konservierenden Hölzer. Die Keimbelastung dieser Objekte kann sicherlich recht stark variieren, aber es ist offensichtlich, daß vornehmlich die im und am Holz angesiedelten Mikroorganismen für die Kontamination der Konservierungslösungen verantwortlich zu machen sind. Daher wäre es sinnvoll den Gehalt an Organismen in den Hölzern zu verringern, um die Bedingungen für die Konservierung zu verbessern. Da eine geringere Keimzahl zu Beginn der Konservierung die Wahrscheinlichkeit vermindert, daß die Zuckerlösung „umkippt“, ist eine möglichst geringe Lebendkeimzahl anzustreben.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurden Holzproben zum einen mittels Mikrowellenbestrahlung und zum anderen durch Dampfdrucksterilisation (Autoklavieren) behandelt. Des weiteren wurden Probehölzer in Bezug auf mikrobielle Aktivität sowie der Zusammensetzung der auftretenden Population mit Probehölzern verglichen, die unter Ausschluß von Sauerstoff gelagert wurden. Auf die Ergebnisse dieser Maßnahmen wird an anderer Stelle genauer eingegangen.

Ein weiterer Punkt, der besondere Betrachtung verdient, ist das Auftreten von mikrobieller Besiedlung durch Luftkeime. Die Dauerformen vieler Mikroorganismen, wie Pilz- oder Bakteriensporen werden durch die Luft verbreitet. Auch Keime in Aerosolen (wie nach einem Niesen) können zur Kontamination der Becken führen. Aus diesem Grund wäre es vorteilhaft, die Becken zumindest mit einer sauberen, wenn möglich sterilen Folie abzudecken, um die Besiedlung durch Luftkeime zu vermeiden. Des weiteren ist auch die Art des Umgangs mit dem Konservierungsansatz durch den /die Restaurator/in von Bedeutung. Es sollte darauf

geachtet werden, einen Eintrag von Keimen wo möglich zu vermeiden. Auf diese Art und Weise könnte es u. U. im Einzelfall möglich werden, auf eine weitere Behandlung gänzlich zu verzichten. Wichtig ist aber eine regelmäßige Keimzahlkontrolle, um auftretenden Kontaminationen rechtzeitig erkennen und eindämmen zu können.

#### 4. Beeinflußbare Parameter zur Verminderung der Keimzahl:

Wie schon erwähnt, können physikalische oder chemische Parameter die Besiedlung durch Mikroorganismen fördernd oder hemmend beeinflussen. Dabei ist die Verfügbarkeit von Wasser und Nährstoffen von grundlegender Bedeutung. Wichtig sind aber auch die Verfügbarkeit von Sauerstoff, der pH-Wert der Zuckerkonzentration und ähnliches mehr [Schlegel, G. 1992].

##### 4.1. Behandlung von Hölzern mittels Mikrowellen und Autoklavieren:

Um die Konzentration von Keimen in den Hölzern möglichst vor Beginn der Zuckerzugabe zu vermindern, wurde die Behandlung mittels Mikrowellen, bzw. Autoklavieren der Hölzer in vorgenommen. Diese Untersuchung wurde von Hr. M. Meyer vom Landesamt für Denkmalpflege in Hannover angeregt, der sich dankenswerter Weise bereit erklärte den Zustand der behandelten Hölzer mit dem unbehandelten Hölzer zu vergleichen. Die Beurteilung der biologischen Aktivität erfolgte auf zwei Arten:

Erstens wurden Probestückchen der Hölzer (ca. 2,5 g) in drei Parallelen jeweils mikrowellenbehandelt (1200 Watt für 5 min.), autoklaviert (120°C bei 1,2 bar für 20 min.) und unbehandelt in 25 ml Flüssigmedium überführt. Nach dreitägiger Inkubation wurden Proben des Flüssigmediums auf Agarplatten ausplattiert und inkubiert. Nach weiteren drei Tagen wurde die Anzahl der gewachsenen Kolonien ermittelt und auf koloniebildende Einheiten (KBE) pro Gramm Holz umgerechnet.

Zweitens wurde die Atmungsaktivität der Organismen mit der Warburg-Technik ermittelt. Holzsplitter wurden in Flüssigmedium überführt und in einem gasdichten Gefäß bei konstanter Temperatur inkubiert. Atmende Organismen setzen unter Verbrauch von Sauerstoff Kohlendioxyd frei. Ein geringes Volumen von Kalilauge (KOH) innerhalb des gasdichten Gefäß bindet das entstehende CO<sub>2</sub>, so daß der Druck in dem Gefäß proportional zum Sauerstoffverbrauch abnimmt. Diese Druckveränderung wird über einen definierten Zeitraum durch ein elektronisches Manometer erfaßt und die Meßdaten werden an einen Rechner weitergegeben, der diese Daten weiterverarbeitet. Die auf diese Art erhaltenen Daten spiegeln die biologische Aktivität anhand des O<sub>2</sub>-Verbrauchs der Organismen über diesen Zeitraum wieder und sind in Diagramm 4.1.1. graphisch dargestellt. Tabelle 4.1.1. enthält die durch das Plattenverfahren ermittelten Daten.

Diagramm 4.1.1: Durchschnittliche Atmungsaktivität auf den behandelten und unbehandeltem Holzproben (Gasbilanz in µl = O<sub>2</sub>-Verbrauch)

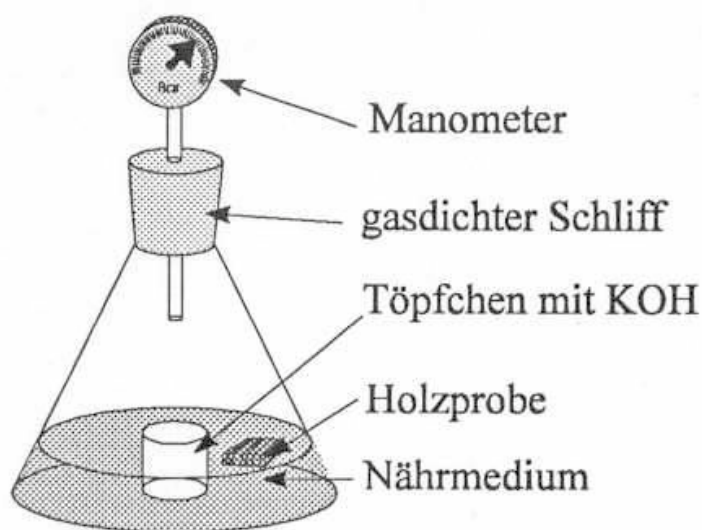


Abb.4.1.1.: Warburggefäß, Volumen ca. 14 ml

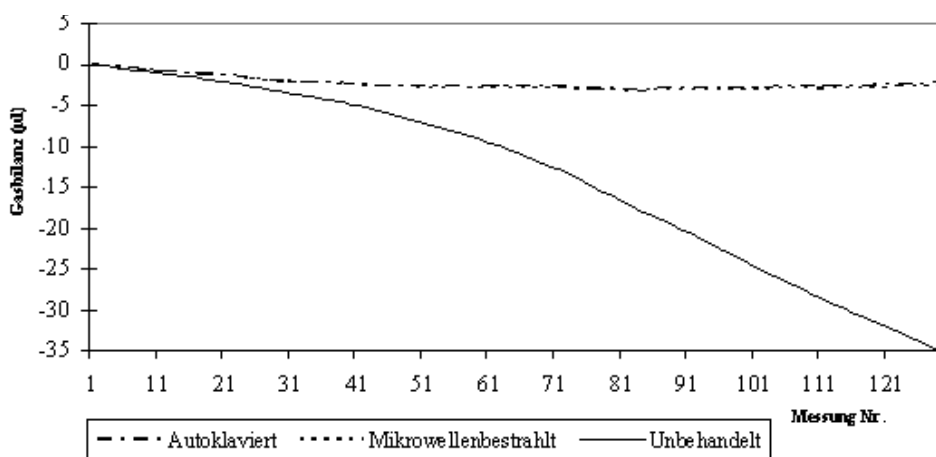


Tabelle 4.1.1: Einfluß der Sterilisation auf die Besiedlungsdichte in KBE/g Holz:

Unbeh.	Gewicht	KBE/g	Mikro.	Gewicht	KBE/g	Autokl.	Gewicht	KBE/g
Nr.: 1	3,05 g	$1,9 \cdot 10^7$	Nr.: 1	2,05 g	0	Nr.: 1	2,90 g	0
Nr.: 2	2,46 g	$1,8 \cdot 10^7$	Nr.: 2	2,44 g	0	Nr.: 2	2,93 g	0
Nr.: 3	1,97 g	$1,5 \cdot 10^7$	Nr.: 3	1,59 g	0	Nr.: 3	2,54 g	0

Wie aus den erhaltenen Daten beider Versuche hervorgeht, sind die Methoden geeignet die Hölzer zu sterilisieren. Da keine biologische Aktivität mehr nachgewiesen werden konnte, ist erwiesen, daß eine vollständige Entkeimung der Hölzer durch beide Methoden zu erreichen ist. Die anschließende Beurteilung der Hölzer durch Herrn M. Meyer auf ihren Erhaltungszustand ergab für kleineren Probenstücke Verluste an Gewicht und eine Veränderung in der Eindringtiefe einer Nadel, also eine Verfestigung der Hölzer durch Wasserverlust. Bei diesen Hölzern konnten zudem im mikroskopischen Bild kollabierte Zellen festgestellt werden, so daß diese Behandlung ein ernstzunehmendes Schädigungspotential für die Hölzer beinhaltet, die im Wasserverlust begründet ist. Wie die Untersuchungen aber auch ergaben, ist die Schädigung der Hölzer abhängig von ihrer Masse, d. h. daß größere Probenstücke weniger bis nicht geschädigt aus den Behandlungen hervorgegangen sind. Bei entsprechender Modifikation der Methoden könnten wohl Einstellungen gefunden werden, die die Anzahl der Organismen erheblich vermindern, ohne die behandelten Hölzer zu schädigen. Zur Klärung dieser Frage wären aber sicherlich noch weitere Versuche zu unternehmen. Da eine solche Maßnahme die Problematik der mikrobiellen Kontamination während der Konservierung verbessern kann, wäre eine derartige Entkeimung vorteilhaft und eine Klärung der verbliebenen Fragen angezeigt.

#### 4.2. Sauerstoff:

Das Verhalten der in Zuckerlösungen vorkommenden Organismen, sowie der direkt auf Holz siedelnden Organismen wurde in Bezug auf die Verfügbarkeit (aerob), bzw. auf die Abwesenheit von Sauerstoff (anaerob) untersucht. So wurden Probhölzchen auf verschiedenen Nährmedien in Petrischalen gelegt und sowohl unter aeroben wie unter anaeroben Bedingungen bei 18°C inkubiert. Desgleichen wurde mit Flüssigproben von Zuckerlösungen verfahren, von denen jeweils 100 µl gleichmäßig auf die entsprechenden Nährmedien ausplattiert wurden. Nach einer Inkubationszeit von 14 Tagen wurden die Petrischalen ausgewertet. Sowohl die Gesamtzahl der aufgetretenen Kolonien (Bewuchstärke), als auch die Anzahl der verschiedenen Arten von Organismen, soweit per Augenschein möglich, wurden beurteilt. Für die Besiedlungsdichte wurde eine subjektive Einschätzung von 0 (wenig) bis 10 (stark) getroffen.

Die von diesen Proben isolierten Organismen wurden in Reinkulturen gebracht und für die nachfolgenden Versuche eingesetzt.

Es fanden folgende Nährmedien Verwendung:

#### BR II: (Bunt- Rovaria's II.) Medium pH 8,6

0,4 g  $K_2HPO_4 \times 3 H_2O$   
 0,5 g  $(NH_4)_2SO_4$   
 0,05 g  $MgSO_4 \times 7 H_2O$   
 0,1 g  $MgCl_2 \times 6 H_2O$   
 0,01 g  $FeCl_3 \times 6 H_2O$   
 0,1 g  $CaCl_2$   
 1,0 g Pepton aus Fleisch  
 1,0 g Hefeextrakt  
 5,0 g Glukose  
 25 ml Gesteinsextrakt (10 fach)  
 0,5 g  $Na_2CO_3$   
 15 g Agar Agar  
 1,0 l  $H_2O$  dest.

#### CzD: Czapek-Dox Medium pH 6,0

2,4 g  $NaNO_3$   
 0,82 g  $MgSO_4 \times 7 H_2O$   
 0,4 g  $KCl$   
 0,0144 g  $FeSO_4 \times 7 H_2O$   
 1,05 g  $K_2HPO_4 \times 3 H_2O$   
 24 g Glukose  
 12 g Agar Agar  
 0,8 l  $H_2O$  dest.

**R2A: Medium pH 7,5**

0,5 g Hefeextrakt  
 0,5 g Casaminosäure  
 0,5 g Glucose  
 0,5 g lösliche Stärke  
 0,3 g Natriumpyruvat  
 9,0 g Natriumchlorid  
 15,0 g Agar  
 1,0 l Aqua dest.

**GNC: (Glycerin Nitrat) Medium pH 7-7,2**

10,0g Glycerin  
 0,3 g Casein  
 2,0 g KNO<sub>3</sub>  
 2,0 g Natriumchlorid  
 2,1g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 3H<sub>2</sub>O  
 0,05 g MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O  
 0,02 g Kalziumcarbonat  
 0,0144 g FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O  
 15 g Agar  
 1,0 l Aqua dest.

Tabelle 4.2.1. : Besiedlungsmuster der Flüssigproben:

Proben Nr.	Nährmedium	Aerobe Inkubation		Anaerobe Inkubation	
		Bewuchsdichte	Artenzahl	Bewuchsdichte	Artenzahl
Konstanz 1	CzD	1	1	1	1
	BR II.	3	1	0	0
	GNCd	1	1	1	1
	R 2 A	7	1	3	1
Konstanz 2	CzD	2	1	1	0
	BR II.	5	2	0	0
	GNCd	2	1	1	0
	R 2 A	6	1	3	1

Fortsetzung Tabelle 4.2.1. : Besiedlungsmuster der Flüssigproben:

Proben Nr.	Nährmedium	Aerobe Inkubation		Anaerobe Inkubation	
		Bewuchsdichte	Artenzahl	Bewuchsdichte	Artenzahl
Konstanz 3	CzD	0	0	0	0
	BR II.	7	2	1	1
	GNCd	0	0	0	0
	R 2 A	6	1	2	1
Konstanz 5	CzD	4	2	0	0
	BR II.	8	1	0	0
	GNCd	8	1	0	0
	R 2 A	8	1	0	0
Konstanz 7	CzD	2	2	0	0
	BR II.	5	2	0	0
	GNCd	5	2	0	0
	R 2 A	4	3	0	0

Ferner wurden jeweils drei parallele Ansätze mit einer Holzeinwaage von 280g +-10g und ca. 750 ml einer 5%igen Zuckerlösung in Weckgläsern angesetzt. Bei den Holzproben handelte es sich um einen Kiefernstamm aus dem Moor beim Dümmer See. Der pH-Wert von 4 war auffallend sauer. Bodenproben aus dem Gebiet wiesen ebenfalls einen pH-Wert von 4 auf.

Die erste Parallele von 1l Weckgläsern wurde bis unter den Rand gefüllt, so daß keine Luftblase mehr im Gefäß verblieb und durch einen Weckring gasdicht verschlossen. In das Weckglas konnte keine Luft mehr eindringen, so daß sich nach Verbrauch des Sauerstoffs in der Lösung anaerobe Verhältnisse einstellten. Die zweite Parallele wurde in 1,5 l Weckgläsern angesetzt, deren Deckel ohne Gummiring aufgelegt wurden, so daß ein Gasaustausch erhalten blieb. Als drittes wurde noch ein Gefäß ohne Deckel angesetzt, dessen Flüssig-

keitsverlust durch Verdunstung regelmäßig durch frisches Trinkwasser ausgeglichen werden mußte. Nach einer Inkubationszeit von 4 und 8 Wochen wurden die Ansätze geöffnet, und jeweils 10µl der Zuckerlösungen auf Nährmedium ausplattiert um die koloniebildenden Einheiten (KBE/ml) zu ermitteln. Der pH-Wert wurde gemessen und der Zuckergehalt refraktometrisch bestimmt. Die erhaltenen Daten werden in der Tabelle 4.2.2 dargestellt. Die Ansätze wurden dann in einen 5l fassenden Ansatz zusammengeführt und in einem Langzeitversuch (siehe 10.) verwendet.

Tabelle 4.2.2 Besiedlungsdichte verschiedener Zuckeransätze:

Inkubation	Aerob offen		Aerob geschlossen		Anaerob geschlossen	
	pH-Wert	KBE/ml	pH-Wert	KBE/ml	pH-Wert	KBE/ml
4 Wochen	4,7	1900	4,7	330	4,7	0
8 Wochen	4,2	4500	4,6	700	4,6	160

*Der Zuckergehalt der Proben hatte sich während des Versuchs nicht meßbar verändert.*

Von den in Reinkultur überführten Organismen wurden die Bakterien auch direkt auf eine Befähigung zu anaeroben Wachstum untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß von 22 getesteten Bakterien nur 6 in der Lage waren ohne Sauerstoff zu wachsen.

Wie man anhand dieser Ergebnisse feststellen kann, trägt ein Ausschluß von Sauerstoff zur Verminderung der Besiedlung durch Mikroorganismen bei, da nur anaerobe oder fakultativ anaerobe Organismen (beispielsweise Hefen) zur Entwicklung kommen können.

Besonders auffällig war, daß bei anaerober Inkubation keine Pilze auftraten. Ein Ausschluß von Sauerstoff ist sicherlich nicht für alle zu restaurierenden Objekte durchführbar, kann aber bei geeigneten, kleineren Objekten ohne großen Aufwand angewendet werden.

#### 4.3. Nährstoffe:

Dieser Punkt ist auf Grund des Konservierungsmittels nicht zu beeinflussen. Für Organismen, die in der Lage sind die Bestandteile des Holzes wie Zellulose, Hemizellulose oder Lignin abzubauen, kann das Holz als Nährstoffquelle dienen, wenn keine anderen geeigneten Kohlenstoffquellen zur Verfügung stehen [Garg, K. L. 1993]. Einige der daraufhin getesteten Organismen zeigten, daß sie in der Lage sind Lignin und/oder Zellulosen als Nährstoffquelle zu nutzen.

In den Zuckerlösungen ist aber genügend Saccharose gelöst, so daß sowohl Glucose wie auch Fructose in überreichlichem Maß als leicht zu verwertende Kohlenstoff (C-) Quelle zur Verfügung stehen.

In der Vergangenheit wurden Stoffe angesprochen, die als Ersatz für Saccharose in Betracht zu ziehen wären, da sie von den Mikroorganismen nicht, oder nur weniger gut als C-Quelle genutzt werden könnten.

Die isolierten Organismen wurden daher auch untersucht, ob Isomalt® oder Raffinose als Nährstoffquelle genutzt werden können. Dabei diente kohlenstoffreier Wasseragar als negative und Saccharoseagar als positive Kontrolle. Die Ergebnisse dieser Tests sind in Tabelle 4.3.1 dargestellt:

Tabelle 4.2.2 Besiedlungsdichte verschiedener Zuckeransätze:

Organismus	Wasseragar	Saccharose	Raffinose	Isomalt®	Lignin	Zellulose
KoB1	-	++	++	++	-	++
KoB2	-	++	++	++	-	++
KoB3	-	-	-	-	-	-
KoB4	-	+	+	+	+	+
KoB5	-	++	++	++	-	-
KoB6	-	+	+	++	-	-
KoB7	-	+	-	-	+	+
KoB9	-	+	+	+	-	-
KoB11	-	++	-	-	ng	++
AB1	-	++	++	++	-	+
AB2	-	+	+	++	-	+
AB3	-	-	-	-	-	ng.
AB4	-	+	+	+	ng	+
AB5	-	++	++	++	+-	+
AB6	-	+	+	+	-	+
AB7	-	++	++	++	+	++
AB11	-	++	++	++	+	++
AB13	-	+	+	++	+	ng
AB14	-	-	++	+	-	ng
AB15	+	++	++	++	++	++
Pilz 1	-	+	++	++	-	++
Pilz 2	-	++	++	+	+	+
Pilz 3	-	+	+	++	ng	++
Pilz 5	-	++	+	+	+	+
Pilz 6	-	-	-	-	+	+

Legende: kein Wachstum - /schwaches Wachstum + /starkes Wachstum ++ / nicht getestet ng

KoB# - Konstanzer Isolat Bakterium# / AB# - in der Arbeitsgruppe vorhandenes, von Holz isoliertes Bakterium# / Pilz# - Konstanzer Pilzisolat #

Wie aus der Tabelle 4.3.1. ersichtlich wird, ist bis auf wenige Ausnahmen das Wachstum der Mikroorganismen auf Isomalt®- und Raffinosemedium gegenüber dem auf Saccharosemedium nicht verringert. Somit lassen die getesteten Organismen im Wesentlichen keinen Vorteil eines Ausweichens auf ein anderes Stabilisierungsmittel als Saccharose erkennen.

Es ist wahrscheinlich, daß andere alternative Stoffe zum Zucker als die getesteten ebenso als Nährstoffquelle fungieren können. Deshalb ist ein Ausweichen auf andere Stabilisierungsmittel als Saccharose aus mikrobiologischer Sicht nicht zu empfehlen.

Ein Ausweichen auf andere Zucker oder auf Zuckeraustauschstoffe ist auch unter ökonomischen Gesichtspunkten nicht ratsam, da es den Kostenfaktor der Konservierung deutlich erhöht. Während 500 Gramm

Saccharose reist ca. 63 DM kosten belaufen sich die Kosten für 100 Gramm Raffinose der gleichen Güte auf ca. 174 DM.

Zudem weisen die Stoffe auf Grund ihrer chemischen Struktur ein im Vergleich zu Saccharose schlechteres Lösungsverhalten im Wasser auf, und können daher nur langsamer und/oder weniger tief in das Holz diffundieren, als Saccharose [Prof. Dr. H. Schieweck 1996]. Das hat zur Folge, daß die Konservierung selbst beeinträchtigt werden kann. Das Löslichkeitsverhalten ließe sich zwar durch ein Beheizen der Becken verbessern, doch bedeutet das nicht nur einen erhöhten Energiebedarf, sondern auch eine Verbesserung der Besiedlungsmöglichkeiten durch Mikroorganismen ( siehe 4.4.).

Nicht auszuschließen ist auch eine mögliche Verschlechterung des optischen Erscheinungsbildes der konservierten Hölzer.

Aus diesen Gründen ist ein Abweichen von Saccharose als Konservierungsmittel aus unserer Sicht nicht angezeigt. Ferner wird deutlich, daß eine relativ große Anzahl von Organismen in der Lage ist, Lignin, bzw. Zellulose anzugreifen. Somit können sie potentiell zu einer Schädigung an den Hölzern führen.

#### **4.4. Temperatur:**

Eine Vielzahl von Mikroorganismen weisen Wachstumsoptima bei Temperaturen um 20-30°C auf. Eine Erniedrigung der Temperatur kann eine Besiedlung der Lösung zwar nicht verhindern, das Wachstum vieler Organismen aber merklich verlangsamen. Insofern ist es sinnvoll den Standort für Konservierungsbecken möglichst kühl zu wählen. Beispielsweise wäre das Aufstellen der Konservierungsbecken in kühlen Kellerräumen sinnvoll. Eine aktive Kühlung erscheint nicht angemessen, da der Nutzen die entstehenden Kosten wohl nicht rechtfertigen würde.

#### **4.5. pH-Wert:**

Ebenso wie für die Temperatur ist auch für den pH-Wert ein Optimum für den jeweiligen Organismus festzustellen.

Das Einstellen des pH-Wertes auf einen „extremen“ Wert wäre eine Möglichkeit zumindest einen Teil von Mikroorganismen an einer Besiedlung zu hindern, bzw. ihr Wachstum zu verlangsamen.

Proben aus einem Moor bei Dümme belegen dies. Der Fundort weist einen pH-Wert von 4,0 auf und ist anaerob, wodurch die dort geborgenen Hölzer auffallend gut erhalten wurden. Ein Ansatz dieser Hölzer in einer 5%igen Saccharoselösung ergab auch nach einer Inkubationszeit von 8 Wochen bei Zimmertemperatur keine nennenswerte Keimbelastung in der Zuckerlösung, was auf den niedrigen pH-Wert zurückzuführen ist (siehe 4.2.). Der Zuckergehalt, der refraktometrisch bestimmt wurde, hatte sich nicht meßbar verringert, so daß keine auffällige biologische Aktivität verzeichnet werden konnte. Erst nach einer Erhöhung des pH-Wertes nahm die Konzentration an koloniebildenden Einheiten (KBE) dramatisch zu.

Sofern der Konservierungsprozeß durch einem pH-Wert von 4-5 nicht negativ beeinflusst wird, könnte eine Ansäuerung des Mediums eine unterstützende Maßnahme zur Verringerung der Keimbelastung in der Zuckerlösung darstellen.

### **5. Mechanismen der Entkeimung durch UV-Strahlung und Ozon:**

Sämtliche genetische Information von Organismen ist in der Desoxyribonukleinsäure (DNA) gespeichert. Die DNA beinhaltet nicht nur die Information für die Synthese von bestimmten Enzymen die für den Stoffwechsel oder die Zellteilung benötigt werden, sondern auch regulatorische Systeme, die das Zusammenspiel der Enzyme den Umweltgegebenheiten entsprechend einstellen.

So werden z. B. Enzyme zur Metabolisierung von Lactose durch die Gegenwart von Glucose unterdrückt, da es für die Zelle energetisch günstiger ist Glucose abzubauen. Erst, wenn keine Glucose mehr zur Verfügung steht, wird die Zelle Lactose umsetzen, um ihren Energiebedarf zu decken. Ähnliche Regulationsmechanismen, die sich zum Teil auch untereinander beeinflussen, sorgen für geregelte biochemische Prozesse in den Zellen [Schlegel, G. 1992]. Aus diesen Gründen ist eine intakte DNA eine Grundvoraussetzung sowohl für die Reproduktion von Organismen, als auch für deren Überleben als Individuum. Eine Zerstörung der DNA stellt also einen wirksamen Eingriff dar, um die Organismen abzutöten, bzw. ihre Vermehrung zu verhindern. Vergegenwärtigt man sich den Aufbau der DNA, so kann man sie sich- sehr stark vereinfacht- als eine Art Leiter vorstellen. Die „Holme“ bestehen aus alternierenden Pentose und Phosphatmolekülen, die das Gerüst bilden. Die Sprossen der Leiter enthalten die eigentliche Information. Sie werden von vier Nukleinsäuren



gebildet, den Purinen Adenin (A) und Guanin(G), sowie den Pyrimidinen Cytosin (C) und Thymin(T). Die Abfolge dieser Nukleinsäuren (NS) beinhaltet die eigentliche Information. Je drei Nukleinsäuren bilden ein Triplett, welches eine der 20 Aminosäuren codiert, aus denen die Proteine aufgebaut werden. Bestrahlt man DNA mit UV-Strahlung einer Wellenlänge von 257,5 nm, so werden vor allem die Thyminmoleküle in ihrer Struktur verändert. In Bereichen der DNA, an denen zwei oder mehr Thyminmoleküle aufeinanderfolgen, kann es zu einer kovalenten, also festen chemischen Bindung zwischen ihnen kommen, einem sogenannten Thymin-Dimer. Zwar verfügen Organismen über Reperaturmechanismen, die diese Thymin-Dimere entweder auflösen, oder entfernen, doch kann man durch die Induktion einer entsprechend hohen Anzahl von Thymin-Dimeren diese Mechanismen überlasten. Dies führt zu einem Reproduktionsverlust der Zelle und zu ihrem Absterben [Knippers et al. 1990].

Unter Einwirkung von Ozon treten bei Organismen verschiedene Veränderungen auf, deren Ausprägung je nach Ozonkonzentration und Reaktionsdauer unterschiedlich sind.

Dokumentiert wurden Veränderungen an den Zellmembranen, die den Stoffaustausch der Zellen mit dem Medium beeinflussten. Bei höheren Ozonkonzentrationen konnte die Zerstörung (Lyse) der Zellen beobachtet werden [Evans, L., Ting, I. P. 1973]. Darüber hinaus wurden schädigende Einflüsse auf Enzyme und andere Zellinhaltsstoffe beschrieben, wobei besonders die Schädigung der Enzyme von Interesse ist.

Auch die Struktur der DNA wird durch Ozon verändert. So wurden Strangbrüche beobachtet und Veränderungen an den Basen, die zu Mutationen führen können. Die mutagene Wirkung wird aber im Vergleich mit der mutagenen Wirkung einer UV-Bestrahlung als gering beschrieben.

Im Hinblick auf eine vorangegangene DNA-Schädigung, beispielsweise durch UV-Bestrahlung, ist besonders interessant, daß die Reperaturmechanismen für die DNA durch eine Ozonbehandlung gehemmt werden. Das wurde besonders für das rad 52 Gen der Bierhefe nachgewiesen, welches die Reparatur von Strahlenschäden an der DNA ermöglicht. Die Hemmung der DNA-Reperatur durch Ozon wird durch geringe Mengen von Koffein im Medium erheblich verstärkt. Schon durch eine Konzentration von 0,1 % Koffein, was ungefähr der doppelten Konzentration im Bohnenkaffee entspricht, kann die Überlebensrate deutlich gesenkt werden [Dubeau, H., Chung, Y. S. 1984]. Versuche zu diesem Aspekt werden unter 9. ausführlicher dargestellt.

## 6. Versuchsaufbau und Durchführung der UV-Bestrahlung und der Ozonbegasung:

Die unter 6. angesprochenen Mechanismen wurden für die Entkeimung der Flüssigmedien genutzt, und wie im folgenden im Versuchsaufbau dargestellt, angewandt:

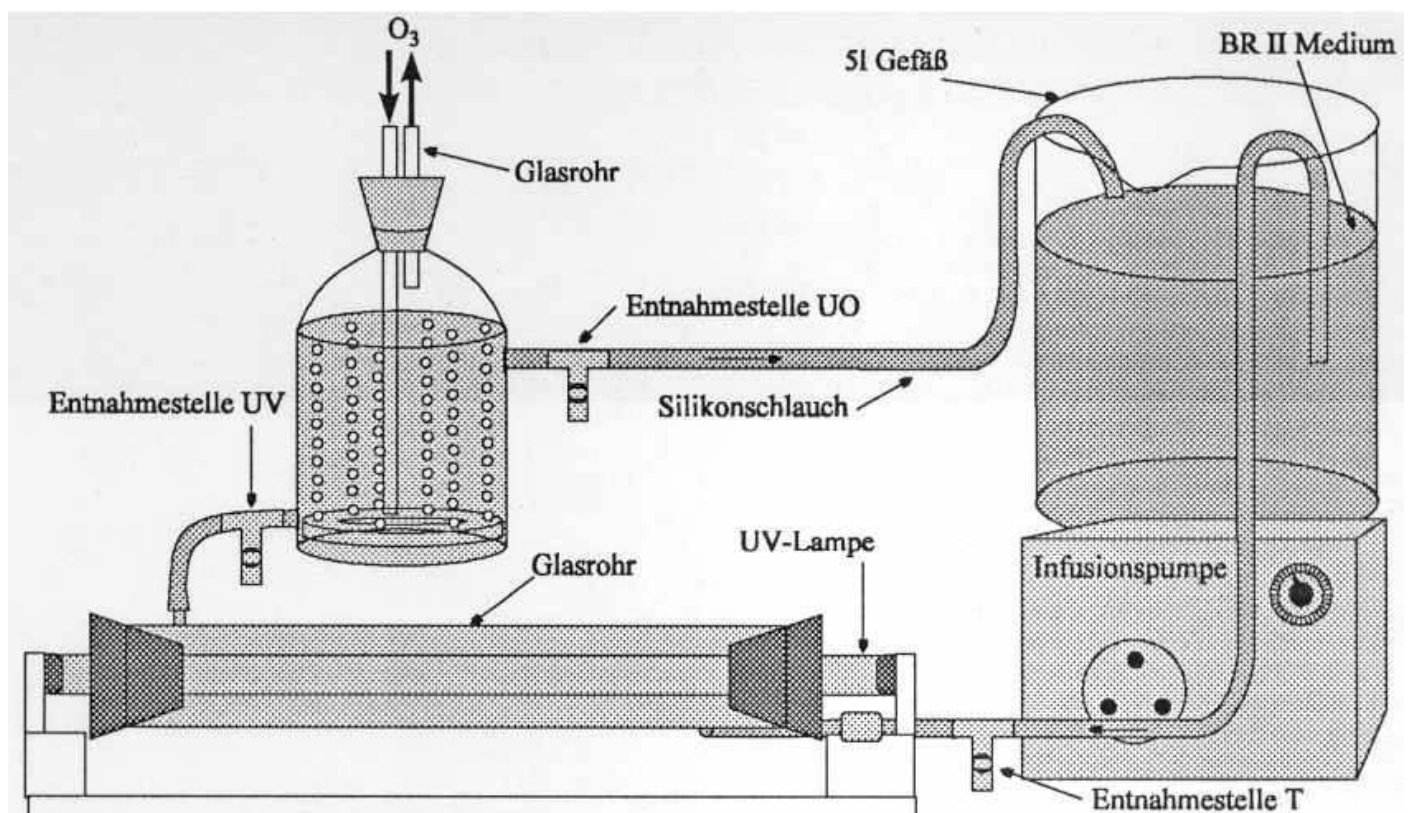


Abb. 6.1.: UV-Bestrahlung und anschließende Ozonbegasung.

Die Bestrahlungseinheit besteht aus einer herkömmlichen UV-Röhre mit einer Leistung von 20 Watt und einer abgestrahlten Wellenlänge von 257,5 nm. Ein Glasrohr, dessen Innendurchmesser den Außendurchmesser der UV-Lampe um ca. 1 cm übersteigt, wurde an jedem Ende mit einem Schlauchanschluß versehen und an beiden Enden aufgeweitet. Mittels zweier Silikonstopfen, die auf den Außendurchmesser der UV-Lampe aufgeböhrt wurden, läßt sich dieses Glasrohr wasserdicht gegen die UV-Lampe verschließen. So wird ein Flüssigkeitsmantel von ca. 0,5 cm Schichtdicke direkt um die Strahlungsquelle erzeugt, der durch die beiden Schlauchanschlüsse umgewälzt werden kann. Zu diesem Zweck wird eine Infusionspumpe mit stufenlos regelbarer Pumpleistung verwendet. Das Volumen des Flüssigkeitsmantel beträgt ca. 400 ml.

Die Ozonbegasung erfolgt in einer Waschflasche. Durch den unteren Schlauchanschluß wird die zu entkeimende Lösung in die Flasche gepumpt, bis sie am Überlauf austritt und in das Kulturgefäß zurückläuft. Das Ozon wurde mittels eines von der Firma HUMARES bereitgestellten Ozonisators erzeugt. Dieser liefert 600 ml Gasgemisch/min., dessen Ozongehalt regelbar ist. Die Verteilung des Gases in der Lösung erfolgt durch einen kreisförmigen, durch Nadelstiche perforierten Silikonschlauch, der in Bodennähe der Flasche liegt. Das aus den Löchern austretende Gas mischt sich im Aufsteigen mit der Flüssigkeit.

Dieser Versuchsaufbau ermöglicht eine getrennte Betrachtung der Wirkung von UV-Strahlen oder Ozon, da die entsprechenden Module durch Umstecken der Schläuche aus dem Flüssigkeitskreislauf genommen werden können. Die Wirksamkeit der jeweiligen Methode wurde vor der Kombinationswirkung getestet. Zu diesem Zweck wurde jeweils flüssiges Vollmedium (BR II ohne Agar) mit einer Mischkultur aus den isolierten Organismen angeimpft. Die Probenahme erfolgte an den in der Abbildung 6.1. gekennzeichneten Entnahmestellen. Von Proben wurden Verdünnungsstufen hergestellt, auf je drei parallele Agarplatten ausplattiert und für 2 Tage inkubiert. Nach dem Auszählen der angewachsenen Kolonien konnte der Titer (KBE/ml) der entsprechenden Probe ermittelt werden. Durch die Auswahl der Probenentnahmestellen konnte zudem der Verlauf der Keimzahlentwicklung nach jeder erfolgten Behandlungsstufe beobachtet werden. So entspricht Entnahmestelle T dem momentanen Titer im Kulturgefäß, Entnahmestelle UV gibt den Titer direkt nach der UV-Bestrahlung und Entnahmestelle UO den Titer nach der Ozonisierung an.

## 7. Ergebnisse der UV-Entkeimung von Flüssigmedien:

Der in Abbildung 6.1. dargestellte Versuchsaufbau wurde modifiziert, indem die Ozonbegasung im Flüssigkeitskreislauf umgangen wurde. Nach der Probenentnahmestelle UV wurde eine direkte Rückleitung zum Kulturgefäß installiert.

Mit diesem Versuchsaufbau wurden verschiedene Tests durchgeführt, die sich durch

0. die Umlaufgeschwindigkeit der Flüssigkeit im System,
1. das Volumens des Gesamtansatzes,
2. die Bestrahlungsdauer,
3. sowie die Gesamtversuchszeit unterschieden.

Exemplarisch für diese Tests wird das Ergebnis eines Versuchs dargestellt, der mit folgenden Parametern durchgeführt wurde:

Volumen des Gesamtansatzes: 2,4 l

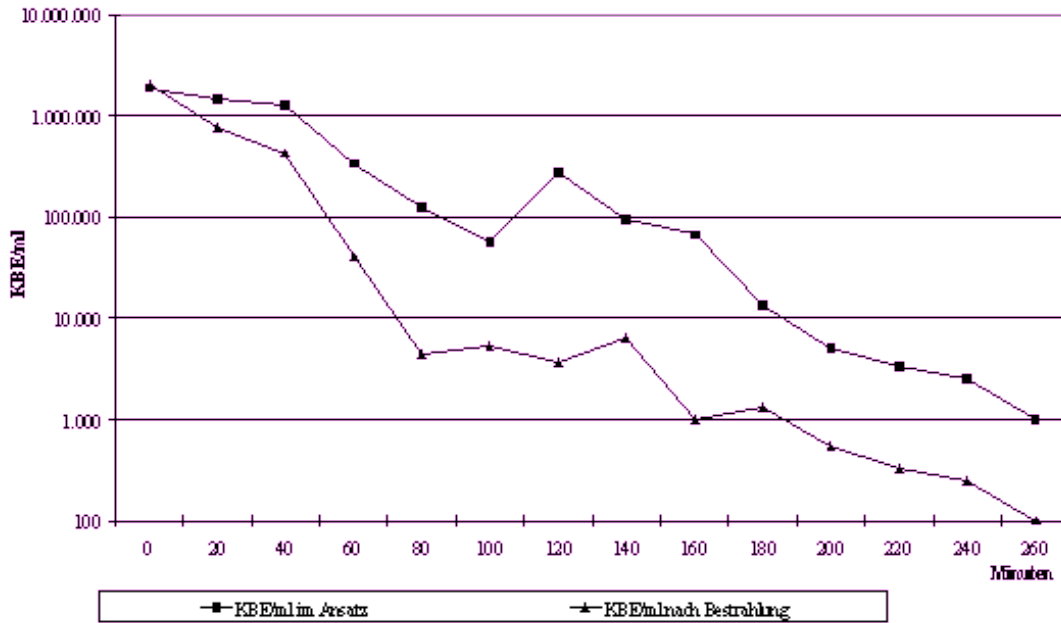
Umlaufgeschwindigkeit im System: 100 ml/min.

Gesamtbehandlungsdauer: 4 h:20 min.

Frequenz der Probenahme: 20 min.

Das Ergebnis des Versuchs wird in *Diagramm 7.1.* dargestellt.

Diagramm 7.1.: Entwicklung der Keimzahl (KBE/ml) einer 4:20 h UV- Bestrahlung:



Dieses Ergebnis dokumentiert die Wirksamkeit der UV-Bestrahlung als keimtötendes Mittel. So ist innerhalb von 180 Minuten der Gehalt an KBE/ml von ca.  $2 \cdot 10^6$  auf ca. 100 KBE/ml nach der UV-Bestrahlung gesunken. Der Titer im Kulturgefäß folgt diesem Verlauf mit entsprechendem zeitlichen Versatz, der durch das höhere Volumen bedingt ist. Auf Grund der Versuchsanordnung kommt es durch das Zuführen keimärmerer Lösung zu einer allmählichen Ausdünnung der Lebendkeimzahl im Kulturgefäß.

Versuche mit höheren Umlaufgeschwindigkeiten erhöhten den Effekt des zeitlichen Versatzes ebenso, wie eine Erhöhung des Volumens des Gesamtansatzes. Daraus ergaben sich längere Behandlungsdauern für eine entsprechende Entkeimung. Es konnte aber festgestellt werden, daß der entkeimende Effekt der UV-Bestrahlung für ein Gesamtvolumen von 5 l bei einer Umlaufgeschwindigkeit von 100 ml/min. ausreichend stark ist. Zusammenfassend kann auf Grund der erhaltenen Daten der UV-Versuche festgehalten werden, daß eine Entkeimung durch UV-Strahlung erreicht werden kann.

## 8. Ergebnisse der Ozonbehandlung von Flüssigmedien:

Analog zu den UV-Versuchen wurde die Wirksamkeit einer Ozonbegasung untersucht. Dabei blieb das Volumen des Gesamtansatzes mit 5 l ebenso konstant wie die Umlaufgeschwindigkeit im System mit 100 ml/min. Die Konzentration des Ozons im Gasgemisch wurde im Bereich von 2 bis 20 µg Ozon pro ml Gas variiert.

Während bei geringeren Ozonkonzentrationen kein, oder ein nur sehr geringer Effekt zu verzeichnen war, wurde mit 20 µg Ozon pro ml Gas eine erkennbare Keimzahlverringering erreicht:

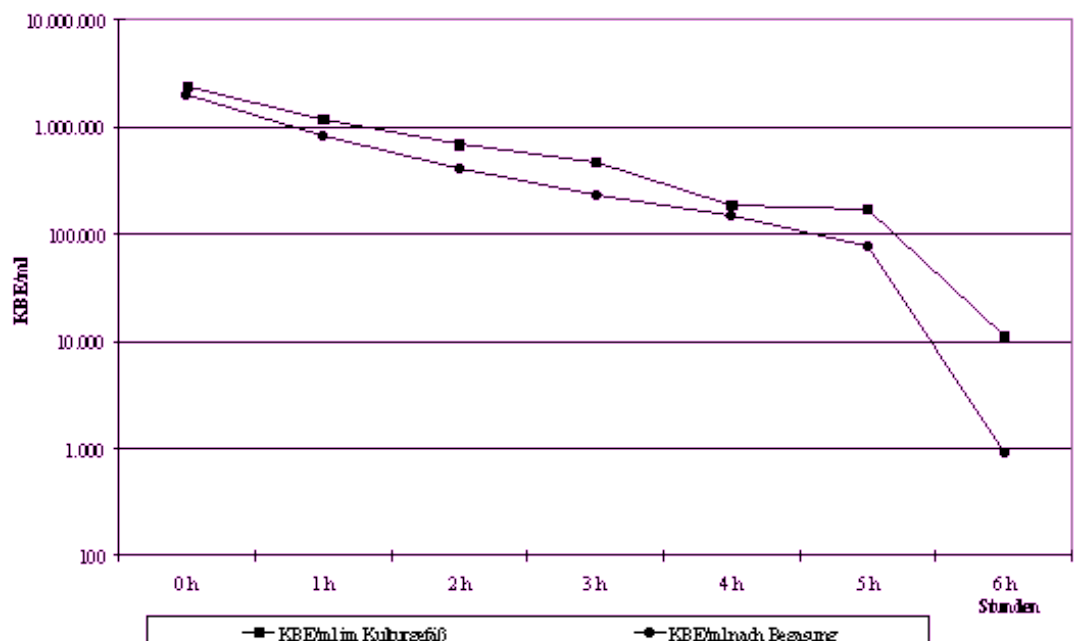


Diagramm 8.1.: Entwicklung der Keimzahl während einer 6stündigen Ozonbegasung:

Auch während weiterer Versuche konnte die entkeimende Wirkung einer Ozonbegasung mit einer Konzentration von 20 µg/ml Gasgemisch nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der zur Ozonbegasung durchgeführten Versuchsreihen lassen die Möglichkeiten einer wirksamen Entkeimung durch Ozon erkennen.

### 9. Kombination von UV-Bestrahlung und Ozonbegasung in koffeinfreiem und koffeinhaltigem Medium:

Wie unter 5. bereits angesprochen, ergänzen sich die Effekte der UV-Bestrahlung und der Ozonbegasung. Beide Methoden verursachen eine Verringerung der Keimzahlen. Wesentlich ist, daß die UV-Bestrahlung DNA-Schäden hervorruft, die zu einem hohen Prozentsatz für die Organismen tödlich ist. Ein gewisser Prozentsatz der geschädigten Organismen wäre aber in der Lage die DNA-Schäden zu reparieren und so zu überleben. Durch die nachfolgende Ozonbegasung werden aber die Reperaturmechanismen dieser Organismen gehemmt, so daß die Überlebensrate der UV-bestrahlten Organismen erheblich gesenkt wird. Durch Zugabe von 0,1 % Koffein in das Medium kann dieser Effekt noch erheblich verstärkt werden. Exemplarisch für die zu diesem Synergismus durchgeführten Tests, sollen hier zwei Versuche dargestellt werden, die sich über je fünf Tage erstreckten.

Je ein Versuchsansatz von 5 l BR II. Medium ohne Koffein und mit 0,1 % Koffein wurden mit einer Mischkultur angeimpft und einer kombinierten UV- und Ozonbehandlung für 4 h unterzogen. Während dieser Zeit wurden alle 60 min eine Probe an den drei in Abbildung 7.1. dargestellten Entnahmestellen entnommen und entsprechend auf BR II. Agarplatten mit 0,1 % Koffein und koffeinfrei ausplattiert. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung des pH-Wertes der Probe.

Nach 24 h erfolgte eine Probennahme, ohne daß eine weitere Behandlung erfolgte. Nach 48 h und nach 72 h wurde jeweils eine 4 stündige Behandlung mit stündlicher Probennahme durchgeführt. Die letzte Probenahme erfolgte nach 98 h. Die beimpften Agarplatten wurden nach 48 stündiger Inkubations ausgezählt und so die KBE/ml im Medium bestimmt. Wie bei den vorangegangenen Versuchen war die Umlaufgeschwindigkeit im System auf 100 ml/min. eingestellt. Der Ozongehalt des Gasgemisches betrug 20 µg/ml. Die Entwicklung des Keimgehaltes ist für beide Versuche sind in Diagramm 9.1. zusammengefaßt. Diagramm 9. 2. stellt die Entwicklung der pH-Werte dar.

Diagramm 9.1.: Vergleich der Keimzahlentwicklung in koffeinhaltigem und koffeinfreiem Medium:

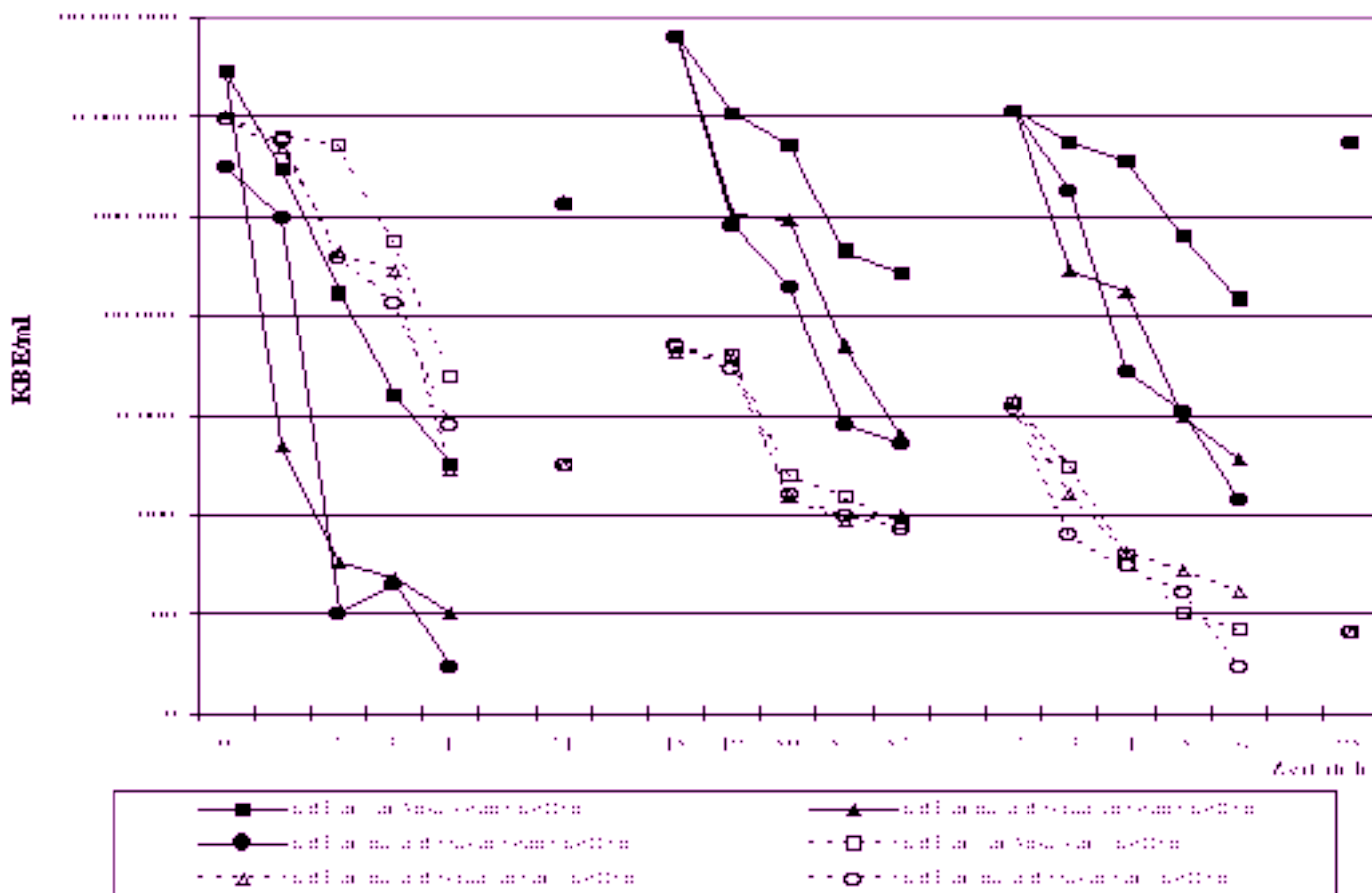
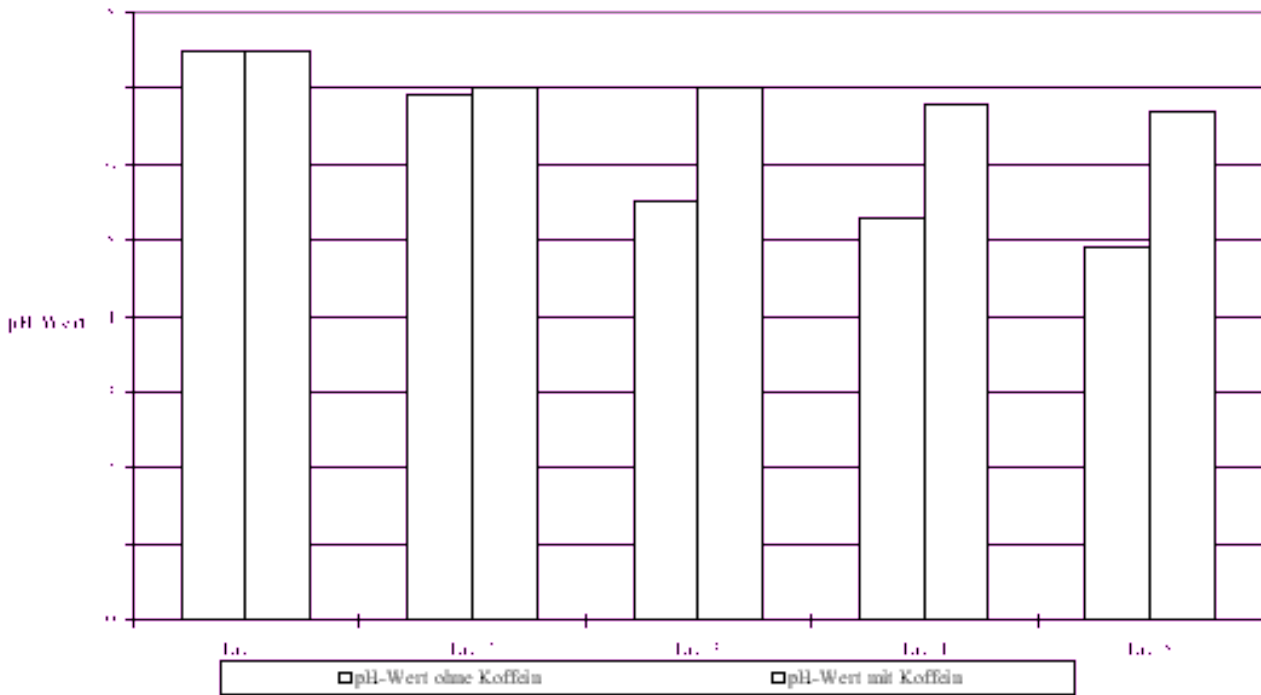


Diagramm 9.2.: Veränderung der pH-Werte in koffeinhaltigem und koffeinfreiem Medium



Für beide Versuche läßt sich eine starke, keimtötende Wirkung einer kombinierten Anwendung von UV- und Ozon feststellen. Diese Wirkung bleibt auch für den gesamten Versuchszeitraum von fünf Tagen relevant. Vergleicht man aber die Graphen in Bezug auf den Koffeingehalt des Mediums, so ist auffällig, daß am ersten Tag der Behandlung die Entkeimung durch Ozon im koffeinhaltigem Medium verschlechtert wird. Möglicherweise übt das Koffein durch Reaktion mit dem Ozon eine gewisse Schutzfunktion aus, so daß die direkte Wirkung des Ozons verringert wird. Diese Vermutung wird durch Beobachtungen untermauert, nach denen die Überlebensraten ozonbegaster Organismen höher sind, wenn die sie umgebenden Medien reich an anderen organischen Inhaltsstoffen sind [Dubeau, H., Chung, Y. S. 1979]. Im weiteren Verlauf des Versuchs wird aber der hemmende Einfluß des Koffeins auf die Reperaturmechanismen der Organismen deutlich. Während sich im koffeinfreien Medium innerhalb der Zeitabstände ohne Behandlung der Titer an Organismen vervielfacht, können im koffeinhaltigem Medium deutlich weniger Organismen überleben. Daher sind die Raten der Organismen, die sich im koffeinhaltigem Medium vermehren um einige Zehnerpotenzen geringer. Durch die Hemmung der Reparaturmechanismen können die UV-induzierten DNA-Schäden nicht mehr in ausreichendem Maß repariert werden, so daß nach 98 h eine Konzentration von weniger als 1000 KBE/ml erreicht wurde. Vergleicht man die Veränderung der pH-Werte so fällt auf, daß diese mit der Entwicklung der Keimzahlen korrelieren. Während im koffeinhaltigen Medium nur wenige Organismen aktiv sind, die eine Veränderung des pH-Wertes verursachen können, ist im koffeinfreien Medium eine starke Erniedrigung des pH-Wertes zu verzeichnen. Das entspricht der Beobachtung, daß einer biologischen Aktivität der getesteten Organismen oft eine Ansäuerung des Mediums einhergeht. Mit den unter 4.2. angesprochenen Organismen, die zu anaeroben Wachstum befähigt sind, wurden Ansätze mit BR II Flüssigmedium (pH 7) in Gährröhrchen angeimpft. Nach 14 Tagen wurde der pH-Wert erneut gemessen. Dabei wurde generell eine Erniedrigung des pHs auf Werte zwischen 3,9 und 4,5 festgestellt. Alle getesteten Bakterien bildeten unter anaeroben Verhältnissen Säuren. Somit könnte also auch eine Veränderung des pH-Wertes ein Indiz für die biologische Aktivität in den Lösungen sein und zur Beurteilung dieser herangezogen werden.

## 10. Versuch zur Keimzahlkontrolle während einer simulierten Konservierungssituation

Die unter 4.2. angesprochenen Holzansätze wurden zu einem 5 l fassendem Gesamtvolumen zusammengefaßt. Die Keimzahl in diesem Ansatz sollte kontrolliert und gegebenenfalls verringert werden. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Versuchen wurde hier kein Nährmedium verwendet, sondern eine 5 %ige Zuckerlösung. Im Verlauf des Versuchszeitraums wurde der Titer in der Zuckerlösung regelmäßig erfaßt, und wenn notwendig die Entkeimungsanlage betrieben. Um den Wirkungsgrad der Entkeimung zu erhöhen wurde der Zuckerlösung 0,1 % Koffein zugesetzt.

Die Parameter der Behandlung blieben wie folgt konstant:

0. Gesamtvolumen: 5 Liter
1. Umlaufgeschw. im System: 100 ml/min
2. Ozonkonz. im Gasgemisch: 20 µg/ml
3. Behandlungsdauer: 4 h

Die erste Probennahme erfolgte vor der UV- und Ozonbehandlung, die zweite Probennahme nachdem die Konservierungslösung beide Behandlungsstufen passiert hatte. Auf diese Weise konnte sowohl die Entwicklung der Besiedlungsdichte im Kulturgefäß ermittelt werden, als auch die Differenz in den Keimzahlen vor und nach der Entkeimung.

Die Keimzahlbestimmung erfolgte durch Ausplattieren auf BR II Medium und anschließender Inkubation für 48 h bei 28°C.

Diagramm 10. gibt die Entwicklung der Besiedlungsdichte im Kulturgefäß und den Einfluß der Entkeimung wieder:

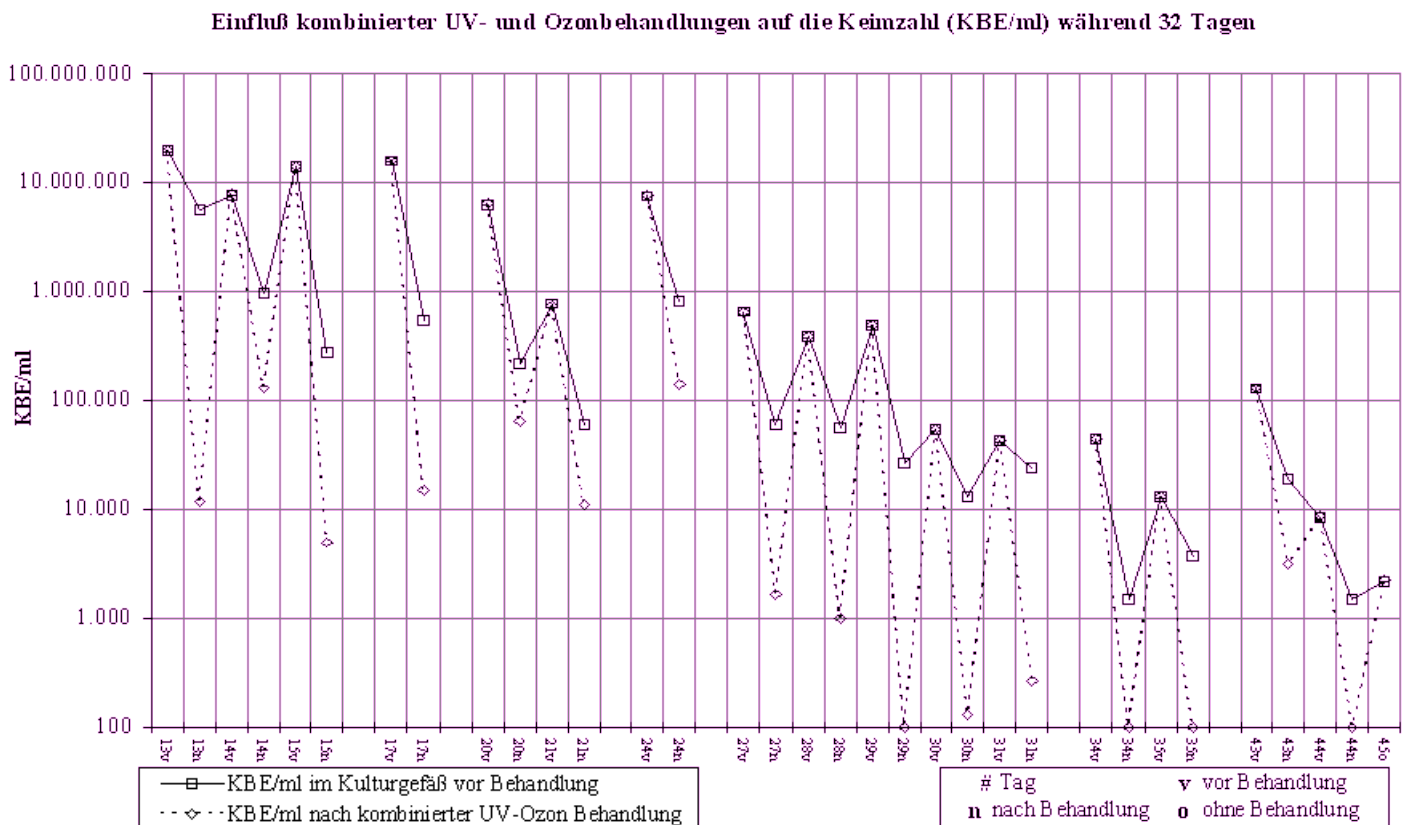


Diagramm 10. zeigt die Entwicklung während 32 Tagen des 45tägigen Versuches.

Für Tag 13v gelten die Keimzahlen vor der Behandlung. Die Keimzahlen für die beiden Entnahmestellen vor und nach der Behandlung entsprechen sich, da bis zu diesem Zeitpunkt keine Einflußnahme erfolgte. Die Werte für 13n geben die Keimzahlen nach 4 Stunden, kurz vor Beendigung der Behandlung wieder.

Deutlich erkennbar ist die Abnahme der KBE/ml im Kulturgefäß während der Entkeimung. Die Keimzahlen für „nach kombinierter UV-Ozon Behandlung“ sind im Durchschnitt um eine bis zwei Zehnerpotenzen geringer als „im Kulturgefäß vor der Behandlung“, wodurch das Maß der erfolgten Entkeimung dokumentiert wird.

Was die Effektivität der Entkeimung angeht, so läßt sich feststellen, daß während der gesamten Versuchsdauer die Wirksamkeit erhalten blieb. Eine Resistenzbildung, die eine weitere Entkeimung verhindert hätte, konnte nicht festgestellt werden. Innerhalb von ca. 20 Tagen wurde die KBE/ml von ca.  $2 \cdot 10^7$  bis auf wenige Tausend Keime gesenkt. Es wurde an maximal 5 Tagen in der Woche eine 4 stündige Behandlung durchgeführt. Eine entsprechende Reduzierung der Keimzahl hätte durch eine Verlängerung der Behandlungsintervalle mit Sicherheit früher erreicht werden können.

## 11. Methoden zur Bestimmung der Lebendkeimzahl und der biologischen Aktivität:

Die Menge der umgesetzten Stoffe pro Zeiteinheit durch eine Population von Mikroorganismen ist von mehreren Faktoren abhängig. Unter gleichen Bedingungen ist die Größe der Population entscheidend. Eine große Anzahl von Organismen kann in der gleichen Zeit entsprechend mehr Stoffe umsetzen, als eine kleinere Population. Es ist also während der Konservierung erforderlich, die Anzahl koloniebildender Einheiten in der Saccharoselösung gering zu halten, um den Abbau des Zuckers zu verhindern. Ebenso entscheidend ist aber auch der physiologische Zustand der Zellen, aus dem die biologische Aktivität resultiert. Betrachtet man zwei gleichartige Populationen, von denen die eine unter optimalen Bedingungen inkubiert ist, die andere aber unter- oder oberhalb des Optimums des betreffenden Parameters, so wird die biologische Aktivität der Letzteren geringer ausfallen. Geeignete Parameter könnten wie bereits erwähnt Temperatur, pH-Wert, Nährstoffangebot u. ä. sein. Verbessert man die Bedingungen für die Organismen, so wird auch die biologische Aktivität steigen. Für den Abbau der Saccharose während der Konservierung bedeutet dies, daß nicht nur die Anzahl der Organismen, sondern auch ihre Aktivität von Bedeutung ist.

Die Bestimmung der KBE/ml ist durch einfache Maßnahmen ausreichend genau durchzuführen. Bei den vorangegangenen Versuchen wurde das „plate count“ Verfahren angewandt, bei dem Verdünnungen einer Suspension auf Agarplatten ausgebracht werden. Nach erfolgter Inkubation werden die angewachsenen Kolonien ausgezählt, und so die Ausgangskonzentration an KBE/ml berechnet. Nach dem gleichen Prinzip arbeiten die im Handel erhältlichen Teststreifen. Diese bestehen aus sterilen, mit einem geeignetem Nährmedium beschichteten Kunststoffstreifen. Nach Eintauchen in die zu testende Lösung werden sie abgeschüttelt und anschließend inkubiert. Nach entsprechender Inkubationszeit kann das Bild der angewachsenen Kolonien mit einer Tabelle verglichen werden und gibt ausreichend genau die KBE/ml in der getesteten Lösung wieder.

Beide Methoden haben allerdings den Nachteil, daß sie keine Aussage über den physiologische Zustand der KBE in der Testlösung zulassen, denn auch inaktive Dauerformen von Organismen in der zu testenden Lösung können auf den Medien auskeimen. Dadurch werden unter Umständen auch Keime erfaßt, die in der Ausgangslösung nicht aktiv waren, also keine Entkeimung erfordert hätten. Zudem ist die Zeitspanne zwischen der Probennahme und der Auswertung der Keimzahl relativ lang, da die Proben für ein bis zwei Tage inkubiert werden müssen. Um entsprechend schneller auf eventuelle Keimzahlveränderungen reagieren zu können wäre, es notwendig die Bestimmung der KBE zu beschleunigen.

Für die Bestimmung der biologischen Aktivität sind verschiedene Methoden gebräuchlich. Bereits erwähnt wurde zum Beispiel die Messung des Sauerstoffverbrauchs. Aber auch andere Stoffumsetzungen können als Maßstab dienen. Dabei läßt sich die Aktivität sowohl anhand der Abnahme des Substrates nachweisen, wie über die Zunahme des Produktes. Für den Bereich der Naßholzkonservierung ist es wichtig dabei eine Stoffumsetzung zu finden, die sehr universell bei einer Vielzahl von Organismenarten vorkommt. Beschränkt man sich beispielsweise auf die Betrachtung einer nur bei aeroben Organismen vorkommenden Stoffumsetzung, entgehen alle anaeroben Keime der Betrachtung.

Eine weitere Anforderung an eine solche Methode ist die möglichst einfache Bestimmung der Stoffumsetzung, z. B. durch photometrische Messung.

Ein Substrat, daß diese Anforderungen erfüllt ist Fluoresceindiacetat (FDA) [K. Alef 1991]. FDA wird durch unspezifische Esterasen, die universell unter Mikroorganismen verbreitet sind, zu Fluorescein und Acetat umgesetzt. Im Gegensatz zu FDA ist Fluorescein neongrün gefärbt und die Intensität einer Anfärbung kann leicht photometrisch gemessen werden. Da die Reaktion nur ca. 1,5 h dauert, wäre ist diese Methode gut geeignet, um innerhalb kurzer Zeit auf die biologische Aktivität in einer Lösung schließen zu können. Bei unbeeinflussten wachsenden Kulturen mit konstanten Parametern (Temperatur, Nährstoffangebot, u. ä.) ist eine Relation zwischen Lebendzellzahl und Intensität der Anfärbung durch FDA Umsetzung festzustellen.

In behandelten Lösungen ist diese Relation nicht mehr gegeben. Die Intensität der Anfärbung der Lösung war im Vergleich zur durch Ausplattieren bestimmten Lebendzellzahl unverhältnismäßig hoch.

Die Begründung dafür liegt in der Induktion der DNA-Reperaturmechanismen in den Organismen durch die UV-Strahlung. Da die DNA-Reperatur einen energetisch sehr aufwendigen Prozeß darstellt, geht er mit einer Erhöhung der biologischen Aktivität einher. Dadurch wird auch mehr FDA umgesetzt, als bei einer vergleichbaren Anzahl unbestrahlter Organismen.

Durch eine Ozonisierung wird die Zerstörung (Lyse) der Zellen verursacht. Die Zellinhaltsstoffe, also auch die enthaltenen Esterasen, gelangen ins umgebende Medium und führen so zu einer Anfärbung durch Bildung von Fluorescein aus FDA, die nicht mit der Anzahl der koloniebildenden Einheiten korreliert.

Eine erfolgreichere Anwendung der FDA Umsetzung ergibt sich aus der möglichen Anregung von Fluorescein durch Licht einer Wellenlänge von 490 nm, wodurch eine Fluoreszenz des Farbstoffes ausgelöst wird.

FDA kann auf Grund seiner chemischen Struktur (unpolar) leicht in Zellen diffundieren, wo es zu Fluorescein umgesetzt wird. Das entstandene Fluorescein hat andere chemische Eigenschaften (polar) und kann nicht durch die Zellmembranen ins Medium zurück strömen. Eine Anreicherung des Farbstoffes in aktiven Zellen ist die Folge. In abgestorbenen Zellen findet diese Reaktion nicht statt [K. Alef 1991].

Eine Anfärbung des Testansatzes resultiert aus der Umsetzung durch Esterasen, die von den Organismen ins Medium abgegeben werden (Exoenzyme). Bedingt durch die Anreicherung des Farbstoffes lassen sich die gefärbten Zellen bei Anregung des Farbstoffes mit einer Wellenlänge von 490 nm unter dem Fluoreszenzmikroskop darstellen.

Diese Reaktion kann für eine schnelle Lebendzellzahlbestimmung genutzt werden.

Zu diesem Zweck wurde ein definiertes Volumen Organismensuspension durch eine Filtermembran mit 0,2 µm Porengröße steril filtriert. Die Zellen können diese kleinen Poren nicht passieren und kommen so auf der Filtermembran zu liegen. Diese Membran wurde mit FDA-Lösung gefärbt, und nach 1,5 h Inkubation gewaschen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnten auf diese Art die fluoreszierenden Zellen, die auf der Membran anheften, gezählt werden.

Die FDA-Färbemethode erwies sich zudem als geeignet, um physiologisch aktive Zellen auf Holzproben fluoreszenzmikroskopisch darzustellen. Abgestorbene Zellen und physiologisch inaktive Dauerformen werden so nicht erfaßt. Auf diese Weise läßt sich vor Beginn der Konservierung eine Einschätzung der Stärke einer vorhandenen Kontamination der Hölzer gewinnen. Eine Notwendigkeit zur Dekontamination (siehe 3. und 4.1.) ließe sich so schnell und zuverlässig erkennen.

## **12. Diskussion:**

Möglichkeiten einer Verringerung der Kontamination zuckerhaltiger Lösungen wurden angesprochen. Im Vorfeld der Konservierung kann eine Dekontamination der Konservierungsbecken und der Hölzer zu einer Verbesserung der Ausgangssituation beitragen. Es wurde gezeigt, daß die Veränderung von Parametern wie Temperatur, Gegenwart von Sauerstoff und pH-Wert geeignet sind, um das Ausmaß einer mikrobiellen Besiedlung zu verringern. Eine Entkeimung von Zuckerlösungen kann so wirkungsvoll unterstützt werden. Die Behandlung kontaminierter Zuckerlösung durch UV-Bestrahlung und anschließender Begasung mit Ozon bewirkt eine zuverlässige Entkeimung. Dieser Effekt kann durch eine geringe Zugabe von Koffein in das Medium entscheidend verbessert werden.

Das Auftreten von resistenten Keimen konnte während eines 45tägigen Versuches nicht beobachtet werden. Zur Beurteilung der Notwendigkeit einer Behandlung der Lösung sollten sowohl die Anzahl der Lebendkeime, als auch ihre biologische Aktivität betrachtet werden. Dabei erscheint eine Färbung mit FDA geeignet um aktive von inaktiven Zellen zu differenzieren. Durch diese Färbemethode sollte es möglich werden ein Verfahren zu etablieren, das sowohl eine schnelle Beurteilung der Situation in den Lösungen in Bezug auf die Lebendzellzahl zuläßt, wie auch eine Einschätzung der biologischen Aktivität ermöglicht.

Eine Darstellung der aktiven Keime auf archäologischem Naßholz ist durch diese Färbung möglich. Die Notwendigkeit einer Dekontamination der zu konservierenden Hölzer kann so beurteilt werden.

Die Versuche zur Entkeimung von Zuckerlösungen zeigten, daß bei entsprechender Anpassung der Behandlung auch größere Volumen an Zuckerlösungen entkeimt werden können. Eine Zugabe von Hemmstoffen würde somit in vielen Fällen unnötig.



## **Danksagung:**

Ohne die Unterstützung und den fachlichen Rat der folgenden Personen wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen:

Frau Cott

Thüringisches Landesamt f. archäologische Denkmalpflege / Weimar

Herr Dr. Fendel, Herr Meyer, Herr Metzger

Niedersächsisches Landesamt f. Denkmalpflege / Hannover

Herr Hübner

Firma HUMARES / Weingarten

Herr Preuss

Archäologisches Landesmuseum / Konstanz

Die Mitglieder der Arbeitsgruppe Geomikrobiologie der Universität Oldenburg / ICBM

Wir möchten uns herzlich für die wertvolle Hilfe bedanken.

## **14. Weiterführende Literatur:**

Alef, K. . 1991. Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie: Aktivitäten, Biomasse, Differenzierung: ecomed Landsberg/Lech

Dubeau, H., Chung, Y. S.. 1979. Ozone response in wild type and radiation-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae* : Mol. Gen. Genet. 176: 393-398

Dubeau, H., Chung, Y. S.. 1984. Effect of coffeine on ozone-sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae* : Mol. Gen. Genet. 195: 361-363

Evans, L. S., Ting , I. P. 1973. Ozone induced membrane permeability changes : Am. J. Bot. 60: 155-162

Garg, K. L., K. G. Mukerji. 1993. Deteration of wooden materials by microorganisms Recent Advantages in Biodeteration and Biodegradation, K. L. Garg, N. Garg, K. G. Mukerji. (Eds.) Vol 1:429-479

Knippers, R.,Phillippsen,P., Schäfer, K. P., Fanning, E. 1990. Molekulare Genetik : 5. Auflage. G. Thieme Verlag Stuttgart - New York

Schlegel, H. G., 1992. Allgemeine Mikrobiologie : 7. Auflage. G. Thieme Verlag Stuttgart - New York

Schiweck, Prof. Dr. H., 1996. Zucker/Saccharose - seine anwendungstechnisch relevanten Eigenschaften bei der Naßholzkonservierung : Arbeitsgemeinschaft der Restauratoren, Arbeitsblätter, Heft 2: 241-246

1990 Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittelbetriebe (Trinkwasserverordnung - TrinkwV): BGBl. I, S.2613 ff.