

Den Keimen auf der Spur

Kulturunabhängige Charakterisierung von Bakterien in wässrigen Beschichtungsmitteln

Monika Lamoratta und Frank Sauer

Um eine Beschichtung effektiv gegen Mikroben auszurüsten, sollte sich die Wahl des passenden Mikrobizids an der Art und Häufigkeit der zerstörenden Mikroorganismen im Produkt orientieren. Konventionelle Methoden zu deren Identifizierung sind auf eine Kultivierung der Mikroben angewiesen, die aber das Ergebnis verfälschen kann. Ein neues Verfahren könnte diesen Schritt nun überflüssig machen.

30

Wie viele andere Materialien auch, können Farben und Lacke sowohl im noch nicht verarbeiteten, flüssigen Zustand als auch später in applizierter Form, z.B. auf einer Fassade von Mikroorganismen angegriffen werden. Mikrobizide helfen, das Wachstum gesundheitsschädlicher Organismen, beispielsweise von Schimmelpilzen in einer Wandfarbe, zu verhindern. Durch eine geeignete Gebindekonservierung ist das zu verarbeitende Beschichtungsmittel länger verwendungsfähig und im Rahmen des Filmschutzes bleibt zum Beispiel eine Immobilie länger ansehnlich und die Integrität der Filmmatrix länger geschützt, sodass kostenaufwendige und Ressourcen verbrauchende Renovierungen seltener durchgeführt werden müssen. Neben der Vermeidung gesundheitlicher Gefahren leistet eine adäquate Konservierung daher einen substanziellen Beitrag zum Erhalt eines Beschichtungsmittels bzw. einer daraus resultierenden Beschichtung, wodurch die natürlichen Ressourcen geschont bleiben. Ein leistungsstarker Schutz gegen Mikroorganismen kann daher als eine nachhaltige Produktoptimierung angesehen werden [1].

Kontakt:
Monika Lamoratta
Lanxess Deutschland GmbH
monika.lamoratta@lanxess.com



Abb. 1.: Kultivierung von Mikroorganismen



Abb. 2: Bakterien in einer kolorierten elektronenmikroskopischen Aufnahme

Konventionelle Identifizierung von Mikroorganismen

Meist sind komplexe mikrobielle Gemeinschaften, häufig aus Bakterien, Pilzen und Hefen bestehend, für den strukturellen Abbau einer noch nicht applizierten Dispersionsfarbe verantwortlich. Die Auswahl des passenden Mikrobizids sollte sich daher an der Art und Häufigkeit der zerstörenden Mikroorganismen im Produkt orientieren.

Um die Bandbreite dieser Mikroorganismen effektiv kontrollieren zu können,

sollte die Zusammensetzung der vorliegenden Gemeinschaften im Idealfall genau bekannt sein. Bisher wurden dazu konventionelle Identifizierungsmethoden angewandt, die eine Kultivierung des befallenen Produktes bedingen (Abb. 1). Bei einem solchen Kultivierungsschritt besteht aber prinzipiell die Gefahr, dass auch diejenigen Mikroorganismen in ihrem Wachstum unterstützt werden, die möglicherweise unbedeutend für die Farberstörung sind. Damit würde die Bedeutung solcher Stämme für die mik-

robiell induzierte Farbzerstörung deutlich überbewertet.

Zwei klassische Methoden zur Identifizierung

Es gibt zwei klassische Methoden zur Identifizierung von Mikroorganismen. Die erste Methode basiert auf einer phänotypischen Charakterisierung, bei der die gewachsene Kolonie auf Eigenschaften wie Größe, Form und Farbe hin untersucht wird (Abb. 2). An diese Untersuchung schließen sich meist noch biochemische Methoden an, etwa die Gram-Färbung und die Oxidase-Reaktion, die eine genauere Eingrenzung der Art und Gattung zulassen.

Die zweite Methode charakterisiert Mikroorganismen auf genetischer Ebene. Sie stützt sich auf evolutionären Veränderungen in den Informationen tragenden Regionen der DNA, dem Genom (Abb. 3). Im Laufe der Evolution haben sich aufgrund von Anpassungen an z.B. veränderte Umweltbedingungen verschiedene Bakterienarten aus einigen Vorläufern gebildet. Eine molekularbiologische Identifizierung basiert auf den Unterschieden im genetischen Kode. Ein Bereich der DNA, der dafür in der Praxis genutzt wird, ist das so genannte 16S rRNA Gen [2-5]. Die dazugehörige Sequenz der Basenpaare eines bestimmten Abschnitts aus diesem Gen kann – ähnlich wie der Vergleich von Fingerabdrücken beim Menschen – einer bestimmten Bakterienart genau zugeordnet werden.

Auch bei dieser Methode müssen die Bakterien zunächst kultiviert und die gewachsenen Kolonien anschließend isoliert werden. Von jeder Kolonie wird genomische DNA gewonnen und der 16S rRNA-Genabschnitt wird mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) *in vitro* vervielfältigt (Abb. 4). Die PCR-Technik arbeitet mit dem Enzym



Abb. 3: Schematische Darstellung eines DNA-Abschnittes

Quelle: [Adam Gault] / [OJO Images] / Getty Images

DNA-Polymerase. Die Produkte vorheriger Zyklen dienen als Ausgangsstoffe für den nächsten Zyklus und ermöglichen somit eine exponentielle Vervielfältigung.

Mittels Sequenzierung des oben genannten Genabschnitts und eines anschließenden Datenbankabgleichs mit veröffentlichten Sequenzen können die einzelnen Organismen dann über Familie und Gattung bis hin zur Art identifiziert werden.

Der Nachteil der beschriebenen Methoden ist, dass sie einen Kultivierungsschritt voraussetzen. Bei diesem Prozess kann es aufgrund der Auswahl der Versuchsparameter, wie Nährstoffangebot, Temperatur und Sauerstoffangebot, zu einer ungewollten Präselektion von bestimmten Mikroorganismen kommen. Organismen, die bei

den gewählten Kulturbedingungen nicht in der Lage sind, sich zu vermehren, können auch nicht detektiert und damit nicht identifiziert werden.

Kultur-unabhängige Identifizierung von Bakterien

Es war daher das Ziel, ein weiteres Verfahren zu entwickeln, welches unter Kombination moderner molekularbiologischer Methoden die Identifizierung von Bakterien direkt aus einem verkeimten, wässrigen Produkt, wie einer Dispersionsfarbe

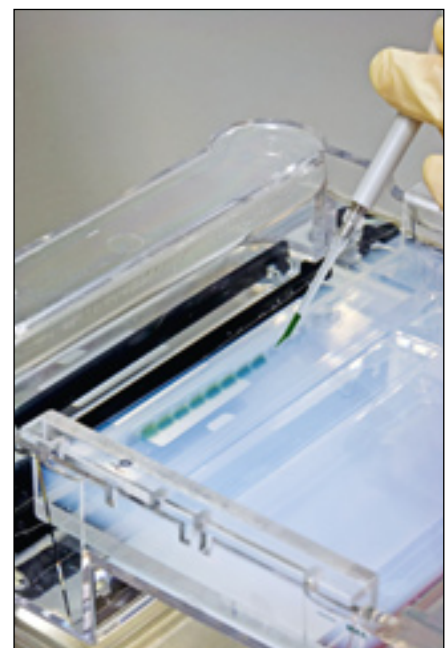


Abb.4.: Elektrophorese mit über PCR gewonnenen DNA-Fragmenten

► Ergebnisse auf einen Blick

- Mikrobielle Gemeinschaften aus Bakterien, Pilzen und Hefen sind für den strukturellen Abbau von Dispersionsfarben verantwortlich.
- Die Auswahl eines Mikrobizids sollte sich an der Art und Häufigkeit der zerstörenden Mikroorganismen im Produkt orientieren.
- Konventionelle Methoden zur Identifizierung von Mikroben bedingen eine Kultivierung des befallenen Produktes.
- Ein solcher Kultivierungsschritt kann auch Mikroorganismen in ihrem Wachstum unterstützen, die für die Farbzerstörung unbedeutend sind. Umgekehrt können Organismen nicht detektiert werden, die sich bei den gewählten Kulturbedingungen nicht vermehren.
- Es wurde eine kulturunabhängige Identifizierung bakterieller Gemeinschaften entwickelt, die auf einer Extraktion von DNA und anschließender sequenzabhängiger Trennung von Genabschnitten gleicher Größe mittels denaturierender Gradientengelelektrophorese basiert.
- Aus einer natürlich verkeimten Dispersionsfarbe ist bakterielle DNA isolierbar, dagegen ist es bisher nicht gelungen, ausreichende Mengen an DNA aus frischer mit Bakterien versetzter Farbe zu extrahieren.



Abb. 5: Schritte der kulturunabhängigen Bakterienbestimmung

oder einer Betriebswasserprobe, zulässt. Ein Kultivierungsschritt, der eine Aussage über die Zusammensetzung einer mikrobiellen Gemeinschaft verfälschen könnte, wäre dann überflüssig.

Diese neuentwickelte Methode basiert auf der sequenzabhängigen Trennung von Genabschnitten gleicher Größe mittels denaturierender Gradientengelelektrophorese (DGGE) [6]. Abb. 5 zeigt den schematischen Ablauf der Methode. Hierbei wird die DNA aller enthaltenen Bakterien direkt aus dem Produkt isoliert, aus der dann die jeweiligen 16S rRNA-Genabschnitt vervielfältigt werden. Liegt eine Verkeimung durch eine bakterielle Gemeinschaft vor, so erhält man eine Mischung aus 16S rRNA-Genabschnitten gleicher Größe, die sich lediglich in ihrer Sequenz voneinander unterscheiden. Diese Mischung wird dann sequenzabhängig durch DGGE aufgetrennt.

Die Auftrennung basiert darauf, dass Genabschnitte mit verschiedenen DNA-Sequenzen unterschiedliche Schmelztemperaturen aufweisen, d.h. die Art und Häufigkeit der Bausteine einer DNA-Se-

quenz bestimmen die Temperatur, bei der sich die DNA-Doppelstränge voneinander trennen. Dies ist als Denaturierung bekannt und kann neben Temperatur auch durch Chemikalien hervorgerufen werden. Diese Eigenschaft macht man sich bei der Elektrophorese zu Nutze, da ein (partiell) aufgetrennter DNA-Strang im Gel eine geringere Mobilität besitzt als ein Doppelstrang. Ein Gemisch von 16S rRNA Genabschnitten lässt sich auf diese Weise im chemischen Gradienten separieren. Die voneinander getrennten Fragmente können nun sequenziert und mit bekannten DNA-Abschnitten einer Datenbank abgeglichen werden. Im Idealfall liefert die Methode eine bestimmte Anzahl an Identifikationsergebnissen, die die kontaminierenden Bakterienstämme im Produkt widerspiegeln. Für eine Anwendung in der Praxis ist es jedoch zwingende Voraussetzung, dass die unterschiedliche DNA einer Bakteriengemeinschaft auch wirklich direkt aus dem zu prüfenden Endprodukt, beispielsweise einer Dispersionsfarbe, isolierbar ist.

Direkte DNA-Isolation aus kontaminierten Produkten

Um DNA aus verschiedenen Materialien zu isolieren, gibt es zwei weit verbreitete Isolationstechniken, die auf der Polarität bzw. negativen Ladung der DNA basieren:

- Bei der Phenol/Chloroform-Extraktion wird ein DNA-haltiges Produkt in einer Mischung aus Phenol und Chloroform gelöst, ausgeschüttelt und die phenolisch-wässrige von der organischen Phase getrennt. Die DNA löst sich hierbei in der phenolischen Phase, wohingegen die meisten Verunreinigungen, wie Proteine oder andere organische Verbindungen, in der Chloroform-Phase vorliegen.



Abb. 6: Elektrophoretische Auftrennung von DNA aus den drei Bakterienstämmen, der Bakterienmischung, sowie aus der kontaminierten Dispersionsfarbe

- Eine andere Methode, DNA zu isolieren, ist die Aufreinigung mittels Anionenaustauscher. Hierbei bindet DNA bei niedriger Salzkonzentrationen in einem definierten pH-Bereich an den Anionenaustauscher und kann von Verunreinigungen getrennt werden. Im Anschluss daran kann durch Erhöhung des Salzgehalts die DNA im Anionenaustauscher wieder verdrängt und somit von der stationären Phase eluiert werden.

Beide Methoden liefern ein aufgereinigtes und aufkonzentriertes DNA-Produkt. Allerdings wurden diese Methoden ursprünglich für die Isolation von Nukleinsäuren aus Geweben, Blut oder anderen biologischen Quellen konzipiert. Eine DNA-Aufreinigung aus einer relativ komplexen Mischung wie einer Dispersionsfarbe kann mit bestehenden Versuchsprotokollen prinzipiell zu Problemen führen.

Um solche Probleme zu identifizieren, wurde die kulturunabhängige Bakterienidentifikation in einem praxisnahen Testsystem erprobt. Drei verschiedene Farbsysteme – typische Dispersionsfarben auf Basis von Reinacrylat-, Styrolacrylat- und Polyvinylacetat-Bindemitteln – wurden dazu mit drei Bakterienstämmen, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus*, in gleicher Keimkonzentration versetzt. Außerdem wurde eine schon natürlich verkeimte Dispersionsfarbe auf Basis von Polyvinylacetat-Bindemittel untersucht. Die darin enthaltene Bakterien-DNA ließ sich mithilfe von Anionenaustauschern isolieren, per PCR vervielfältigen und über eine DGGE auftrennen. Aus den frisch hergestellten und absichtlich kontaminierten Dispersionsfarben ließen sich mit dieser Aufreinigungsmethode dagegen bislang keine ausreichenden Mengen an DNA isolieren. Auch die Phenol/Chloroform-Extraktion lieferte für diese Proben keine besseren Resultate.

Dieser Befund deutet darauf hin, dass zumindest einige Farbbestandteile die verwendeten Aufreinigungsmethoden behindern. Ein Grund könnte sein, dass Farbbestandteile an die Anionenaustauscher-Oberfläche binden, sodass diese nicht mehr für



• Dr. Frank Sauer

studierte Chemie in Köln, wo er 1993 promovierte. Seine berufliche Laufbahn startete Sauer 1995 bei einem Autoreparaturlack-Hersteller. 1999 wechselte er zur Borchers GmbH, wo er für die Entwicklung von Additiven für Farben und Lacke verantwortlich war. 2001 übernahm er die Leitung der F&E-Abteilung. Seit Juli 2006 ist Sauer Manager Technical Marketing Coatings in der Business Unit Material Protection Products von Lanxess.



• Monika Lamoratta

absolvierte ihre Ausbildung zur Biologielaborantin 2003 bei der Bayer AG in Wuppertal. Anschließend arbeitete sie bei Miltenyi Biotec im Bereich Antikörper basierter Zellseparation und machte eine Fortbildung zur Labortechnikerin. Seit 2008 ist sie im Technical Marketing Coatings in der Business Unit Material Protection Products von Lanxess tätig. Derzeit absolviert sie einen Bachelor-Studiengang für Molekulare Biologie.

► Tab. 1: Identifizierungsergebnisse aus kontaminierter Dispersionsfarbe

Mit Kultivierung
Comamonas testosteroni
Flavobacterium mizutaii
Pseudomonas aeruginosa
Delftia tsuruhatensis
Pseudomonas sp.
Microbacterium keratanolyticum
Kulturunabhängig
Pseudomonas fluoreszens
Pseudomonas putida

eine Bindung der DNA zur Verfügung steht. Diese Bestandteile könnten durch den länger andauernden Bakterienbefall bereits degradiert sein, sodass die Aufreinigung mit der älteren Probe funktioniert.

DNA-Identifizierung per DGGE

Aus der reinen artifiziiellen Bakterienmischung konnten mit der DGGE wie erwartet alle eingesetzten Keime mit hoher Übereinstimmung wiedergefunden werden. In der oben genannten kontaminierten Dispersionsfarbe war überraschenderweise nur die Spezies *Pseudomonas aeruginosa* prominent vertreten (Abb. 6). Ein Methodenvergleich, der mit einem natürlich verkeimten Farbmuster durchgeführt wurde, zeigte, dass die konventionelle kulturabhängige Methode eine ganze Reihe zusätzlicher Bakterienarten identifiziert als die kultu-

runabhängige DGGE-Methode (Tab. 1). Die konventionelle Methode mit Kultivierung unterstützt offenbar auch solche Bakterien in ihrem Wachstum, die nur in sehr geringer Menge vorkommen und für die Farbzerstörung möglicherweise nicht relevant sind, sodass die Detektion solcher Bakterienstämme in diesem Fall falsch interpretiert werden könnte.

Die DGGE kann dagegen als semiquantitative Methodik angesehen werden, denn die Auftrennung mittels DGGE liefert Ergebnisse, die in gewissem Maße mit der Konzentration an Bakterien-DNA in der Probe korrelieren. Somit könnte es sich bei den mittels DGGE detektierten Bakterien um die dominierenden Spezies im Beschichtungsprodukt handeln, welche maßgeblich für die Produktzerstörung verantwortlich sind. Offensichtlich sind nicht alle vorliegenden Bakterienstämme gleichermaßen an der Produktzerstörung beteiligt. Mithilfe der DGGE war es zudem, anders als mit der konventionellen Methode, möglich, die *Pseudomonas*-Spezies genauer zu identifizieren.

Soviel wie nötig, so wenig wie möglich

Die vorgestellten Resultate zeigen, dass es grundsätzlich möglich ist, eine bakterielle Gemeinschaft kulturunabhängig mittels DGGE zu identifizieren. Im Hinblick auf kontaminierte Produkte wie Dispersionsfarben werden zurzeit noch weniger Stämme identifiziert als mit der konventionellen Methode, wobei zu klären ist, ob dies durch die Methode bedingt ist oder durch die Relevanz der Bakterien im Hinblick auf die Farbzerstörung. Es erscheint aber möglich,

dass eine Optimierung der DGGE Methode diese Frage klären könnte, sodass dadurch neue Einblicke in die Prozesse der Farbzerstörung im Gebinde gewonnen werden. Bakterien, die für die Zersetzung der Farbe keine Rolle spielen, müssen auch nicht unbedingt durch ein Mikrobizid bekämpft werden. Der Anwender könnte, im Sinne von Nachhaltigkeit und nach dem Motto: „Soviel wie nötig, so wenig wie möglich“ Mikrobizid einsparen, aber gleichzeitig seine Produkte effektiv schützen. ◀

► Literaturhinweise


- [1] Wissenschaftliche Dienste des Deutschen Bundestages: Nachhaltigkeit, Der aktuelle Begriff 06/2004, 6. April 2004.
- [2] Bottger, E. C.: FEMS Microbiol Lett, 65, 171-176 (1989).
- [3] Harmsen, D.; Karch, H.: ASM News, 70, 19-24 (2004).
- [4] Kolbert, C. P.; Persing, D. H.: Curr Opin Microbiol, 2, 299-305 (1999).
- [5] Wood, S. A.; Mountfort, D. et al.: Appl Environ Microbiol, 74 (23), 7243 – 7251 (2008).
- [6] Rölleke, S.: Appl. Environ. Microbiol., 62 (6), 2059-2065 (1996).



**Und nun sind Sie gefragt:
Bewerten Sie diesen Beitrag für den
FARBE UND LACK Preis 2011
www.farbeundlack.de/bewertung**

Oxylink™

For better waterborne coatings



Das neue Additiv für wasserbasierte Beschichtungen

- Kürzere Trockenzeit
- Höhere Blockfestigkeit
- Größere Lösemittelbeständigkeit
- Bessere Feuchtigkeitsbeständigkeit
- Geringere Anschmutzung
- Verstärkte Quervernetzung

Setzen Sie sich mit uns in Verbindung für weitere Informationen oder für ein kostenloses Muster!

Oxylink@buhlergroup.com
+49 (0) 681 - 394 6550
www.buhlergroup.com

