TEXTE
174/2020

Weiterentwicklung der produktbezogenen Anforderungen an Konservierungsmittel für Produkte mit dem Blauen Engel zum Schutz der Gesundheit

Abschlussbericht

Für Mensch & Umwelt

Umwelt Bundesamt

TEXTE 174/2020

Ressortforschungsplan des Bundesministerium für
Umwelt, Naturschutz und nukleare Sicherheit

Forschungskennzahl 3717 37 321 0
UBA-FB000391

Weiterentwicklung der produktbezogenen Anforderungen an Konservierungsmittel für Produkte mit dem Blauen Engel zum Schutz der Gesundheit

Abschlussbericht

von

Viola Boenke, Sigrid Drecker, Ina Stephan
Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, Berlin

Im Auftrag des Umweltbundesamtes

Impressum

Herausgeber
Umweltbundesamt
Wörlitzer Platz 1
06844 Dessau-Roßlau
Tel: +49 340-2103-0
Fax: +49 340-2103-2285
info@umweltbundesamt.de
Internet: www.umweltbundesamt.de

/umweltbundesamt.de
/umweltbundesamt

Durchführung der Studie:
Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung
Unter den Eichen 87
12205 Berlin

Abschlussdatum:
April 2020

Redaktion:
Fachgebiet III 1.4 Stoffbezogene Produktfragen
Anke Oehm

Publikationen als pdf:
http://www.umweltbundesamt.de/publikationen

ISSN 1862-4804

Dessau-Roßlau, Juli 2020

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autorinnen und Autoren.

Kurzbeschreibung

Die Zertifizierung von Lasuren, Vorlacken und Decklacken durch den Blauen Engel erfolgt derzeit durch Beurteilung der Zusammen-setzung ihrer Formulierung oder durch Verwendung eines Emissionstests (nach DIN EN 16402). Aufgrund des Wassergehalts dieser Produkte müssen Konservierungsmittel hinzugefügt werden, um das Produkt vor dem Abbau durch Mikroorganismen zu schützen und damit seine Haltbarkeit während der Lagerung im Gebinde zu verlängern.

Das Hauptziel dieses Forschungsprojekts war es zu bestimmen, ob der in einem früheren Projekt (FKZ: 3715373040) überarbeitete Gebrauchstauglichkeitstest („Biotest“) zur Feststellung der Wirksamkeit von Bioziden zur Gebindekonservierung in weißer Innenraumwandfarbe auch für andere Beschichtungs-materialien für Innenräume wie Lasuren, Vorlacke und Decklacke verwendet werden kann. Es wurden gealterte (bei 40°C) und nicht gealterte Produkte untersucht. Die Studie zeigte, dass es Unterschiede in der Empfindlichkeit der verschiedenen Beschichtungen gegenüber den verwendeten Mikroorganismen gab. Die Ergebnisse sind detailliert im Bericht wiedergegeben, ebenso wie drei Richtlinienformulierungen für die verschiedenen Produktarten, die nach Rücksprache mit Vertretern der beteiligten Branchen definiert wurden.

Ein weiteres Ziel war es festzustellen, ob konservierungsmittelfreie, weiße Innenwandfarben, die im Heimwerkerbaumarkt erhältlich sind, frei von mikrobiologischer Kontamination sind. Aufgrund der Entscheidung des Umweltbundesamtes (Dezember 2018), Konservierungsmittel in Wandfarben mit dem Blauen Engel nicht zuzulassen, haben gekennzeichnete, konservierungsmittelfreie, weiße Innenraumwandfarben zunehmend an Bedeutung gewonnen. Erste Untersuchungen zur Besiedlung von konservierungsmittelfreien Farben wurden mit zwei alkaliphilen Bakteriengattungen durchgeführt, die aus einer konservierungsmittelfreien Farbe isoliert worden waren.

Abstract

Blue Angel certification of stains, primers and top-coats is achieved currently by assessing the composition of their formulation and through the use of an emission test (according to DIN EN 16402). Due to their water content in-can, these products are susceptible to microbial attack. Preservatives for in-can preservation must be added to protect the product from degradation by microorganisms and thus to extend their shelf life.

The primary aim of this research project was to determine whether the ‘biotest’ for establishing the effectiveness of preservatives in white interior wall paint that was revised in a previous project (FKZ: 3715373040) can also be used for other indoor coating materials such as stains, primers and top-coats. Artificially aged (at 40^C) and non-aged products were investigated. The study showed that there were differences in the susceptibility of the different coatings to the microorganisms used. Detailed results are reported in the study as well as three guideline formulations which were defined after consultation with representatives from the industries involved.

A secondary aim was to determine whether preservative-free white, interior wall paints available on the DIY market were free of microbiological contamination. Due to the decision of the Umweltbundesamt (December 2018) not to allow preservatives to be used in wall paints bearing the Blue Angel mark, preservative-free, white, interior wall paints have become increasingly important. Initial investigations into the colonisation of preservative-free paints were performed with two alkaliphilic bacterial genera that had been isolated from a preservative-free paint.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis 9

Tabellenverzeichnis 9

Abkürzungsverzeichnis 9

1.1 Bestimmung der Eignung des Gebrauchstauglichkeitstests für Lasuren, Vorlacke und Decklacke 11

1.1.1 Besiedlung durch Bakterien und Hefen 12

1.1.2 Definition von Richtlinienformulierungen 12

1.2 Konservierungsmittelfreie, weiße Wandfarben 13

2 Summary 14

2.1 Determination of the suitability of the 'biotest' for stains, primers and top-coats 14

2.1.1 Colonisation by bacteria and yeasts 15

2.1.2 Definition of guideline formulations 15

2.2 Preservative-free, white, interior wall paints 16

3 Einleitung 17

4 Material und Methoden 19

4.1 Dispersionslacke 19

4.2 Mikroorganismenstämme 19

4.3 Bestimmung des MIT und BIT Gehalts 20

4.3.1 Lacke 20

4.4 Nährmedien 20

4.5 Bestimmung der Gesamtzellzahl 20

4.6 Herstellung der Impfsuspension 21

4.6.1 Bakterien 21

4.6.2 Hefen 21

4.7 Herstellung der Sporensuspension 21

4.8 Gebrauchstauglichkeitstest 22

4.9 Dampfraumtest 22

4.10 Molekularbiologische Methoden 23

4.10.1 Präparation chromosomaler DNA 23

4.10.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 23

4.10.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA 24

4.10.4 Sequenzierung 24

5 Ergebnisse 25

5.1 Anwendbarkeit des Gebrauchstauglichkeitstests auf Lacke ... 25
5.1.1 Acryllack ... 25
5.1.2 Hybrid-Weißlack ... 25
5.1.2.1 Dampfraumtest ... 25
5.1.3 Lacke Firma II ... 26
5.1.3.1 Analyse der Konservierungsmittelkonzentration ... 26
5.1.3.2 Gebrauchstauglichkeitstest mit Bakterien ... 27
5.1.3.3 Gebrauchstauglichkeitstest mit Hefen ... 28
5.1.4 Einfluss der künstlichen Alterung auf die Besiedelbarkeit von Lacken ... 30
5.1.4.1 Analyse der Konservierungsmittelkonzentration ... 30
5.1.4.2 Gebrauchstauglichkeitstest mit Bakterien vor der künstlichen Alterung ... 30
5.1.4.3 Gebrauchstauglichkeitstest mit Bakterien nach der künstlichen Alterung ... 32
5.1.4.4 Gebrauchstauglichkeitstest mit Hefen vor der künstlichen Alterung ... 33
5.1.4.5 Gebrauchstauglichkeitstest mit Hefen nach der künstlichen Alterung ... 34
5.1.4.6 Gebrauchstauglichkeitstest mit Schimmelpilzsporen ... 35
5.1.5 Festlegung von Richtrezepturen ... 35
5.1.5.1 Analyse der Konservierungsmittelkonzentration ... 35
5.1.5.2 Gebrauchstauglichkeitstest mit Bakterien ... 36
5.1.5.3 Gebrauchstauglichkeitstest mit Bakterien nach der künstlichen Alterung ... 37
5.1.5.4 Gebrauchstauglichkeitstest mit Hefen ... 38
5.1.5.5 Gebrauchstauglichkeitstest mit Hefen nach der künstlichen Alterung ... 39
5.1.5.6 Gebrauchstauglichkeitstest mit Schimmelpilzsporen ... 40
5.2 Konservierungsmittelfreie Dispersionsfarben ... 41
5.2.1 Bestimmung des pH-Wertes ... 42
5.2.2 Nachweis von Mikroorgansimen ... 42
5.2.3 Polymerase-Kettenreaktion ... 43
5.2.4 Sporentest ... 45
5.2.5 Wachstumsversuche in konservierungsmittelfreien Farben ... 46
6 Diskussion und Schlussfolgerung ... 50
6.1 Anfälligkeit von Lacken gegenüber Mikroorganismen ... 50
6.2 Konservierungsmittelfreie matte, weiße Wandfarben für den Innenraum ... 52
7 Quellenverzeichnis ... 53
8 Anhang ... 54
8.1 Bestimmung der Wirkungsgrenze und des maximal zulässigen Gehaltes im Lack (Biotest) 54
8.1.1 Anlage 4a zur Vergabegrundlage DE-UZ 12a “Schadstoffarme Lacke“ ... 54

8.1.2 Anlage 4b zur Vergabegrundlage DE-UZ 12a “Schadstoffarme Lacke“ 57
8.1.3 Anlage 4c zur Vergabegrundlage DE-UZ 102 “Schadstoffarme Lacke“ 60
8.2 Bestimmung der koloniebildenden Einheit in Dispersionslacken..... 65
8.3 Richtrezepturen 122
8.3.1 Lasuren..... 122
8.3.2 Weiß- und Buntlacke..... 123
8.3.3 Vorlacke 124

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Belastungstest mit Schimmelpilzsporen....22
Abbildung 2: Darstellung des Dampfraumtests....23
Abbildung 3: Dampfraumtest Hybrid-Weißlack mit Schimmelpilzsporen....26
Abbildung 4: Belastungstest mit Bakterien....28
Abbildung 5: Belastungstest mit Hefen....29
Abbildung 6: Belastungstest mit Bakterien vor künstlicher Alterung....31
Abbildung 7: Belastungstest mit Bakterien nach künstlicher Alterung....32
Abbildung 8: Belastungstest mit Hefen vor künstlicher Alterung....33
Abbildung 9: Belastungstest mit Hefen nach künstlicher Alterung....34
Abbildung 10: Belastungstest der Richtrezepturen mit Bakterien....37
Abbildung 11: Belastungstest der Richtrezepturen mit Bakterien nach künstlicher Alterung....38
Abbildung 12: Belastungstest der Richtrezepturen mit Hefen....39
Abbildung 13: Belastungstest der Richtrezepturen mit Hefen nach künstlicher Alterung....40
Abbildung 14: Belastungstest der Richtrezepturen mit Schimmelpilzsporen....41
Abbildung 15: Agarose-Gelelektrophorese nach PCR mit bakterienspezifischen Primern....44
Abbildung 16: Keimzahlbestimmung nach Temperatureinwirkung auf Dispersionsfarben....46
Abbildung 17: Belastungstest Farbe 1 (Hersteller I) mit Bakterien....47
Abbildung 18: Belastungstest Farbe 2 (Hersteller I) mit Bakterien....48
Abbildung 19: Belastungstest Farbe 3 (Hersteller I) mit Bakterien....49

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

A. faecalis	*Alcaligenes faecalis*
ANA	Alkaline nutrient agar
A. oryzae	*Aspergillus oryzae*
BIT	Benzisothiazolinon
CIT	Chlormethylisothiazolinon
C. boidinii	*Candida boidinii*
C. valida	*Candida valida*
DAD	Diodenarraydetektor
E. coli	*Escherichia coli*
KBE	koloniebildende Einheit
MIT	Methylisothiazolinon

A. faecalis	*Alcaligenes faecalis*
P. aeruginosa	*Pseudomonas aeruginosa*
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDA	Kartoffel-Glucose-Agar (Potato-dextrose-agar)
ppm	Parts per million
P. ochrochloron	*Penicillium ochrochloron*
P. putida	*Pseudomonas putida*
P. stutzeri	*Pseudomonas stutzeri*
P. variotii	*Paecilomyces variotii*
RA	Reinacrylat
RT	Raumtemperatur
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
rpm	Rounds per minute
UHPLC	Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Y. lipolytica	*Yarrowia lipolytica*

Zusammenfassung

Das Umweltzeichen „Blauer Engel“ besteht seit 40 Jahren und kennzeichnet Produkte für Verbraucher, die umweltfreundlicher sind als andere vergleichbare Standardprodukte. Produkte, die mit diesem Umweltzeichen ausgezeichnet wurden, sind emissions- und schadstoffarm und die Raumluft wird durch ihre Anwesenheit so wenig wie möglich beeinträchtigt, wodurch potenzielle Gesundheitsrisiken minimiert werden können.

Bei Umweltzeichen DE-UZ 12a „Schadstoff- und emissionsarme Lacke“ sind die vorhandenen Schwermetallmengen und die Verwendung von Weichmachern (Phthalate und Organophosphate) streng geregelt. Zusätzlich sind Alkylphenolethoxylate, per- und poly-fluorierte Chemikalien und Oxime ausgeschlossen. Die Zertifizierung von Lasuren, Vorlacken und Decklacken durch den Blauen Engel erfolgt derzeit durch Beurteilung der Zusammen-setzung ihrer Formulierung oder durch Verwendung eines Emissionstests (nach DIN EN 16402). Gemäß den Vergabekriterien muss die Einhaltung aller Anforderungen nachgewiesen werden, damit das Umweltzeichen verwendet werden kann. Informationen zum Schutz der Verbraucher und der Umwelt müssen sowohl auf der Verpackung des Produkts als auch im zugehörigen Technischen Merkblattblatt angegeben werden. Die Verwendung von Beschichtungen auf Wasserbasis, mit geringen Emissionen und mit geringem Schadstoffgehalt reduziert nicht nur die Emission organischer Lösungsmittel in die Atmosphäre, sondern auch die Belastung der Innenraumluft. Aufgrund ihres Wassergehalts im Gebinde und der Ver-wendung natürlicher Rohstoffe sind diese Produkte jedoch anfällig für mikrobielle Angriffe. Konservierungsmittel müssen hinzugefügt werden, um das Produkt vor dem Abbau durch Mikroorganismen zu schützen und damit seine Haltbarkeit während der Lagerung im Gebinde zu verlängern. Im Rahmen der Zulassung durch den Blauen Engel dürfen nur diejenigen Biozide verwendet werden, die in Anhang C der Vergabekriterien DE-UZ 12a als Gebindekonservierungsmittel aufgeführt sind.

Das Hauptziel dieses Forschungsprojekts war es zu bestimmen, ob der in einem früheren Projekt (FKZ: 3715373040) überarbeitete Gebrauchstauglichkeitstest („Biotest“) zur Feststellung der Wirksamkeit von Bioziden zur Gebindekonservierung in weißer Innenraumwandfarbe auch für andere Beschichtungs-materialien für Innenräume wie Lasuren, Vorlacke und Decklacke verwendet werden kann. Ein weiteres Ziel war es festzustellen, ob konservierungsmittelfreie, weiße Innenwandfarben, die im Heimwerkerbaumarkt erhältlich sind, frei von mikrobiologischer Kontamination sind.

1.1 Bestimmung der Eignung des Gebrauchstauglichkeitstests für Lasuren, Vorlacke und Decklacke

Drei verschiedene Beschichtungstypen wurden hinsichtlich ihrer Anfälligkeit für die Besiedlung durch Bakterien, Hefen und Schimmelpilze untersucht. Es wurde unterschieden, ob ein mikrobielles Wachstum[1] beobachtet wurde oder ob die zugefügten Organismen nur in den Materialien überlebten.

In Absprache mit der Industrie wurden die Beschichtungen in drei Beschichtungstypen eingeteilt (Gruppe 1: weiße und farbige Decklacke, Gruppe 2: Vorlacke und Gruppe 3: Lasuren) und auf ihre Anfälligkeit für die Besiedlung durch Mikroorganismen untersucht. Es wurden nur Produkte verwendet, bei denen das Bindemittel entweder mit MIT / BIT oder nur mit BIT minimal konserviert war. Der geringe Gehalt an vorhandenen Konservierungsstoffen wurde vor Beginn der Tests immer durch UHPLC bestätigt.

[1] Im weiteren Text wird der Ausdruck „Wachstum“ gebraucht, wenn die Anzahl der auf dem Kulturmedium angezogenen Kolonien je Milliliter Farbe nach der Inkubation die Anzahl der zugefügten Keime je Milliliter vor der Inkubation übersteigt.

Während der Studie wurde darauf geachtet, dass den zu testenden Beschichtungen keine Konservierungsmittel zugesetzt wurden. Es war jedoch nicht zu vermeiden, dass durch bestimmte Rohstoffe eine geringe Menge Konservierungsmittel eingeführt wurde. Dieses Problem wurde gleich zu Beginn der Tests deutlich. Eine relativ hohe Konzentration an MIT und BIT (75 ppm und 50 ppm), die über die Rohstoffe in die Produkte eingebracht wurde, verhinderte das Wachstum von Bakterien, Hefen und Schimmelpilzen vollständig (siehe 5.1.1).

Um dies zu korrigieren, stellte ein anderer Hersteller schließlich Produkte zur Verfügung, bei denen die Menge an MIT und BIT ausreichend niedrig war, um ein Wachstum der Mikro-organismen zu erzielen.

1.1.1 Besiedlung durch Bakterien und Hefen

Anhand der Tests wurde eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Beschichtungstypen gegen-über Bakterien nachgewiesen. Bei Beschichtungen, bei denen nur BIT über das Bindemittel zugesetzt wurde, begann das Bakterienwachstum zuerst in dem weißen Lack (nach einer Woche), aber die maximal erzielte Wachstumsmenge war signifikant niedriger als in dem Vorlack und der Lasur. Das stärkste Wachstum wurde in dem Vorlack erzielt. Wenn sowohl BIT als auch MIT über das Bindemittel zu den Formulierungen gegeben wurden, wurde in keinem Produkt ein Bakterienwachstum festgestellt. Anhand der Versuche wurde deutlich, dass bereits eine sehr geringe MIT-Konzentration (8 ppm bis 16 ppm) das Bakterienwachstum beeinflusst und unterdrückt. Bei einer Wiederholung des Tests wuchsen Bakterien in dem Weißlack, in dem der MIT-Gehalt ein Zehntel im Vergleich zu der vorherigen Probe (0,7 ppm statt 8 ppm) betrug. Auf dieser Grundlage scheint eine Konzentration von 8 ppm in dieser Formulierung ausreichend zu sein, um das Wachstum der eingeführten Bakterien zu verhindern. Die künstliche Alterung der drei Beschichtungstypen führte zu einer früheren Besiedlung durch Bakterien. Die am Ende der Inkubationszeit vorhandene Anzahl war jedoch sowohl bei den gealterten als auch bei den nicht gealterten Proben ähnlich.

Versuche, die Farbsysteme mit Hefen zu besiedeln, führten zu deren Überleben, aber es wurde kein Wachstum erzielt; die nachgewiesene Zahl der KBE lag bei Versuchsende immer unter der mit dem Inokulum zugefügten Keimzahl. Im Gegensatz zu den Experimenten mit Bakterien wurden Hefen auch in allen Beschichtungsformulierungen nachgewiesen, in die MIT über das Bindemittel eingeführt worden war. Künstliche Alterung führte zu keiner Veränderung der Empfindlichkeit der Beschichtungen gegenüber Hefen.

Die Untersuchungen zeigten, dass die verwendeten Beschichtungstypen signifikant anfälliger für Besiedlung und Wachstum durch Bakterien waren als durch Hefen. Das Vorhandensein von MIT (8 ppm), das über das Bindemittel eingebracht wurde, eliminierte die Bakterien, die über das Inokulum zugesetzt wurden, jedoch nicht die Hefen.

1.1.2 Definition von Richtlinienformulierungen

Die Konservierungsmittel und Wirkstoffe, die in Decklacken, Vorlacken und Lasuren verwendet werden können, werden durch die DE-UZ12a-Vergabekriterien definiert. Die Neuklassifizierung von MIT hat jedoch dazu geführt, dass alternative Wirkstoffe und / oder Wirkstoffkombinationen zum Schutz von Formulierungen vor mikrobiellem Verderb eingesetzt werden müssen. Der Biotest sollte durchgeführt werden, um alle Änderungen zu validieren, die sich aus diesem Prozess ergeben haben.

Nach Rücksprache mit Vertretern der beteiligten Branchen wurden drei Richtlinien-formulierungen definiert. Diese gelten als repräsentativ für weiße und farbige Decklacke, Vorlacke und Lasuren und wurden in der Studie verwendet. Ein anschließender Biotest zeigte, dass nur der Vorlack für Bakterienwachstum anfällig war. Weder in dem Weißlack noch in der Lasur wurde ein Wachstum oder Überleben beobachtet. Gleiches wurde nach künstlicher Alterung der Lacktypen beobachtet. Die Inokulation mit Hefen führte nur zu deren Wachstum im

Vorlack. Die Hefen konnten jedoch im Weißlack und in der Lasur überleben. Wiederum wurde dasselbe nach künstlicher Alterung der Formulierungen beobachtet.

Die Studie zeigte, dass es Unterschiede in der Empfindlichkeit der verschiedenen Beschichtungen gegenüber den verwendeten Mikroorganismen gab. Während die Bakterien nur den Vorlack besiedelten, wurden in allen verwendeten Formulierungen Hefekolonien nachgewiesen.

Wenn der Biotest mit Schimmelpilzsporen durchgeführt wurde, wurde eine Änderung der Viskosität sowohl in den nicht gealterten als auch in den gealterten Proben des Vorlacks und der Lasur beobachtet. Kontrollen, bei denen keine Schimmelpilzsporen hinzugefügt worden waren, zeigten diese Änderung nicht.

Obwohl auf der Oberfläche der Proben kein Schimmelwachstum beobachtet wurde, kann angenommen werden, dass keimende Pilzsporen zu einer Veränderung des Produkts führten, wahrscheinlich durch die Produktion von Exoenzymen.

1.2 Konservierungsmittelfreie, weiße Wandfarben

Konservierungsmittel, die Wirkstoffe auf Isothiazolinonbasis enthalten, werden am häufigsten in Dispersionsfarben verwendet, um sie vor mikrobiellem Verderb zu schützen. Aufgrund der Neuklassifizierung von Isothiazolinonen (außer BIT), die sie bei alleiniger oder kombinierter Anwendung auf maximal 15 ppm begrenzt, und der Entscheidung des Umweltbundesamtes (Dezember 2018), eine Verwendung von Konservierungsmitteln in Wandfarben mit dem Blauen Engel nicht zuzulassen, haben gekennzeichnete, konservierungsmittelfreie, weiße Innenraumwandfarben zunehmend an Bedeutung gewonnen. Diese Produkte zeichnen sich häufig durch einen pH-Wert von 10,4 bis 11,1 aus, und dieser scheint Schutz vor mikrobiellem Verderb zu bieten. Der stark alkalische pH-Wert bedeutet, dass die normalerweise mit Verderb verbundenen Mikroorganismen nicht mehr wachsen und sich vermehren können und möglicherweise abgetötet werden. Einige Organismen werden als Sporen vorliegen, die unter diesen Bedingungen überleben können. Sollte sich der pH-Wert jedoch mit der Zeit verringern, können sich Bedingungen ergeben, die für die Keimung der Sporen und das Wachstum der vegetativen Zellen geeignet sind.

Um festzustellen, ob Mikroorganismen in handelsüblichen, konservierungsmittelfreien, weißen Innenwandfarben vorhanden waren, wurden Farbproben aus Heimwerkermärkten untersucht. Diese wurden durch Verdünnungsplattenzählung auf das Vorhandensein lebensfähiger Mikroorganismen analysiert. Jeder auf diese Weise isolierte Organismus wurde unter Verwendung molekularbiologischer Methoden identifiziert. In der Hälfte der Proben wurden Bakterien und / oder Hefen nachgewiesen. Dies waren Arten, die an eine Umgebung mit höheren pH-Werten angepasst sind. Vertreter der Gattung Bacillus waren die hauptsächlich nachgewiesenen Organismen.

Da Bacillus spp. Endosporen bilden kann, wurde die Behandlung der Proben bei erhöhter Temperatur vor der erneuten Analyse verwendet, um zu bestimmen, ob die vorhandenen Bakterien in der Sporenform oder in ihrer vegetativen Form vorlagen. Die Ergebnisse zeigten, dass die meisten Mikroorganismen in ihrer vegetativen Form vorhanden waren.

Erste Untersuchungen zur Besiedlung von konservierungsmittelfreien Farben wurden mit zwei alkaliphilen Bakteriengattungen durchgeführt, die aus einer konservierungsmittelfreien Farbe (*Bacillus polygonii* und *Nesterenkonia* sp.) isoliert worden waren. Die Ergebnisse zeigten, dass diese Bakterien in der frischen Farbe wachsen konnten, was darauf hindeutet, dass die Formulierungen anfällig für mikrobielle Angriffe sind. Wie sich dies auf die Qualität der Farbe auswirkt, war nicht Gegenstand des Forschungsprojekts, es wird jedoch empfohlen, dies weiter zu untersuchen.

2 Summary

The “Blue Angel” eco-label has existed for 40 years and identifies products to consumers that are more environmentally ‘friendly’ than other, comparable standard products. Products that have been awarded the “Blue Angel” are low in pollutants andemission and the indoor air is affected as little as possible by their presence, which can minimize potential health risks.

With eco-label DE-UZ 12a „Low-pollutant and low-emissions Varnishes“the amounts of heavy metals present and the use of plasticisers (phthalates and organophosphates) in glazes, primers and top coats are strictly regulated. Additionally, alkylphenol ethoxylates, per- and polyfluorinated chemicals and oximes are excluded. Blue Angel certification of stains, primers and top-coats is achieved currently by assessing the composition of their formulation and through the use of an emission test (according to DIN EN 16402). According to the award criteria, compliance with all requirements must be demonstrated in order for the eco-label to be used. Information on the protection of consumers and the environment must be given both on the packaging of the product and in the associated technical data sheet. The use of water-based, low-emission and low-pollutant containing coatings not only reduces the emission of organic solvents into the atmosphere, but also the environmental burden of the interior environment. However, due to their water content in-can and the use of natural raw materials, these products are susceptible to microbial attack. Preservatives for in-can preservation must be added to protect the product from degradation by microorganisms and thus to extend their shelf life. As part of the Blue Angel approval, only those biocides that are listed as in-can preservatives in Appendix C of the basic award criteria DE-UZ 12a may be used.

The primary aim of this research project was to determine whether the ‘biotest’ for establishing the effectiveness of biocides in white interior wall paint that was revised in a previous project (FKZ: 3715373040) can also be used for other indoor coating materials such as stains, primers and top-coats.

A secondary aim was to determine whether preservative-free white, interior wall paints available on the DIY market were free of microbiological contamination.

2.1 Determination of the suitability of the ‘biotest’ for stains, primers and top-coats

Three different types of coating were examined with regard to their susceptibility to colonisation by bacteria, yeasts and moulds. A distinction was made between whether microbial growth[2] was observed or whether the organisms introduced simply survived in the materials. In consultation with industry, the coatings were divided into three groups (white and coloured top coats, primers and low-build stains) and examined for their susceptibility to colonisation by microorganisms. Only products in which the binder was either minimally preserved with MIT / BIT or only with BIT were used. The low level of preservatives present was always confirmed by UHPLC before the tests were started.

During the study, care was taken to ensure that no preservatives were added to the coatings under test. However, it was impossible to avoid that a small amount of preservative was introduced through certain raw materials. This issue became apparent right at the start of the tests. A relatively high concentration of MIT and BIT (75 ppm and 50 ppm) introduced into the products via the raw materials completely prevented the growth of bacteria, yeast and mould (see 5.1.1).

To rectify this another manufacturer finally made available products in which the amount of MIT and BIT was sufficiently low to achieve growth of microorganisms.

[2] In the following text the term "growth" is used when the number of colonies grown on the culture medium per millilitre of paint after incubation exceeds the number of germs added per millilitre before incubation.

2.1.1 Colonisation by bacteria and yeasts

On the basis of the tests, differing susceptibilities of the coating formulations to bacteria was demonstrated. In the case of coatings in which only BIT was added via the binder, bacterial growth started first in the white top-coat (after one week), but the maximum amount of growth achieved was significantly lower than in the primer and the stain. The most growth achieved was in the primer. When both BIT and MIT were added to the formulations via the binder, no bacterial growth was detected in any product.

On basis of the experiments, it became clear that even a very low concentration of MIT (8 ppm to 16 ppm) had an impact on bacterial growth and suppressed it. In a repeat of the test, bacteria grew in the white top-coat, in which the MIT content was 10 times lower than in the previous sample (0.7 ppm instead of 8 ppm). Based of this it would appear that a concentration of 8 ppm in this formulation was sufficient to prevent the growth of the bacteria introduced.

Artificial aging of the three coating formulations led to earlier colonisation by bacteria. However, the number present at the end of the incubation period was similar in both the aged and the non-aged samples. Attempts to colonise the coating formulations with yeasts resulted in their survival, but no growth was achieved; the number present was always below that introduced with the inoculum. In contrast to the experiments with bacteria, yeasts were also detected in all of the coating formulation in which MIT had been introduced via the binder. Artificial aging did not lead to any change in the susceptibility of the formulations to yeasts.

The investigations showed that the types of coatings used were significantly more susceptible to colonisation and growth with bacteria than yeasts. The presence of MIT (8 ppm) introduced via the binder eliminated the bacteria introduced via the inoculum, but not the yeasts.

2.1.2 Definition of guideline formulations

The preservatives and active substances that may be used in top-coats, primers and stains, are defined by the DE-UZ12a award criteria. However, the reclassification of MIT has resulted in the need for alternative active substances and / or combinations of active substances to be employed to protect formulations against microbial spoilage. The biotest must be performed to validate any changes that have resulted from this process.

After consultation with representatives from the industries involved, three guideline formulations were defined. These are considered representative of white and coloured topcoats, primers and stains and were used in the study.

A subsequent biotest showed that only the primer formulation was susceptible to bacterial growth. No growth or survival was observed in either the white and coloured top-coats and the stain. The same was observed after artificial aging of the paints. Inoculation with yeasts resulted in growth in the primer only. However, the yeasts were able to survive in the top-coats and the stain. Again, the same was observed after artificial aging of the formulations.

The study showed that there were differences in the susceptibility of the different coatings to the microorganisms used. While the bacteria only colonised the primer, yeast colonies were found in all of the formulations used.

When the biotest was performed with mould spores, a change in the viscosity was observed both in the unaged and in the aged samples of the primer and the stain. Controls, in which mould spores had not been added did not show this change. Although no mould growth was observed on the surface of the samples, it can be assumed that germinating fungal spores led to a change in the product, probably through the production of exo-enzymes

2.2 Preservative-free, white, interior wall paints

Preservatives containing Isothiazolinone-based active substances are the ones most commonly used in emulsion paints to protect them from microbial spoilage. Due to the reclassification of isothiazolinones (except BIT) that limits them to a maximum of 15 ppm when used either alone or in combination, and the decision of the Umweltbundesamt (December 2018) not to allow preservatives to be used in wall paints bearing the Blue Angel mark, preservative-free, white, interior wall paints have become increasingly important. These products are often characterised by a pH of 10.4-11.1, and it is this that appears to provide protection against microbial attack. The highly alkaline pH means that the microorganisms normally associated with spoilage can no longer grow and multiply and may well be killed. Some organisms will be present as spores that can survive under these conditions. However, should the pH reduce over time, conditions suitable for the germination of the spores and growth of the vegetative cells may result.

To detect whether microorganisms were present in commercially available, preservative-free, white interior wall paints, paint samples were obtained from hardware stores. These were analysed for the presence of viable microorganisms by dilution plate count. Any organism isolated in this manner were identified using molecular biological methods. Bacteria and / or yeasts were detected in half of the samples. These appeared to be species that are adapted to an environment with higher pH values. Representatives of the genus *Bacillus* were the mainly detected microorganisms.

As *Bacillus spp* can form endospores, treatment of the samples at elevated temperature prior to re-analysis was used to determine whether the bacteria present were in the spore form or in their vegetative form. The results showed that most of the microorganisms were present in their vegetative form. Initial investigations into the colonisation of preservative-free paints were performed with two alkaliphilic bacterial genera that had been isolated from a preservative-free paint (*Bacillus polygonii* and *Nesterenkonia sp*). The results indicate that these bacteria were capable of growing in the fresh paint suggesting that the formulations are susceptible to microbial attack. How this affects the quality of the paint was not the subject of the research project, but it is recommended that it be investigated further.

3 Einleitung

Mit der Umstellung von Lösemittel-basierten Innenraumbauprodukten auf wässrige Systeme kam es zu einer deutlichen Reduzierung der Innenraumbelastung durch Lösungsmittel. Wasserbasierte Produkte bieten jedoch aufgrund ihres hohen Wassergehalts und der Verwendung natürlicher Rohstoffe die Voraussetzungen für das Wachstum von Mikroorganismen. Als Folge dessen kann es bei den Produkten zu Veränderungen der Produkteigenschaften, wie z.B. Viskositätsveränderungen und Geruchsbildung, kommen. Daher werden gezielt Konservierungsmittel eingesetzt, um die Produkte vor dem Abbau durch stoffwechselaktive Mikroorganismen zu schützen.

In der Vergangenheit war das am häufigsten eingesetzte Topfkonservierungsmittel ein Gemisch aus Methylisothiazolinon (MIT) und Benzisothiazolinon (BIT), wobei bei Produkten mit dem Blauen Engel die zulässige Einsatzmenge weit unter der gemäß der Biozidprodukte-Verordnung (BPVO) zulässigen Menge lag. Aufgrund des allergenen Potentials der meisten dieser Verbindungen wird jedoch angestrebt, den Gehalt an Topfkonservierern in wassergelösten Innenraumbauprodukten weiter zu senken, ohne dabei die positive Auswirkung der Topfkonservierung zu gefährden. Mit der Opinion vom März 2016 hat der Ausschuss für Risikobewertung (RAC) die Einführung eines spezifischen Konzentrationsgrenzwerts von 15 ppm für MIT vorgeschlagen, was durch die 13. ATP der CLP-Verordnung umgesetzt wurde. Die Bewertung durch die Biozidprodukteverordnung steht bislang weiterhin aus, so dass MIT als Konservierungsmittel für Produktgruppe 6 (Schutzmittel für Produkte während der Lagerung) gemäß der Biozidverordnung bis zur abschließenden Bewertung verkehrsfähig bleibt. Derzeit ist es aus Sicht der Industrie bei Lacken nicht möglich, auf Topfkonservierung zu verzichten und gleichzeitig die Haltbarkeit von der Produktion, über die Vermarktung und bis hin zur Anwendung beim Endverbraucher zu gewährleisten. Würde bei diesen Produkten die zulässige Höchstmenge von 100 ppm MIT weiterhin eingesetzt, hätte dies zur Folge, dass neben dem Blauen Engel auch eine Kennzeichnung der Produkte mit dem Gefahrensymbol GHS07 erforderlich wäre. Um diese gleichzeitige Kennzeichnung der Produkte zu vermeiden, müssen neue Wege zur Konservierung dieser Produkte gefunden werden.

Im Rahmen des Forschungsvorhabens wird die Anfälligkeit von Lacken gegenüber Bakterien, Hefen und Schimmelpilzen untersucht. Hierzu wird ein Gebrauchstauglichkeitstest („Biotest“) angewendet, der im Rahmen des vorherigen Vorhabens (FKZ: 3715 37 304 0) für weiße Wandfarben über-arbeitet wurde. Bei dem Testverfahren kommt es zu einer wiederkehrenden Belastung des Produkts durch Beimpfung mit einer hohen Konzentration an Mikroorgansimen in einwöchigen Intervallen. Wöchentlich wird der Gehalt an koloniebildenden Einheiten auf einem künstlichen Nährmedium bestimmt. Zeigen die Untersuchungen, dass dieses Testverfahren für Lacke anwendbar ist, sollen auch Aussagen darüber getroffen werden, ob verschiedene Lacktypen eine unterschiedliche Besiedelbarkeit durch die Mikroorganismen zulassen. Des Weiteren werden durch die Industrie Richtrezepturen für Lacke vorgeschlagen, die zukünftig als Prüfmatrices dienen sollen, in denen zu betrachtende, biozide Wirkstoffe, deren Konzentrationen und deren Kombinationen getestet werden sollen. In welcher Konzentration bzw. Kombination, die derzeit in Anhang C gelisteten Topfkonservierer eingesetzt werden dürfen, gilt es neu zu definieren und mit der Industrie zu diskutieren.

Einen weiteren Schwerpunkt in diesem Vorhaben bildeten die konservierungsmittelfreien Farben. Die Jury Umweltzeichen hat im Dezember 2017 für Wandfarben beschlossen, keine neuen Zeichennutzungsverträge mehr für matte, weiße Wandfarben abzuschließen, wenn diese Biozide (MIT und/oder CIT) zur Topfkonservierung enthalten. Der Biozidgehalt der Vorprodukte ist so zu gestalten, dass keine konservierende Wirkung im Endprodukt vorliegt. In der gebrauchsfertigen Form darf der Gehalt an Isothiazolinonen im Einzelnen einen festgesetzten Maximalgehalt nicht überschreiten (BIT ≤ 10 ppm, MIT < 1,5 ppm, CIT < 0,5 ppm). Diese Wandfarben müssen auf dem Gebinde und im Technischen Merkblatt entsprechend gekennzeichnet werden („Kann Spuren von Konservierungsmitteln enthalten“).

Wird das Produkt Wandfarbe als konservierungsmittelfrei ausgelobt, sind alle Konservierungsmittel, mit Ausnahme von MIT (Höchstmenge < 1,5 ppm) und CIT (Höchstmenge< 0,5 ppm), bezogen auf die Einzelsubstanz auf 2 ppm begrenzt.

Die z.Zt. auf dem Markt käuflichen, konservierungsmittelfreien Wandfarben zeichnen sich durch eine hohe Alkalität (pH ca. 10,4-11,1) aus, welche das Wachstum von Mikroorgansimen verhindern sollen. Pilz- und Bakteriensporen können unter diesen Bedingungen überdauern und auskeimen, wenn sich die Lebensbedingungen (z.B. Abfall des pH-Wertes) ändern. Im Forschungsvorhaben sollen konservierungsmittelfreie Wandfarben aus dem Baumarkt bezogen und stichprobenartig auf das Vorhandensein von Mikroorganismen untersucht werden. Anschließend sollen die isolierten Keime durch Sequenzierung eindeutig identifiziert werden und somit Informationen über das Vorkommen bestimmter Gattungen von Mikroorganismen in den Farben liefern.

4 Material und Methoden

4.1 Dispersionslacke

Für die Durchführung des Gebrauchstauglichkeitstests wurden Dispersionslacke verwendet, die von der Industrie zur Verfügung gestellt wurden. Die gelieferten Lacke waren in ihrer Formulierung frei von Lösemitteln. Seitens des Lackherstellers wurden keine Konservierungsmittel zugesetzt. Der Eintrag an MIT und BIT erfolgte ausschließlich über die Rohstoffe.

4.2 Mikroorganismenstämme

Der Gebrauchstauglichkeitstest wurde mit verschiedenen Bakterien, Hefe – und Schimmelpilzen durchgeführt (siehe Tabellen 1-3).

Tabelle 1: Bakterienstämme

Stamm	Stammnummer
Alcaligenes faecalis *	BAM 604, DSM 6174, ATCC 35655
Escherichia coli	BAM 605, DSM 787, ATCC 11229
Pseudomonas aeruginosa *	BAM 489, DSM 939, ATCC 15442
Pseudomonas putida	BAM 644, DSM 291T, ATCC 12633
Pseudomonas stutzeri	BAM 607, DSM 5190T, ATCC 17588
Staphylococcus aureus *	BAM 65, DSM 799, ATCC 6538

*: Risikogruppe 2, alle anderen gelisteten Bakterien gehören zur Risikogruppe 1.

Tabelle 2: Hefestämme

Stamm	Stammnummer
Candida boidinii	BAM 649
Yarrowia lipolytica	BAM 641, BIO 11-0335
Candida valida	BAM 643

Tabelle 3: Schimmelpilzstämme

Stamm	Stammnummer
Aspergillus oryzae	BAM 613
Paecilomyces variotii *	BAM 19, DSM 1961, IMI 359544
Penicillium janthinellum Biourge	BAM 25, DSM 1945

*: Risikogruppe 2, alle anderen gelisteten Pilze gehören zur Risikogruppe 1.

4.3 Bestimmung des MIT und BIT Gehalts

4.3.1 Lacke

Die Bestimmung des MIT- und BIT-Gehalts erfolgte mittels Ultra-Hochleistungsflüssigkeits-chromatographie. Dazu wurde 1 g der Probe mit 10 ml Methanol versetzt, unter Rühren für 30 Minuten extrahiert und folgend für 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Nach erneutem Rühren wurde 1 ml dieser Lösung bei 14 000 U/min und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert und der Ansatz durch einen Filter aus regenerierter Cellulose mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm filtriert. Dieser Ablauf wurde zweimal wiederholt. Die Analyse erfolgte mittels Agilent 1290 Infinity System mit DAD. Hierzu wurde 1 µl der Probe auf einer H12Poroschell 120 EC-C18 Säule (100 cmx4,6 cm, 2,7 µm) mit Vorsäule bei einer Flussrate von 0,75 ml/min und Aceto-nitril/Wasser (Tabelle 4) als Laufmittel bei 40 °C getrennt. Zur Detektion wurde ein DAD bei 280 nm (MIT) und 320 nm (BIT) verwendet. Je Ansatz wurden drei Parallelproben verwendet.

Tabelle 4: Acetonitril/Wassergradient

Zeit [min]	Acetonitril [%]	Wasser [%]
0	10	90
1	10	90
5	90	10
6	90	10
6,2	10	90
8	10	90

4.4 Nährmedien

Für die Versuche mit Bakterien wurde CASO-Medium verwendet. Dieses setzte sich aus 1,5 % Pepton aus Casein, 1,5 % Pepton aus Soja, 0,5 % Natriumchlorid und 1,5 % Agar zusammen. Der pH lag bei 7,3 ± 0,2. Die Versuche mit Hefe- und Schimmelpilzen wurde mit PDA-Medium durch-geführt. Dieses Medium setzte sich aus 0,4 % Kartoffel-Infus, 2 % Glucose und 1,5 % Agar zu-sammen. Der pH lag bei 5,6 ± 0,2. Um ein unerwünschtes Wachstum von Bakterien zu unter-drücken, wurde dem PDA-Nährmedium Chloramphenicol in einer finalen Konzentration von 30 µg/ml zugegeben.

Für die Anzucht von alkaliphilen und alkalitoleranten Mikroorganismen wurde ANA- Medium verwendet. Dieses Nährmedium mit erhöhtem pH-Wert setzte sich aus 0,5 % Pepton, 0,3 % Fleischextrakt und 1,5 % Agar zusammen. Nach dem Sterilisieren wurde dem Medium eine 1 M Natrium-Sesquicarbonat Lösung (5,3% wasserfreies Natriumcarbonat und 4,2 % Natriumhydro-gencarbonat) zugesetzt, die zuvor steril filtriert wurde. Der pH lag final bei 9,7.

4.5 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Für die mikroskopische Zählung von Bakterien wurde eine Thoma - Zählkammer mit einer Kammertiefe von 0,02 mm verwendet, für die Zählung von Hefen und Pilzsporen eine Thoma - Kammer mit einer Tiefe von 0,1 mm.

Die Zellzahl pro ml unverdünnter Mikroorganismensuspension berechnet sich nachfolgender Formel:

Bakterien:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\sum \text{gezählte Zellen} * \text{Verdünnungsfaktor} * 2 * 10^7}{\text{Zahl der ausgezählten Kleinquadrate}}$$

Hefe- und Schimmelpilze:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\sum \text{gezählte Zellen} * \text{Verdünnungsfaktor} * 4 * 10^6}{\text{Zahl der ausgezählten Kleinquadrate}}$$

4.6 Herstellung der Impfsuspension

4.6.1 Bakterien

Zur Herstellung von Impfsuspensionen wurden die Bakterien von einer Dauerkultur (Kryokultur) auf Nähragarplatten ausgestrichen und für 18 - 24 h bei 30 °C ± 2 °C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien von diesen Platten auf frische Nähragarplatten überimpft (2. Subkultur), für weitere 18 - 24 Stunden bei 30 °C ± 2 °C inkubiert und für die Herstellung der Impfsuspension verwendet. Von jedem Bakterienstamm wurden getrennte Suspensionen hergestellt, indem die bewachsene Oberfläche der Nähragarplatte mit einer sterilen Verdünnungslösung (physiologische Kochsalzlösung) benetzt und der Bewuchs vorsichtig mit einem sterilen Wattestab abgewaschen wurde. Die Anzahl der Organismen in jeder Suspension wurde mittels einer Thoma-Zählkammer ermittelt (siehe 4.5). Zur Herstellung der Mischsuspension wurden die einzelnen Bakteriensuspensionen gemischt und auf eine finale Zellzahl von $1x10^8$ – $3x10^8$ KBE/ml eingestellt. Die eingestellte Zellzahl der Mischsuspension wurde durch ausplattieren einer geeigneten Verdünnungsstufe kontrolliert.

4.6.2 Hefen

Zur Herstellung von Impfsuspensionen wurden die Hefen von einer Dauerkultur (Kryokultur) auf Nähragarplatten ausgestrichen und für 18 - 24 h bei 30 °C ± 2 °C inkubiert. Anschließend wurden die Hefen von diesen Platten auf frische Nähragarplatten überimpft (2. Subkultur), für 18 - 24 h bei 30 °C ± 2 °C inkubiert und für die Herstellung der Impfsuspension verwendet. Von jedem Hefestamm wurden getrennte Suspensionen hergestellt, indem die bewachsene Oberfläche der Nähragarplatte mit einer sterilen Verdünnungslösung (physiologische Kochsalzlösung) benetzt und der Bewuchs vorsichtig mit einem sterilen Wattestab abgewaschen wurde. Die Anzahl der Organismen in jeder Suspension wurde mittels einer Thoma-Zählkammer ermittelt (siehe 4.5). Zur Herstellung der Mischsuspension wurden die einzelnen Hefesuspensionen gemischt und auf eine finale Zellzahl von $8x10^7$ - $2x10^8$ KBE/ml eingestellt. Die eingestellte Zellzahl der Mischsuspension wurde durch ausplattieren einer geeigneten Verdünnungsstufe kontrolliert.

4.7 Herstellung der Sporensuspension

Zur Herstellung der Sporensuspension wurden die Schimmelpilze ca. 14 Tage vor Ansatz des Gebrauchstauglichkeitstests auf Nähragarplatten überimpft. Unter sterilen Bedingungen wurden Reagenzgläser mit 10 ml Benetzungsmittel-Lösung (Tween 80) gefüllt und ein Wattestab mit dieser Lösung befeuchtet. Das Sporenmaterial wurde anschließend mit dem Wattestab von der Nähragarplatte abgestrichen und durch Reiben an der Reagenzglaswand in die befüllten

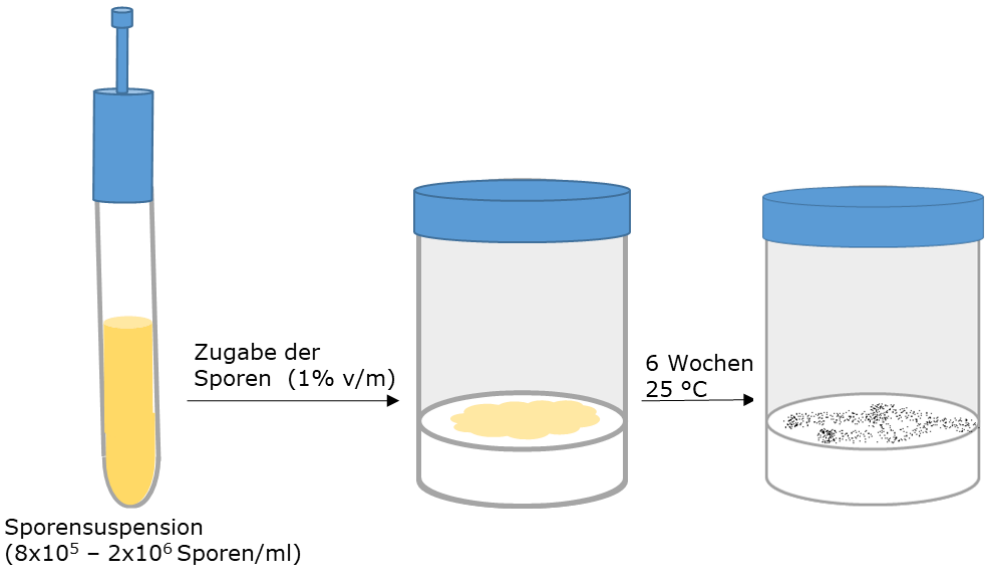
Reagenzgläser überführt. Der gesamte Ansatz wurde durchmischt und anschließend durch eine Filternutsche in einen Zentrifugenbecher gegossen.

Für jeden Pilz wurden eine separate Filternutsche sowie ein separater Zentrifugenbecher verwendet. Die Suspensionen wurden für 10 Minuten bei 3 000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand anschließend vorsichtig abgenommen. Der Bodensatz wurde mit 10 ml sterilem, demineralisiertem Wasser gewaschen und erneut für 10 Minuten bei 3 000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, so dass die Sporen insgesamt dreimal gewaschen wurden. Der Bodensatz wurde in 3-5 ml sterilem, demineralisiertem Wasser aufgenommen und die Konzentration der Sporen mit einer Thoma-Zählkammer bestimmt (siehe 4.5). Die vorbereitete Sporensuspension wurde bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt. Zur Herstellung der Mischsuspension wurden die einzelnen Sporensuspensionen gemischt und final auf $8x10^5$ - $2x10^6$ Sporen/ml eingestellt.

4.8 Gebrauchstauglichkeitstest

Im Rahmen des Vorhabens wurde geprüft, ob der überarbeitete Gebrauchstauglichkeitstest für weiße Dispersionsfarben (erarbeitet im Rahmen von UBA Forschungsvorhaben FKZ:3715 37 304 0) auch auf Lacktypen anwendbar ist. Das Prinzip dieses Tests beruht auf der wiederkehrenden Belastung eines Produkts (z.B. Lack) durch Beimpfung mit einer hohen Konzentration von Mikroorganismen (Pilzsporen, Hefen oder Bakterien) in einwöchigen Intervallen. Vor jeder neuen Beimpfung wird ein Aliquot des Produkts entnommen, um den Gehalt an koloniebildenden Einheiten auf einem künstlichen Nährmedium zu bestimmen. Bei Versuchen mit Schimmelpilzen wurde die Sporensuspension auf die Oberfläche des Produktes gegeben und durch vorsichtiges Schwenken der Probe auf der Oberfläche verteilt. Da das Wachstum in diesem Fall nicht über eine Keimzahlbestimmung erfolgen kann, wurde die Auswertung rein visuell vorgenommen. Der Versuchsablauf mit Pilzsporen ist in Abbildung 1 dargestellt.

Abbildung 1: Belastungstest mit Schimmelpilzsporen



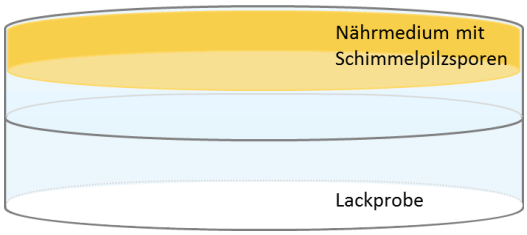
Eigene Darstellung, BAM

4.9 Dampfraumtest

Für den Dampfraumtest wurden 30 g Hybrid-Weißlack in den Boden einer Petrischale eingewogen. Anschließend wurde eine Nähragarplatte mit Pilzsporen darüber gestellt, so dass kein direkter Kontakt zwischen Sporen und Lack gegeben war (siehe Abb.2). Die Petrischalen wurden

luftdicht verschlossen und bei 25 °C inkubiert. Für den Test wurden Sporen der in Tabelle 3 gelisteten Schimmelpilze eingesetzt. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Lack.

Abbildung 2: Darstellung des Dampfraumtests



4.10 Molekularbiologische Methoden

4.10.1 Präparation chromosomaler DNA

Die Präparation chromosomaler DNA erfolgte mit dem Soil DNA Isolation Plus Kit der Firma Norgen Biotek Corp. nach Angaben des Herstellers. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Spektralphotometer (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific) gemessen. Für die Bestimmung des Reinheitsgrades wurde das Verhältnis des Absorptionskoeffizienten bei 260 zu 280 nm ermittelt. Bei einem Quotienten von 1,8 bis 2,0 lagen reine DNA-Präparationen vor.

4.10.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurden ausgewählte DNA-Bereiche *in vitro* amplifiziert. Als Matrize diente hierbei die isolierte chromosomale DNA (4.10.1). Die Amplifikationen erfolgten im Mastercycler epgradient S der Firma Eppendorf. Zur Amplifikation kamen universelle Primer zum Einsatz (siehe Tab. 5).

Tabelle 5: verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5´ → 3´)
27f	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG
1492r	GTT TAC CTT GTT ACG ACT T
NL1	GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG
NL2	GGT CCG TGT TTC AAG ACG G

Für den PCR-Ansatz (25 µl) wurde genomische DNA mit 200 µM dNTP-Mix, 3 mM $MgCl_2$, 2,5 U/µl Taq-Polymerase, je 100 pmol Primer und 2,5 µl 10x PCR-Puffer versetzt und mit nuklease-freiem Wasser auf 25 µl aufgefüllt.

Die Amplifizierung erfolgte nach den folgenden Protokollen:

Bakterien

Denaturierung der DNA	3 min	94°C
Denaturierung der DNA	30 s	94°C
Annealing	30 s	52°C

35 Zyklen

Elongation	1 min	72°C	
Abschluss Elongation	5 min	72°C	
Kühlen		4°C	
Hefen			
Denaturierung der DNA	3 min	94°C	
Denaturierung der DNA	30 s	94°C	
Annealing	30 s	55°C	35 Zyklen
Elongation	1 min	72°C	
Abschluss Elongation	5 min	72°C	
Kühlen		4°C	

4.10.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die analytische Auftrennung von DNA erfolgte mittels horizontaler Elektrophorese in 1%-igen Agarosegelen in 1x TBE-Puffer (10x Stock: 900 mM Tris, 900 mM Borsäure, 25 mM EDTA; pH 8,2-8,3). Die Proben wurde mit 6x Ladepuffer (10 mM Tris-HCL (pH 7,6), 0,03 % Bromphenolblau, 0,03 % Xylencyanol FF, 60 % Glycerin, 60 mM EDTA) versetzt. Als Größenstandard diente eine kB-DNA Leiter der Firma Thermo Fisher Scientific. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 80 V durchgeführt. Zur Sichtbarmachung der DNA wurden die Gele für 30 Minuten in einer GelRed Lösung gefärbt und anschließend mit Wasser gewaschen. Das Ergebnis wurde mittels Kamera dokumentiert.

4.10.4 Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma LGC Genomics (Berlin) vorgenommen. Es wurden 20 ng/µl (Fragmente zwischen 500-1000 bp) bzw. 40 ng/µl (Fragmente zwischen 1000 – 2000 bp) für die Sequenzierung eingesetzt.

5 Ergebnisse

5.1 Anwendbarkeit des Gebrauchstauglichkeitstests auf Lacke

Der Belastungstest wurde mit Bakterien, Hefen und Schimmelpilzen durchgeführt. Zusätzlich zu den in dem Testverfahren gelisteten Mikroorganismen wurde *Staphylococcus aureus* (BAM 65) als Vertreter der Gram-positiven Bakterien eingesetzt. Die Vitalität der eingesetzten Mikroorganismen wurde bei jedem Inokulationsschritt durch Ausplattieren der Mischsuspension auf Nährmedium überprüft und bestätigt. Zu Beginn der Versuche erfolgte eine Eingangskontrolle der zu testenden Lacke. Hierzu wurde der Lack mit einer sterilen Impföse auf Nähragarplatten ausgestrichen und auf mögliches Wachstum überprüft. Dabei wurden weder Bakterien noch Pilze nachgewiesen.

5.1.1 Acryllack

Das erste Testprodukt wurde Mitte Februar 2018 aus der Lackindustrie zur Verfügung gestellt (Firma I). Es handelte sich dabei um einen weißen Acryllack, der laut Industriepartner ohne zusätzliche Zugabe von Konservierungsmitteln hergestellt worden war. Eine Untersuchung des Lackes mittels UHPLC zeigte, dass allein durch die Rohstoffe 75 ppm MIT und 50 ppm BIT in das Produkt eingetragen worden waren. Dieser hohe Gehalt an Konservierungsmitteln verhinderte das Wachstum von Bakterien, Hefen und Schimmelpilzen in dem Lack, so dass keine Aussage hinsichtlich der Anfälligkeit des Produkts gegenüber Mikroorganismen getroffen werden konnte. Gleiche Ergebnisse wurden auch für die künstlich gealterten Proben erhalten. Der Lack war damit für die weiteren Versuche untauglich.

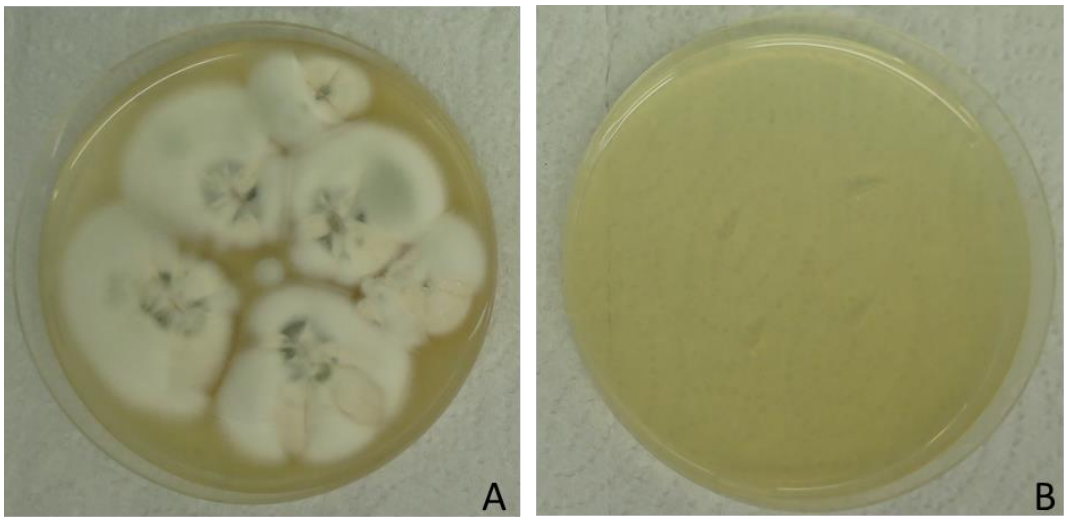
5.1.2 Hybrid-Weißlack

In Absprache mit dem Lackproduzenten wurde für die folgenden Versuche ein Hybrid-Weißlack verwendet, dem seitens des Herstellers keine Konservierungsmittel zugefügt wurden. Der Eintrag an MIT und BIT erfolgte alleinig über die Rohstoffe. Die Bestimmung des Konservierungsmittelgehalts bestätigte nur geringe Mengen an MIT (10 ppm) und BIT (4 ppm) und der Lack wurde folgend für die Versuche mit Bakterien, Hefen und Schimmelpilzen eingesetzt. Über den gesamten Versuchszeitraum von sechs Wochen wurde in keinem Ansatz ein Wachstum von Mikroorganismen nachgewiesen. Gleiche Ergebnisse wurden auch für die künstlich gealterten Proben erhalten. Der Lack war damit für die weiteren Versuche untauglich.

5.1.2.1 Dampfraumtest

Bei einem sog. Dampfraumtest mit dem Hybrid-Weißlack zeigte sich, dass die sonst sehr dauerhaften Pilzsporen vermutlich durch aus dem Lack austretende Gase abgetötet wurden und nicht mehr auskeimen konnten (siehe Abb. 3). Formaldehyd, das für seine sporozide Wirkung bekannt ist, wurde nicht nachgewiesen. Seitens des Lackherstellers wurden auch nach Anfrage keine weiteren Aussagen hinsichtlich der Zusammensetzung des Lacks gemacht.

Abbildung 3: Dampfraumtest Hybrid-Weißlack mit Schimmelpilzsporen



A: Kontrolle ohne Weißlack, B: Ansatz mit Weißlack

5.1.3 Lacke Firma II

Nach Rücksprache mit dem Umweltbundesamt wurde beschlossen, die Besiedelbarkeit von Lacken eines weiteren Herstellers (Firma II) zu untersuchen. Hierzu wurden drei Lacktypen zur Verfügung gestellt. Ziel der folgenden Versuche war es zudem zu untersuchen, ob es innerhalb der Lacke Unterschiede bezüglich der Anfälligkeit gegenüber Mikroorganismen gibt. Hierzu wurden die Lacke in Absprache mit der Lackindustrie in drei Gruppen eingeteilt:

Gruppe 1: Weißlack, Buntlack, Klarlack
Gruppe 2: Grundierung / Vorlack
Gruppe 3: Lasur

Die gelieferten Lacke waren in ihrer Formulierung frei von Lösemitteln, d.h. seitens des Lackherstellers wurden keine Konservierungsmittel zugesetzt. Von jedem Lack wurden zwei Ansätze hergestellt, die sich nur in der Eigenkonservierung (BIT bzw. MIT/BIT) des Bindemittels Reinacrylat unterschieden:

- Acryl-Weißlack glänzend (MIT/BIT-Eintrag über das Bindemittel)
- Acryl-Weißlack glänzend (BIT-Eintrag über das Bindemittel)
- Vorlack weiß (MIT/BIT-Eintrag über das Bindemittel)
- Vorlack weiß (BIT-Eintrag über das Bindemittel)
- Acryllasur Kiefer (MIT/BIT-Eintrag über das Bindemittel)
- Acryllasur Kiefer (BIT-Eintrag über das Bindemittel)

5.1.3.1 Analyse der Konservierungsmittelkonzentration

Mittels Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC) wurde die Konzentration an MIT und BIT in den Lacken nach Lieferung bestimmt. BIT wurde in keiner Probe nachgewiesen. Für MIT wurde eine maximale Konzentration von 15,62 ppm bestimmt (siehe Tab. 6). Somit wurden alle Proben für den Belastungstest mit Bakterien, Hefen und Schimmelpilzsporen eingesetzt.

Tabelle 6: Bestimmung des MIT- und BIT-Gehalts

Lacktyp	Gehalt MIT [mg/kg]	Gehalt BIT [mg/kg]
Acryl-Weißlack + MIT/BIT	8,02 ± 0,54	n.n.
Acryl-Weißlack + BIT	n.n.	n.n.
Vorlack + MIT/BIT	12,75 ± 1,24	n.n.
Vorlack + BIT	1,83 ± 0,09	n.n.
Lasur + MIT/BIT	15,62 ± 0,90	n.n.
Lasur + BIT	n.n.	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

5.1.3.2 Gebrauchstauglichkeitstest mit Bakterien

Die Lackproben wurden in wöchentlichem Abstand dreimal 1 %-ig (v/m) mit einer Bakteriensuspension beimpft und jeweils anschließend bei 30 ± 2 °C gelagert. Die Suspension enthielt die Prüforganismen in einer Konzentration von 3 x 10^8 KBE/ml (koloniebildende Einheit /Milliliter). Dies führte zu einem Keimgehalt von 3 x 10^6 KBE/ml in dem beimpften Lack. Maximal lagen folglich 9 x 10^6 KBE/ml in dem Lack vor, die nur durch Beimpfung des Lacks zugesetzt worden waren. Die Lebendzellzahl wurde direkt nach der ersten Beimpfung (Wiederfindung), vor jeder neuen Beimpfung und nach Abschluss des Belastungstests ermittelt. Wie Abbildung 4 zu entnehmen ist, wurde ein deutlicher Unterschied zwischen den verschiedenen Lacktypen beobachtet.

BIT-Eintrag durch die Rohstoffe

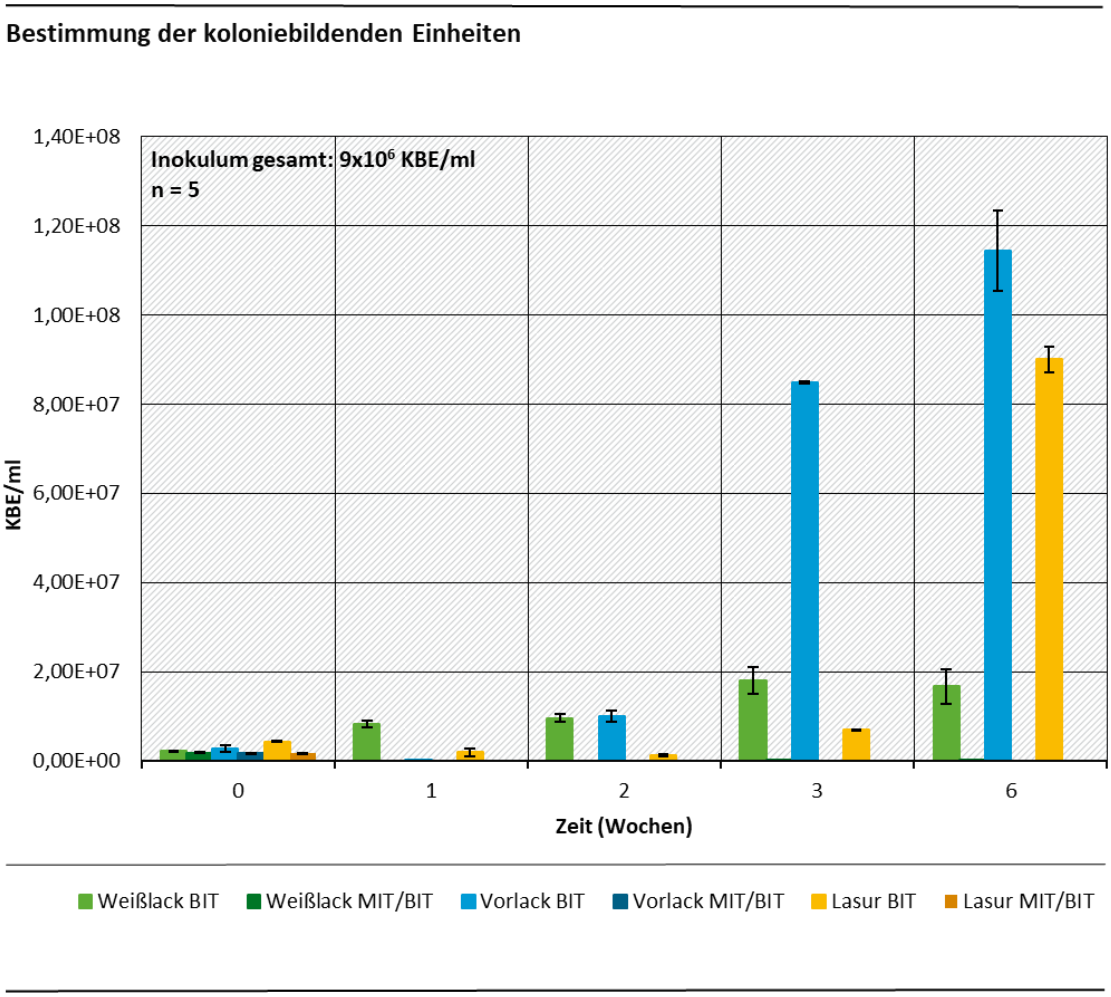
Beim Acryl-Weißlack, bei dem durch die Rohstoffe ausschließlich BIT in das System eingetragen wurde, wurde bereits nach einer Woche ein bakterielles Wachstum verzeichnet. Bei Abschluss des Belastungstests wurde eine Zellzahl von 1,67x10^7 KBE/ml nachgewiesen. Im Vergleich dazu wurde beim Vorlack erst nach zwei Wochen ein Wachstum der Bakterien beobachtet. Die Zellzahl stieg dabei schnell an und zeigte nach sechs Wochen einen Wert von 1,14x10^8 KBE/ml. Auch bei der eingesetzten Lasur wurde ein verzögertes bakterielles Wachstum verzeichnet. In den ersten zwei Wochen des Versuchs war kein Wachstum zu beobachten; die Zellzahl lag immer unter dem durch die Beimpfung der Probe eingebrachten Keimgehalt. Nach drei Wochen wurde ein deutliches, bakterielles Wachstum nachgewiesen. Bei Abschluss des Tests lag die Zellzahl bei 9x10^7 KBE/ml.

MIT/BIT-Eintrag durch die Rohstoffe

Vorlack und Lasur, bei denen ein Eintrag von MIT und BIT über die Rohstoffe erfolgte, zeigten über den gesamten Testzeitraum kein bakterielles Wachstum oder ein Auftreten von Kolonien. Beim Weißlack wurden nach drei Wochen Kolonien nachgewiesen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die verschiedenen Lacktypen deutlich in ihrer Anfälligkeit gegenüber Bakterien unterscheiden. Der Weißlack zeigte bereits nach einer Woche ein Wachstum der Bakterien, jedoch war die maximal erreichte Zellzahl wesentlich geringer als bei dem Vorlack und der Lasur, bei denen das Wachstum verzögert einsetzte.

Abbildung 4: Belastungstest mit Bakterien



Quelle: BAM

5.1.3.3 Gebrauchstauglichkeitstest mit Hefen

Die Lackproben wurden in wöchentlichem Abstand dreimal 1 %-ig mit einer Hefesuspension beimpft und jeweils anschließend bei 30 ± 2 °C gelagert. Die Suspension enthielt die Prüforganismen in einer Konzentration von 1 x 10^8 KBE/ml (koloniebildende Einheit/Milliliter). Dies führte zu einem Keimgehalt von 1 x 10^6 KBE/ml in dem beimpften Lack. Maximal lagen folglich 3 x 10^6 KBE/ml in dem Lack vor, die nur durch Beimpfung des Lacks zugesetzt worden waren. Die Lebendzellzahl wurde direkt nach der ersten Beimpfung (Wiederfindung), vor jeder neuen Beimpfung und nach Abschluss des Belastungstests ermittelt.

<u>BIT-Eintrag durch die Rohstoffe</u>

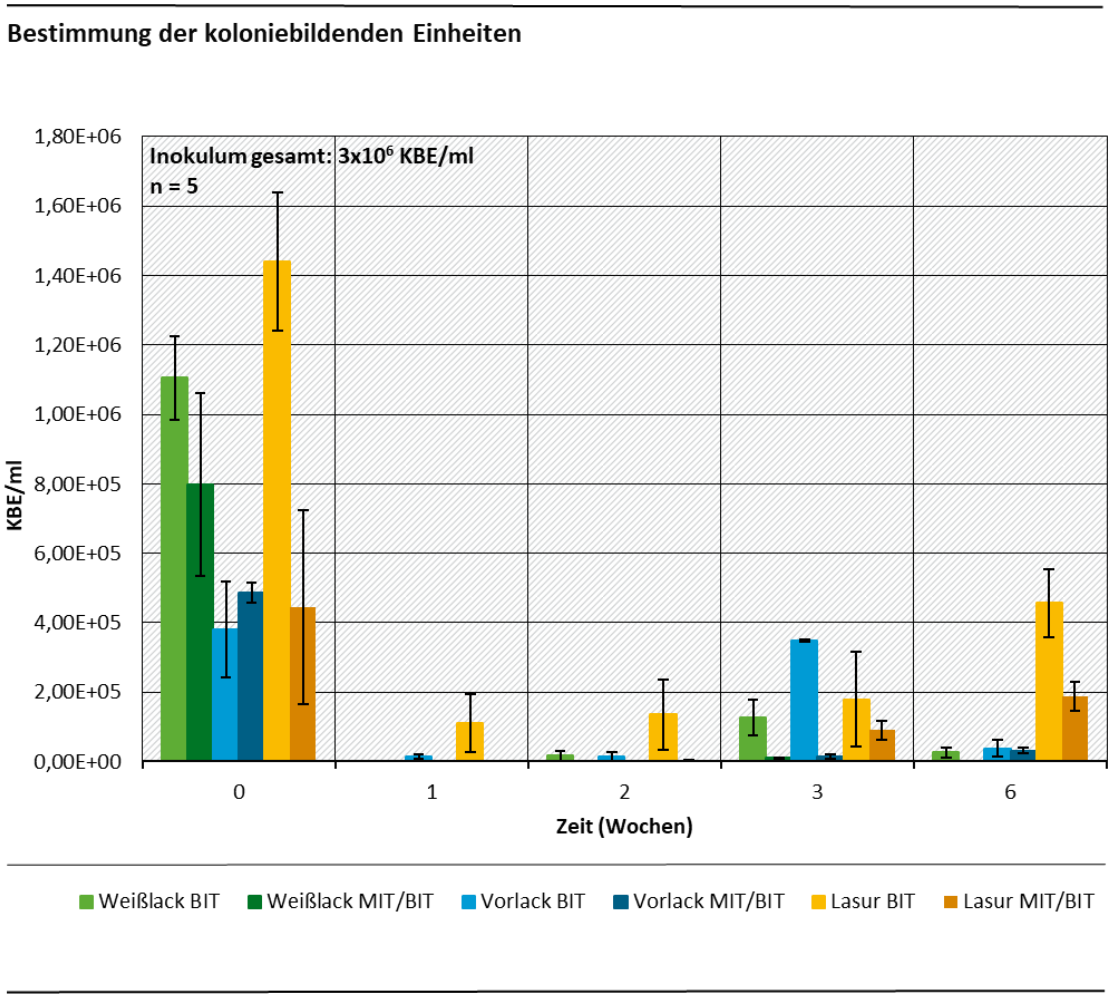
Alle Lacke, bei denen ein Eintrag von BIT über die Rohstoffe erfolgte, zeigten über den gesamten Testzeitraum kein Wachstum von Hefen. Beim Weißlack wurden nach zwei Wochen Kolonien auf dem Nährmedium nachgewiesen. Nach drei Wochen war die Zellzahl weiter angestiegen, lag jedoch unterhalb dem durch die Beimpfung der Proben eingebrachten Keimgehalt. Nach Abschluss des Belastungstests lag die Zellzahl bei 2,60x10^4 KBE/ml. Beim Vorlack wurden nach einer Woche Kolonien nachgewiesen, deren Anzahl bis zur zweiten Woche schwach und bis zur dritten Woche deutlich zunahm. Nach Beendigung des Tests wurde eine Zellzahl von 3,74x10^4 KBE/ml erreicht.

Im Unterschied dazu waren bei der Lasur erst nach zwei Wochen Kolonien zu beobachten. Die Zellzahl nahm zur dritten Woche zu und erzielte nach sechs Wochen einen Wert von 4,57x10^5 KBE/ml.

MIT/BIT-Eintrag durch die Rohstoffe

Im Gegensatz zu den Versuchen mit Bakterien wurden bei allen drei Lackgruppen mit einem MIT/BIT-Eintrag Hefen nachgewiesen. Zu keinem Zeitpunkt lag jedoch ein Wachstum vor; die Zellzahl lag immer unter der Zellzahl des Inokulums. Bei der Lasur und dem Vorlack wurden nach drei Wochen erstmals Kolonien nachgewiesen. Beim Weißlack traten nur vereinzelt Kolonien auf. Nach Beendigung des Belastungstests wurde bei der Lasur die höchste Zellzahl innerhalb der drei Lackgruppen bestimmt (1,88x10^5 KBE/ml).

Abbildung 5: Belastungstest mit Hefen



Quelle: BAM

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass der überarbeitete Gebrauchstauglichkeitstest auch für verschiedene Lacktypen anwendbar ist und es Unterschiede in der Anfälligkeit der verschiedenen Lacke gegenüber Mikroorganismen gibt. Insgesamt war die Empfindlichkeit der getesteten Lacke gegenüber Bakterien im Testzeitraum von sechs Wochen deutlich höher als gegenüber Hefen. Dies zeigt die Bedeutsamkeit der Verwendung verschiedener Mikroorganismen für die Testung, um Aussagen über die notwendige Konservierung des Produkts zu treffen.

5.1.4 Einfluss der künstlichen Alterung auf die Besiedelbarkeit von Lacken

Zur Untersuchung des Einflusses einer künstlichen Alterung auf die Besiedelbarkeit wurden erneut Lacke vom Hersteller bezogen und die Proben zunächst für vier Wochen bei 40 °C inkubiert. Anschließend wurden die Lacke mit Bakterien, Hefen oder Schimmelpilzsporen versetzt. Vergleichend wurden die Untersuchungen mit ungealterten Proben durchgeführt.

5.1.4.1 Analyse der Konservierungsmittelkonzentration

Mittels Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC) wurde die Konzentration an MIT und BIT in den Lacken nach Lieferung bestimmt.

Tabelle 7: Bestimmung des MIT- und BIT-Gehalts

Lacktyp	Gehalt MIT [mg/kg]	Gehalt BIT [mg/kg]
Acryl-Weißlack + MIT/BIT	0,71 ± 0,01	n.n.
Acryl-Weißlack + BIT	n.n.	n.n.
Vorlack + MIT/BIT	10,03 ± 0,49	n.n.
Vorlack + BIT	n.n.	n.n.
Lasur + MIT/BIT	12,62 ± 0,53	n.n.
Lasur + BIT	n.n.	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

Es zeigte sich, dass der Eintrag an MIT durch die Rohstoffe beim Vorlack und der Lasur vergleichbar zu den vorherigen Systemen war. Beim Weißlack hingegen war eine Reduktion auf ein Zehntel gegenüber dem vorhergehend gelieferten Produktansatz zu verzeichnen. Wie bei den vorherigen Untersuchungen war kein BIT nachweisbar.

5.1.4.2 Gebrauchstauglichkeitstest mit Bakterien vor der künstlichen Alterung

Die Lackproben wurden in wöchentlichem Abstand dreimal 1 %-ig mit einer Bakteriensuspension beimpft und jeweils anschließend bei 30 ± 2 °C gelagert. Die Suspension enthielt die Prüforganismen in einer Konzentration von 3 x 10^8 KBE/ml (koloniebildende Einheit /Milliliter). Dies führte zu einem Keimgehalt von 3 x 10^6 KBE/ml in dem beimpften Lack. Die Lebendzellzahl wurde direkt nach der ersten Beimpfung (Wiederfindung), vor jeder neuen Beimpfung und nach Abschluss des Belastungstests ermittelt. Auch bei diesem Versuch war ein deutlicher Unterschied zwischen den verschiedenen Lacktypen zu erkennen.

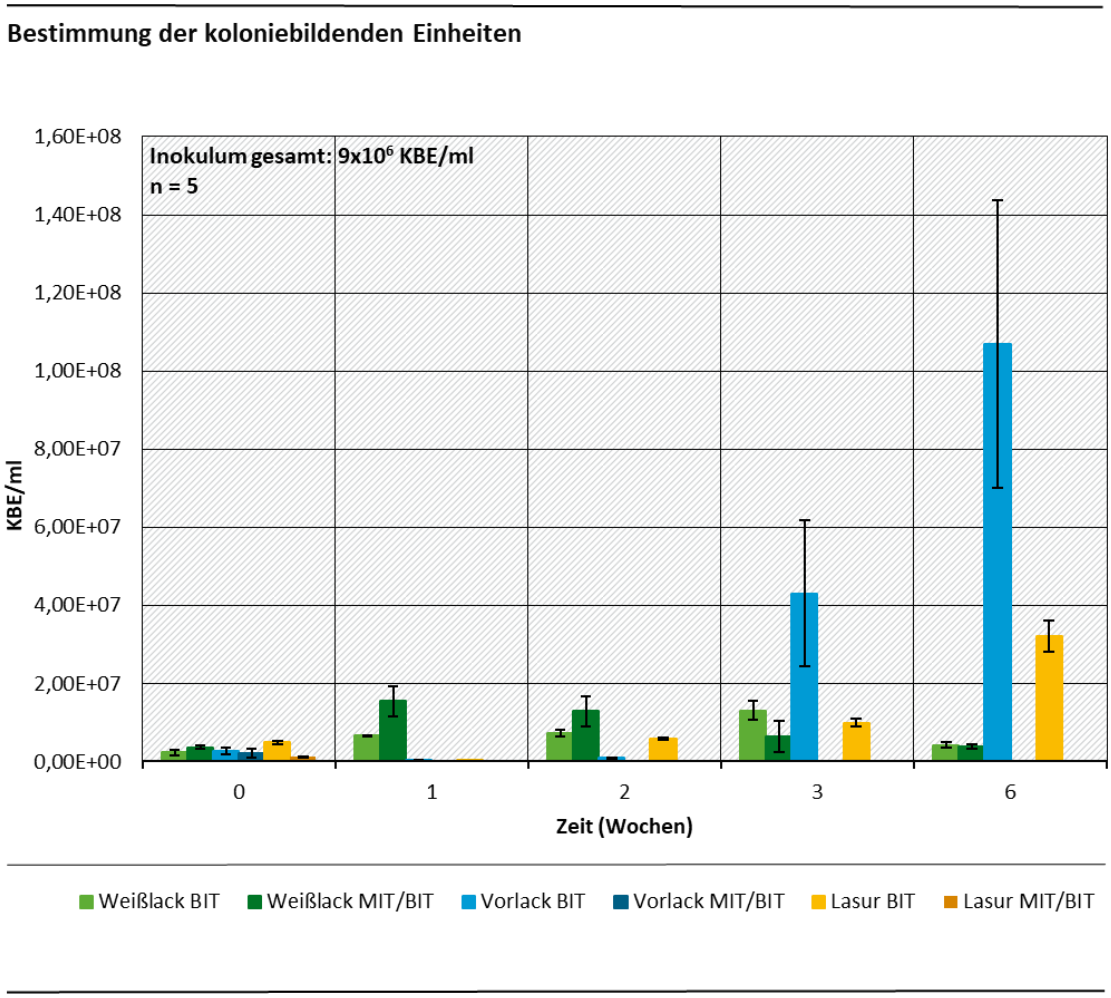
<u>BIT-Eintrag durch die Rohstoffe</u>

Beim Acryl-Weißlack, bei dem durch die Rohstoffe ausschließlich BIT in das System eingetragen wurde, wurde zunächst nur die Ausbildung von Kolonien beobachtet. Ein Wachstum wurde nach drei Wochen nachgewiesen (Zellzahl 1,31x10^7 KBE/ml). Bei Abschluss des Belastungstests lag die Zellzahl bei 4,24x10^6 KBE/ml. Beim Vorlack wurde ein Wachstum der Bakterien nach drei Wochen nachgewiesen, wobei die Zellzahl schnell anstieg und nach sechs Wochen einen Wert von 1,07x10^8 KBE/ml erreichte. Auch bei der eingesetzten Lasur wurde eine Zunahme in der Zellzahl beobachtet. In den ersten drei Wochen des Versuchs lag die Zellzahl unter dem durch die Beimpfung der Probe eingebrachten Keimgehalt. Bei Abschluss des Tests wurde ein bakterielles Wachstum nachgewiesen und die Zellzahl lag bei 3,21x10^7 KBE/ml.

MIT/BIT-Eintrag durch die Rohstoffe

Beim Vorlack und der Lasur, bei denen ein Eintrag von MIT und BIT über die Rohstoffe erfolgte, wurde über den gesamten Testzeitraum weder ein Wachstum von Bakterien noch die Ausbildung von Kolonien beobachtet. Beim Weißlack hingegen wurde bereits nach einer Woche ein bakterielles Wachstum nachgewiesen. Nach drei Wochen nahm die Zellzahl kontinuierlich ab und lag bei Versuchsende bei 3,96x10^6 KBE/ml.

Abbildung 6: Belastungstest mit Bakterien vor künstlicher Alterung



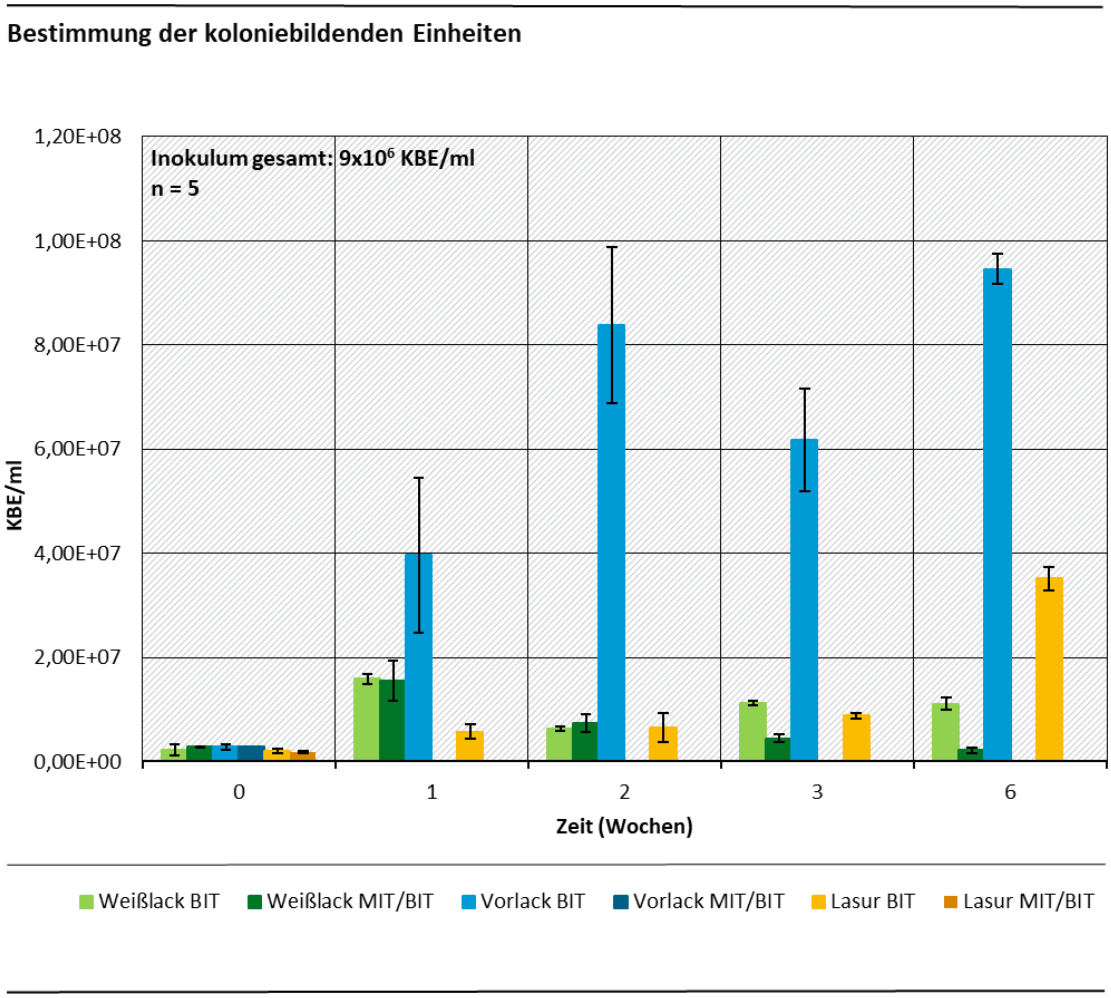
Quelle: BAM

Auch durch diese Ergebnisse wird die unterschiedliche Anfälligkeit der verschiedenen Lacksysteme gegenüber Bakterien deutlich. Wie bei dem vorherigen Versuch (siehe 5.1.3.2) wurde das stärkste Wachstum bei dem Vorlack beobachtet, bei dem ausschließlich BIT über die Rohstoffe in das Produkt eingebracht wurde. Die Tatsache, dass bei diesem Versuch ein Wachstum im MIT/BIT-haltigen Weißlack nachgewiesen wurde, lässt sich vermutlich durch den sehr geringen Gehalt an MIT erklären (0,71 ± 0,01 ppm). Diese Konzentration war hier ausreichend, um das Wachstum der Bakterien zu beeinflussen bzw. zu unterbinden. Beim ersten Test (siehe 5.1.3.2) war der Wert für MIT im Weißlack um das Zehnfache erhöht (8,02 ± 0,54 ppm) und unterdrückte das bakterielle Wachstum vollständig.

5.1.4.3 Gebrauchstauglichkeitstest mit Bakterien nach der künstlichen Alterung

Für die künstliche Alterung wurden die Lacke zunächst für vier Wochen bei 40 °C inkubiert, bevor sie anschließend mit Bakterien beimpft wurden. Wie aus Abbildung 7 ersichtlich ist, war durch die künstliche Alterung ein deutlicher Einfluss auf die Besiedelbarkeit der Lacke gegeben.

Abbildung 7: Belastungstest mit Bakterien nach künstlicher Alterung



Quelle: BAM

BIT-Eintrag durch die Rohstoffe

Bei allen Proben wurde bereits nach einer Woche ein bakterielles Wachstum nachgewiesen. Wie bei den ungealterten Proben wurde auch hier eine klare Präferenz der Bakterien gegenüber dem Vorlack beobachtet. Bei Abschluss des Belastungstests lag die Zellzahl hier bei 9,46x10⁷ KBE/ml. Beim Weißlack hingegen nahm die Zellzahl nach zwei Wochen kontinuierlich ab und lag bei Versuchsende bei 1,11x10⁷ KBE/ml. Bei der Lasur blieb die Zellzahl zwischen Woche eins und drei nahezu konstant. Nach sechs Wochen war eine deutliche Zunahme der Zellzahl zu verzeichnen (3,52x10⁷ KBE/ml).

MIT/BIT-Eintrag durch die Rohstoffe

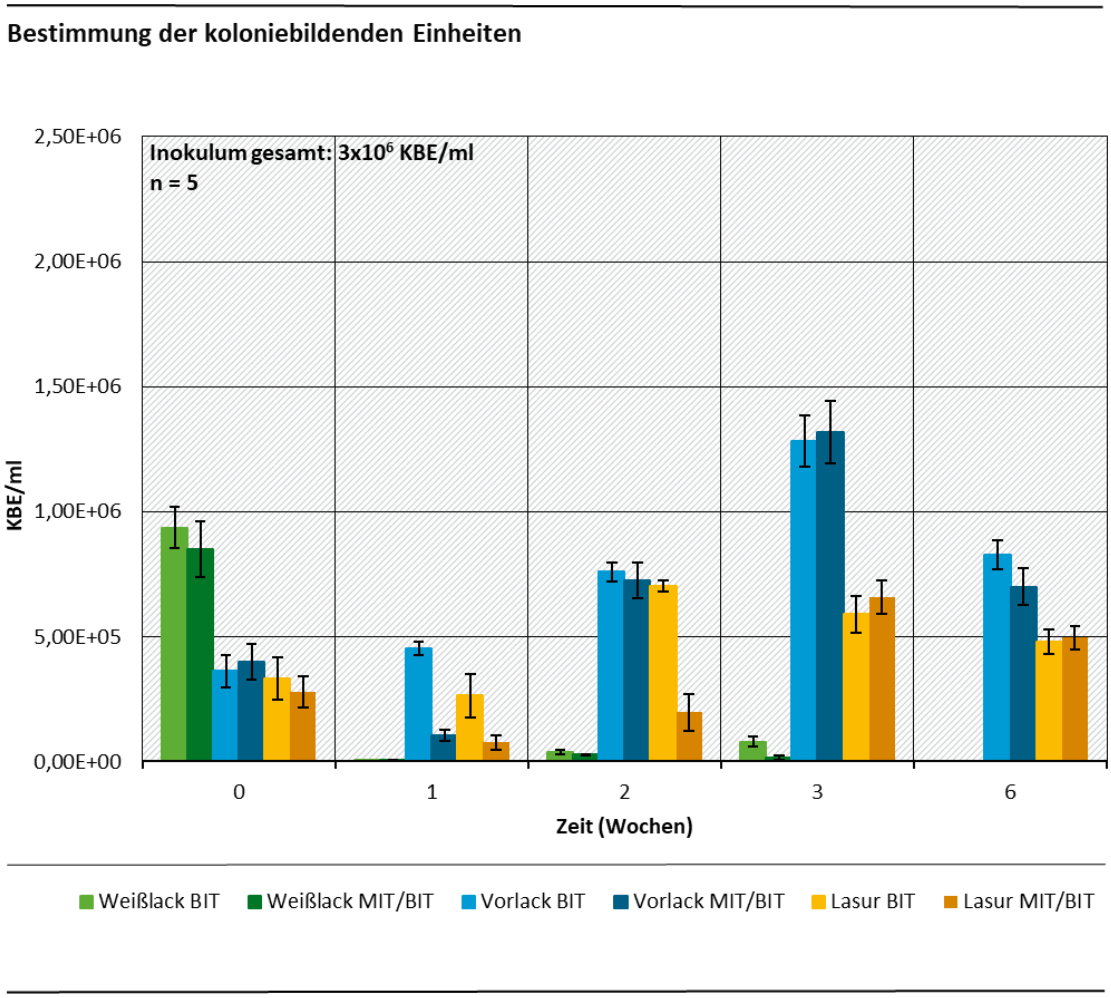
Wie bei den ungealterten Proben wurde beim Vorlack und der Lasur, bei denen ein Eintrag von MIT und BIT über die Rohstoffe erfolgte, über den gesamten Testzeitraum weder ein Wachstum von Bakterien noch die Ausbildung von Kolonien beobachtet. Beim Weißlack hingegen wurde nach einer Woche ein bakterielles Wachstum nachgewiesen. Anschließend nahm die Zellzahl kontinuierlich ab und lag nach sechs Wochen bei 2,17x10⁶ KBE/ml.

Durch die Versuche zeigte sich, dass die künstliche Alterung zu keiner Veränderung in der Präferenz der Bakterien für einen Lacktypen führt. Unabhängig von der Alterung zeigte der Vorlack die höchste Besiedelbarkeit durch Bakterien. Die künstliche Alterung führte jedoch insgesamt zu einer schnelleren Anfälligkeit der Lacke gegenüber Bakterien.

5.1.4.4 Gebrauchstauglichkeitstest mit Hefen vor der künstlichen Alterung

Die Lackproben wurden in wöchentlichem Abstand dreimal 1 %-ig mit einer Hefesuspension beimpft und jeweils anschließend bei 30 ± 2 °C gelagert. Die Suspension enthielt die Prüforganismen in einer Konzentration von 1 x 10^8 KBE/ml (koloniebildende Einheit/Milliliter). Dies führte zu einem Keimgehalt von 1 x 10^6 KBE/ml in dem beimpften Lack. Maximal lagen folglich 3 x 10^6 KBE/ml in dem Lack vor, die nur durch Beimpfung des Lacks zugesetzt worden waren. Die Lebendzellzahl wurde direkt nach der ersten Beimpfung (Wiederfindung), vor jeder neuen Beimpfung und nach Abschluss des Belastungstests ermittelt.

Abbildung 8: Belastungstest mit Hefen vor künstlicher Alterung



Quelle: BAM

<u>BIT-Eintrag durch die Rohstoffe</u>

Jeder Lack, bei dem ein Eintrag von BIT über die Rohstoffe erfolgte, ließ kein Wachstum von Hefen zu. Bei allen Ansätzen waren ab der ersten Woche Kolonien nachweisbar, wobei die geringsten Zellzahlen beim Weißlack erhalten wurden. Beim Vorlack nahm die Zellzahl kontinuierlich zu, lag jedoch immer unterhalb dem durch die Beimpfung der Proben eingebrachten Keimgehalt. Nach sechs Wochen wurde eine Zellzahl von 8,27x10^5 KBE/ml bestimmt. Auch bei der Lasur wurde eine Zunahme der Zellzahl verzeichnet. Nach Beendigung des Tests wurde eine Zellzahl von 4,80x10^5 KBE/ml erreicht.

MIT/BIT-Eintrag durch die Rohstoffe

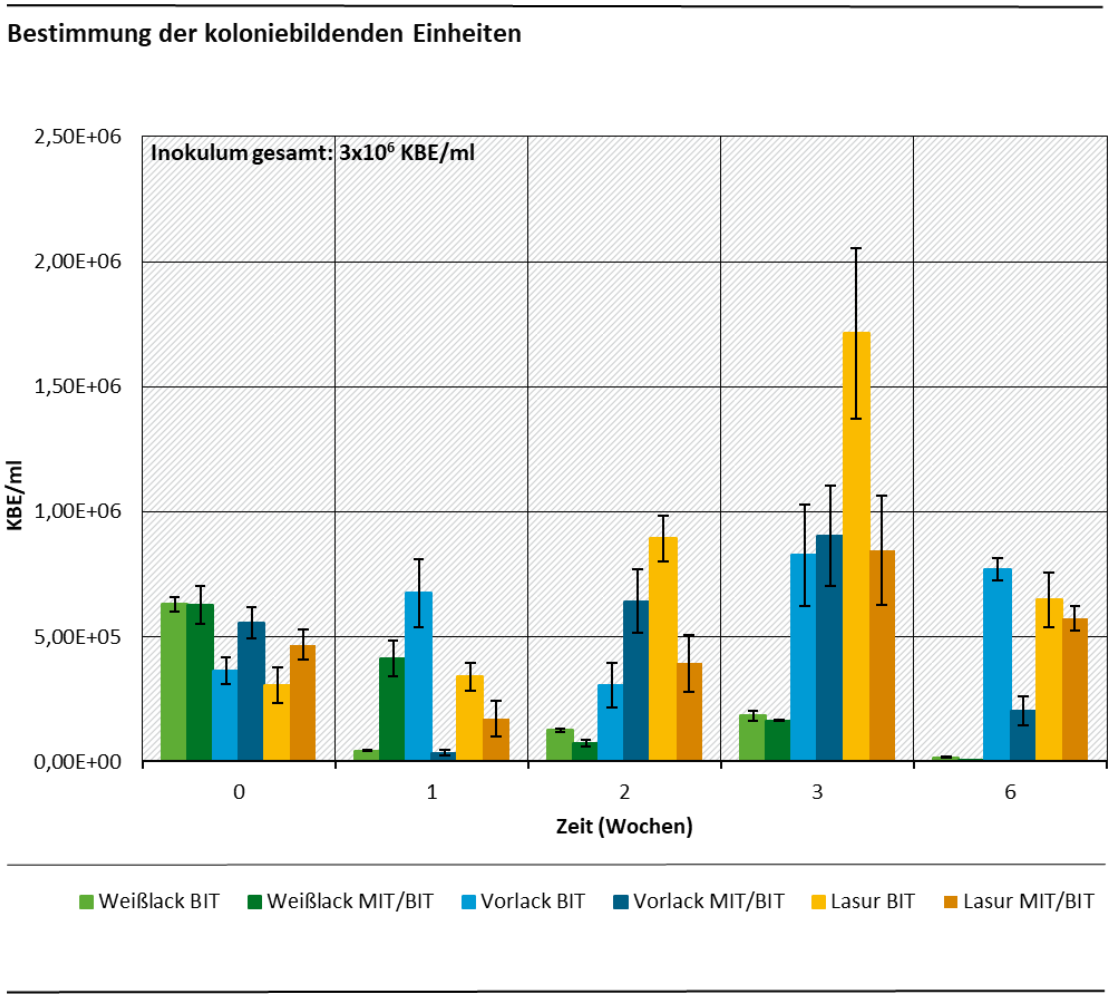
Im Gegensatz zu den Versuchen mit Bakterien wurden bei allen drei Lackgruppen mit einem MIT/BIT-Eintrag Kolonien nachgewiesen, wobei beim Weißlack die geringsten Zellzahlen bestimmt wurden. Die höchsten Zellzahlen lagen beim Vorlack vor.

Die Versuche haben gezeigt, dass die Hefen in keinem der Lacktypen wachsen. Anhand der ermittelten Zellzahlen zeigt sich dennoch ein Unterschied in der Anfälligkeit der Lacke gegenüber Hefen. Wie schon für die Bakterien nachgewiesen, lagen die höchsten Zellzahlen beim Vorlack vor, wobei der Unterschied zur Lasur im Falle der Hefen nicht stark ausgeprägt war. Die geringsten Zellzahlen lagen beim Weißlack vor.

5.1.4.5 Gebrauchstauglichkeitstest mit Hefen nach der künstlichen Alterung

Nach einer vierwöchigen Inkubation der Proben bei 40 °C wurden die verschiedenen Lacksysteme dem Belastungstest mit Hefen unterzogen.

Abbildung 9: Belastungstest mit Hefen nach künstlicher Alterung



Quelle: BAM

BIT-Eintrag durch die Rohstoffe

Wie bei den ungealterten Proben fand auch nach der künstlichen Alterung in keinem Lacktyp ein Wachstum der Hefen statt. Auch hier wurde die geringste Zellzahl für den Weißlack bestimmt.

Beim Vorlack war eine Zunahme der Zellzahl nach drei Wochen zu verzeichnen. Bei Beendigung des Tests wurde eine Zellzahl von 7,68x10^{5}KBE/ml bestimmt.

Wie aus Abbildung 9 hervorgeht, kam es nach der künstlichen Alterung der Proben bei der Lasur zu einer schnelleren und stärkeren Zunahme der Zellzahl. Die höchste Zellzahl wurde dabei nach drei Wochen bestimmt (1,71x10^6 KBE/ml).

MIT/BIT-Eintrag durch die Rohstoffe

Wie bei den ungealterten Proben wurden auch hier bei allen drei Lackgruppen Kolonien nachgewiesen. Die geringsten Zellzahlen wurden für den Weißlack bestimmt. Beim Vorlack war eine Zunahme der Zellzahl nach zwei Wochen zu verzeichnen, wohingegen die Zellzahl bei der Lasur erst nach drei Wochen zunahm.

Anhand der Versuche wird deutlich, dass zum einen die Besiedelbarkeit durch Mikroorganismen zwischen den Lacktypen variiert und zum anderen ein unterschiedliches Verhalten von Hefen und Bakterien vorliegt. Der Einfluss der künstlichen Alterung war besonders beim Vorlack (BIT) zu beobachten. Bei der ungealterten Probe wurde ein Wachstum der Bakterien (siehe Abb. 6) erst nach drei Wochen nachgewiesen, bei der gealterten Probe hingegen setzte das Wachstum bereits nach einer Woche ein (siehe Abb. 7). Dies lässt vermuten, dass durch die Lagerung des Vorlacks bei 40 °C das Produkt schneller anfällig für Bakterienbefall wird.

5.1.4.6 Gebrauchstauglichkeitstest mit Schimmelpilzsporen

Schimmelpilze entwickeln sich vor allem an der Oberfläche von Lacken oder an den Seitenwänden des Gebindes, wenn diese nur geringfügig mit Lack benetzt sind. Daher wurde bei den Versuchen die Sporensuspension lediglich auf die Oberfläche des Produktes gegeben und nicht mit dem Lack vermischt. Die verschiedenen Lacke wurden in wöchentlichem Abstand dreimal 1 %-ig mit der Sporensuspension inokuliert. Die Suspension wurde auf eine Konzentration von 1 x 10^6 Sporen/ml eingestellt und durch vorsichtiges Schwenken der Probe auf der Oberfläche verteilt. Jeweils anschließend wurden die Proben bei 25 ± 2 °C gelagert. Da das Wachstum in diesem Fall nicht über eine Keimzahlbestimmung erfolgen kann, wurde die Auswertung rein visuell vorgenommen. Zur Vitalitätskontrolle der Schimmelpilze wurde die Sporensuspension auf Nähragarplatten ausgestrichen und die Platten für maximal 7 Tage bei 25 ± 2 °C bebrütet. Die Versuche wurden mit ungealterten und gealterten Proben durchgeführt.

Über den gesamten Versuchszeitraum von sechs Wochen wurde bei keinem Lacktyp ein Wachstum von Schimmelpilzen beobachtet. Das gleiche Ergebnis wurde auch für die künstlich gealterten Lacke erhalten.

5.1.5 Festlegung von Richtrezepturen

Die Industrie entwickelte für die drei Lacktypen Richtrezepturen (siehe 8.3), an denen künftig der in der Vergabegrundlage RAL-UZ 12a aufgeführte Biotest durchgeführt wird. Dieser Gebrauchstauglichkeitstest ist bei Lacken insbesondere dann von Bedeutung, wenn neue Wirkstoffe bzw. deren Kombi-nationen auf den Anhang 1 der Vergabegrundlage gebracht werden sollen. Die Rezepturen wurden dem Belastungstest mit Bakterien, Hefen und Schimmelpilzsporen unterzogen. Die Vitalität der eingesetzten Mikroorganismen bzw. Sporen wurde bei jedem Inokulationsschritt durch Ausplattieren der Mischsuspension auf Nährmedium überprüft und bestätigt. Zu Beginn der Versuche erfolgte eine Eingangskontrolle der zu testenden Lacke. Hierzu wurde der Lack mit einer sterilen Impföse auf Nähragarplatten ausgestrichen und auf mögliches Wachstum über-prüft. Dabei wurden weder Bakterien noch Pilze nachgewiesen.

5.1.5.1 Analyse der Konservierungsmittelkonzentration

Mittels Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC) wurde die Konzentration an MIT und BIT in den Lacken nach Lieferung bestimmt.

Tabelle 7: Bestimmung des MIT- und BIT-Gehalts

Lacktyp	Gehalt MIT [mg/kg]	Gehalt BIT [mg/kg]
Dispersionsglanzlack	6,47 ± 0,6	1,21 ± 0,11
Lasur	5,67 ± 0,07	n.n.
Vorlack	5,55 ± 0,12	0,467 ± 0,04

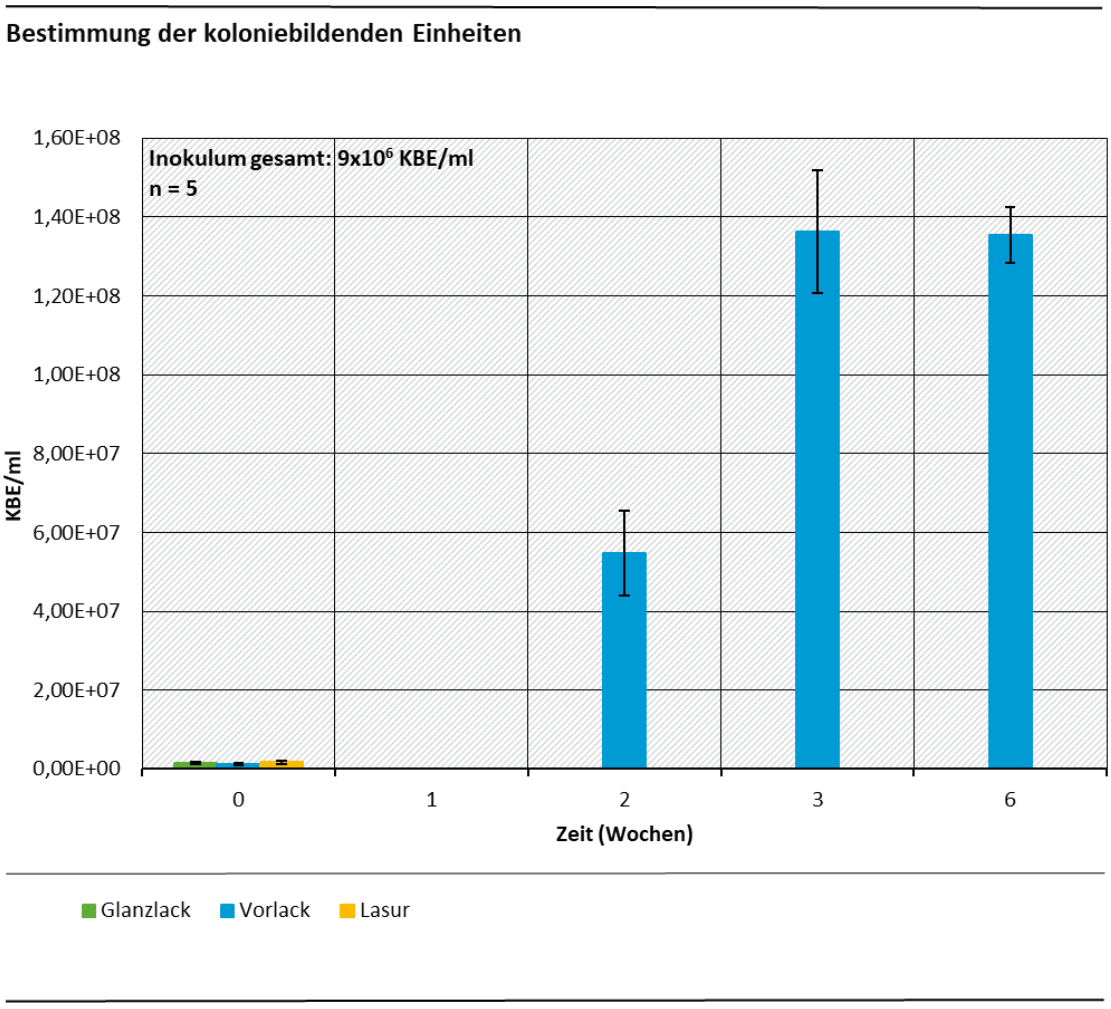
n.n.: nicht nachweisbar

5.1.5.2 Gebrauchstauglichkeitstest mit Bakterien

Die Lackproben wurden in wöchentlichem Abstand dreimal 1 %-ig mit einer Bakteriensuspension beimpft und jeweils anschließend bei 30 ± 2 °C gelagert. Die Suspension enthielt die Prüforganismen in einer Konzentration von 3 x 10^8 KBE/ml (koloniebildende Einheit /Milliliter). Dies führte zu einem Keimgehalt von 3 x 10^6 KBE/ml in dem beimpften Lack. Maximal lagen folglich 9 x 10^6 KBE/ml in dem Lack vor, die nur durch Beimpfung des Lacks zugesetzt worden waren. Die Lebendzellzahl wurde direkt nach der ersten Beimpfung (Wiederfindung), vor jeder neuen Beimpfung und nach Abschluss des Belastungstests ermittelt. Wie Abbildung 10 zu entnehmen ist, wurde ein deutlicher Unterschied zwischen den verschiedenen Lacktypen beobachtet.

Über den gesamten Versuchseitraum von sechs Wochen wurde ausschließlich im Vorlack ein bakterielles Wachstum nachgewiesen, welches nach zwei Wochen einsetzte. Im Gegensatz dazu wurden im Glanzlack und der Lasur weder ein Wachstum noch die Ausbildung von Kolonien beobachtet. Es wurde somit keine Besiedelbarkeit dieser beiden Systeme nachgewiesen.

Abbildung 10: Belastungstest der Richtrezepturen mit Bakterien



Quelle: BAM

5.1.5.3 Gebrauchstauglichkeitstest mit Bakterien nach der künstlichen Alterung

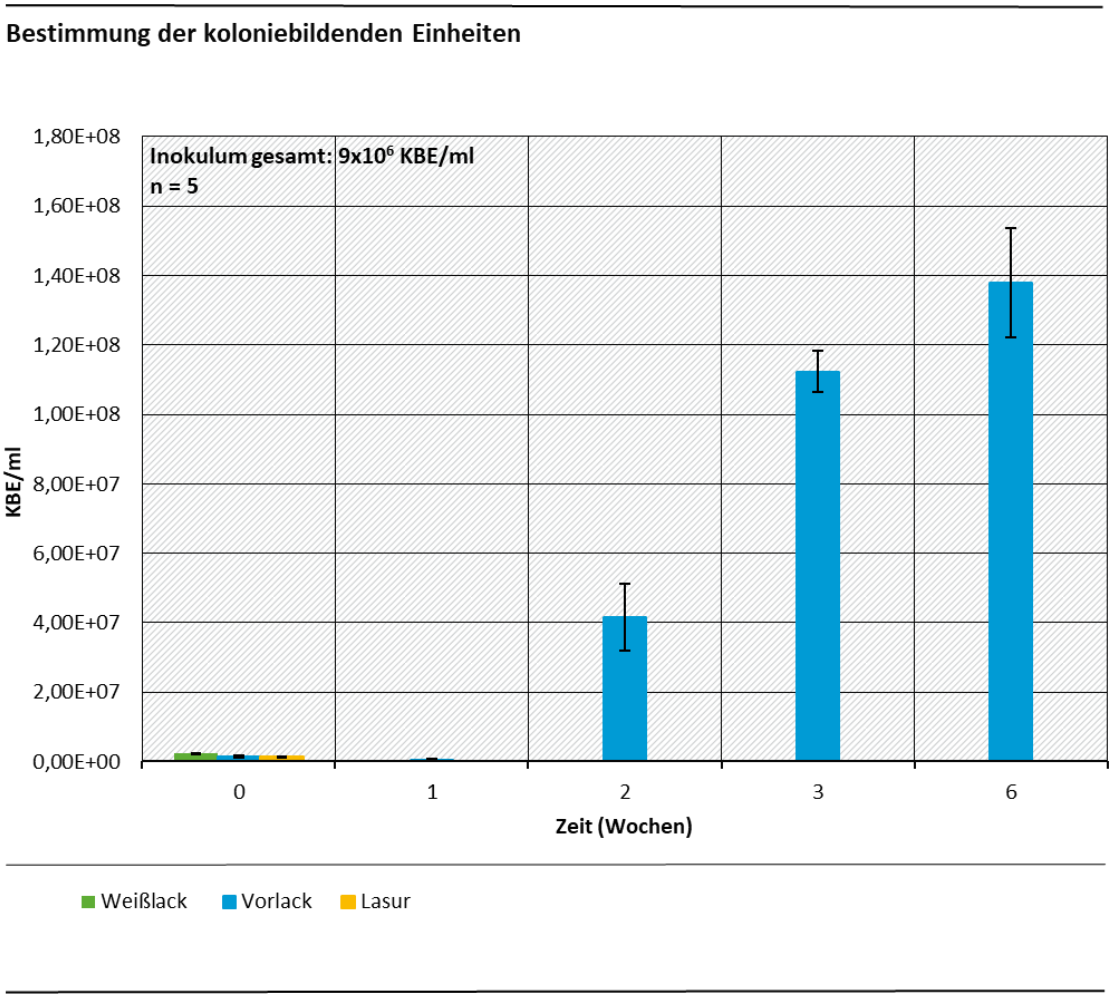
Nach einer vierwöchigen Alterung der Proben bei 40 °C wurde der Gehalt an MIT und BIT bestimmt und die verschiedenen Lacktypen wurden einem Belastungstest mit Bakterien unterzogen.

Tabelle 8: Bestimmung des MIT- und BIT-Gehalts nach der künstlichen Alterung

Lacktyp	Gehalt MIT [mg/kg]	Gehalt BIT [mg/kg]
Dispersionsglanzlack	6,05 ± 0,16	n.n.
Lasur	5,33 ± 0,24	n.n.
Vorlack	5,35 ± 0,33	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

Abbildung 11: Belastungstest der Richtrezepturen mit Bakterien nach künstlicher Alterung



Quelle: BAM

Auch nach der künstlichen Alterung wurde ein Wachstum der Bakterien ausschließlich im Vorlack nachgewiesen. Verglichen mit den ungealterten Proben erfolgte das Wachstum etwas langsamer, wobei bei Abschluss des Belastungstests nach sechs Wochen eine ähnliche Zellzahl ermittelt wurde. Beim Weißlack und der Lasur hingegen wurde weder ein Wachstum noch die Ausbildung von Kolonien beobachtet.

5.1.5.4 Gebrauchstauglichkeitstest mit Hefen

Die Lackproben wurden in wöchentlichem Abstand dreimal 1 %-ig mit einer Hefesuspension beimpft und jeweils anschließend bei 30 ± 2 °C gelagert. Die Suspension enthielt die Prüf-organismen in einer Konzentration von 1 x 10^8 KBE/ml (koloniebildende Einheit/Milliliter). Dies führte zu einem Keimgehalt von 1 x 10^6 KBE/ml in dem beimpften Lack. Maximal lagen folglich 3 x 10^6 KBE/ml in dem Lack vor, die nur durch Beimpfung des Lacks zugesetzt worden waren. Die Lebendzellzahl wurde direkt nach der ersten Beimpfung (Wiederfindung), vor jeder neuen Beimpfung und nach Abschluss des Belastungstests ermittelt. Nach Erhalt der Proben wurde der Gehalt an MIT und BIT bestimmt und die verschiedenen Lacktypen wurden dem Belastungstest mit Hefen unterzogen.

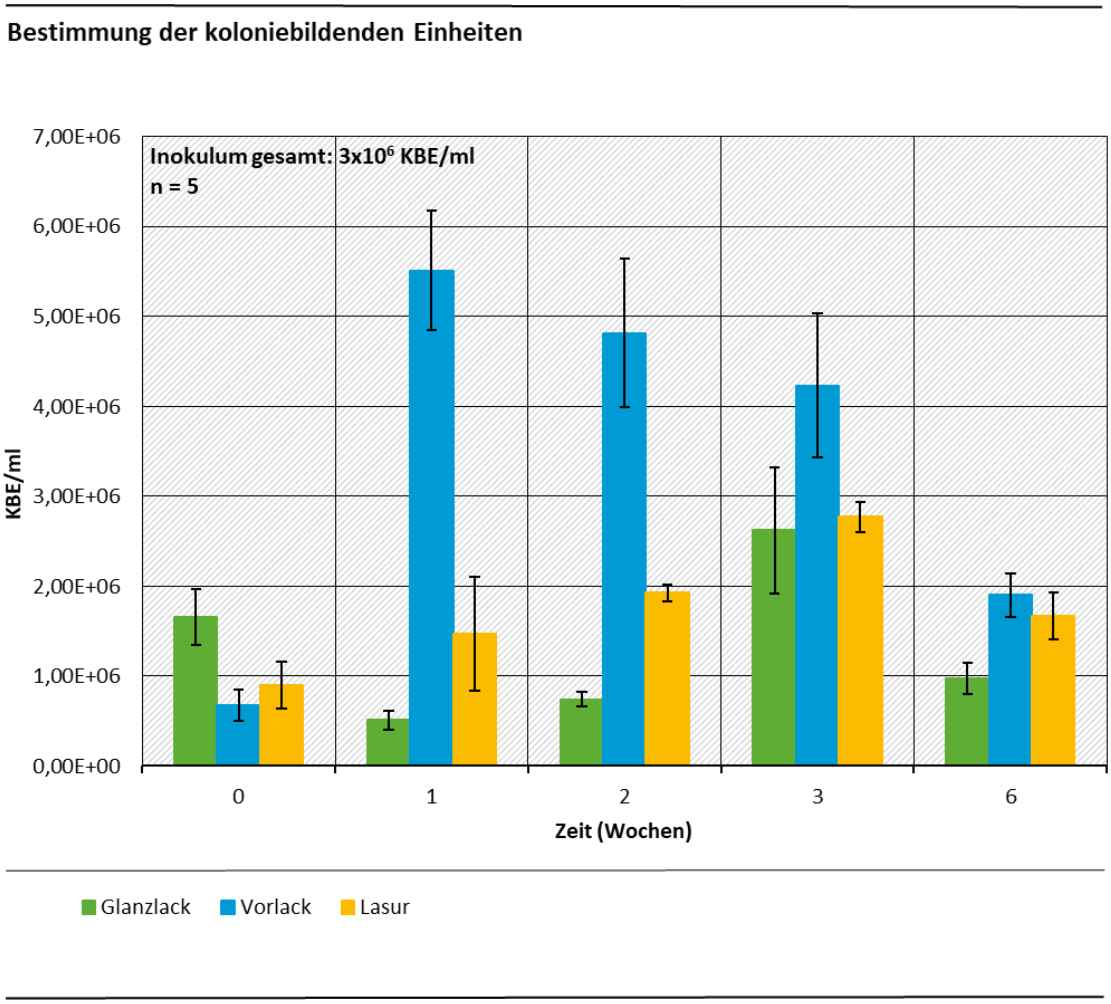
Tabelle 9: Bestimmung des MIT- und BIT-Gehalts

Lacktyp	Gehalt MIT [mg/kg]	Gehalt BIT [mg/kg]
Dispersionsglanzlack	1,36 ± 0,10	n.n.
Lasur	1,43 ± 0,08	n.n.
Vorlack	1,30 ± 0,03	n.n.

n.n.: nicht nachgewiesen

Anhand Abbildung 12 ist ersichtlich, dass ausschließlich beim Vorlack ein Wachstum der Hefen stattgefunden hat. Im Gegensatz zu den Versuchen mit Bakterien wurden bei den Hefen Kolonien im Glanzlack und der Lasur nachgewiesen. Die Zellzahl lag immer unter der des Inokulums, so dass in diesen Fällen kein Wachstum vorlag. Wie bei den Bakterien zeigt sich eine klare Präferenz gegenüber dem Vorlack.

Abbildung 12: Belastungstest der Richtrezepturen mit Hefen



5.1.5.5 Gebrauchstauglichkeitstest mit Hefen nach der künstlichen Alterung

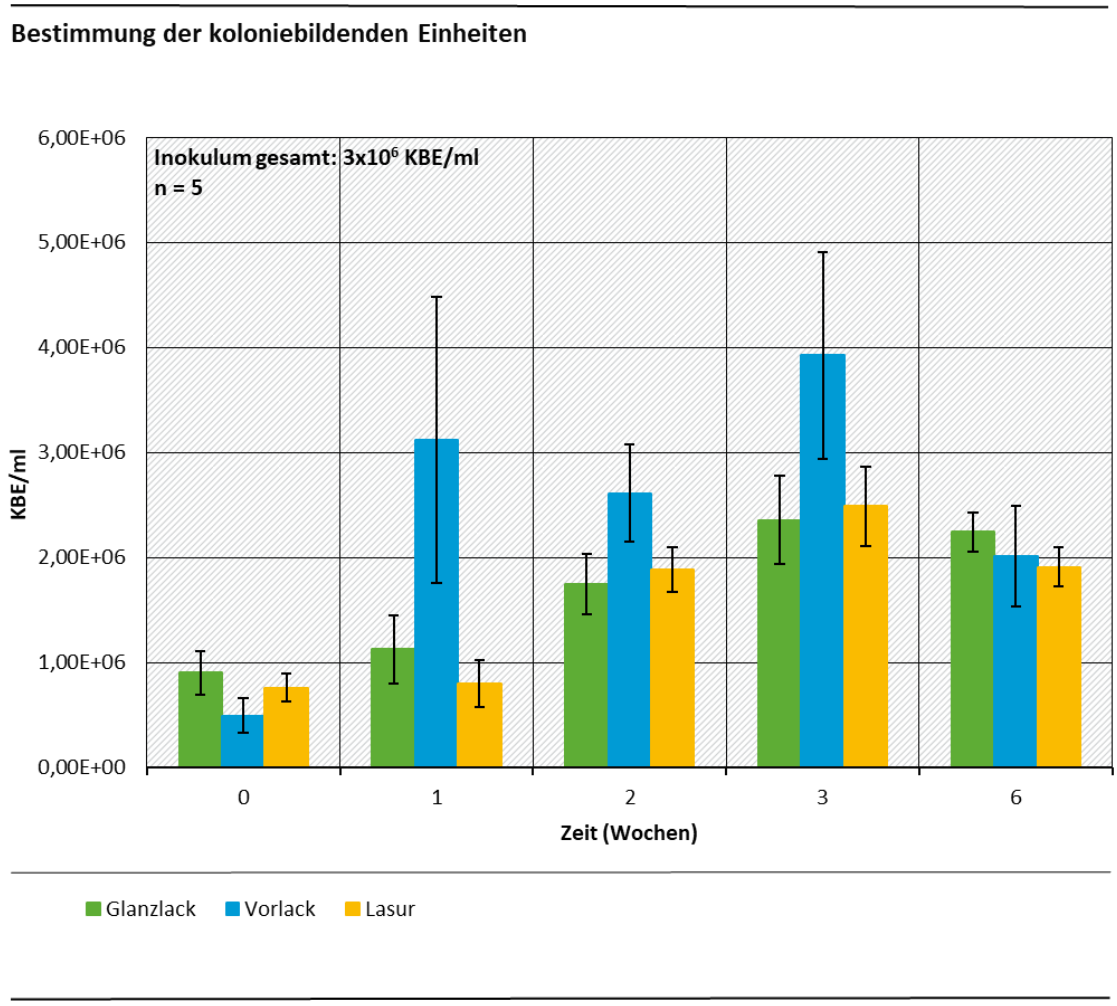
Nach einer vierwöchigen Alterung der Proben bei 40 °C wurde der Gehalt an MIT und BIT bestimmt und die verschiedenen Lacktypen wurden dem Belastungstest mit Hefen unterzogen.

Tabelle 10: Bestimmung des MIT- und BIT-Gehalts nach der künstlichen Alterung

Lacktyp	Gehalt MIT [mg/kg]	Gehalt BIT [mg/kg]
Dispersionsglanzlack	1,34 ± 0,02	n.n.
Lasur	1,37 ± 0,04	n.n.
Vorlack	1,28 ± 0,08	n.n.

n.n.: nicht nachgewiesen

Abbildung 13: Belastungstest der Richtrezepturen mit Hefen nach künstlicher Alterung



Quelle: BAM

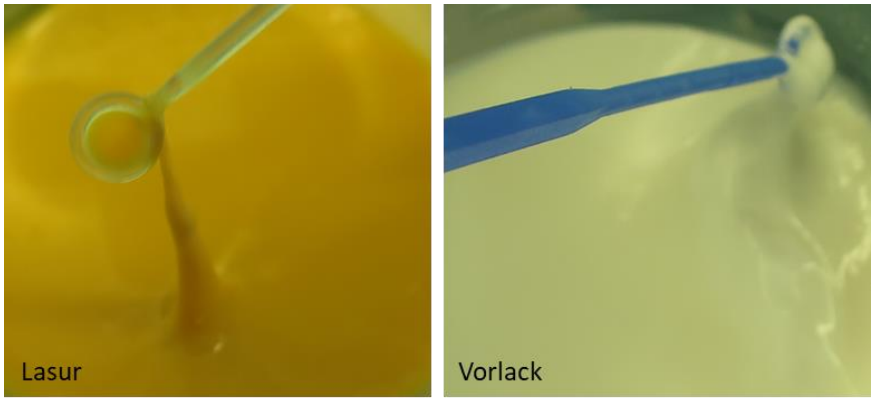
Wie im vorherigen Versuch wurde nach der künstlichen Alterung ausschließlich beim Vorlack ein Wachstum der Hefen beobachtet. Beim Glanzlack und der Lasur kam es zur Ausbildung von Kolonien. Die Zellzahl lag immer unter der des Inokulums, so dass in diesen Fällen kein Wachstum vorlag.

5.1.5.6 Gebrauchstauglichkeitstest mit Schimmelpilzsporen

Schimmelpilze entwickeln sich vor allem an der Oberfläche von Lacken oder an den Seitenwänden des Gebindes, wenn diese nur geringfügig mit dem Lack benetzt sind. Daher wurde bei den Versuchen die Sporensuspension lediglich auf die Oberfläche des Produktes gegeben und nicht mit dem Lack vermischt. Die Lacke wurde in wöchentlichem Abstand dreimal

1 %-ig mit der Sporensuspension inokuliert. Die Suspension wurde auf eine Konzentration von 1 x 10^6 Sporen/ml eingestellt und durch vorsichtiges Schwenken der Probe auf der Oberfläche verteilt. Anschließend wurden die Proben bei 25 ± 2 °C gelagert. Da das Wachstum in diesem Fall nicht über eine Keimzahlbestimmung erfolgen kann, wurde die Auswertung rein visuell vorgenommen. Zur Vitalitätskontrolle der Schimmelpilze wurde die Sporensuspension auf Nähragarplatten ausgestrichen und die Platten für maximal 7 Tage bei 25 ± 2 °C bebrütet. Nach Abschluss des Belastungstests war beim Vorlack und der Lasur eine Veränderung der Lackoberfläche zu sehen; die Substanz war zäher als zu Beginn der Inkubation und zog Fäden, wenn eine Impföse oberflächlich darüber gezogen wurde (siehe Abb. 14). Bei den Kontrollen, die nicht mit Schimmelpilzsporen versetzt worden waren, wurde dies nicht beobachtet. Bei Glanzlack wurde keine Veränderung in der Viskosität nachgewiesen. Gleiche Ergebnisse wurden für die künstlich gealterten Proben erhalten.

Abbildung 14: Belastungstest der Richtrezepturen mit Schimmelpilzsporen



5.2 Konservierungsmittelfreie Dispersionsfarben

Die Neueinstufung von MIT als hautsensibilisierend der Kategorie 1A mit einem spezifischen Konzentrationsgrenzwert von ≤ 15 ppm (0,0015 %) führt zu einer Kennzeichnungspflicht von Produkten ab einer Konzentration von 15 ppm mit dem Gefahrenhinweis H317 (kann allergische Hautreaktionen verursachen). Da i.d.R. MIT allein bei dieser Konzentration als Topfkonservierer nicht mehr wirksam ist, sind Alternativen zum Schutz der Produkte vor mikrobiellem Befall gefragt. Dies ist von besonderer Relevanz, da die Jury Umweltzeichen im Dezember 2018 beschlossen hat, dass matte, weiße Innenwandfarben mit dem Blauen Engel nicht mehr mit bioziden Wirkstoffen konserviert werden dürfen.

Definitionsgemäß gilt eine Farbe als konservierungsmittelfrei, wenn sie weniger als 2 ppm Konservierungsmittel enthält. Ausnahmen hierbei bilden MIT (<1,5 ppm) und CIT (<0,5ppm). Die z.Zt. auf dem Markt käuflichen konservierungsmittelfreie Wandfarben zeichnen sich durch eine hohe Alkalität (pH ca. 10,4-11,1) aus, welche den Verderb durch Mikroorgansimen verhindert. Im Rahmen des Vorhabens wurden weiße Wandfarben, die als konservierungsmittelfrei deklariert sind, verschiedener Hersteller aus dem Baumarkt bezogen. Nach Erhalt der Farben erfolgte eine Eingangskontrolle dieser Farben bezüglich ihres Keimgehaltes und eine Bestimmung des pH-Wertes.

5.2.1 Bestimmung des pH-Wertes

Tabelle 11: Bestimmung des pH-Wertes

Farbe	pH (Herstellerangaben)	pH (gemessen)
Hersteller I		
Farbe 1	< 11,4	10,40
Farbe 2	Keine Angabe	10,95
Farbe 3	ca. 11	10,90
Hersteller II		
Farbe 1	11	10,32
Farbe 2	11,5	10,27
Farbe 3	11,0	10,85
Hersteller III		
Farbe 1	9,0 bis < 11,5	10,75
Farbe 2	9,0 bis < 11,5	10,27
Hersteller IV		
Farbe 1	ca. 11	10,68
Hersteller V		
Farbe 1	11	9,94

5.2.2 Nachweis von Mikroorgansimen

Alle Wandfarben wurden mit einer sterilen Impföse auf Nähragarplatten ausgestrichen und auf mögliches Wachstum überprüft. Zum einen wurde ein universelles Nährmedium (CASO, pH-Wert 7,3) verwendet, zum anderen wurde ein Medium eingesetzt, dass durch einen erhöhten pH-Wert von ca. 9,7 das Wachstum von alkaliphilen und alkalitoleranten Mikroorganismen ermöglicht (ANA). Bei fünf Produkten wurden auch nach einem Zeitraum von drei Wochen keine Mikroorganismen auf den Nähragarplatten nachgewiesen (siehe Tabelle 12). Bei allen anderen getesteten Farben traten Kolonien auf den verschiedenen Nährmedien auf.

Tabelle 12: Nachweis von Mikroorganismen

Farbe	CASO-Medium (pH 7,3 ± 0,2)	ANA-Medium (pH 9,7)
Hersteller I		
Farbe 1	+	+
Farbe 2	-	-
Farbe 3	-	-
Hersteller II		
Farbe 1	+	+
Farbe 2	+	+
Farbe 3	-	-
Hersteller III		
Farbe 1	-	-
Farbe 2	-	-
Hersteller IV		
Farbe 1	-	+
Hersteller V		
Farbe 1	-	+

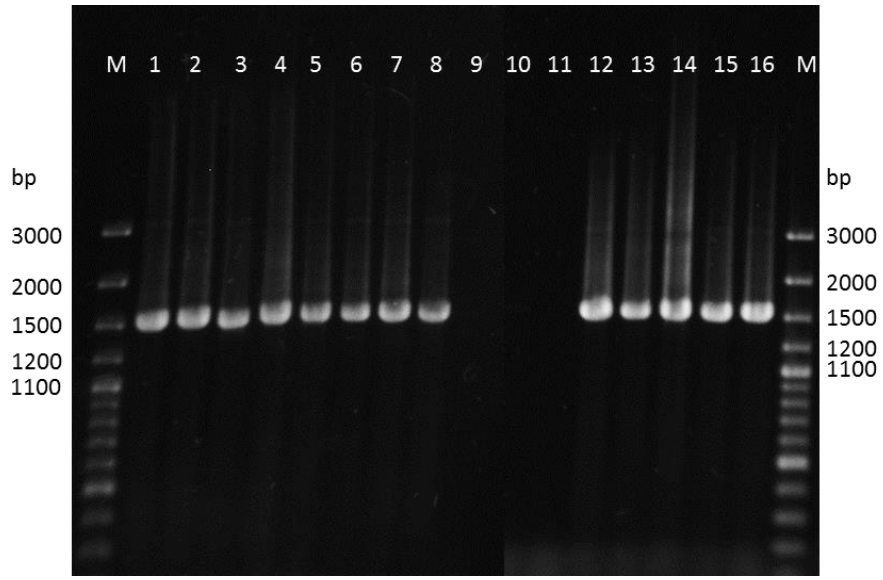
„+“ Ausbildung von Kolonien; „-„ keine Ausbildung von Kolonien auf Nährmedium

5.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Nach Isolierung der DNA aus den verschiedenen Farben wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt, durch die ein konservierter DNA-Bereich (16 S rRNA) amplifiziert wurde. Durch Gelelektrophorese wurde das amplifizierte PCR-Produkt bei 1500 bp nachgewiesen (siehe Abb. 15).

Mit Ausnahme der Proben aus der Farbe 2 (Hersteller II) (Spuren 9-11) wurde bei allen Ansätzen ein PCR-Produkt mit einer erwarteten Größe von ca. 1500 bp erhalten. Die Tatsache, dass bei drei Proben mit universellen Bakterienprimern kein PCR-Produkt nachgewiesen wurde, deutete darauf hin, dass es sich bei diesen Proben vermutlich um Pilze handelte. Dementsprechend wurde mit diesen drei Proben eine PCR mit Primern durchgeführt, die für Pilze spezifisch sind. In allen drei Proben wurde ein PCR-Produkt mit einer erwarteten Größe von ca. 600 bp erhalten (Gelbild nicht gezeigt). Alle PCR-Produkte wurden mit einem Kit gereinigt, aufkonzentriert und zur Sequenzanalyse gegeben. Anschließend wurde das Programm blastn von NCBI (National Center for Biotechnology Information) verwendet, bei dem die erhaltenden Nukleotidsequenzen mit bereits in einer Datenbank hinterlegten Nukleotid-sequenzen verglichen werden. Die auf diesem Wege ermittelten Mikroorgansimen sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Abbildung 15: Agarose-Gelelektrophorese nach PCR mit bakterienspezifischen Primern



M: Marker, Spuren 1-4: Hersteller I (Farbe 1), Spuren 5-8: Hersteller II (Farbe 1), Spuren 9-11: Hersteller II (Farbe 2), Spuren 12-14: Hersteller IV (Farbe 1), Spur 15: Hersteller V (Farbe 1), Spur 16: Hersteller II (Farbe 1)

Bei den nachgewiesenen Bakterien und Pilzen handelt es sich ausschließlich um Arten, die an alkalische Bedingungen angepasst sind (siehe Tab. 13). Bei den Bakterien wurden meist Vertreter der Gattung *Bacillus* nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um stäbchenförmige, grampositive Bakterien, die aerob oder fakultativ aerob leben. Charakteristisch für *Bacillus* ist die Bildung von Endosporen. Hierbei handelt es sich um Dauerstadien, die sich durch eine hohe Resistenz gegenüber Hitze, UV-Strahlung und Chemikalien auszeichnen. Zur Ausbildung der Endosporen kommt es, wenn für *Bacillus* ungünstige Wachstumsbedingungen vorliegen. Die Gattung *Nesterenkonia* gehört zur Familie der Micrococcaceae und umfasst mesophile, moderat haloalkaliphile Bakterien. Es handelt sich hierbei ebenfalls um Gram-positive Organismen, die aerob leben und ubiquitär verbreitet sind (Chandler *et al.*, 2017). Im Gegensatz zu *Bacillus* bildet *Nesterenkonia* keine Sporen. Die Gattung *Alkalibacterium* gehört zur Familie Carnobacteriaceae (Ordnung Lactobacillales) und stellt ebenfalls einen Vertreter Gram-positiver Bakterien dar. Es handelt sich hierbei um aerotolerante, nicht sporenbildende Bakterien, die bei einem pH zwischen 9,0 und 11,5 wachsen (Ishikawa *et al.*, 2009).

Tabelle 13: Identifizierung der Mikroorganismen aus konservierungsmittelfreien Farben

Farbe	Mikroorgansimen
Hersteller I	
Farbe 1	*Bacillus polygoni / clarkii*
Farbe 1	*Bacillus polygoni / clarkii*
Farbe 1	*Nesterenkonia*
Farbe 1	*Bacillus polygoni / clarkii*
Hersteller II	
Farbe 1	*Bacillus pseudofirmus*
Farbe 1	*Bacillus alcalophilus*
Farbe 1	*Bacillus alcalophilus*

Farbe	Mikroorgansimen
Farbe 1	*Bacillus halodurans*
Farbe 1	*Alkalibakterium*
Farbe 2	*Cladosporium halotolerans*
Farbe 2	*Cladosporium halotolerans*
Farbe 2	*Cladosporium halotolerans*
Hersteller IV	
Farbe 1	*Bacillus sp.*
Farbe 1	*Bacillus pseudofirmus*
Farbe 1	*Alkalibakterium*
Hersteller V	
Farbe 1	*Alkalibakterium*

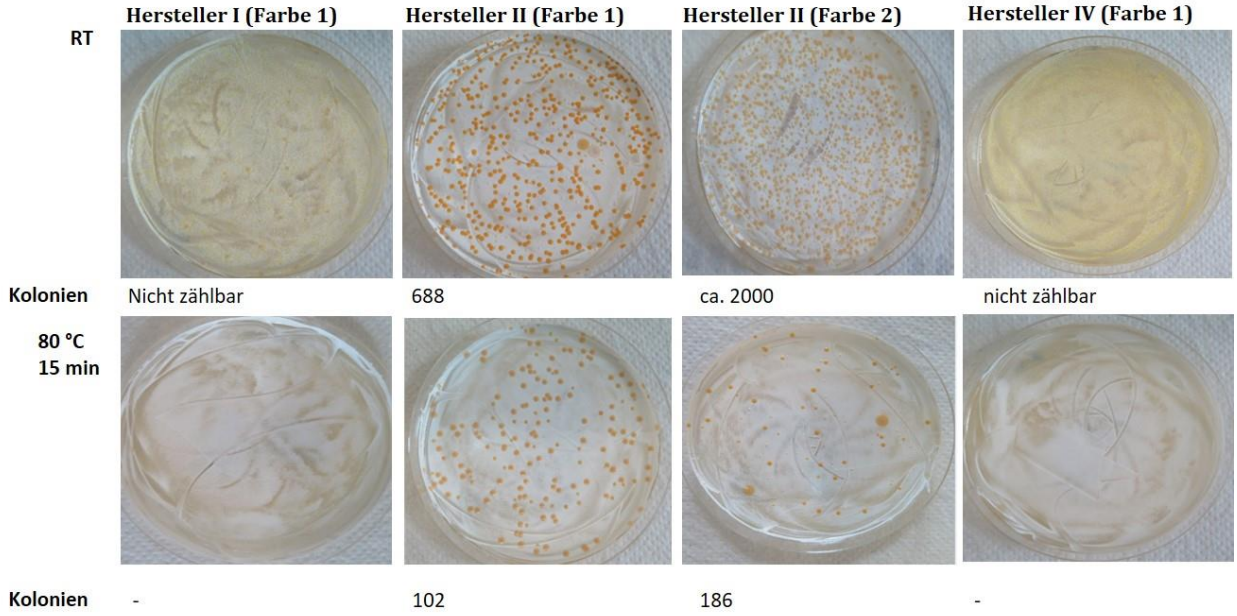
5.2.4 Sporentest

Die Gattung *Bacillus* zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, Sporen als Dauerstadien zu bilden. Sollte Bacillus in den Farben als Dauerstadium vorliegen, ist davon auszugehen, dass dies für die Farbe unproblematisch ist. Handelt es sich dagegen um die vegetative Form von *Bacillus*, kann es durch Stoffwechselaktivitäten zu einer Beeinträchtigung der Farbe kommen. Um eine Einschätzung bezüglich der Aktivität der Bakterien in den verschiedenen Farben zu treffen, wurden die Farben einer Hitzebehandlung bei 80 °C unterzogen. Während die vegetativen Keime unter diesen Bedingungen abgetötet werden, überstehen die Sporen diese Temperatur und keimen anschließend auf Nähragarplatten aus.

Von Hersteller I (Farbe 1), Hersteller II (Farbe 1 und 2) und Hersteller IV (Farbe 1) wurden 30 g Farbe abgewogen und zunächst unverdünnt auf ANA-Nährmedium ausplattiert. Anschließend wurden die Farbproben für 15 Minuten bei 80 °C inkubiert und folgend erneut unverdünnt auf ANA-Medium ausplattiert. Die Platten wurden für 48 Stunden bei 30 °C inkubiert.

Bei allen Proben wurde eine deutliche Reduktion in der Lebendzellzahl nachgewiesen (siehe Abb. 16). Dies bedeutet, dass ein Großteil der Zellen in den Farben in der vegetativen Form vorliegt und durch das Erhitzen der Proben auf 80 °C abgetötet wurde. Bei Bakterien, die als Sporen vorliegen, hatte die Temperaturerhöhung keinen Einfluss und die Sporen konnten anschließend auf dem Nährmedium auskeimen.

Abbildung 16: Keimzahlbestimmung nach Temperatureinwirkung auf Dispersionsfarben



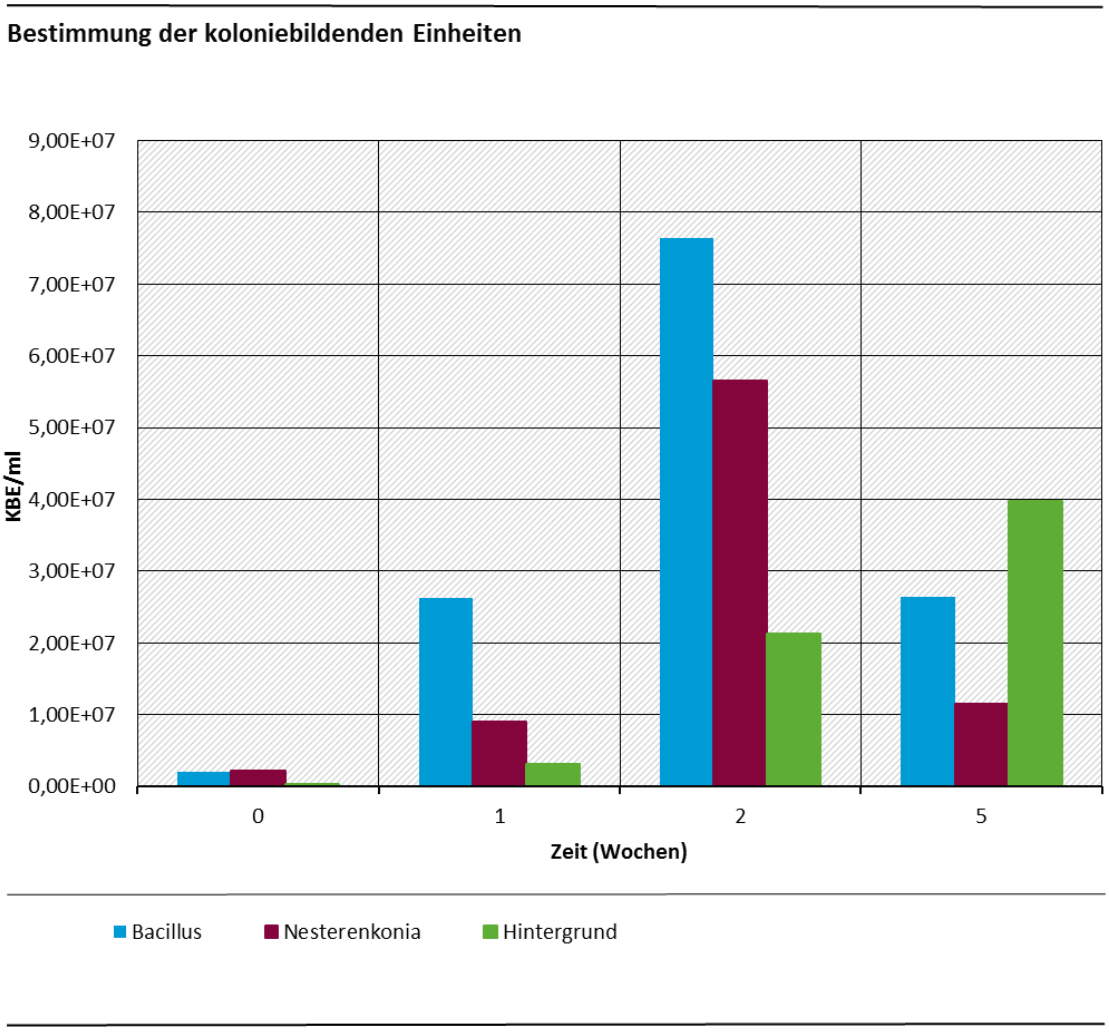
5.2.5 Wachstumsversuche in konservierungsmittelfreien Farben

Es wurde überprüft, ob die isolierten Bakterien in konservierungsmittelfreien Farben wachsen können. Als Produkte wurden die drei Farben des Herstellers 1 ausgewählt, wobei lediglich bei Farbe 1 Mikroorgansimen nach Erhalt der Farbe nachgewiesen wurden.

Die Farben wurden entweder mit *Bacillus polygonii* oder mit *Nesterenkonia* angeimpft, die zuvor aus Farbe 1 isoliert wurden (siehe Tab. 13). Die Farbproben wurden einmalig 1 %-ig mit der Bakteriensuspension beimpft und anschließend bei 30 ± 2 °C gelagert. Die Suspension enthielt die Prüforganismen in einer Konzentration von 3 x 10^8 KBE/ml (kolonienbildende Einheit/Milliliter), was zu einem Keimgehalt von 3 x 10^6 KBE/ml in der beimpften Farbe führte. Die Lebendzellzahl wurde direkt nach der Beimpfung (Wiederfindung), nach einer und zwei Wochen sowie nach fünf Wochen ermittelt (siehe Abb. 17-19).

Da die für diesen Versuch eingesetzten Bakterien zuvor aus der Farbe 1 isoliert wurden, wurde die Farbe als Kontrolle über den Versuchszeitraum von fünf Wochen mitgeführt und ausplattiert (Hintergrund ohne beimpfen, siehe Abb. 17). Zu Beginn des Versuchs wurde eine Zellzahl von 2,92x10^5 KBE/ml in der Farbe ermittelt. Durch die Inkubation der Farbe (ohne zusätzliche Beimpfung) bei 30 °C nahm die Zellzahl zu und erreichte bei Versuchsende eine Zellzahl von 3,98x10^7 KBE/ml. Bei den anderen Proben, die zuvor mit *Nesterenkonia* und *Bacillus* angeimpft wurden, wurde ebenfalls ein Wachstum der Mikroorganismen nachgewiesen. Bei *Bacillus* wurde die höchste Zellzahl nach zwei Wochen bestimmt (7,64x10^7 KBE/ml). Nach Abschluss des Tests hatte die Zellzahl abgenommen und lag bei 2,65x10^7 KBE/ml. Verglichen mit *Bacillus* zeigte *Nesterenkonia* ein etwas schwächeres Wachstum. Bei Beendigung des Tests wurde eine Zellzahl von 1,15x10^7 KBE/ml ermittelt.

Abbildung 17: Belastungstest Farbe 1 (Hersteller I) mit Bakterien

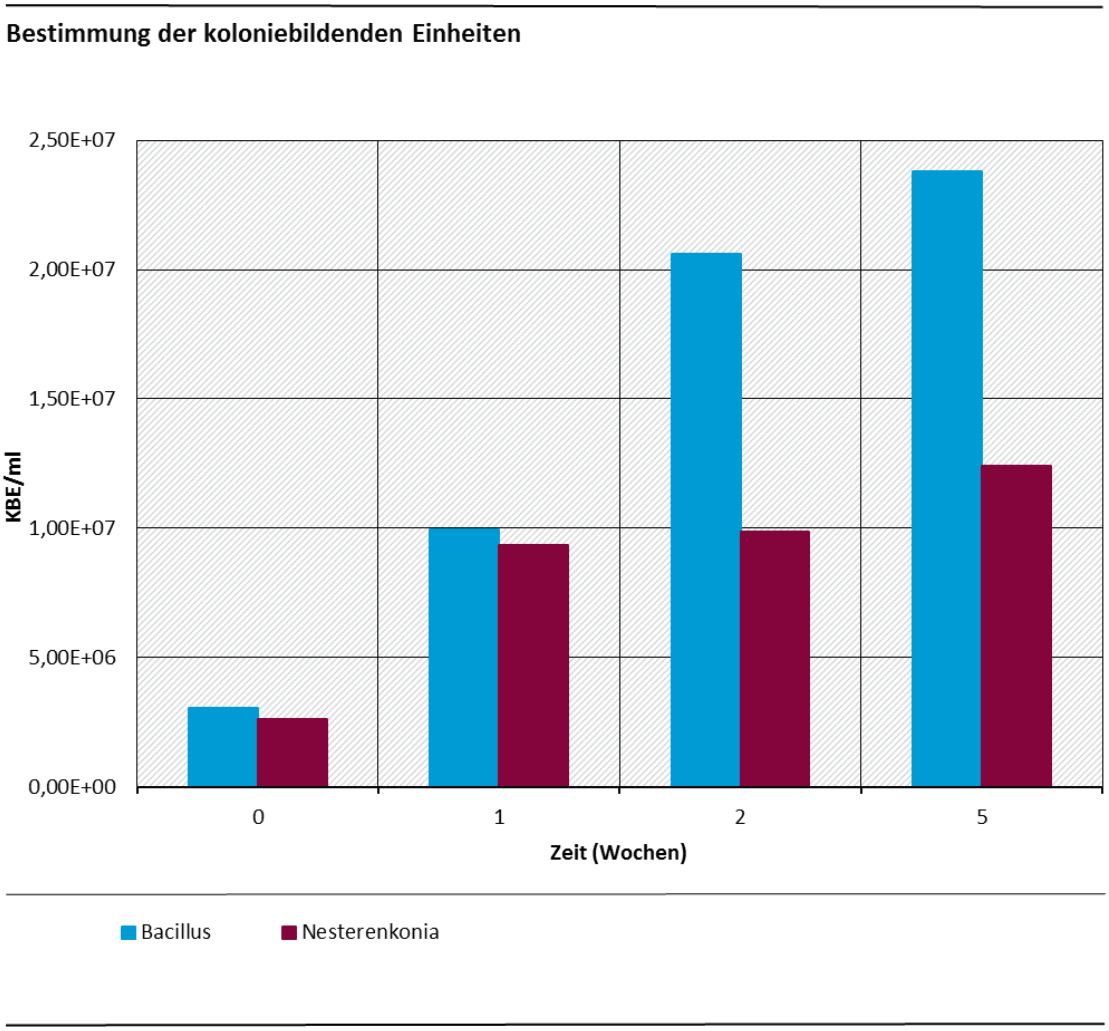


Quelle: BAM

Es wurden zwei weitere Farben hinsichtlich der Besiedelbarkeit durch Bakterien untersucht, bei denen bei der Eingangskontrolle keine Mikroorganismen nachgewiesen worden waren (siehe Abb. 18-19).

Bei dem Belastungstest mit Farbe 2 zeigte sich, dass auch diese Farbe gute Bedingungen für das Wachstum der eingebrachten Bakterien bietet. Insbesondere für *Bacillus* war ein starkes Wachstum zu verzeichnen. Nach einem Versuchszeitraum von fünf Wochen hatte sich die Zellzahl nahezu verachtfacht und lag bei $2{,}38 \times 10^7$ KBE/ml. Bei *Nesterenkonia* war ebenfalls nach einer Woche ein deutliches Wachstum zu verzeichnen. Anschließend nahm die Zellzahl nur gering zu und lag bei Beendigung des Tests bei $1{,}24 \times 10^7$ KBE/ml. Im Gegensatz zu dem Versuch mit Farbe 1 (siehe Abb. 17) war bis zum Ende des Tests eine Zunahme in der Zellzahl zu beobachten.

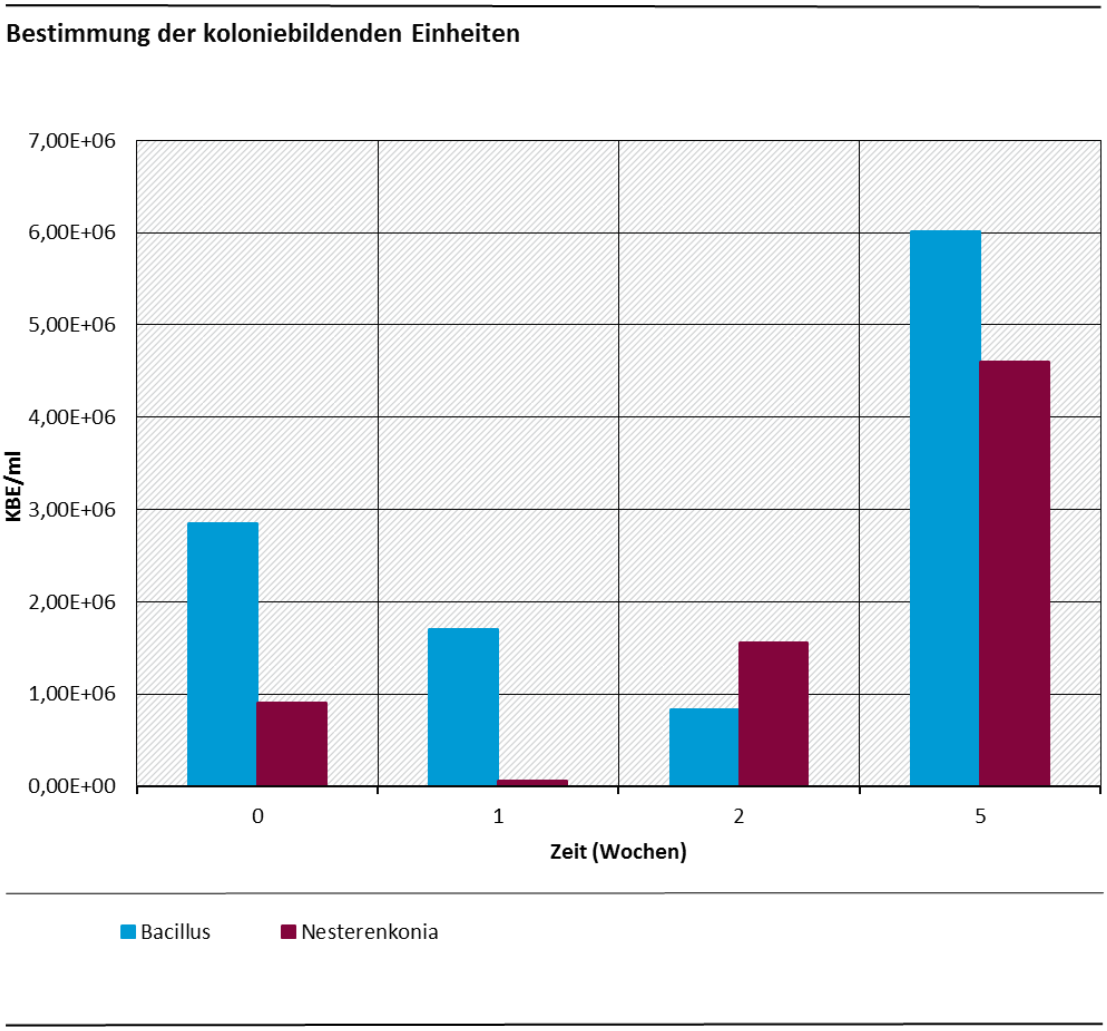
Abbildung 18: Belastungstest Farbe 2 (Hersteller I) mit Bakterien



Quelle: BAM

Bei Farbe 3 (siehe Abb. 19) wurde in beiden Ansätzen zunächst eine Abnahme in der Zellzahl beobachtet, bevor ein Wachstum der Bakterien stattgefunden hat. Dies deutet auf eine Anpassung der Bakterien an die neuen Bedingungen hin. Bei *Nesterenkonia* wurde bereits nach zwei Wochen ein Wachstum verzeichnet. Am Ende des Versuchszeitraums von fünf Wochen war weiterhin eine deutliche Zunahme in der Zellzahl (4,60x10^6 KBE/ml) zu beobachten. Bei *Bacillus* hingegen wurde in den ersten zwei Wochen eine Abnahme in der Zellzahl nachgewiesen. Anschließend kam es zu einem Wachstum von *Bacillus* und bei Versuchsende wurde eine Zellzahl von 6,02x10^6 KBE/ml bestimmt.

Abbildung 19: Belastungstest Farbe 3 (Hersteller I) mit Bakterien



Quelle: BAM

Bei den Belastungstests mit konservierungsmittelfreien Farben bleibt zu berücksichtigen, dass es sich um eine einmalige Durchführung handelt. Hieraus sollten sich lediglich Hinweise ergeben, ob diese Farben künstlich eingebrachten Keimen ein Wachstum ermöglichen.

6 Diskussion und Schlussfolgerung

Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurde überprüft, ob der überarbeitete Biotest zur Bestimmung der Wirksamkeit von Bioziden in weißer Wandfarbe auch auf Lacktypen anwendbar ist. Da sich die Lacke hinsichtlich ihrer Anwendung und Rezepturen sehr stark voneinander unterscheiden, wurden Produktgruppen gebildet, die eine Aussage bezüglich der Besiedelbarkeit von Lacken erlauben sollten.

Aufgrund der Neueinstufung von MIT und des Beschlusses des Umweltbundesamtes, keine Konservierungsmittel für matte, weiße Wandfarben mehr zuzulassen, gewinnen die konservierungsmittelfreien Farben immer mehr an Bedeutung. Im Rahmen des Vorhabens wurden stichprobenartig verschiedene Wandfarben hinsichtlich des Vorkommens von Mikroorganismen untersucht.

6.1 Anfälligkeit von Lacken gegenüber Mikroorganismen

In Zusammenarbeit mit der Industrie wurde eine Einteilung von Lacken in Produkttypen vorgenommen. Hierbei waren Typ a: Weiß- und Buntlack, Typ b: Grundierungen/Vorlacke und Typ c Lasuren.

Für das Forschungsvorhaben wurden ein Weißlack, ein Vorlack und eine Lasur von der Farbindustrie angesetzt und für die Versuche im Forschungsvorhaben zur Verfügung gestellt. Um Aussagen hinsichtlich ihrer Anfälligkeit gegenüber Mikroorganismen zu treffen, wurden ausschließlich Produkte verwendet, die in ihrer Formulierung frei von Lösemitteln waren und denen seitens des Lackherstellers keine Konservierungsmittel zugesetzt worden waren. Da die einzelnen Rohstoffe, wie zum Beispiel das Bindemittel, schon konserviert vorliegen, erfolgt hierüber immer ein geringer Eintrag an Konservierungsmitteln in das Produkt. Im Vorhaben wurde der Gehalt an MIT und BIT mittels HPLC bestimmt, um sicherzustellen, dass diese Konzentration zu gering ist, um die Lacke bereits vor Mikroorganismen zu schützen. Bei den getesteten Lacken wurden kein BIT und geringe Mengen an MIT (maximal 16 ppm) nachgewiesen. Die Durchführung des mikrobiologischen Belastungstests zeigte, dass es einen deutlichen Unterschied in der Anfälligkeit der drei Lacktypen gegenüber Bakterien gibt. Von den Lacken bei denen nur BIT über die Rohstoffe eingetragen wurde, zeigte der eingesetzte Weißlack nur ein geringes bakterielles Wachstum verglichen mit Lasur und Vorlack. In allen Versuchen wurde eine klare Präferenz der Bakterien für den Vorlack bestimmt. Bei den Hefen wurde über den gesamten Versuchszeitraum die Ausbildung von Kolonien, jedoch kein Wachstum, nachgewiesen.

Ein deutlicher Unterschied in der Besiedelbarkeit war bei den Proben zu verzeichnen, bei denen MIT über die Rohstoffe in das Produkt gelangt war. Die Bestimmung des MIT-Gehalts beim Vorlack und der Lasur hat bei beiden Versuchsansätzen ähnlich niedrige Werte ergeben (Vorlack: 13 ppm und 10 ppm; Lasur: 16 ppm und 13 ppm). Da bekannt ist, dass eine Wirksamkeit von MIT in diesem Konzentrationsbereich nicht gegeben ist, hätte es zu keiner Beeinträchtigung im Wachstum der Bakterien kommen sollen. Über den gesamten Versuchszeitraum von sechs Wochen wurden jedoch weder bei der Lasur noch beim Vorlack ein bakterielles Wachstum oder die Ausbildung von Kolonien verzeichnet. Die Ursache dafür ist nicht bekannt, es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass Abbauprodukte der Konservierungsmittel entstehen, die eine Wirksamkeit gegenüber Mikroorganismen haben. Zudem kann der geringe Gehalt an MIT weiterhin wirksam sein, jedoch zu keiner gesicherten Konservierung führen. Auch beim Weißlack war ein Einfluss der MIT-Konzentration auf das bakterielle Wachstum gegeben. Beim ersten Versuchsansatz (MIT: 8 ppm) wurde über die gesamte Versuchsdauer die Ausbildung von Kolonien, jedoch kein Wachstum, beobachtet.

Im zweiten Versuchsdurchgang mit erneuten Ansätzen der Lacktypen durch die Industrie wurde, verglichen mit den ersten Lackansätzen, nur ca. ein Zehntel des MITs (MIT: 0,7 ppm) ermittelt.

In diesen neuen Ansätzen der Lacke wurde ein schwaches, bakterielles Wachstum nachgewiesen. Im Gegensatz zu den Bakterien kam es bei den Versuchen mit Hefen in allen Ansätzen zur Ausbildung von Kolonien. Es ist bekannt, dass es sich bei MIT um ein starkes Bakterizid handelt, das nur bedingt gegen Hefen wirkt. Um diese Wirkungslücke zu schließen, wird MIT mit anderen Topfkonservierern, meistens BIT, kombiniert.

Diese unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber MIT spiegelt sich in den Versuchsergebnissen wider. Während die Bakterien in den Lacken mit MIT nicht mehr wachsen bzw. überleben, kommt es bei den Hefen weiterhin zur Ausbildung von Kolonien.

Für die künstliche Alterung wurden die Produkte über einen Zeitraum von vier Wochen bei 40°C gelagert und anschließend hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Mikroorganismen untersucht. Die Auswirkung der Alterung zeigte sich besonders stark bei der Besiedelbarkeit des Vorlacks durch Bakterien. Während bei den ungealterten Proben ein Wachstum nach drei Wochen einsetzte, erfolgte es bei den gealterten Proben bereits nach einer Woche. Vergleicht man den gesamten Versuchszeitraum wurde im Vorlack bei beiden Versuchen eine ähnliche Zellzahl erreicht, jedoch war die Anfälligkeit bei den gealterten Proben früher gegeben.

Anhand der Versuche wird deutlich, dass

- Bakterien eine klare Präferenz für den Vorlack aufweisen, welche durch die künstliche Alterung verstärkt wird;
- es bezogen auf die eingesetzten Mikroorgansimen einen deutlichen Unterschied in der Besiedelbarkeit der Lacke gibt. Während bei allen Lacktypen ohne MIT ein bakterielles Wachstum auftrat, wurden bei den Versuchen mit den Hefen lediglich überlebende Keime nachgewiesen. Zwar kam es auch hier zu einer Zunahme in der Zellzahl, jedoch lag diese immer unter dem durch Beimpfung eingebrachten Keimgehalt.
- ausschließlich bei Bakterien klare Unterschiede zwischen den Lacktypen in Abhängigkeit von der Konservierung des Bindemittels (BIT und MIT) gegeben sind.

Der Gebrauchstauglichkeitstest sollte angewendet werden, um neue Konservierungsmittel in den Anhang 1 der Vergabegrundlage aufzunehmen. Dafür wurden von der Industrie Richtrezepturen entwickelt, welche Produkte aus der Gruppe der Weiß- und Buntlacke, der Lasuren und der Vorlacke abbilden. Bei den Untersuchungen wurde ein bakterielles Wachstum ausschließlich im Vorlack nachgewiesen. Ein gleiches Ergebnis wurde auch nach der künstlichen Alterung erhalten. Nach Rücksprache mit der Industrie wurde darauf verwiesen, dass es unter Verwendung von adaptierten Keimen aus der Produktion durchaus zu einem Wachstum in den anderen Produkttypen kommen könne. Zudem wurde auf die Problematik verwiesen, dass es bei den Produzenten häufig produktions- und ortsspezifische Keime gäbe. Dies bedeutet, dass in den verschiedenen Produktionsanlagen unterschiedliche Probleme hinsichtlich einer möglichen mikrobiellen Kontamination vorliegen könnten. Um dennoch die Bedingungen des Blauen Engels zu erfüllen, müssen entsprechende Maßnahmen in der Betriebshygiene getroffen werden. Bei den Hefen hingegen wurde in allen drei Richtrezepturen die Ausbildung von Kolonien beobachtet. Bei den Versuchen mit Schimmelpilzsporen kam es beim Vorlack und der Lasur zu einer Veränderung in der Viskosität des Produkts. Ein Ziel wird es nun sein, zu definieren, wie der biologische Gebrauchstauglichkeitstest sinnvoll eingesetzt wird, um eine Neuaufnahme von Konservierungsmitteln in den Anhang 1 zu ermöglichen.

6.2 Konservierungsmittelfreie matte, weiße Wandfarben für den Innenraum

Durch den hohen Wassergehalt und die Verwendung natürlicher Rohstoffe bieten Dispersionsfarben die Voraussetzungen für das Wachstum von Mikroorganismen, infolge dessen es zu unerwünschten Produktänderungen kommen kann. Eine Möglichkeit die Produkte vor mikrobiellem Befall zu schützen, ist die Verwendung von Topfkonservierern, deren Gehalt bei Farben mit dem Blauen Engel begrenzt und durch die Vergabegrundlage RAL-UZ 102 streng geregelt ist. Aufgrund erhöht allergischer Unverträglichkeiten und Sensibilisierungsraten in der Bevölkerung kam es zu einer Neueinstufung von MIT mit einem spezifischen Konzentrationsgrenzwert von 15 ppm. Im Dezember 2018 beschloss das Umweltbundesamt, dass matte, weiße Wandfarben für den Innenraum, die mit dem Umweltzeichen „Blauer Engel“ ausgezeichnet sind, künftig keine Konservierungsmittel enthalten dürfen. Auf dem Markt wurden deshalb vermehrt Innenraumwandfarben dieses Typs mit einem hohen pH-Wert angeboten. Der hohe pH-Wert soll den mikrobiell bedingten Verderb der Farbe verhindern.

Lebensräume, die dauerhaft alkalische Bedingungen mit pH-Werten über pH 9 aufweisen, werden primär von alkaliphilen und alkalitoleranten Mikroorganismen besiedelt.

In dem Vorhaben wurden handelsübliche, weiße Dispersionsfarben aus dem Baumarkt bezogen und hinsichtlich ihres Gehalts an Mikroorganismen untersucht. Bei der Hälfte der Farben wurden Mikroorgansimen nachgewiesen, die durch eine molekularbiologische Charakterisierung eindeutig bestimmt wurden. Bei allen identifizierten Mikroorgansimen handelt es sich um Bakterien und Pilze, die an einen erhöhten pH-Wert angepasst sind. Im Falle der Bakterien wurden meist Vertreter aus der sporenbildenden Gattung *Bacillus* identifiziert. Gelangen die Sporen über die Rohstoffe in die Farbe und keimen nicht aus, ist davon auszugehen, dass es aufgrund fehlender Stoffwechselaktivität zu keiner Beeinträchtigung der Farbe kommt. Wenn sich die Bedingungen jedoch ändern, wie zum Beispiel durch den Abfall des pH-Wertes, können die Sporen auskeimen und sich vermehren, wodurch es zu einer Beeinträchtigung der Farbe kommen kann. Da hier ausschließlich *Bacillus*-Arten identifiziert wurden, die an hohe pH-Werte adaptiert sind, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese in der Farbe auch in ihrer vegetativen Form vorliegen.

Anhand der Wachstumsversuche zeigte sich, dass allein durch die Inkubation der Farbe 1, in welcher Bakterien nachgewiesen worden waren, bei 30 °C die Zellzahl deutlich zunahm. Untersuchungen mit zwei weiteren Farben desselben Herstellers (Farbe 2 und 3) zeigten zudem, dass die aus der Farbe 1 isolierten Bakterien *Bacillus polygoni* und *Nesterenkonia* auch in diesen Farben wuchsen. Bei Farbe 1 zeigten die Bakterien zu Beginn das stärkste Wachstum. Vergleicht man die Zellzahlen bei Beendigung der Versuche mit den Farben 1 und 2 miteinander, wird deutlich, dass diese nach fünf Wochen im ähnlichen Bereich lagen. Bei Farbe 1, aus der die Bakterien isoliert wurden, wurden besonders bei *Bacillus* deutlich höhere Zellzahlen erreicht als in Farbe 2. Zum Ende des Versuchs nahm die Zellzahl jedoch ab und erreichte nahezu gleiche Werte wie bei Farbe 2, bei denen das Wachstum langsamer erfolgte. Im Unterschied dazu kam es in der Farbe 3 zunächst zu einer Abnahme in der Zellzahl von *Bacillus polygoni* und *Nesterenkonia*. Dies lässt vermuten, dass sich die Bakterien zunächst an die neuen Bedingungen adaptieren mussten. Möglicherweise war bei dieser Farbe eine andere Nahrungsquelle gegeben als bei den anderen beiden Farben, so dass die Bakterien ihren Stoffwechsel dementsprechend zunächst anpassen mussten.

Nach dem derzeitigen Stand scheint die Erhöhung des pH-Wertes eine geeignete Methode zu sein, die Farben vor Wertverlust durch mikrobiellen Verderb zu schützen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass sich Mikroorganismen, die die Qualität der Farbe herabsetzen, über die Zeit an den erhöhten pH-Wert adaptieren und neue Strategien zum Produktschutz erforderlich werden.

7 Quellenverzeichnis

Vergabegrundlage RAL-UZ 102: Emissionsarme Innenwandfarben 2019

Vergabegrundlage RAL-UZ 12a. Emissions- und schadstoffarme Lacke 2019

Chander, A.M. *et al*. (2017). Genome Insight and Comparative Pathogenomic Analysis of *Nesterenkonia jeotgali* Strain CD08_7 Isolated from Duodenal Mucosa of Celiac Disease Patient. *Front. Microbiol*. 8:129.

Ishikawa, M. et al. (2009). *Alkalibacterium thalassium* sp. nov., *Alkalibacterium pelagium* sp. nov., *Alkalibacterium putridalgicola* sp. nov. and *Alkalibacterium kapii* sp. nov., slightly halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacteria isolated from marine organisms and salted foods collected in Japan and Thailand

https://www.malerblatt.de/allgemein/konservierungsmittelfreie-farben/ 04.09.2018

8 Anhang

8.1 Bestimmung der Wirkungsgrenze und des maximal zulässigen Gehaltes im Lack (Biotest)

Zur Ermittlung der minimalen Menge an Konservierungsmittelzubereitung ist vom Antragsteller ein Gebrauchstauglichkeitstest in mindestens 3 Gehaltsabstufungen gemäß der in den Anlagen 4a-4c beigefügten Vorschriften durchzuführen. Die Ergebnisse sind dem UBA, Fachgebiet III 1.4 mitzuteilen und werden von der BAM und UBA bewertet.

8.1.1 Anlage 4a zur Vergabegrundlage DE-UZ 12a "Schadstoffarme Lacke"

Zur Ermittlung der minimalen Menge an Biozidprodukt2,3 ist vom Antragsteller ein Gebrauchstauglichkeitstest nach folgendem Verfahren durchzuführen:

Eine Labormethode zur Ermittlung der erforderlichen Konzentration eines Biozidprodukts gegen Bakterien in schadstoffarmen Lackes gemäß DE-UZ 12a

1. Geltungsbereich

Die Methode kann angewendet werden, um die Wirksamkeit von Biozidprodukten bezüglich der Verhinderung des Wachstums und des Überlebens von Schadorganismen in wässrigen Lacken zu prüfen.

2. Gesundheitshinweis

Nationale Gesundheitsvorschriften müssen bei der Versuchsdurchführung beachtet werden. Gleiches gilt für die EG Richtlinie 200/54/EG 'Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe bei der Arbeit'. Bei der Handhabung von Lacken und Bioziden sind die Angaben in den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern und Produktinformationen für den sicheren Umgang mit diesen Produkten zu beachten.

3. Geräte und Nährmedien

- geeignete sterile Schraubgefäße (100 ml);
- sterile Messpipetten, Nennvolumen 1,0 ml und 5,0 ml;
- sterile Petrischalen aus Glas oder Kunststoff, Durchmesser 90 oder 100 mm;
- sterile Verdünnungslösung; z.B. destilliertes Wasser (für Agar) gemäß ISO 3696;
- physiologische Kochsalzlösung (zum Abwaschen und Verdünnen der Bakterienkulturen);
- Waage;
- Pipette und 0,1 cm^3 sterile Spitzen;
- Bunsenbrenner;
- Brutschrank, thermostatisierbar (30 +/- 2°C);
- Autoklav;
- sterile Impfösen oder Impfnadeln;
- sterile Spatel;
- sterile Nährmedien für die entsprechenden Mikroorganismen, Zusammensetzung und Herstellung;
- pH-Messgerät;
- Reagenzgläser;
- Bakterien-Stammkulturen;
- Reagenzglasständer;
- Reagenzglasschüttler
- Zählkammer (Tiefe 0,02 mm)
- Mikroskop

4. Prüforganismen

Die folgenden Bakterien sollten für den Keimbelastungstest herangezogen werden:

Bakterien:

Alcaligenes faecalis	BAM 604, DSM 6174, ATCC 35655
Escherichia coli	BAM 605, DSM 787, ATCC 11229
Pseudomonas aeruginosa	BAM 60, DSM 939, ATCC 15442
Pseudomonas putida	BAM 644, DSM 291^T, ATCC 12633
Pseudomonas stutzeri	BAM 607, DSM 5190^T, ATCC17588

Weitere Keime, die ständig wiederkehrend zu Infektionen führen, können zusätzlich für eine separate Impfsuspension herangezogen werden. Bei diesen Organismen, die als Reinkulturen vorliegen müssen, soll eine molekularbiologische Charakterisierung vorgenommen werden, wodurch der verwendete Bakterienstamm eindeutig bestimmt werden kann. Die Organismen sollen bei einer anerkannten Stammsammlung hinterlegt werden.

5. Methode

Zu Beginn der Versuche erfolgt eine Eingangskontrolle der zu testenden Materialien. Hierzu wird die Farbe mit einer sterilen Impföse auf Nähragarplatten ausgestrichen und auf mögliches Wachstum überprüft. Geprüft werden müssen ungealterte Proben als auch künstlich gealterte Proben (s. 5.2). In beiden Fällen muss das Pass/Fail-Kriterium (s. 5.5) erreicht werden.

5.1 Impfsuspensionen-Zubereitung

5.1.1 Die Prüforganismen werden von einer Dauerkultur (z.B. Kryokultur) auf Nähragarplatten ausgestrichen und für 18 - 24 h bei 30 °C ± 2 °C inkubiert *.

5.1.2 Die Bakterien werden von diesen Platten auf frische Nähragarplatten überimpft (2. Subkultur) und für 18 - 24 h bei 30 °C ± 2 °C inkubiert*. Ausschließlich diese Kulturen werden für den Belastungstest eingesetzt.

5.1.3 Es werden getrennte Suspensionen von jedem Bakterienstamm zubereitet. Hierzu wird die bewachsene Oberfläche der Nähragarplatte mit einer sterilen Verdünnungslösung, z.B. physiologische Kochsalzlösung, benetzt und der Bewuchs vorsichtig mit einem sterilen Wattestab abgewaschen.

5.1.4 Die Anzahl der Organismen in jeder Suspension wird mittels einer geeigneten Zählkammer ermittelt (z. B. Thoma-Kammer, Kammertiefe 0,02 mm). Die Zellzahl der einzelnen Bakteriensuspensionen soll

$$\mathbf{1x10^8 – 5x10^8\ KBE/ml}$$

betragen.

Die vorbereitete Impfsuspension muss noch am gleichen Tag verwendet werden und sollte bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt werden.

5.1.5 Zur Herstellung der Mischsuspension werden gleiche Volumina jeder einzelnen Bakteriensuspension gemischt. Die Zellzahl soll dann ebenso

$$\mathbf{1x10^8 – 5x10^8\ KBE/ml}$$

betragen.

5.1.6 Die eingestellte Zellzahl der Mischsuspension wird durch ausplattieren einer geeigneten Verdünnungsstufe der Mischkultur auf CASO-Agar und Bestimmung der koloniebildenden Einheiten kontrolliert.

* Sollten separat auch hauseigene Prüfstämme verwendet werden, so kann die Inkubationszeit für diese Keime nach Bedarf angepasst werden. Die geänderten Parameter für die Prüfung mit hauseigenen Keimen müssen im Prüfbericht vermerkt werden.

5.2 Künstliche Alterung

5.2.1 Das Biozidprodukt wird in geeigneten Konzentrationsreihen dem Dispersionslack hinzugefügt, die Proben kräftig gemischt und für mindestens zwei Tage bei Raumtemperatur gelagert.

5.2.2 Es werden geeignete Anteile (z.B. 50 g oder 100 g) des Dispersionslacks in sterile Schraubgefäße eingewogen und diese fest verschlossen.

5.2.3 Zusätzlich dienen sechs unkonservierte Proben als Kontrollen. Hiervon werden drei Proben mit Bakterien beimpft (Positivkontrolle), die anderen drei Proben bleiben unbeimpft (Negativkontrolle, bzw. Rückstellmuster).

5.2.4 Die Proben werden für 4 Wochen bei 40 °C ± 2 °C oder alternativ für 18 Wochen bei 30 °C ± 2 °C gelagert.

5.2.5 Nach 4-bzw. 18-wöchiger Alterung wird der Keimbelastungstest wie unter 5.3 beschrieben durchgeführt.

5.3 Keimbelastungstest

5.3.1 Jede Probe (mit Ausnahme der Negativkontrolle) wird mit gleichem Volumen der Mischsuspension äquivalent zu 1,0% des Probengewichtes beimpft. Die Probe wird mit einem sterilen Spatel gut vermischt und die Schraubgefäße anschließend so verschlossen, dass ein Sauerstoffzutritt in das Gefäß gewährleistet ist.

5.3.2 Zur Bestimmung der mikrobiellen Anfangsbelastung aller Proben wird eine geeignete Verdünnungsreihe angesetzt und auf Nähragarplatten ausplattiert oder für ein Plattengussverfahren eingesetzt. Anschließend sind die Platten bei 30 °C ± 2°C für max. 3 Tage zu bebrüten*. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten wird mittels eines geeigneten Verfahrens quantitativ ermittelt.

5.3.3 Zur Kontrolle der Vitalität der verwendeten Bakterien wird die Mischsuspension wie unter 5.3.2 beschrieben angesetzt und ausgezählt.

5.3.4 Alle Proben werden für 7 Tage bei 30 °C ± 2°C inkubiert.

5.3.5 Zur Bestimmung der Keimzahl in den Proben wird eine geeignete Verdünnungsreihe angesetzt und auf Nähragarplatten ausplattiert oder für ein Plattengussverfahren eingesetzt. Nach dem Bebrüten der Platten bei 30°C ± 2°C für max. 3 Tage * sind die koloniebildenden Einheiten zu ermitteln.

5.3.6 Die Schritte 5.3.1 bis 5.3.5 werden in wöchentlichen Intervallen wiederholt, bis insgesamt 3 Impfzyklen durchgeführt sind. Nach insgesamt 6 Wochen Inkubation bei 30 °C ± 2 °C ist der Test beendet und es wird eine abschließende Bestimmung der koloniebildenden Einheiten vorgenommen.

5.3.7 Zur Differenzierung der Wirksamkeit verschiedener Biozidkonzentrationen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer können zusätzliche Keimzahlbestimmungen, z.B. nach 1 und 3 Tagen nach Beimpfung, durchgeführt werden.

5.4 Validität der Prüfung

Die Prüfung ist valide, wenn die Wachstumsfähigkeit des Inokulums auf CASO-Agar in Petrischalen nachgewiesen werden konnte (s. Punkt 5.1.6).

5.5 Pass./. Fail Kriterien

5.5.1 Die kurative Wirkung des Biozids in der Farbe durch die eingesetzte Biozidkonzentration ist gegeben, wenn nach Ablauf des Tests die Keimzahl < 1000 KBE/ml ist.

5.5.2 Die Wirksamkeit eines zu prüfenden Biozids kann nicht nachgewiesen werden, wenn in der biozidfreien Farbe nach Beimpfung und Ablauf des Tests die Keimzahl < 1000 KBE/ml ist.

5.6 Nachweis signifikanter Unterschiede

Es sind geeignete statistische Methoden anzuwenden, die signifikante Unterschiede zwischen den Keimzahlen in den mit Topfkonservierern behandelten Proben und den unbehandelten Proben ggf. nachweisen können.

Nährmedium CASO-Agar

Das Medium setzt sich aus 1,5 % Pepton aus Casein, 1,5 % Pepton aus Soja, 0,5 % Natrium-chlorid und 1,5 % Agar zusammen. Der pH beträgt bei 7,3 ± 0,2.

Zubereitung

40 g Nähragar sind in 1 L destillierten Wasser zu suspendieren, bis zum vollständigen Lösen zu rühren und 15 Minuten bei 121°C zu autoklavieren.

8.1.2 Anlage 4b zur Vergabegrundlage DE-UZ 12a “Schadstoffarme Lacke“

Durchführung eines Biotests mit Hefen

Zur Ermittlung der minimalen Menge an Biozidprodukt* ist vom Antragsteller ein Gebrauchstauglichkeitstest nach folgendem Verfahren durchzuführen:

Eine Labormethode zur Ermittlung der erforderlichen Konzentration eines Biozidprodukts gegen Bakterien in schadstoffarmen Lackes gemäß DE-UZ 12a

1. Geltungsbereich

Die Methode kann angewendet werden, um die Wirksamkeit von Biozidprodukten bezüglich der Verhinderung des Wachstums und des Überlebens von Schadorganismen in wässrigen Lacken zu prüfen.

2. Gesundheitshinweis

Nationale Gesundheitsvorschriften müssen bei der Versuchsdurchführung beachtet werden. Gleiches gilt für die EG Richtlinie 200/54/EG ‘Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe bei der Arbeit’. Bei der Handhabung von Lacken und Bioziden sind die Angaben in den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern und Produktinformationen für den sicheren Umgang mit diesen Produkten zu beachten.

3. Geräte und Nährmedien

- geeignete sterile Schraubgefäße (100 ml);
- sterile Messpipetten, Nennvolumen 1,0 ml und 5,0 ml;
- sterile Petrischalen aus Glas oder Kunststoff, Durchmesser 90 oder 100 mm;
- sterile Verdünnungslösung; z.B. destilliertes Wasser (für Agar) gemäß ISO 3696;

- physiologische Kochsalzlösung (zum Abwaschen und Verdünnen der Hefekulturen);
- Waage;
- Pipette und 0,1 cm^3 sterile Spitzen;
- Bunsenbrenner;
- Brutschrank, thermostatisierbar (30 +/- 2°C);
- Autoklav;
- sterile Impfösen oder Impfnadeln;
- sterile Spatel;
- sterile Nährmedien für die entsprechenden Mikroorganismen, Zusammensetzung und Herstellung;
- pH-Messgerät;
- Reagenzgläser;
- Hefe-Stammkulturen;
- Reagenzglasständer;
- Reagenzglasschüttler
- Zählkammer (Tiefe 0,02 mm)
- Mikroskop

4. Prüforganismen

Die folgenden Bakterien sollten für den Keimbelastungstest herangezogen werden:

Hefen:

Candida boidinii	BAM 649
Candida lipolytica	BAM 641
Candida valida	BAM 643

Weitere Keime, die ständig wiederkehrend zu Infektionen führen, können zusätzlich für eine separate Impfsuspension herangezogen werden. Bei diesen Organismen, die als Reinkulturen vorliegen müssen, soll eine molekularbiologische Charakterisierung vorgenommen werden, wodurch der verwendete Bakterienstamm eindeutig bestimmt werden kann. Die Organismen sollen bei einer anerkannten Stammsammlung hinterlegt werden.

5. Methode

Zu Beginn der Versuche erfolgt eine Eingangskontrolle der zu testenden Materialien. Hierzu wird die Farbe mit einer sterilen Impföse auf Nähragarplatten ausgestrichen und auf mögliches Wachstum überprüft. Geprüft werden müssen ungealterte Proben als auch künstlich gealterte Proben (s. 5.2). In beiden Fällen muss das Pass/Fail-Kriterium (s. 5.5) erreicht werden.

5.1 Impfsuspensionen-Zubereitung

5.1.1 Die Prüforganismen werden von einer Dauerkultur (z.B. Kryokultur) auf Nähragar-platten ausgestrichen und für 18 - 24 h bei 30 °C ± 2 °C inkubiert *.

5.1.2 Die Hefen werden von diesen Platten auf frische Nähragarplatten überimpft (2. Subkultur) und für 18 - 24 h bei 30 °C ± 2 °C inkubiert*. Ausschließlich diese Kulturen werden für den Belastungstest eingesetzt.

5.1.3 Es werden getrennte Suspensionen von jedem Hefestamm zubereitet. Hierzu wird die bewachsene Oberfläche der Nähragarplatte mit einer sterilen Verdünnungslösung, z.B. physiologische Kochsalzlösung, benetzt und der Bewuchs vorsichtig mit einem sterilen Wattestab abgewaschen.

5.1.4 Die Anzahl der Organismen in jeder Suspension wird mittels einer geeigneten Zählkammer ermittelt (z. B. Thoma-Kammer, Kammertiefe 0,1 mm). Die Zellzahl der einzelnen Bakteriensuspensionen soll

$8x10^7$ – $2x10^8$ KBE/ml

betragen.
Die vorbereitete Impfsuspension muss noch am gleichen Tag verwendet werden und sollte bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt werden.

5.1.5 Zur Herstellung der Mischsuspension werden gleiche Volumina jeder einzelnen Hefesuspension gemischt. Die Zellzahl soll dann ebenso

810^7 – $2x10^8$ KBE/ml

betragen.

5.1.6 Die eingestellte Zellzahl der Mischsuspension wird durch ausplattieren einer geeigneten Verdünnungsstufe der Mischkultur auf CASO-Agar und Bestimmung der koloniebildenden Einheiten kontrolliert.

* Sollten separat auch hauseigene Prüfstämme verwendet werden, so kann die Inkubationszeit für diese Keime nach Bedarf angepasst werden. Die geänderten Parameter für die Prüfung mit hauseigenen Keimen müssen im Prüfbericht vermerkt werden.

5.2 Künstliche Alterung

5.2.1 Das Biozidprodukt wird in geeigneten Konzentrationsreihen dem Dispersionslack hinzugefügt, die Proben kräftig gemischt und für mindestens zwei Tage bei Raumtemperatur gelagert.

5.2.2 Es werden geeignete Anteile (z.B. 50 g oder 100 g) des Dispersionslacks in sterile Schraubgefäße eingewogen und diese fest verschlossen.

5.2.3 Zusätzlich dienen sechs unkonservierte Proben als Kontrollen. Hiervon werden drei Proben mit Hefen beimpft (Positivkontrolle), die anderen drei Proben bleiben unbeimpft (Negativkontrolle, bzw. Rückstellmuster).

5.2.4 Die Proben werden für 4 Wochen bei 40 °C ± 2 °C oder alternativ für 18 Wochen bei 30 °C ± 2 °C gelagert.

5.2.5 Nach 4-bzw. 18-wöchiger Alterung wird der Keimbelastungstest wie unter 5.3 beschrieben durchgeführt.

5.3 Keimbelastungstest

5.3.1 Jede Probe (mit Ausnahme der Negativkontrolle) wird mit gleichem Volumen der Mischsuspension äquivalent zu 1,0% des Probengewichtes beimpft. Die Probe wird mit einem sterilen Spatel gut vermischt und die Schraubgefäße anschließend so verschlossen, dass ein Sauerstoffzutritt in das Gefäß gewährleistet ist.

5.3.2 Zur Bestimmung der mikrobiellen Anfangsbelastung aller Proben wird eine geeignete Verdünnungsreihe angesetzt und auf Nähragarplatten ausplattiert oder für ein Plattengussverfahren eingesetzt. Anschließend sind die Platten bei 30 °C ± 2°C für max. 3 Tage zu bebrüten*. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten wird mittels eines geeigneten Verfahrens quantitativ ermittelt.

5.3.3 Zur Kontrolle der Vitalität der verwendeten Hefen wird die Mischsuspension wie unter 5.3.2 beschrieben angesetzt und ausgezählt.

5.3.4 Alle Proben werden für 7 Tage bei 30 °C ± 2°C inkubiert.

5.3.5 Zur Bestimmung der Keimzahl in den Proben wird eine geeignete Verdünnungsreihe angesetzt und auf Nähragarplatten ausplattiert oder für ein Plattengussverfahren eingesetzt. Nach dem Bebrüten der Platten bei 30°C ± 2°C für max. 3 Tage * sind die koloniebildenden Einheiten zu ermitteln.

5.3.6 Die Schritte 5.3.1 bis 5.3.5 werden in wöchentlichen Intervallen wiederholt, bis insgesamt 3 Impfzyklen durchgeführt sind. Nach insgesamt 6 Wochen Inkubation bei 30 °C ± 2 °C ist der Test beendet und es wird eine abschließende Bestimmung der koloniebildenden Einheiten vorgenommen.

5.3.7 Zur Differenzierung der Wirksamkeit verschiedener Biozidkonzentrationen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer können zusätzliche Keimzahlbestimmungen, z.B. nach 1 und 3 Tagen nach Beimpfung, durchgeführt werden.

5.4 Validität der Prüfung

Die Prüfung ist valide, wenn die Wachstumsfähigkeit des Inokulums auf CASO-Agar in Petrischalen nachgewiesen werden konnte (s. Punkt 5.1.6).

5.5 Pass./. Fail Kriterien

5.5.1 Die kurative Wirkung des Biozids in der Farbe durch die eingesetzte Biozidkonzentration ist gegeben, wenn nach Ablauf des Tests die Keimzahl < 1000 KBE/ml ist.

5.5.2 Die Wirksamkeit eines zu prüfenden Biozids kann nicht nachgewiesen werden, wenn in der biozidfreien Farbe nach Beimpfung und Ablauf des Tests die Keimzahl < 1000 KBE/ml ist.

5.6 Nachweis signifikanter Unterschiede

Es sind geeignete statistische Methoden anzuwenden, die signifikante Unterschiede zwischen den Keimzahlen in den mit Topfkonservierern behandelten Proben und den unbehandelten Proben ggf. nachweisen können.

Nährmedium PD-Agar

Das Medium setzt sich aus 0,4 % Kartoffel-Infus, 2 % Glucose und 1,5 % Agar zusammen. Der pH liegt bei 5,6 ± 0,2. Um ein unerwünschtes Wachstum von Bakterien zu unterdrücken, wurde dem PDA-Nährmedium Chloramphenicol in einer finalen Konzentration von 30 µg/ml zugegeben.

Zubereitung

40 g Nähragar sind in 1 L destillierten Wasser zu suspendieren, bis zum vollständigen Lösen zu rühren und 15 Minuten bei 121°C zu autoklavieren.

8.1.3 Anlage 4c zur Vergabegrundlage DE-UZ 102 “Schadstoffarme Lacke“

Durchführung eines Biotests mit Schimmelpilzsporen

Zur Ermittlung der minimalen Menge an Biozidprodukt* ist vom Antragsteller ein Gebrauchstauglichkeitstest nach folgendem Verfahren durchzuführen:

Eine Labormethode zur Ermittlung der erforderlichen Konzentration eines Biozidprodukts gegen Bakterien in schadstoffarmen Lackes gemäß DE-UZ 12a

1. Geltungsbereich

Die Methode kann angewendet werden, um die Wirksamkeit von Biozidprodukten bezüglich der Verhinderung des Wachstums und des Überlebens von Schadorganismen in wässrigen Lacken zu prüfen.

2. Gesundheitshinweis

Nationale Gesundheitsvorschriften müssen bei der Versuchsdurchführung beachtet werden. Gleiches gilt für die EG Richtlinie 200/54/EG 'Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe bei der Arbeit'. Bei der Handhabung von Lacken und Bioziden sind die Angaben in den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern und Produktinformationen für den sicheren Umgang mit diesen Produkten zu beachten.

---

*Produkttyp 6 gemäß der Biozidprodukteverordnung (EU Nr. 528/2012)

3. Geräte und Nährmedien

- geeignete sterile Schraubgefäße (100ml);
- sterile Pipetten, Nennvolumen 1,0 ml und 5,0 ml;
- sterile Pipettenspitzen;
- sterile Zentrifugenbecher (35 ml);
- sterile Filternutschen Größe 1;
- sterile Petrischalen aus Glas oder Kunststoff, Durchmesser 90 oder 100 mm;
- sterile Verdünnungslösung; z.B. destilliertes Wasser oder physiologische Kochsalzlösung;
- sterile Benetzungsmittel-Lösung;
- Waage;
- Brutschrank, thermostatisierbar (30 ± 2 °C);
- Autoklav;
- Trockenschrank;
- sterile Wattestäbe;
- sterile Impfösen oder Impfnadeln;
- Reagenzglasständer;
- Reagenzgläser;
- Reagenzglasschüttler;
- Zentrifuge;
- Sicherheitswerkbank Klasse 2;
- sterile Nährmedien für die entsprechenden Pilzkulturen, Zusammensetzung und Herstellung;
- Pilz-Stammkulturen;
- Zählkammer (0,1 mm Tiefe);
- Mikroskop;

4. Prüforganismen

Die folgenden Schimmelpilze sollten für den Keimbelastungstest herangezogen werden:

Schimmelpilze:

Aspergillus oryzae	BAM 613, NBRC 100959
Paecilomyces variotii	BAM 19, DSM 1961, ATCC 18502
Penicillium ochrochloron	BAM 25, DSM 1945

Weitere Keime, die ständig wiederkehrend zu Infektionen führen, können zusätzlich für eine separate Sporensuspension herangezogen werden. Bei diesen Organismen, die als Reinkulturen vorliegen müssen, soll eine molekularbiologische Charakterisierung vorgenommen werden, wodurch der verwendete Stamm eindeutig bestimmt werden kann. Die Organismen sollen bei einer anerkannten Stammsammlung hinterlegt werden.

5. Methode

Zu Beginn der Versuche erfolgt eine Eingangskontrolle der zu testenden Materialien. Hierzu wird die Farbe mit einer sterilen Impföse auf Nähragarplatten ausgestrichen und auf mögliches Wachstum überprüft. Geprüft werden müssen ungealterte Proben als auch künstlich gealterte Proben (s. 5.2). In beiden Fällen muss das Pass/Fail-Kriterium (s. 5.5) erreicht werden.

5.1 Sporensuspension-Zubereitung

5.1.1 Die Prüfpilze werden ca. 14 Tage vor Ansatz der Prüfung auf Nähragarplatten überimpft. Benötigte Geräte und Flüssigkeiten werden bei 121°C für 20 Minuten im Autoklaven sterilisiert.

5.1.2 Unter sterilen Bedingungen werden die Reagenzgläser mit 10 ml Benetzungsmittel-Lösung gefüllt und ein Wattestab mit dieser Lösung befeuchtet. Das Sporenmaterial wird anschließend mit dem Wattestab von der Nähragarplatte abgestrichen und durch Reiben an der Reagenzglaswand in die befüllten Reagenzgläser überführt. Der gesamte Ansatz wird mittels Reagenzglasschüttler durchmischt.

5.1.3 Der Ansatz wird erneut geschüttelt und anschließend durch eine Filternutsche in einen Zentrifugenbecher gegossen. Bei schwach sporulierenden Pilzkulturen sind weitere Sporen aus zusätzlichen Nähragarplatten zu gewinnen. Für jeden Pilz muss eine separate Filternutsche sowie ein separater Zentrifugenbecher verwendet werden.

5.1.4 Die Suspensionen werden für 10 Minuten bei 3 000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend vorsichtig abgenommen. Der Bodensatz wird mit 10 ml sterilem, demineralisiertem Wasser gewaschen und erneut für 10 Minuten bei 3 000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert.

5.1.5 Der Vorgang wird wie unter 5.1.4 beschrieben zweimal wiederholt, so dass die Sporen insgesamt dreimal gewaschen werden.

5.1.6 Der Bodensatz wird in 3-5 ml sterilem, demineralisiertem Wasser aufgenommen und die Konzentration der Sporen mit einer geeigneten Zählkammer bestimmt (z.B. Thoma-Kammer, Kammertiefe 0,1 mm).

5.1.7 Die Sporenzahl der einzelnen Sporensuspensionen soll

$8x10^5$ - $2x10^6$ Sporen/ml

betragen. Die vorbereitete Sporensuspension sollte bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt werden.

5.1.8 Zur Herstellung der Mischsuspension werden gleiche Volumina jeder einzelnen Sporensuspension zusammengegeben und gemischt. Die Sporensuspension sollte dann ebenfalls

$8x10^5$ - $2x10^6$ Sporen/ml

betragen.

5.1.9 Die Vitalität der Schimmelpilze wird durch Ausstreichen der Sporensuspension auf PDA-Platten überprüft. Die Platten werden für maximal 7 Tage bei 30°C ± 2 °C bebrütet.

5.2 Künstliche Alterung

5.2.1 Das Biozidprodukt wird in geeigneten Konzentrationsreihen der Dispersionsfarbe hinzugefügt, die Proben kräftig gemischt und für mindestens zwei Tage bei Raumtemperatur gelagert.

5.2.2 Es werden geeignete Anteile (z.B. 50 g oder 100 g) der Dispersionsfarbe in sterile Schraubgefäße eingewogen und diese fest verschlossen.

5.2.3 Zusätzlich dienen sechs unkonservierte Proben als Kontrollen. Hiervon werden drei Proben mit Bakterien beimpft (Positivkontrolle), die anderen drei Proben bleiben unbeimpft (Negativkontrolle, bzw. Rückstellmuster).

5.2.4 Die Proben werden für 4 Wochen bei 40 °C ± 2 °C oder alternativ für 18 Wochen bei 30 °C ± 2 °C gelagert.

5.2.5 Nach 4-bzw. 18-wöchiger Alterung wird der Keimbelastungstest wie unter 5.3 beschrieben durchgeführt.

5.3 Keimbelastungstest

5.3.1 Jede Probe (mit Ausnahme der Negativkontrolle) wird mit gleichem Volumen der Sporensuspension äquivalent zu 1,0% des Probengewichtes beimpft. Die Sporensuspension wird dabei durch vorsichtiges Schwenken der Probe homogen auf der Oberfläche der Probe verteilt. Die Schraubgefäße werden anschließend so verschlossen, dass ein Sauerstoffzutritt in das Gefäß gewährleistet ist.

5.3.3 Zur Kontrolle der Vitalität der Schimmelpilze wird die Sporensuspension auf Nähragarplatten und die Platten für maximal 7 Tage bei 30 °C ± 2°C inkubiert.

5.3.4 Alle Proben werden für 7 Tage bei 30 °C ± 2°C inkubiert.

5.3.5 Das Oberflächenwachstum der Schimmelpilze wird visuell überprüft.

0: kein Bewuchs
1: schwaches Wachstum (bis zu 10 % der Oberfläche bedeckt)
2: mittleres Wachstum (bis zu 30 % der Oberfläche bedeckt)
3: starkes Wachstum (bis zu 70 % der Oberfläche bedeckt)
4: vollständiges Wachstum (bis zu 100 % der Oberfläche bedeckt)

5.3.6 Die Schritte 5.3.1 bis 5.3.4 werden in wöchentlichen Intervallen wiederholt, bis insgesamt 3 Impfzyklen durchgeführt sind. Nach insgesamt 6 Wochen Inkubation bei 30 °C ± 2 °C ist der Test beendet und es wird eine abschließende visuelle Bewertung der Proben vorgenommen.

5.3.7 Zur Differenzierung der Wirksamkeit verschiedener Biozidkonzentrationen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer können zusätzliche Keimzahlbestimmungen, z.B. nach 1 und 3 Tagen nach Beimpfung, durchgeführt werden.

5.4 Validität der Prüfung

Die Prüfung ist valide, wenn die Wachstumsfähigkeit der Schimmelpilze auf PDA-Agar in Petrischalen nachgewiesen werden konnte (s. Punkt 5.1.9).

5.5 Pass./. Fail Kriterien

5.5.1 Die kurative Wirkung des Biozids in der Farbe durch die eingesetzte Biozidkonzentration ist gegeben, wenn nach Ablauf des Tests keine Ausbildung von Schimmel beobachtet werden kann.

5.5.2 Die Wirksamkeit eines zu prüfenden Biozids kann nicht nachgewiesen werden, wenn in der biozidfreien Farbe nach Beimpfung und Ablauf des Tests keine Schimmelbildung nachgewiesen werden kann.

5.6 Nachweis signifikanter Unterschiede

Es sind geeignete statistische Methoden anzuwenden, die signifikante Unterschiede zwischen den mit Topfkonservierern behandelten Proben und den unbehandelten Proben ggf. nachweisen können.

Nährmedium PD-Agar

Das Medium setzt sich aus 0,4 % Kartoffel-Infus, 2 % Glucose und 1,5 % Agar zusammen. Der pH liegt bei 5,6 ± 0,2. Um ein unerwünschtes Wachstum von Bakterien zu unterdrücken, wurde dem PDA-Nährmedium Chloramphenicol in einer finalen Konzentration von 30 µg/ml zugegeben.

Zubereitung

40 g Nähragar sind in 1 L destillierten Wasser zu suspendieren, bis zum vollständigen Lösen zu rühren und 15 Minuten bei 121°C zu autoklavieren.

8.2 Bestimmung der koloniebildenden Einheit in Dispersionslacken

Tabelle 14: Belastungstest Bakterien in Weißlack mit BIT-Eintrag aus Bindemittel

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Lack)
Lack 1_1	0	$2,27x10^3$ $2,45x10^3$ $2,48x10^3$	10^3 10^3 10^3	$2,40x10^6$	
Lack 1_2	0	$2,12x10^3$ $2,31x10^3$ $2,13x10^3$	10^3 10^3 10^3	$2,19x10^6$	$2,20x10^6$
Lack 1_3	0	$2,10x10^3$ $1,93x10^3$ $1,97x10^3$	10^3 10^3 10^3	$2,00x10^6$	
Lack 1_1	1	$7,96x10^4$ $8,15x10^4$ $8,43x10^4$	10^2 10^2 10^2	$8,18\ x10^6$	
Lack 1_2	1	$8,98x10^4$ $1,02x10^5$ $8,24x10^4$	10^2 10^2 10^2	$9,14x10^6$	$8,35x10^6$
Lack 1_3	1	$7,69x10^4$ $7,22x10^4$ $8,24x10^4$	10^2 10^2 10^2	$7,72x10^6$	
Lack 1_1	2	$5,00x10^1$ $9,49x10^3$ $8,76x10^3$	10^3 10^3 10^3	$9,12x10^6$	
Lack 1_2	2	$1,20x10^4$ $1,09x10^4$ $8,76x10^3$	10^3 10^3 10^3	$1,06x10^7$	$9,68x10^6$
Lack 1_3	2	$1,40x10^2$ $8,39x10^3$ $1,02x10^4$	10^3 10^3 10^3	$9,31x10^6$	
Lack 1_1	3	$2,05x10^4$ $1,38x10^4$ $1,61x10^4$	10^3 10^3 10^3	$1,50x10^7$	
Lack 1_2	3	$1,67x10^4$ $1,76x10^4$ $1,89x10^4$	10^3 10^3 10^3	$1,83x10^7$	$1,80x10^7$
Lack 1_3	3	$2,03x10^4$ $2,23x10^4$ $1,94x10^4$	10^3 10^3 10^3	$2,08x10^7$	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Lack)
Lack 1_1	6	$1{,}31x10^4$ $1{,}46x10^4$ $1{,}06x10^4$	10^3 10^3 10^3	$1{,}26x10^7$	
Lack 1_2	6	$2{,}04x10^4$ $2{,}41x10^4$ $1{,}68x10^4$	10^3 10^3 10^3	$2{,}04x10^7$	$1{,}67x10^7$
Lack 1_3	6	$1{,}80x10^4$ $1{,}93x10^4$ $1{,}50x10^4$	10^3 10^3 10^3	$1{,}71x10^7$	

Tabelle 15: Belastungstest Bakterien in Weißlack mit MIT- und BIT-Eintrag aus Bindemittel

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Lack)
Lack 1_1	0	$1{,}73x10^3$ $1{,}74x10^3$ $1{,}83x10^3$	10^3 10^3 10^3	$1{,}77x10^6$	
Lack 1_2	0	$1{,}96x10^3$ $2{,}08x10^3$ $2{,}15x10^3$	10^3 10^3 10^3	$2{,}06x10^6$	$1{,}88x10^6$
Lack 1_3	0	$1{,}87x10^3$ $1{,}73x10^3$ $1{,}87x10^3$	10^3 10^3 10^3	$1{,}82x10^6$	
Lack 1_1	1	0 0 0	- - -	-	
Lack 1_2	1	0 0 0	- - -	-	-
Lack 1_3	1	0 0 0	- - -	-	
Lack 1_1	2	0 0 0	- - -	-	
Lack 1_2	2	0 0 0	- - -	-	-
Lack 1_3	2	0 0 0	- - -	-	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Lack)
Lack 1_1	3	1,89x10³ 1,93x10³ 1,83x10³	unverdünnt unverdünnt unverdünnt	1,88x10³	
Lack 1_2	3	2,80x10² 4,30x10² 4,70x10²	unverdünnt unverdünnt unverdünnt	4,50x10²	1,87x10³
Lack 1_3	3	2,84x10³ 2,63x10³ 3,94x10³	unverdünnt unverdünnt unverdünnt	3,28x10³	
Lack 1_1	6	1,54x10³ 1,62x10³ 1,48x10³	unverdünnt unverdünnt unverdünnt	1,55x10³	
Lack 1_2	6	1,80x10² 2,30x10² 3,10x10²	unverdünnt unverdünnt unverdünnt	2,70x10²	1,67x10⁷
Lack 1_3	6	2,30x10³ 2,19x10³ 2,30x10³	unverdünnt unverdünnt unverdünnt	2,24x10³	

Tabelle 16: Belastungstest Bakterien in Lasur mit BIT-Eintrag aus Bindemittel

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Lack)
Lack 1_1	0	4,17x10³ 4,36x10³ 4,55x10³	10³ 10³ 10³	4,36x10⁶	
Lack 1_2	0	4,55x10³ 4,73x10³ 4,55x10³	10³ 10³ 10³	4,61x10⁶	4,42x10⁶
Lack 1_3	0	4,32x10³ 4,34x10³ 4,18x10³	10³ 10³ 10³	4,28x10⁶	
Lack 1_1	1	2,80x10² - -	10² 10² 10²	2,80x10²	
Lack 1_2	1	1,28x10⁴ 1,35x10⁴ 1,50x10⁴	10² 10² 10²	1,37x10⁶	1,97x10⁶

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Lack)
Lack 1_3	1	$3{,}06\times10^{4}$ $1{,}94\times10^{4}$ $2{,}69\times10^{4}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$2{,}56\times10^{6}$	
Lack 1_1	2	$1{,}59\times10^{4}$ $1{,}33\times10^{4}$ $1{,}69\times10^{4}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$1{,}53\times10^{6}$	
Lack 1_2	2	$5{,}09\times10^{4}$ $4{,}54\times10^{4}$ $4{,}17\times10^{4}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$4{,}60\times10^{6}$	$1{,}33\times10^{6}$
Lack 1_1	2	$1{,}34\times10^{4}$ $1{,}17\times10^{4}$ $8{,}33\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$1{,}12\times10^{6}$	
Lack 1_1	3	$3{,}14\times10^{3}$ $2{,}78\times10^{3}$ $3{,}01\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}99\times10^{6}$	
Lack 1_2	3	$7{,}77\times10^{3}$ $6{,}63\times10^{3}$ $6{,}62\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$7{,}00\times10^{6}$	$7{,}07\times10^{6}$
Lack 1_3	3	$6{,}44\times10^{3}$ $7{,}58\times10^{3}$ $7{,}35\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$7{,}13\times10^{6}$	
Lack 1_1	6	$1{,}53\times10^{4}$ $1{,}31\times10^{4}$ $2{,}04\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}63\times10^{7}$	
Lack 1_2	6	$9{,}81\times10^{4}$ $7{,}96\times10^{4}$ $8{,}61\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$8{,}80\times10^{7}$	$9{,}00\times10^{7}$
Lack 1_3	6	$9{,}35\times10^{4}$ $9{,}72\times10^{4}$ $8{,}52\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$9{,}20\times10^{7}$	

Tabelle 17: Belastungstest Bakterien in Lasur mit MIT- und BIT-Eintrag aus Bindemittel

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Lack)
Lack 1_1	0	$1{,}61\times10^{3}$ $1{,}58\times10^{3}$ $1{,}51\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}57\times10^{6}$	
Lack 1_2	0	$1{,}87\times10^{3}$ $2{,}08\times10^{3}$ $1{,}91\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}95\times10^{6}$	$1{,}71\times10^{6}$

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Lack)
Lack 1_3	0	$1{,}63x10^3$ $1{,}66x10^3$ $1{,}58x10^3$	10^3 10^3 10^3	$1{,}62x10^6$	

Tabelle 18: Belastungstest Bakterien im Vorlack mit BIT-Eintrag aus Bindemittel

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Lack)
Lack 1_1	0	$4{,}30x10^2$ $4{,}70x10^2$ $5{,}10x10^2$	10^3 10^3 10^3	$4{,}70x10^5$	
Lack 1_2	0	$2{,}24x10^3$ $2{,}19x10^3$ $2{,}29x10^3$	10^3 10^3 10^3	$2{,}24x10^6$	$2{,}81x10^6$
Lack 1_3	0	$3{,}40x10^3$ $3{,}43x10^3$ $3{,}31x10^3$	10^3 10^3 10^3	$3{,}38x10^6$	
Lack 1_1	1	$6{,}00x10^1$ $7{,}00x10^1$ $9{,}00x10^1$	10^2 10^2 10^2	$7{,}33x10^3$	
Lack 1_2	1	$3{,}81x10^3$ $3{,}76x10^3$ $4{,}31x10^3$	10^2 10^2 10^2	$3{,}96x10^5$	$6{,}83x10^3$
Lack 1_3	1	$6{,}00x10^1$ $8{,}00x10^1$ $5{,}00x10^1$	10^2 10^2 10^2	$6{,}33x10^3$	
Lack 1_1	2	$2{,}01x10^4$ $1{,}97x10^4$ $1{,}97x10^4$	10^2 10^2 10^2	$1{,}98x10^6$	
Lack 1_2	2	$1{,}15x10^5$ $8{,}98x10^4$ $1{,}24x10^5$	10^2 10^2 10^2	$1{,}10x10^7$	$1{,}01x10^7$
Lack 1_3	2	$1{,}54x10^5$ $5{,}58x10^4$ $6{,}35x10^4$	10^2 10^2 10^2	$9{,}10x10^6$	
Lack 1_1	3	$6{,}20x10^4$ $5{,}28x10^4$ $4{,}44x10^4$	10^3 10^3 10^3	$5{,}31x10^7$	
Lack 1_2	3	$9{,}81x10^4$ $7{,}50x10^4$ $8{,}06x10^4$	10^3 10^3 10^3	$8{,}46x10^7$	$8{,}48x10^7$

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Lack)
Lack 1_3	3	$9,35x10^4$ $8,24x10^4$ $7,87x10^4$	10^3 10^3 10^3	$8,49x10^7$	
Lack 1_1	6	$9,91x10^4$ $1,11x10^5$ $1,06x10^5$	10^3 10^3 10^3	$1,05x10^8$	
Lack 1_2	6	$1,12x10^5$ $1,06x10^5$ $1,28x10^5$	10^3 10^3 10^3	$1,15x10^8$	$1,14x10^8$
Lack 1_3	6	$1,30x10^5$ $1,12x10^5$ $1,26x10^5$	10^3 10^3 10^3	$1,23x10^8$	

Tabelle 19: Belastungstest Bakterien im Vorlack mit MIT- und BIT-Eintrag aus Bindemittel

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Lack)
Lack 1_1	0	$2,24x10^3$ $1,97x10^3$ $1,08x10^3$	10^3 10^3 10^3	$1,76x10^6$	
Lack 1_2	0	$3,07x10^3$ $2,97x10^3$ $3,12x10^3$	10^3 10^3 10^3	$3,05x10^6$	$1,79x10^6$
Lack 1_3	0	$1,78x10^3$ $1,92x10^3$ $1,75x10^3$	10^3 10^3 10^3	$1,82x10^6$	

Tabelle 20: Belastungstest Hefen in Weißlack mit BIT-Eintrag aus Bindemittel

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Lack)
Lack 1_1	0	$2.00x10^2$ $2,30x10^2$ $2,30x10^2$	10^3 10^3 10^3	$2,20x10^5$	
Lack 1_2	0	$9,12x10^2$ $1,15x10^3$ $9,90x10^2$	10^3 10^3 10^3	$1,02x10^6$	$1,11x10^6$
Lack 1_3	0	$1,04x10^3$ $1,19x10^3$ $1,33x10^3$	10^3 10^3 10^3	$1,19x10^6$	
Lack 1_1	1	$1,00x10^1$ - -	10^1 10^1 10^1	$1,00x10^1$	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Lack)
Lack 1_2	1	$1{,}00\times10^{1}$ - -	10^{1} 10^{1} 10^{1}	$1{,}00\times10^{1}$	$1{,}00\times10^{1}$
Lack 1_3	1	$1{,}00\times10^{1}$ - $1{,}00\times10^{1}$	10^{1} 10^{1} 10^{1}	$1{,}00\times10^{1}$	
Lack 1_1	2	$1{,}40\times10^{3}$ $1{,}59\times10^{3}$ $1{,}88\times10^{3}$	10^{1} 10^{1} 10^{1}	$1{,}62\times10^{4}$	
Lack 1_2	2	$9{,}60\times10^{2}$ $1{,}26\times10^{3}$ $1{,}21\times10^{3}$	10^{1} 10^{1} 10^{1}	$1{,}14\times10^{4}$	$1{,}62\times10^{4}$
Lack 1_3	2	$2{,}70\times10^{3}$ $2{,}26\times10^{3}$ $2{,}41\times10^{3}$	10^{1} 10^{1} 10^{1}	$2{,}46\times10^{4}$	
Lack 1_1	3	$1{,}16\times10^{3}$ $1{,}87\times10^{3}$ $1{,}49\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$1{,}51\times10^{5}$	
Lack 1_2	3	$7{,}20\times10^{2}$ $6{,}50\times10^{2}$ $7{,}10\times10^{2}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$6{,}93\times10^{4}$	$1{,}27\times10^{5}$
Lack 1_3	3	$1{,}21\times10^{3}$ $1{,}79\times10^{3}$ $1{,}79\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$1{,}60\times10^{5}$	
Lack 1_1	6	$1{,}20\times10^{2}$ $1{,}70\times10^{2}$ $1{,}90\times10^{2}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$1{,}60\times10^{4}$	
Lack 1_2	6	- - -	- - -	- - -	
Lack 1_3	6	$2{,}80\times10^{2}$ $3{,}00\times10^{2}$ $5{,}00\times10^{2}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$3{,}64\times10^{4}$	$2{,}60\times10^{4}$

Tabelle 21: Belastungstest Bakterien in Weißlack mit MIT- und BIT-Eintrag aus Bindemittel

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Lack)
Lack 1_1	0	$8{,}50\times10^{2}$ $9{,}50\times10^{2}$ $1{,}16\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$9{,}87\times10^{5}$	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Lack)
Lack 1_2	0	$5,90x10^2$ $4,70x10^2$ $4,20x10^2$	10^3 10^3 10^3	$4,97x10^5$	
Lack 1_3	0	$8,20x10^2$ $7,80x10^2$ $1,13x10^3$	10^3 10^3 10^3	$9,10x10^5$	
Lack 1_1	1	0 0 0	- - -	-	
Lack 1_2	1	0 0 0	- - -	-	-
Lack 1_3	1	0 0 0	- - -	-	
Lack 1_1	2	0 0 0	- - -	-	
Lack 1_2	2	0 0 0	- - -	-	-
Lack 1_3	2	0 0 0	- - -	-	
Lack 1_1	3	$7,77x10^3$ $1,25x10^4$ $1,59x10^4$	unverdünnt unverdünnt unverdünnt	$1,21x10^4$	
Lack 1_2	3	$1,25x10^4$ $7,95x10^3$ $7,77x10^3$	unverdünnt unverdünnt unverdünnt	$9,41x10^3$	$1,87x10^3$
Lack 1_3	3	$6,44x10^3$ $6,44x10^3$ $8,33x10^3$	unverdünnt unverdünnt unverdünnt	$7,07x10^3$	
Lack 1_1	6	0 0 0	- - -	-	
Lack 1_2	6	0 0 0	- - -	-	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Lack)
Lack 1_3	6	0 0 0	- - -	-	

Tabelle 22: Belastungstest Hefen in Lasur mit BIT-Eintrag aus Bindemittel

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Lack)
Lack 1_1	0	$1{,}63\times10^{3}$ $1{,}59\times10^{3}$ $1{,}51\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}58\times10^{6}$	
Lack 1_2	0	$1{,}30\times10^{3}$ $1{,}41\times10^{3}$ $1{,}18\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}30\times10^{6}$	$1{,}44\times10^{6}$
Lack 1_3	0	$3{,}00\times10^{2}$ $2{,}70\times10^{2}$ $3{,}20\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}97\times10^{5}$	
Lack 1_1	1	$2{,}60\times10^{2}$ $2{,}20\times10^{2}$ $1{,}40\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}07\times10^{5}$	
Lack 1_2	1	$7{,}00\times10^{1}$ $8{,}00\times10^{1}$ $5{,}00\times10^{1}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$6{,}67\times10^{4}$	$1{,}55\times10^{5}$
Lack 1_3	1	$7{,}00\times10^{1}$ $7{,}00\times10^{1}$ $4{,}00\times10^{1}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$6{,}00\times10^{4}$	
Lack 1_1	2	$8{,}30\times10^{2}$ $7{,}50\times10^{2}$ $1{,}12\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$9{,}00\times10^{4}$	
Lack 1_2	2	$5{,}50\times10^{2}$ $5{,}90\times10^{2}$ $7{,}90\times10^{2}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$6{,}43\times10^{4}$	$1{,}35\times10^{5}$
Lack 1_3	2	$2{,}44\times10^{3}$ $2{,}60\times10^{3}$ $2{,}50\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$2{,}51\times10^{5}$	
Lack 1_1	3	$1{,}79\times10^{2}$ $1{,}78\times10^{2}$ $2{,}86\times10^{2}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$2{,}14\times10^{4}$	
Lack 1_2	3	$2{,}53\times10^{3}$ $2{,}98\times10^{3}$ $2{,}41\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$2{,}64\times10^{5}$	$1{,}35\times10^{5}$

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_3	3	2,75x10³ 2,25x10³ 2,49x10³	10² 10² 10²	2,50x10⁵	
Lack 1_3	6	5,04x10³ 5,06x10³ 5,54x10³	10² 10² 10²	5,21x10⁵	
Lack 1_3	6	3,40x10³ 3,49x10³ 3,43x10³	10² 10² 10²	3,44x10⁵	4,57x10⁵
Lack 1_3	6	4,60x10³ 5,15x10³ 5,38x10³	10² 10² 10²	5,04x10⁵	

Tabelle 23: Belastungstest Hefen in Lasur mit MIT- und BIT-Eintrag aus Bindemittel

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	4,90x10² 3,60x10² 4,90x10²	10³ 10³ 10³	4,47x10⁵	
Lack 1_2	0	7,00x10² 8,30x10² 6,40x10²	10³ 10³ 10³	7,23x10⁵	4,44x105
Lack 1_3	0	1,40x10² 1,70x10² 1,80x10²	10³ 10³ 10³	1,63x10⁵	
Lack 1_1	1	6,00x10¹ 5,00x10¹ 2,00x10¹	unverdünnt unverdünnt unverdünnt	4,33x10¹	
Lack 1_2	1	2,00x10¹ 4,00x10¹ 1,00x10¹	unverdünnt unverdünnt unverdünnt	2,33x10¹	2,89x10¹
Lack 1_3	1	2,00x10¹ - -	unverdünnt unverdünnt unverdünnt	2,00x10¹	
Lack 1_1	2	7,00x10¹ 7,00x10¹ 2,00x10¹	unverdünnt unverdünnt unverdünnt	5,33x10¹	
Lack 1_2	2	4,10x10² 2,70x10² 2,70x10²	unverdünnt unverdünnt unverdünnt	3,17x10²	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_3	2	$5,84x10^3$ $2,02x10^3$ $4,75x10^3$	unverdünnt unverdünnt unverdünnt	$4,20x10^3$	
Lack 1_1	3	unzählbar	unverdünnt unverdünnt unverdünnt		
Lack 1_2	3	$5,09x10^4$ $8,61x10^4$ $7,78x10^4$	unverdünnt unverdünnt unverdünnt	$7,16x10^4$	$9,08x10^4$
Lack 1_3	3	$1,15x10^5$ $1,13x10^5$ $1,02x10^5$	unverdünnt unverdünnt unverdünnt	$1,10x10^5$	
Lack 1_1	6	$2,20x10^3$ $2,23x10^3$ $2,54x10^3$	10^2 10^2 10^2	$2,32x10^5$	
Lack 1_2	6	$1,79x10^3$ $1,87x10^3$ $1,67x10^3$	10^2 10^2 10^2	$1,78x10^5$	$1,88x10^5$
Lack 1_1	6	$1,52x10^3$ $1,37x10^3$ $1,70x10^3$	10^2 10^2 10^2	$1,53x10^5$	

Tabelle 24: Belastungstest Hefen in Vorlack mit BIT-Eintrag aus Bindemittel

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Lack)
Lack 1_1	0	$1,90x10^2$ $3,70x10^2$ $2,90x10^2$	10^3 10^3 10^3	$2,83x10^5$	
Lack 1_2	0	$4,10x10^2$ $5,40x10^2$ $4,80x10^2$	10^3 10^3 10^3	$4,77x10^5$	$3,80x10^5$
Lack 1_3	0	$1,50x10^3$ $1,01x10^3$ $1,18x10^3$	10^3 10^3 10^3	$1,23x10^6$	
Lack 1_1	1	$2,10x10^2$ $1,80x10^2$ $2,40x10^2$	10^2 10^2 10^2	$2,1x10^4$	
Lack 1_2	1	$4,00x10^1$ $9,00x10^1$ $1,07x10^2$	10^2 10^2 10^2	$1,07x10^4$	$1,36x10^4$

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Lack)
Lack 1_3	1	$6{,}00\times10^{1}$ $7{,}00\times10^{1}$ $1{,}40\times10^{2}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$9{,}00\times10^{3}$	
Lack 1_1	2	$4{,}40\times10^{2}$ $3{,}50\times10^{2}$ $3{,}90\times10^{2}$	10^{1} 10^{1} 10^{1}	$3{,}93\times10^{3}$	
Lack 1_2	2	$2{,}42\times10^{3}$ $2{,}41\times10^{3}$ $2{,}15\times10^{3}$	10^{1} 10^{1} 10^{1}	$2{,}33\times10^{4}$	$1{,}36\times10^{4}$
Lack 1_3	2	$9{,}35\times10^{4}$ $1{,}03\times10^{5}$ $1{,}05\times10^{5}$	10^{1} 10^{1} 10^{1}	$1{,}01\times10^{6}$	
Lack 1_1	3	$3{,}47\times10^{3}$ $3{,}71\times10^{3}$ 3.16×10^{3}	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$3{,}45\times10^{5}$	
Lack 1_2	3	$3{,}43\times10^{3}$ $3{,}69\times10^{3}$ $3{,}39\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$3{,}50\times10^{5}$	$3{,}48\times10^{5}$
Lack 1_3	3	$1{,}04\times10^{4}$ $9{,}39\times10^{3}$ $7{,}23\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$9{,}01\times10^{5}$	
Lack 1_1	6	$2{,}40\times10^{2}$ $2{,}30\times10^{2}$ $1{,}30\times10^{2}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	2,00	
Lack 1_2	6	$1{,}38\times10^{3}$ $1{,}95\times10^{3}$ $1{,}42\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$1{,}58\times10^{5}$	$3{,}74\times10^{4}$
Lack 1_3	6	$5{,}30\times10^{2}$ $4{,}60\times10^{2}$ $6{,}50\times10^{2}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$5{,}47\times10^{4}$	

Tabelle 25: Belastungstest Hefen im Vorlack mit MIT- und BIT-Eintrag aus Bindemittel

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Lack)
Lack 1_1	0	$8{,}80\times10^{2}$ $1{,}05\times10^{3}$ $1{,}34\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}09\times10^{6}$	
Lack 1_2	0	$6{,}00\times10^{2}$ $5{,}00\times10^{2}$ $4{,}20\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$5{,}07\times10^{5}$	$4{,}87\times10^{5}$

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Lack)
Lack 1_3	0	$4{,}30\times10^{2}$ $6{,}10\times10^{2}$ $3{,}60\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$4{,}67\times10^{5}$	
Lack 1_1	1	- - -	- - -	-	
Lack 1_2	1	- - -	- - -	-	
Lack 1_3	1	- - -	- - -	-	
Lack 1_1	2	- - -	- - -	-	
Lack 1_2	2	- - -	- - -	-	
Lack 1_3	2	- - -	- - -	-	
Lack 1_1	3	$2{,}06\times10^{4}$ $2{,}08\times10^{4}$ $2{,}16\times10^{4}$	unverdünnt unverdünnt unverdünnt	$2{,}10\times10^{4}$	
Lack 1_2	3	$1{,}17\times10^{4}$ $9{,}47\times10^{3}$ $7{,}58\times10^{3}$	unverdünnt unverdünnt unverdünnt	$9{,}60\times10^{3}$	$1{,}41\times10^{4}$
Lack 1_3	3	$1{,}23\times10^{4}$ $1{,}14\times10^{4}$ $1{,}44\times10^{4}$	unverdünnt unverdünnt unverdünnt	$1{,}27\times10^{4}$	
Lack 1_1	6	$2{,}80\times10^{2}$ $2{,}20\times10^{2}$ $1{,}60\times10^{2}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$2{,}24\times10^{4}$	
Lack 1_2	6	$3{,}70\times10^{2}$ $4{,}70\times10^{2}$ $3{,}00\times10^{2}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$3{,}80\times10^{4}$	$3{,}19\times10^{4}$
Lack 1_3	6	$3{,}48\times10^{2}$ $4{,}13\times10^{2}$ $3{,}08\times10^{2}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$3{,}56\times10^{4}$	

Tabelle 26: Belastungstest Bakterien im Weißlack mit BIT-Eintrag aus Bindemittel vor Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$1,57x10^3$ $1,56x10^3$ $1,47x10^3$	10^3 10^3 10^3	$1,53x10^6$	
Lack 1_2	0	$2,84x10^3$ $3,06x10^3$ $2,63x10^3$	10^3 10^3 10^3	$2,84x10^6$	$2,33x10^6$
Lack 1_3	0	$2,41x10^3$ $2,63x10^3$ $2,84x10^3$	10^3 10^3 10^3	$2,63x10^6$	
Lack 1_1	1	$1,46x10^4$ $1,39x10^4$ $2,00x10^4$	10^2 10^2 10^2	$1,63x10^6$	
Lack 1_2	1	$6,90x10^4$ $6,30x10^4$ $6,76x10^4$	10^2 10^2 10^2	$6,67x10^6$	$6,72x10^6$
Lack 1_3	1	$6,85x10^4$ $6,20x10^4$ $7,22x10^4$	10^2 10^2 10^2	$6,76x10^6$	
Lack 1_1	2	$7,95x10^3$ $7,58x10^3$ $8,33x10^3$	10^3 10^3 10^3	$7,95x10^6$	
Lack 1_2	2	$8,52x10^3$ $6,63x10^3$ $7,20x10^3$	10^3 10^3 10^3	$7,45x10^6$	$7,26x10^6$
Lack 1_3	2	$8,52x10^3$ $6,44x10^3$ $4,17x10^3$	10^3 10^3 10^3	$6,38x10^6$	
Lack 1_1	3	$1,53x10^4$ $1,48x10^4$ $1,14x10^4$	10^3 10^3 10^3	$1,38x10^7$	
Lack 1_2	3	$1,72x10^4$ $1,40x10^4$ $1,44x10^4$	10^3 10^3 10^3	$1,52x10^7$	$1,31x10^7$
Lack 1_3	3	$1,14x10^4$ $1,02x10^4$ $9,28x10^3$	10^3 10^3 10^3	$1,03x10^7$	
Lack 1_1	6	$4,16x10^3$ $3,50x10^3$ $3,39x10^3$	10^3 10^3 10^3	$3,68x10^6$	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_2	6	$5,30x10^3$ $4,38x10^3$ $3,79x10^3$	10^3 10^3 10^3	$4,49x10^6$	$4,24x10^6$
Lack 1_3	6	$4,73x10^3$ $3,98x10^3$ $5,68x10^3$	10^3 10^3 10^3	$4,80x10^6$	

Tabelle 27: Belastungstest Bakterien im Weißlack mit MIT- und BIT-Eintrag aus Bindemittel vor Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$3,17x10^3$ $3,28x10^3$ $3,94x10^3$	10^3 10^3 10^3	$3,46x10^6$	
Lack 1_2	0	$3,94x10^3$ $3,50x10^3$ $2,28x10^3$	10^3 10^3 10^3	$3,24x10^6$	$3,58x10^6$
Lack 1_3	0	$3,98x10^3$ $3,79x10^3$ $3,98x10^3$	10^3 10^3 10^3	$3,91x10^6$	
Lack 1_1	1	$1,84x10^5$ $1,85x10^5$ $1,99x10^5$	10^2 10^2 10^2	$1,90x10^7$	
Lack 1_2	1	$1,44x10^5$ $1,57x10^5$ $1,39x10^5$	10^2 10^2 10^2	$1,47x10^7$	$1,54x10^7$
Lack 1_3	1	$9,72x10^4$ $1,19x10^5$ $1,41x10^5$	10^2 10^2 10^2	$1,19x10^7$	
Lack 1_1	2	$1,61x10^4$ $1,44x10^4$ $1,76x10^4$	10^3 10^3 10^3	$1,60x10^7$	
Lack 1_2	2	$8,52x10^3$ $8,33x10^3$ $8,33x10^3$	10^3 10^3 10^3	$8,40x10^6$	$1,28x10^7$
Lack 1_3	2	$1,34x10^4$ $1,16x10^4$ $1,72x10^3$	10^3 10^3 10^3	$1,41x10^7$	
Lack 1_1	3	$9,66x10^3$ $8,90x10^3$ $1,23x10^4$	10^3 10^3 10^3	$1,03x10^7$	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_2	3	8,14x10³ 5,68x10³ 5,87x10³	10³ 10³ 10³	6,57x10⁶	6,37x10⁶
Lack 1_3	3	2,40x10³ 2,20x10³ 2,11x10³	10³ 10³ 10³	2,24x10⁶	
Lack 1_3	6	3,79x10³ 4,36x10³ 3,17x10³	10³ 10³ 10³	3,77x10⁶	
Lack 1_3	6	5,68x10³ 3,98x10³ 4,17x10³	10³ 10³ 10³	4,61x10⁶	3,96x10⁶
Lack 1_3	6	4,17x10³ 3,50x10³ 2,84x10³	10³ 10³ 10³	3,50x10⁶	

Tabelle 28: Belastungstest Bakterien im Vorlack mit BIT-Eintrag aus Bindemittel vor Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	4,05x10³ 3,50x10³ 3,17x10³	10³ 10³ 10³	3,57x10⁶	
Lack 1_2	0	1,80x10³ 1,87x10³ 2,00x10³	10³ 10³ 10³	1,89x10⁶	2,73x10⁶
Lack 1_3	0	2,84x10³ 2,63x10³ 2,70x10³	10³ 10³ 10³	2,72x10⁶	
Lack 1_1	1	- - -	10² 10² 10²	-	
Lack 1_2	1	4,55x10³ 4,92x10³ 4,16x10³	10² 10² 10²	5,54x10⁵	2,92x10⁵
Lack 1_3	1	1,26x10³ 1,35x10³ 1,29x10³	10² 10² 10²	1,29x10⁵	
Lack 1_1	2	- - -	10² 10² 10²	-	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_2	2	$9{,}09\times10^{3}$ $1{,}04\times10^{4}$ $9{,}09\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$9{,}53\times10^{5}$	$9{,}60\times10^{5}$
Lack 1_3	2	$9{,}85\times10^{3}$ $1{,}14\times10^{4}$ $7{,}77\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$9{,}66\times10^{5}$	
Lack 1_1	3	- - -	10^{3} 10^{3} 10^{3}	-	
Lack 1_2	3	$4{,}35\times10^{4}$ $6{,}11*\times10^{4}$ $6{,}39\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$5{,}62\times10^{7}$	$4{,}31\times10^{7}$
Lack 1_3	3	$2{,}96\times10^{4}$ $3{,}15\times10^{4}$ $2{,}87\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}99\times10^{7}$	
Lack 1_1	6	- - -	10^{3} 10^{3} 10^{3}		
Lack 1_2	6	$1{,}26\times10^{5}$ $1{,}46\times10^{5}$ $1{,}26\times10^{5}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}33\times10^{8}$	$1{,}07\times10^{8}$
Lack 1_3	6	$5{,}59\times10^{4}$ $8{,}15\times10^{4}$ $8{,}52\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$8{,}09\times10^{7}$	

Tabelle 29: Belastungstest Bakterien im Vorlack mit MIT- und BIT-Eintrag aus Bindemittel vor Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$2{,}63\times10^{3}$ $2{,}41\times10^{3}$ $2{,}52\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}52\times10^{6}$	
Lack 1_2	0	$8{,}90\times10^{2}$ $8{,}70\times10^{2}$ $9{,}60\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$9{,}07\times10^{5}$	$2{,}10\times10^{6}$
Lack 1_3	0	$2{,}95\times10^{3}$ $3{,}17\times10^{3}$ $2{,}52\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}88\times10^{6}$	

Ab Woche 1 war kein Wachstum oder die Ausbildung von Kolonien zu verzeichnen.

Tabelle 30: Belastungstest Bakterien in der Lasur mit BIT-Eintrag aus Bindemittel vor Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$5{,}11\times10^{3}$ $4{,}82\times10^{3}$ $5{,}87\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$5{,}30\times10^{6}$	
Lack 1_2	0	$4{,}92\times10^{2}$ $4{,}55\times10^{2}$ $5{,}30\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$4{,}92\times10^{6}$	$4{,}90\times10^{6}$
Lack 1_3	0	$3{,}98\times10^{3}$ $4{,}55\times10^{3}$ $4{,}92\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$4{,}48\times10^{6}$	
Lack 1_1	1	$4{,}90\times10^{2}$ $5{,}50\times10^{2}$ $5{,}70\times10^{2}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$5{,}37\times10^{4}$	
Lack 1_2	1	5,00 2,00 $1{,}20\times10^{2}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$6{,}67\times10^{3}$	$5{,}94\times10^{4}$
Lack 1_3	1	$6{,}50\times10^{2}$ $6{,}00\times10^{2}$ $6{,}90\times10^{2}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$6{,}50\times10^{4}$	
Lack 1_1	2	$6{,}30\times10^{4}$ $6{,}39\times10^{4}$ $6{,}02\times10^{4}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$6{,}23\times10^{6}$	
Lack 1_2	2	$5{,}37\times10^{4}$ $5{,}93\times10^{4}$ $6{,}20\times10^{4}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$5{,}83\times10^{6}$	$5{,}85\times10^{6}$
Lack 1_3	2	$5{,}93\times10^{4}$ $5{,}37\times10^{4}$ $5{,}19\times10^{4}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$5{,}49\times10^{6}$	
Lack 1_1	3	$9{,}47\times10^{3}$ $9{,}47\times10^{3}$ $1{,}00\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$9{,}66\times10^{6}$	
Lack 1_2	3	$9{,}47\times10^{3}$ $7{,}77\times10^{3}$ $1{,}00\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$9{,}09\times10^{6}$	$9{,}92\times10^{6}$
Lack 1_3	3	$8{,}90\times10^{3}$ $1{,}40\times10^{4}$ $1{,}00\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}10\times10^{7}$	
Lack 1_1	6	$3{,}61\times10^{4}$ $2{,}31\times10^{4}$ $4{,}63\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$3{,}52\times10^{7}$	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_2	6	$2{,}96\times10^{4}$ $2{,}69\times10^{4}$ $2{,}59\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}75\times10^{7}$	$3{,}21\times10^{7}$
Lack 1_3	6	$3{,}24\times10^{4}$ $3{,}15\times10^{4}$ $3{,}70\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$3{,}36\times10^{7}$	

Tabelle 31: Belastungstest Bakterien in der Lasur mit MIT- und BIT-Eintrag aus Bindemittel vor Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$1{,}31\times10^{3}$ $1{,}43\times10^{3}$ $1{,}27\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}34\times10^{6}$	
Lack 1_2	0	$1{,}15\times10^{2}$ $1{,}26\times10^{2}$ $1{,}35\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}25\times10^{6}$	$1{,}30\times10^{6}$
Lack 1_3	0	$1{,}27\times10^{3}$ $1{,}45\times10^{3}$ $1{,}19\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}30\times10^{6}$	

Ab Woche 1 war kein Wachstum oder die Ausbildung von Kolonien zu verzeichnen.

Tabelle 32: Belastungstest Bakterien im Weißlack mit BIT-Eintrag aus Bindemittel nach Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$1{,}10\times10^{3}$ $1{,}19\times10^{3}$ $1{,}06\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}12\times10^{6}$	
Lack 1_2	0	$2{,}95\times10^{3}$ $2{,}74\times10^{3}$ $3{,}59\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$3{,}06\times10^{6}$	$2{,}29\times10^{6}$
Lack 1_3	0	$2{,}84\times10^{3}$ $2{,}41\times10^{3}$ $2{,}84\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}70\times10^{6}$	
Lack 1_1	1	$1{,}33\times10^{4}$ $1{,}57\times10^{4}$ $1{,}61\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}50\times10^{7}$	
Lack 1_2	1	$1{,}82\times10^{4}$ $1{,}55\times10^{4}$ $1{,}67\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}68\times10^{7}$	$1{,}59\times10^{7}$

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_3	1	$1{,}52\times10^{4}$ $1{,}70\times10^{4}$ $1{,}53\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}58\times10^{7}$	
Lack 1_1	2	$3{,}17\times10^{3}$ $7{,}95\times10^{3}$ $8{,}30\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$6{,}49\times10^{6}$	
Lack 1_2	2	$4{,}81\times10^{3}$ $5{,}80\times10^{3}$ $6{,}78\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$7{,}45\times10^{6}$	$6{,}31\times10^{6}$
Lack 1_3	2	$7{,}20\times10^{3}$ $7{,}58\times10^{3}$ $5{,}14\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$6{,}64\times10^{6}$	
Lack 1_1	3	$1{,}33\times10^{4}$ $1{,}04\times10^{4}$ $1{,}08\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}15\times10^{7}$	
Lack 1_2	3	$1{,}17\times10^{4}$ $1{,}14\times10^{4}$ $1{,}10\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}14\times10^{7}$	$1{,}12\times10^{7}$
Lack 1_3	3	$1{,}02\times10^{4}$ $1{,}14\times10^{4}$ $1{,}08\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}08\times10^{7}$	
Lack 1_1	6	$1{,}13\times10^{4}$ $1{,}20\times10^{4}$ $1{,}24\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}19\times10^{7}$	
Lack 1_2	6	$1{,}09\times10^{4}$ $1{,}24\times10^{4}$ $1{,}20\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}18\times10^{7}$	$1{,}11\times10^{7}$
Lack 1_3	6	$9{,}47\times10^{3}$ $8{,}71\times10^{3}$ $1{,}24\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}02\times10^{7}$	

Tabelle 33: Belastungstest Bakterien im Weißlack mit MIT und- BIT-Eintrag aus Bindemittel nach Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$2{,}84\times10^{3}$ $3{,}06\times10^{3}$ $2{,}95\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}95\times10^{6}$	
Lack 1_2	0	$3{,}61\times10^{3}$ $2{,}95\times10^{3}$ $1{,}95\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}84\times10^{6}$	$2{,}84\times10^{6}$

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_3	0	$3{,}06\times10^{3}$ $2{,}41\times10^{3}$ $2{,}74\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}74\times10^{6}$	
Lack 1_1	1	$1{,}23\times10^{4}$ $1{,}17\times10^{4}$ $1{,}33\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}24\times10^{7}$	
Lack 1_2	1	$2{,}06\times10^{4}$ $1{,}88\times10^{4}$ $2{,}01\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}98\times10^{7}$	$1{,}55\times10^{7}$
Lack 1_3	1	$1{,}34\times10^{4}$ $1{,}52\times10^{4}$ $1{,}46\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}44\times10^{7}$	
Lack 1_1	2	$7{,}20\times10^{3}$ $5{,}30\times10^{3}$ $7{,}20\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$6{,}57\times10^{6}$	
Lack 1_2	2	$7{,}01\times10^{3}$ $9{,}12\times10^{3}$ $1{,}17\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$9{,}27\times10^{6}$	$7{,}36\times10^{6}$
Lack 1_3	2	$6{,}25\times10^{3}$ $6{,}06\times10^{3}$ $6{,}44\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$6{,}25\times10^{6}$	
Lack 1_1	3	$3{,}83\times10^{3}$ $3{,}83\times10^{3}$ $3{,}83\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$3{,}83\times10^{6}$	
Lack 1_2	3	$5{,}11\times10^{3}$ $6{,}06\times10^{3}$ $4{,}60\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$5{,}26\times10^{6}$	$4{,}45\times10^{6}$
Lack 1_3	3	$5{,}03\times10^{3}$ $4{,}05\times10^{3}$ $3{,}72\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$4{,}27\times10^{6}$	
Lack 1_1	6	$1{,}85\times10^{3}$ $2{,}06\times10^{3}$ $2{,}06\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}99\times10^{6}$	
Lack 1_2	6	$1{,}66\times10^{3}$ $1{,}81\times10^{3}$ $1{,}62\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}70\times10^{6}$	$2{,}17\times10^{6}$
Lack 1_3	6	$2{,}84\times10^{3}$ $2{,}99\times10^{3}$ $2{,}63\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}82\times10^{6}$	

Tabelle 34: Belastungstest Bakterien in der Lasur mit BIT-Eintrag aus Bindemittel nach Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$1{,}87\times10^3$ $2{,}07\times10^3$ $1{,}80\times10^3$	10^3 10^3 10^3	$1{,}91\times10^6$	
Lack 1_2	0	$2{,}53\times10^3$ $2{,}20\times10^3$ $2{,}73\times10^3$	10^3 10^3 10^3	$2{,}49\times10^6$	$2{,}02\times10^6$
Lack 1_3	0	$1{,}67\times10^3$ $1{,}80\times10^3$ $1{,}53\times10^3$	10^3 10^3 10^3	$1{,}67\times10^6$	
Lack 1_1	1	$5{,}68\times10^3$ $6{,}82\times10^3$ $7{,}58\times10^3$	10^3 10^3 10^3	$6{,}69\times10^6$	
Lack 1_2	1	$3{,}61\times10^3$ $3{,}98\times10^3$ $4{,}73\times10^3$	10^3 10^3 10^3	$4{,}11\times10^6$	$5{,}75\times10^6$
Lack 1_3	1	$5{,}68\times10^3$ $7{,}20\times10^3$ -	10^3 10^3 10^3	$6{,}44\times10^6$	
Lack 1_1	2	$3{,}61\times10^3$ $3{,}61\times10^3$ $5{,}87\times10^3$	10^3 10^3 10^3	$4{,}36\times10^6$	
Lack 1_2	2	$9{,}12\times10^3$ $9{,}85\times10^3$ $1{,}02\times10^4$	10^3 10^3 10^3	$9{,}73\times10^6$	$6{,}53\times10^6$
Lack 1_3	2	$7{,}20\times10^3$ $5{,}11\times10^3$ $4{,}17\times10^3$	10^3 10^3 10^3	$5{,}49\times10^6$	
Lack 1_1	3	$2{,}63\times10^3$ $2{,}84\times10^3$ $3{,}61\times10^3$	10^3 10^3 10^3	$3{,}03\times10^6$	
Lack 1_2	3	$8{,}76\times10^3$ $8{,}39\times10^3$ $8{,}03\times10^3$	10^3 10^3 10^3	$8{,}39\times10^6$	$8{,}78\times10^6$
Lack 1_3	3	$1{,}14\times10^4$ $8{,}39\times10^3$ $7{,}77\times10^3$	10^3 10^3 10^3	$9{,}16\times10^6$	
Lack 1_1	6	$3{,}33\times10^4$ $3{,}24\times10^4$ $3{,}52\times10^4$	10^3 10^3 10^3	$3{,}56\times10^7$	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_2	6	$7,66x10^3$ $7,66x10^3$ $8,03x10^3$	10^3 10^3 10^3	$7,79x10^6$	$3,52x10^7$
Lack 1_3	6	$3,43x10^4$ $3,61x10^4$ $3,98x10^4$	10^3 10^3 10^3	$3,76x10^7$	

Tabelle 35: Belastungstest Bakterien in der Lasur mit MIT und- BIT-Eintrag aus Bindemittel nach Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$1,53x10^3$ $1,40x10^3$ $1,67x10^3$	10^3 10^3 10^3	$1,53x10^6$	
Lack 1_2	0	$1,87x10^3$ $2,33x10^3$ $2,07x10^3$	10^3 10^3 10^3	$2,09x10^6$	$1,81x10^6$
Lack 1_3	0	$1,93x10^3$ $1,73x10^3$ $1,73x10^3$	10^3 10^3 10^3	$1,80x10^6$	

Ab Woche 1 war kein Wachstum oder die Ausbildung von Kolonien zu verzeichnen.

Tabelle 36: Belastungstest Bakterien im Vorlack mit BIT-Eintrag aus Bindemittel nach Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$3,06x10^3$ $3,06x10^3$ $2,84x10^3$	10^3 10^3 10^3	$2,99x10^6$	
Lack 1_2	0	$2,07x10^3$ $2,33x10^3$ $2,27x10^3$	10^3 10^3 10^3	$2,22x10^6$	$2,84x10^6$
Lack 1_3	0	$3,06x10^3$ $3,17x10^3$ $3,72x10^3$	10^3 10^3 10^3	$3,32x10^6$	
Lack 1_1	1	$2,87x10^4$ $2,78x10^4$ $2,78x10^4$	10^3 10^3 10^3	$2,81x10^7$	
Lack 1_2	1	$3,53x10^4$ $3,61x10^4$ $3,15x10^4$	10^3 10^3 10^3	$3,43x10^7$	$3,96x10^7$

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_3	1	$5{,}00\times10^{4}$ $5{,}65\times10^{4}$ $6{,}30\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$5{,}65\times10^{7}$	
Lack 1_1	2	$7{,}50\times10^{4}$ $7{,}13\times10^{4}$ -	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$7{,}31\times10^{7}$	
Lack 1_2	2	$1{,}11\times10^{5}$ $8{,}89\times10^{4}$ $1{,}02\times10^{5}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}01\times10^{8}$	$8{,}39\times10^{7}$
Lack 1_3	2	$8{,}24\times10^{4}$ $7{,}22\times10^{4}$ $7{,}78\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$7{,}75\times10^{7}$	
Lack 1_1	3	$6{,}57\times10^{4}$ $6{,}11\times10^{4}$ $5{,}83\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$6{,}34\times10^{7}$	
Lack 1_2	3	$7{,}22\times10^{4}$ $7{,}41\times10^{4}$ $6{,}57\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$7{,}07\times10^{7}$	$6{,}18\times10^{7}$
Lack 1_3	3	$5{,}56\times10^{4}$ $5{,}46\times10^{4}$ $4{,}35\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$5{,}12\times10^{7}$	
Lack 1_1	6	$9{,}44\times10^{4}$ $9{,}07\times10^{4}$ $9{,}81\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$9{,}27\times10^{7}$	
Lack 1_2	6	$1{,}06\times10^{5}$ $9{,}35\times10^{4}$ $8{,}98\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$9{,}66\times10^{7}$	$9{,}46\times10^{7}$
Lack 1_3	6	$2{,}96\times10^{4}$ $3{,}06\times10^{4}$ $2{,}87\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}96\times10^{7}$	

Tabelle 37: Belastungstest Bakterien im Vorlack mit MIT- und BIT-Eintrag aus Bindemittel nach Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$2{,}74\times10^{3}$ $2{,}84\times10^{3}$ $3{,}06\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}88\times10^{6}$	
Lack 1_2	0	$2{,}95\times10^{3}$ $3{,}06\times10^{3}$ $2{,}63\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}88\times10^{6}$	$2{,}90\times10^{6}$

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_2	0	$2{,}95x10^3$ $2{,}84x10^3$ $3{,}06x10^3$	10^3 10^3 10^3	$2{,}95x10^6$	

Ab Woche 1 war kein Wachstum oder die Ausbildung von Kolonien zu verzeichnen.

Tabelle 38: Belastungstest Hefen im Weißlack mit BIT-Eintrag aus Bindemittel vor Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$1{,}01x10^3$ $9{,}40x10^2$ $1{,}10x10^3$	10^3 10^3 10^3	$1{,}02x10^6$	
Lack 1_2	0	$8{,}40x10^2$ $7{,}20x10^2$ $1{,}01x10^3$	10^3 10^3 10^3	$8{,}57x10^5$	$9{,}36x10^5$
Lack 1_3	0	$9{,}40x10^2$ $9{,}20x10^2$ $9{,}30x10^2$	10^3 10^3 10^3	$9{,}30x10^5$	
Lack 1_1	1	$5{,}00x10^1$ $8{,}00x10^1$ $6{,}00x10^1$	10^1 10^1 10^1	$6{,}33x10^2$	
Lack 1_2	1	$5{,}00x10^1$ $3{,}00x10^1$ $1{,}00x10^1$	10^1 10^1 10^1	$3{,}00x10^2$	$3{,}34x10^2$
Lack 1_3	1	$5{,}00x10^1$ $2{,}00x10^1$ $4{,}00x10^1$	10^1 10^1 10^1	$3{,}67x10^2$	
Lack 1_1	2	$3{,}03x10^3$ $3{,}13x10^3$ $2{,}91x10^3$	10^1 10^1 10^1	$3{,}02x10^4$	
Lack 1_2	2	$4{,}66x10^3$ $4{,}46x10^3$ $5{,}37x10^3$	10^1 10^1 10^1	$4{,}83x10^4$	$3{,}91x10^4$
Lack 1_3	2	$3{,}66x10^3$ $4{,}06x10^3$ $3{,}92x10^3$	10^1 10^1 10^1	$3{,}88x10^4$	
Lack 1_1	3	$5{,}40x10^2$ $6{,}30x10^2$ $4{,}40x10^2$	10^2 10^2 10^2	$5{,}85x10^4$	
Lack 1_2	3	$9{,}60x10^2$ $1{,}06x10^3$ $9{,}20x10^2$	10^2 10^2 10^2	$9{,}80x10^4$	$7{,}91x10^4$

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_3	3	$8{,}20\times10^{2}$ $8{,}10\times10^{2}$ $8{,}00\times10^{2}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$8{,}10\times10^{4}$	

Tabelle 39: Belastungstest Hefen im Weißlack mit MIT- und BIT-Eintrag aus Bindemittel vor Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$9{,}50\times10^{2}$ $9{,}20\times10^{2}$ $9{,}20\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$9{,}30\times10^{5}$	
Lack 1_2	0	$2{,}20\times10^{2}$ $1{,}50\times10^{2}$ $1{,}60\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}77\times10^{5}$	$8{,}50\times10^{5}$
Lack 1_3	0	$6{,}90\times10^{2}$ $8{,}10\times10^{2}$ $8{,}30\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$7{,}70\times10^{5}$	
Lack 1_1	1	$7{,}10\times10^{2}$ $5{,}30\times10^{2}$ $6{,}40\times10^{2}$	10^{1} 10^{1} 10^{1}	$6{,}27\times10^{3}$	
Lack 1_2	1	$6{,}80\times10^{2}$ $7{,}50\times10^{2}$ $7{,}10\times10^{2}$	10^{1} 10^{1} 10^{1}	$7{,}13\times10^{3}$	$7{,}14\times10^{3}$
Lack 1_3	1	$7{,}30\times10^{2}$ $8{,}50\times10^{2}$ $8{,}30\times10^{2}$	10^{1} 10^{1} 10^{1}	$8{,}03\times10^{3}$	
Lack 1_1	2	$3{,}12\times10^{3}$ $2{,}78\times10^{3}$ $2{,}91\times10^{3}$	10^{1} 10^{1} 10^{1}	$2{,}94\times10^{4}$	
Lack 1_2	2	$2{,}62\times10^{3}$ $2{,}56\times10^{3}$ $2{,}41\times10^{3}$	10^{1} 10^{1} 10^{1}	$2{,}53\times10^{4}$	$2{,}77\times10^{4}$
Lack 1_3	2	$3{,}42\times10^{3}$ $2{,}16\times10^{3}$ $2{,}91\times10^{3}$	10^{1} 10^{1} 10^{1}	$2{,}83\times10^{4}$	
Lack 1_1	3	$8{,}60\times10^{2}$ $9{,}30\times10^{2}$ $9{,}50\times10^{2}$	10^{1} 10^{1} 10^{1}	$9{,}13\times10^{3}$	
Lack 1_2	3	$1{,}06\times10^{3}$ $8{,}60\times10^{2}$ $8{,}80\times10^{2}$	10^{1} 10^{1} 10^{1}	$9{,}33\times10^{3}$	$1{,}45\times10^{4}$

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_3	3	$2,63x10^3$ $2,77x10^3$ $2,33x10^3$	10^1 10^1 10^1	$2,49x10^4$	

Tabelle 40: Belastungstest Hefen in der Lasur mit BIT-Eintrag aus Bindemittel vor Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$2,40x10^2$ $3,00x10^2$ $2,20x10^2$	10^3 10^3 10^3	$2,53x10^5$	
Lack 1_2	0	$4,40x10^2$ $4,00x10^2$ $4,30x10^3$	10^3 10^3 10^3	$4,23x10^5$	$3,32x10^5$
Lack 1_3	0	$3,50x10^2$ $2,60x10^2$ $3,50x10^2$	10^3 10^3 10^3	$3,20x10^5$	
Lack 1_1	1	$2,30x10^3$ $2,52x10^3$ $2,30x10^3$	10^2 10^2 10^2	$2,37x10^5$	
Lack 1_2	1	$2,30x10^3$ $4,36x10^3$ $4,17x10^3$	10^2 10^2 10^2	$3,61x10^5$	$2,63x10^5$
Lack 1_3	1	$1,93x10^3$ $1,73x10^3$ $2,07x10^3$	10^2 10^2 10^2	$1,91x10^5$	
Lack 1_1	2	$6,06x10^3$ $8,33x10^3$ $7,20x10^3$	10^2 10^2 10^2	$2,37x10^5$	
Lack 1_2	2	$1,39x10^4$ $1,17x10^4$ $9,49x10^3$	10^2 10^2 10^2	$1,17x10^6$	$7,04x10^5$
Lack 1_3	2	$6,63x10^3$ $6,82x10^3$ $7,20x10^3$	10^2 10^2 10^2	$6,88x10^5$	
Lack 1_1	3	$5,68x10^3$ $7,77x10^3$ $6,25x10^3$	10^2 10^2 10^2	$6,27x10^5$	
Lack 1_2	3	$5,30x10^3$ $6,06x10^3$ $6,63x10^3$	10^2 10^2 10^2	$6,00x10^5$	$5,89x10^5$

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_3	3	$5{,}11\times10^{3}$ $5{,}30\times10^{3}$ $4{,}92\times10^{3}$	10^{1} 10^{1} 10^{1}	$5{,}11\times10^{5}$	
Lack 1_1	6	$3{,}79\times10^{3}$ $5{,}11\times10^{3}$ $3{,}98\times10^{3}$	10^{1} 10^{1} 10^{1}	$4{,}29\times10^{5}$	
Lack 1_2	6	$5{,}87\times10^{3}$ $5{,}87\times10^{3}$ $4{,}17\times10^{3}$	10^{1} 10^{1} 10^{1}	$5{,}30\times10^{5}$	$4{,}80\times10^{5}$
Lack 1_3	6	$5{,}11\times10^{3}$ $5{,}11\times10^{3}$ $4{,}17\times10^{3}$	10^{1} 10^{1} 10^{1}	$4{,}80\times10^{5}$	

Tabelle 41: Belastungstest Hefen in der Lasur mit MIT- und BIT-Eintrag aus Bindemittel vor Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$1{,}80\times10^{2}$ $3{,}60\times10^{2}$ $2{,}00\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}47\times10^{5}$	
Lack 1_2	0	$4{,}40\times10^{2}$ $2{,}90\times10^{2}$ $3{,}20\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$3{,}50\times10^{5}$	$2{,}78\times10^{5}$
Lack 1_3	0	$3{,}00\times10^{2}$ $1{,}50\times10^{2}$ $2{,}60\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}37\times10^{5}$	
Lack 1_1	1	$1{,}13\times10^{3}$ $1{,}13\times10^{3}$ $1{,}08\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$1{,}11\times10^{5}$	
Lack 1_2	1	$5{,}00\times10^{3}$ $5{,}20\times10^{3}$ $6{,}50\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$5{,}57\times10^{5}$	$7{,}61\times10^{4}$
Lack 1_3	1	$6{,}20\times10^{3}$ $6{,}60\times10^{3}$ $5{,}70\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$6{,}17\times10^{5}$	
Lack 1_1	2	$2{,}30\times10^{3}$ $2{,}30\times10^{3}$ $2{,}74\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$2{,}44\times10^{5}$	
Lack 1_2	2	$1{,}25\times10^{4}$ $1{,}14\times10^{4}$ $1{,}01\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$1{,}13\times10^{6}$	$1{,}97\times10^{5}$

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_3	2	$2{,}30\times10^{3}$ $2{,}41\times10^{3}$ $2{,}30\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$2{,}33\times10^{5}$	
Lack 1_1	3	$5{,}87\times10^{3}$ $7{,}01\times10^{3}$ $7{,}20\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$6{,}69\times10^{5}$	
Lack 1_2	3	$5{,}68\times10^{3}$ $8{,}33\times10^{3}$ $7{,}20\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$7{,}07\times10^{5}$	$6{,}60\times10^{5}$
Lack 1_3	3	$5{,}49\times10^{3}$ $6{,}82\times10^{3}$ $6{,}06\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$6{,}12\times10^{5}$	
Lack 1_1	6	$6{,}25\times10^{3}$ $4{,}73\times10^{3}$ $5{,}49\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$5{,}49\times10^{5}$	
Lack 1_2	6	$3{,}79\times10^{3}$ $5{,}30\times10^{3}$ $5{,}11\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$4{,}73\times10^{5}$	$4{,}95\times10^{5}$
Lack 1_3	6	$5{,}49\times10^{3}$ $4{,}17\times10^{3}$ $4{,}27\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$4{,}64\times10^{5}$	

Tabelle 42: Belastungstest Hefen im Vorlack mit BIT-Eintrag aus Bindemittel vor Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$5{,}10\times10^{2}$ $4{,}30\times10^{2}$ $3{,}70\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$4{,}37\times10^{5}$	
Lack 1_2	0	$3{,}00\times10^{2}$ $3{,}90\times10^{2}$ $3{,}10\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$3{,}33\times10^{5}$	$3{,}62\times10^{5}$
Lack 1_3	0	$3{,}20\times10^{2}$ $2{,}50\times10^{2}$ $3{,}80\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$3{,}17\times10^{5}$	
Lack 1_1	1	$1{,}82\times10^{3}$ $2{,}19\times10^{3}$ $2{,}52\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$2{,}18\times10^{5}$	
Lack 1_2	1	$4{,}92\times10^{3}$ $5{,}30\times10^{3}$ $3{,}98\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$4{,}73\times10^{5}$	$4{,}53\times10^{5}$

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_3	1	$4{,}36\times10^{3}$ $4{,}92\times10^{3}$ $3{,}72\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$4{,}33\times10^{5}$	
Lack 1_1	2	$2{,}30\times10^{3}$ $2{,}30\times10^{3}$ $2{,}74\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$2{,}44\times10^{5}$	
Lack 1_2	2	$7{,}58\times10^{3}$ $8{,}33\times10^{3}$ $7{,}66\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$7{,}86\times10^{5}$	$7{,}59\times10^{5}$
Lack 1_3	2	$3{,}17\times10^{3}$ $3{,}94\times10^{3}$ $4{,}17\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$3{,}76\times10^{5}$	
Lack 1_1	3	$1{,}02\times10^{4}$ $1{,}50\times10^{4}$ $1{,}42\times10^{4}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$1{,}31\times10^{6}$	
Lack 1_2	3	$1{,}28\times10^{4}$ $1{,}17\times10^{4}$ $1{,}06\times10^{4}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$1{,}17\times10^{6}$	$1{,}28\times10^{6}$
Lack 1_3	3	$1{,}39\times10^{4}$ $1{,}28\times10^{4}$ $1{,}46\times10^{4}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$1{,}37\times10^{6}$	
Lack 1_1	6	$7{,}95\times10^{3}$ $4{,}55\times10^{3}$ $1{,}35\times10^{4}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$8{,}76\times10^{5}$	
Lack 1_2	6	$5{,}87\times10^{3}$ $5{,}68\times10^{3}$ $1{,}20\times10^{4}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$7{,}87\times10^{5}$	$8{,}27\times10^{5}$
Lack 1_3	6	$5{,}80\times10^{2}$ $4{,}70\times10^{2}$ $5{,}20\times10^{2}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$5{,}23\times10^{4}$	

Tabelle 43: Belastungstest Hefen im Vorlack mit MIT- und BIT-Eintrag aus Bindemittel vor Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$4{,}00\times10^{2}$ $3{,}90\times10^{2}$ $6{,}30\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$4{,}73\times10^{5}$	
Lack 1_2	0	$2{,}20\times10^{2}$ $3{,}40\times10^{2}$ $4{,}30\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$3{,}30\times10^{5}$	$3{,}62\times10^{5}$

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_3	0	$3{,}50\times10^{2}$ $3{,}60\times10^{2}$ $4{,}60\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$3{,}90\times10^{5}$	
Lack 1_1	1	$8{,}90\times10^{2}$ $9{,}70\times10^{2}$ $8{,}30\times10^{2}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$8{,}97\times10^{4}$	
Lack 1_2	1	$8{,}00\times10^{2}$ $1{,}03\times10^{3}$ $9{,}20\times10^{2}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$9{,}17\times10^{4}$	$1{,}03\times10^{5}$
Lack 1_3	1	$1{,}17\times10^{3}$ $1{,}32\times10^{3}$ $1{,}39\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$1{,}29\times10^{5}$	
Lack 1_1	2	$6{,}44\times10^{3}$ $8{,}76\times10^{3}$ $8{,}76\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$7{,}99\times10^{5}$	
Lack 1_2	2	$5{,}87\times10^{3}$ $7{,}01\times10^{3}$ $8{,}76\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$7{,}21\times10^{5}$	$7{,}26\times10^{5}$
Lack 1_3	2	$6{,}06\times10^{3}$ $7{,}01\times10^{3}$ $6{,}63\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$6{,}57\times10^{5}$	
Lack 1_1	3	$1{,}20\times10^{4}$ $1{,}24\times10^{4}$ $1{,}31\times10^{4}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$1{,}25\times10^{6}$	
Lack 1_2	3	$1{,}46\times10^{4}$ $1{,}53\times10^{4}$ $1{,}39\times10^{4}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$1{,}46\times10^{6}$	$1{,}32\times10^{6}$
Lack 1_3	3	$1{,}31\times10^{4}$ $1{,}24\times10^{4}$ $1{,}17\times10^{4}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$1{,}24\times10^{6}$	
Lack 1_1	6	$7{,}39\times10^{3}$ $7{,}66\times10^{3}$ $8{,}03\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$7{,}69\times10^{5}$	
Lack 1_2	6	$5{,}11\times10^{3}$ $8{,}39\times10^{3}$ $7{,}66\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$7{,}06\times10^{5}$	$6{,}99\times10^{5}$
Lack 1_3	6	$3{,}50\times10^{3}$ $6{,}25\times10^{3}$ $8{,}90\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$6{,}22\times10^{5}$	

Tabelle 44: Belastungstest Hefen im Weißlack mit BIT-Eintrag aus Bindemittel nach Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$7{,}00\times10^{2}$ $5{,}50\times10^{2}$ $5{,}40\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$5{,}97\times10^{5}$	
Lack 1_2	0	$5{,}80\times10^{2}$ $5{,}90\times10^{2}$ $7{,}50\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$6{,}40\times10^{5}$	$6{,}30\times10^{5}$
Lack 1_3	0	$7{,}90\times10^{2}$ $6{,}40\times10^{2}$ $7{,}00\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$7{,}10\times10^{5}$	
Lack 1_1	1	$3{,}00\times10^{1}$ $4{,}00\times10^{1}$ $6{,}00\times10^{1}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$4{,}33\times10^{4}$	
Lack 1_2	1	$6{,}00\times10^{1}$ $3{,}00\times10^{1}$ $3{,}00\times10^{1}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$4{,}00\times10^{4}$	$4{,}33\times10^{4}$
Lack 1_3	1	$5{,}00\times10^{1}$ $5{,}00\times10^{1}$ $4{,}00\times10^{1}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$4{,}67\times10^{4}$	
Lack 1_1	2	$1{,}08\times10^{3}$ $1{,}34\times10^{3}$ $1{,}49\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$1{,}21\times10^{5}$	
Lack 1_2	2	$1{,}33\times10^{3}$ $1{,}36\times10^{3}$ $1{,}28\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$1{,}32\times10^{5}$	$1{,}26\times10^{5}$
Lack 1_3	2	$1{,}24\times10^{3}$ $1{,}19\times10^{3}$ $1{,}28\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$1{,}24\times10^{5}$	
Lack 1_1	3	$2{,}03\times10^{3}$ $2{,}28\times10^{3}$ $1{,}71\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$2{,}01\times10^{5}$	
Lack 1_2	3	$1{,}50\times10^{3}$ $1{,}71\times10^{3}$ $1{,}67\times10^{2}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$1{,}63\times10^{5}$	$1{,}83\times10^{5}$
Lack 1_3	3	$1{,}79\times10^{3}$ $2{,}07\times10^{3}$ $1{,}71\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$1{,}86\times10^{5}$	
Lack 1_1	6	$1{,}95\times10^{3}$ $1{,}85\times10^{3}$ $2{,}08\times10^{3}$	10×10^{1} 10×10^{1} 10×10^{1}	$1{,}96\times10^{4}$	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_2	6	$1{,}48x10^3$ $1{,}53x10^3$ $1{,}28x10^2$	$10x10^1$ $10x10^1$ $10x10^1$	$1{,}43x10^4$	$1{,}61x10^4$
Lack 1_3	6	$1{,}53x10^3$ $1{,}45x10^3$ $1{,}37x10^3$	$10x10^1$ $10x10^1$ $10x10^1$	$1{,}45x10^4$	

Tabelle 45: Belastungstest Hefen im Weißlack mit MIT- und BIT-Eintrag aus Bindemittel nach Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$6{,}10x10^2$ $7{,}20x10^2$ $7{,}30x10^2$	10^3 10^3 10^3	$6{,}87x10^5$	
Lack 1_2	0	$5{,}60x10^2$ $4{,}30x10^2$ $6{,}40x10^3$	10^3 10^3 10^3	$5{,}43x10^5$	$6{,}28x10^5$
Lack 1_3	0	$7{,}00x10^2$ $5{,}80x10^2$ $6{,}80x10^2$	10^3 10^3 10^3	$6{,}53x10^5$	
Lack 1_1	1	$3{,}60x10^2$ $5{,}30x10^2$ $6{,}00x10^2$	10^3 10^3 10^3	$4{,}97x10^5$	
Lack 1_2	1	$3{,}40x10^2$ $4{,}50x10^2$ $3{,}10x10^3$	10^3 10^3 10^3	$3{,}67x10^5$	$4{,}12x10^5$
Lack 1_3	1	$3{,}40x10^2$ $3{,}60x10^2$ $4{,}20x10^2$	10^3 10^3 10^3	$3{,}73x10^5$	
Lack 1_1	2	$5{,}70x10^2$ $6{,}60x10^2$ $6{,}27x10^2$	10^2 10^2 10^2	$6{,}27x10^4$	
Lack 1_2	2	$8{,}30x10^2$ $9{,}70x10^2$ $8{,}40x10^2$	10^2 10^2 10^2	$8{,}80x10^4$	$7{,}21x10^4$
Lack 1_3	2	$7{,}60x10^2$ $6{,}40x10^2$ $5{,}70x10^2$	10^2 10^2 10^2	$6{,}57x10^4$	
Lack 1_1	3	$1{,}50x10^3$ $1{,}79x10^3$ $1{,}67x10^3$	10^2 10^2 10^2	$1{,}65x10^3$	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
				$1,63x10^3$	$1,63x10^5$
Lack 1_3	3	$1,91x10^3$ $1,42x10^3$ $1,50x10^3$	10^2 10^2 10^2	$1,61x10^4$	
Lack 1_1	6	$3,80x10^2$ $5,20x10^2$ $4,40x10^2$	unverdünnt unverdünnt unverdünnt	$4,47x10^2$	
Lack 1_2	6	$4,40x10^2$ $4,90x10^2$ $5,60x10^2$	unverdünnt unverdünnt unverdünnt	$4,97x10^2$	$4,18x10^2$
Lack 1_3	Lack 1_2	3	$1,42x10^3$ $1,87x10^3$ $1,59x10^3$	10^2 10^2 10^2	

Tabelle 46: Belastungstest Hefen in der Lasur mit BIT-Eintrag aus Bindemittel nach Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$3,90x10^2$ $3,30x10^2$ $3,10x10^2$	10^3 10^3 10^3	$3,04x10^5$	
Lack 1_2	0	$3,60x10^2$ $1,40x10^2$ $1,70x10^3$	10^3 10^3 10^3	$2,23x10^5$	$3,05x10^5$
Lack 1_3	0	$4,60x10^2$ $2,80x10^2$ $3,60x10^2$	10^3 10^3 10^3	$3,47x10^5$	
Lack 1_1	1	$8,00x10^1$ $6,10x10^2$ $5,00x10^2$	10^3 10^3 10^3	$3,39x10^5$	
Lack 1_2	1	$2,40x10^2$ $3,00x10^2$ $3,10x10^2$	10^3 10^3 10^3	$2,83x10^5$	$3,39x10^5$
Lack 1_3	1	$4,30x10^2$ $2,60x10^2$ $3,20x10^2$	10^3 10^3 10^3	$3,37x10^5$	
Lack 1_1	2	$8,03x10^3$ $9,12x10^3$ $8,03x10^3$	10^2 10^2 10^2	$8,39x10^5$	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_2	2	$1{,}06\times10^{4}$ $9{,}85\times10^{3}$ $9{,}49\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$9{,}98\times10^{5}$	$8{,}92\times10^{5}$
Lack 1_3	2	$9{,}12\times10^{3}$ $8{,}03\times10^{3}$ $8{,}03\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$8{,}39\times10^{5}$	
Lack 1_1	3	$1{,}89\times10^{4}$ $1{,}80\times10^{4}$ $1{,}67\times10^{4}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$1{,}79\times10^{6}$	
Lack 1_2	3	$1{,}14\times10^{4}$ $1{,}42\times10^{4}$ $1{,}48\times10^{4}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$1{,}34\times10^{6}$	$1{,}71\times10^{6}$
Lack 1_3	3	$1{,}88\times10^{4}$ $2{,}01\times10^{4}$ $2{,}14\times10^{4}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$2{,}01\times10^{6}$	
Lack 1_1	6	$6{,}44\times10^{3}$ $6{,}25\times10^{3}$ $7{,}39\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$6{,}69\times10^{5}$	
Lack 1_2	6	$6{,}06\times10^{3}$ $4{,}92\times10^{3}$ $4{,}92\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$5{,}30\times10^{5}$	$6{,}48\times10^{5}$
Lack 1_3	6	$8{,}33\times10^{3}$ $7{,}77\times10^{3}$ $6{,}25\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$7{,}45\times10^{5}$	

Tabelle 47: Belastungstest Hefen in der Lasur mit MIT- und BIT-Eintrag aus Bindemittel nach Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$4{,}30\times10^{2}$ $4{,}70\times10^{2}$ $6{,}00\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$5{,}00\times10^{5}$	
Lack 1_2	0	$4{,}00\times10^{2}$ $6{,}50\times10^{2}$ $4{,}60\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$5{,}03\times10^{5}$	$4{,}67\times10^{5}$
Lack 1_3	0	$3{,}20\times10^{2}$ $4{,}20\times10^{2}$ $4{,}50\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$3{,}97\times10^{5}$	
Lack 1_1	1	$2{,}70\times10^{2}$ $1{,}70\times10^{2}$ $2{,}20\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}20\times10^{5}$	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_2	1	$1{,}00\times10^{2}$ $1{,}00\times10^{2}$ $1{,}60\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}20\times10^{5}$	$1{,}70\times10^{5}$
Lack 1_3	1	$5{,}00\times10^{1}$ $3{,}00\times10^{1}$ $4{,}00\times10^{1}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$4{,}00\times10^{4}$	
Lack 1_1	2	$4{,}73\times10^{3}$ $5{,}30\times10^{3}$ $4{,}92\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$4{,}99\times10^{5}$	
Lack 1_2	2	$2{,}74\times10^{4}$ $3{,}06\times10^{4}$ $2{,}41\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$2{,}74\times10^{5}$	$3{,}92\times10^{5}$
Lack 1_3	2	$3{,}98\times10^{3}$ $4{,}17\times10^{3}$ $3{,}98\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$4{,}04\times10^{5}$	
Lack 1_1	3	$6{,}25\times10^{3}$ $5{,}11\times10^{3}$ $6{,}44\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$5{,}93\times10^{5}$	
Lack 1_2	3	$9{,}85\times10^{3}$ $9{,}47\times10^{3}$ $1{,}02\times10^{4}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$9{,}85\times10^{5}$	$8{,}46\times10^{5}$
Lack 1_3	3	$9{,}28\times10^{3}$ $9{,}85\times10^{3}$ $9{,}66\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$9{,}60\times10^{5}$	
Lack 1_1	6	$5{,}87\times10^{3}$ $4{,}73\times10^{3}$ $5{,}11\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$5{,}24\times10^{5}$	
Lack 1_2	6	$6{,}25\times10^{3}$ $5{,}30\times10^{3}$ $5{,}49\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$5{,}68\times10^{5}$	$5{,}72\times10^{5}$
Lack 1_3	6	$7{,}39\times10^{3}$ $4{,}92\times10^{3}$ $6{,}44\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$6{,}25\times10^{5}$	

Tabelle 48: Belastungstest Hefen im Vorlack mit BIT-Eintrag aus Bindemittel nach Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$3{,}80\times10^{2}$ $4{,}30\times10^{2}$ $3{,}70\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$3{,}93\times10^{5}$	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_2	0	$3{,}80\times10^{2}$ $3{,}90\times10^{2}$ $4{,}10\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$3{,}93\times10^{5}$	$3{,}63\times10^{5}$
Lack 1_3	0	$3{,}20\times10^{2}$ $2{,}70\times10^{2}$ $3{,}20\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$3{,}03\times10^{5}$	
Lack 1_1	1	$8{,}80\times10^{2}$ $6{,}90\times10^{2}$ $7{,}90\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$7{,}87\times10^{5}$	
Lack 1_2	1	$7{,}00\times10^{2}$ $6{,}00\times10^{2}$ $8{,}30\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$7{,}20\times10^{5}$	$6{,}73\times10^{5}$
Lack 1_3	1	$4{,}90\times10^{2}$ $5{,}60\times10^{2}$ $5{,}20\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$5{,}23\times10^{5}$	
Lack 1_1	2	$3{,}10\times10^{2}$ $2{,}70\times10^{2}$ $3{,}90\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$3{,}25\times10^{5}$	
Lack 1_2	2	$3{,}10\times10^{2}$ $4{,}20\times10^{2}$ $4{,}20\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$3{,}83\times10^{5}$	3.05×10^{5}
Lack 1_3	2	$2{,}00\times10^{2}$ $1{,}80\times10^{2}$ $2{,}40\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}07\times10^{5}$	
Lack 1_1	3	$8{,}60\times10^{2}$ $9{,}60\times10^{2}$ $9{,}60\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$9{,}27\times10^{5}$	
Lack 1_2	3	$8{,}50\times10^{2}$ $9{,}90\times10^{2}$ $1{,}06\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$5{,}67\times10^{5}$	$8{,}2510^{5}$
Lack 1_3	3	$5{,}80\times10^{2}$ $7{,}30\times10^{2}$ $7{,}40\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$6{,}83\times10^{5}$	
Lack 1_1	6	$5{,}49\times10^{3}$ $8{,}52\times10^{3}$ $7{,}33\times10^{3}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$7{,}26\times10^{5}$	
Lack 1_2	6	$6{,}44\times10^{3}$ $7{,}39\times10^{3}$ $1{,}06\times10^{4}$	10^{2} 10^{2} 10^{2}	$8{,}14\times10^{5}$	$7{,}68\times10^{5}$

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_3	6	$7{,}39 \times 10^3$ $9{,}28 \times 10^3$ $6{,}25 \times 10^3$	10^2 10^2 10^2	$7{,}64 \times 10^5$	

Tabelle 49: Belastungstest Hefen im Vorlack mit MIT- und BIT-Eintrag aus Bindemittel nach Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$9{,}10 \times 10^2$ $5{,}20 \times 10^2$ $4{,}20 \times 10^2$	10^3 10^3 10^3	$6{,}17 \times 10^5$	
Lack 1_2	0	$4{,}00 \times 10^2$ $5{,}10 \times 10^2$ $5{,}60 \times 10^3$	10^3 10^3 10^3	$4{,}90 \times 10^5$	5,55x105
Lack 1_3	0	$7{,}10 \times 10^2$ $5{,}40 \times 10^2$ $4{,}20 \times 10^2$	10^3 10^3 10^3	$5{,}57 \times 10^5$	
Lack 1_1	1	$5{,}00 \times 10^1$ $5{,}00 \times 10^1$ $1{,}00 \times 10^1$	10^3 10^3 10^3	$3{,}67 \times 10^4$	
Lack 1_2	1	$5{,}00 \times 10^1$ $5{,}00 \times 10^1$ $3{,}00 \times 10^1$	10^3 10^3 10^3	$4{,}33 \times 10^4$	$3{,}43 \times 10^4$
Lack 1_3	1	$2{,}00 \times 10^1$ $3{,}00 \times 10^1$ $2{,}00 \times 10^1$	10^3 10^3 10^3	$2{,}33 \times 10^5$	
Lack 1_1	2	$5{,}30 \times 10^3$ $5{,}68 \times 10^3$ $6{,}06 \times 10^3$	10^2 10^2 10^2	$5{,}49 \times 10^5$	
Lack 1_2	2	$6{,}63 \times 10^3$ $5{,}11 \times 10^3$ $5{,}49 \times 10^3$	10^2 10^2 10^2	$5{,}87 \times 10^5$	$6{,}40 \times 10^5$
Lack 1_3	2	$7{,}66 \times 10^3$ $7{,}66 \times 10^3$ $8{,}03 \times 10^3$	10^2 10^2 10^2	$7{,}85 \times 10^5$	
Lack 1_1	3	$8{,}14 \times 10^3$ $6{,}44 \times 10^3$ $6{,}63 \times 10^3$	10^2 10^2 10^2	$7{,}07 \times 10^5$	
Lack 1_2	3	$1{,}08 \times 10^4$ $1{,}12 \times 10^4$ $1{,}14 \times 10^4$	10^2 10^2 10^2	$1{,}11 \times 10^6$	$9{,}02 \times 10^5$

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_3	3	$7,58x10^3$ $9,85x10^3$ $9,28x10^3$	10^2 10^2 10^2	$8,90x10^5$	
Lack 1_1	6	$1,60x10^3$ $1,49x10^3$ $1,73x10^3$	10^2 10^2 10^2	$1,61x10^5$	
Lack 1_2	6	$2,23x10^3$ $2,47x10^3$ $2,65x10^3$	10^2 10^2 10^2	$2,45x10^5$	$2,03x10^5$
Lack 1_3	6	$5,68x10^3$ $5,87x10^3$ $6,82x10^3$	10^2 10^2 10^2	$6,12x10^5$	

Tabelle 50: Belastungstest Bakterien in der Richtrezeptur für Weißlacke vor Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$1,90x10^3$ $1,98x10^3$ $1,87x10^3$	10^3 10^3 10^3	$1,92x10^6$	
Lack 1_2	0	$1,43x10^3$ $1,56x10^3$ $1,50x10^3$	10^3 10^3 10^3	$1,50x10^6$	
Lack 1_3	0	$1,19x10^3$ $1,25x10^3$ $1,41x10^3$	10^3 10^3 10^3	$1,28x10^6$	
Lack 1_4	0	$1,58x10^3$ $1,47x10^3$ $1,75x10^3$	10^3 10^3 10^3	$1,66x10^6$	$1,54x10^6$
Lack 1_5	0	$1,38x10^3$ $1,48x10^3$ $1,38x10^3$	10^3 10^3 10^3	$1,42x10^6$	

Ab Woche 1 waren weder Kolonien noch Wachstum zu verzeichnen.

Tabelle 51: Belastungstest Bakterien in der Richtrezeptur für Lasuren vor Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$2,14x10^3$ $2,02x10^3$ $1,78x10^3$	10^3 10^3 10^3	$1,98x10^6$	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_2	0	$1{,}44\times10^{3}$ $1{,}25\times10^{3}$ $1{,}18\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}25\times10^{6}$	
Lack 1_3	0	$2{,}15\times10^{3}$ $2{,}28\times10^{3}$ $2{,}07\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}17\times10^{6}$	$1{,}71\times10^{6}$
Lack 1_4	0	$1{,}61\times10^{3}$ $1{,}34\times10^{3}$ $1{,}41\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}45\times10^{6}$	$1{,}54\times10^{6}$
Lack 1_5	0	$1{,}75\times10^{3}$ $1{,}44\times10^{3}$ $1{,}86\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}68\times10^{6}$	

Ab Woche 1 waren weder Kolonien noch Wachstum zu verzeichnen.

Tabelle 52: Belastungstest Bakterien in der Richtrezeptur für Vorlacke vor Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$1{,}40\times10^{3}$ $1{,}30\times10^{3}$ $1{,}27\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}52\times10^{6}$	
Lack 1_2	0	$1{,}62\times10^{3}$ $1{,}68\times10^{3}$ $1{,}30\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}53\times10^{6}$	
Lack 1_3	0	$9{,}70\times10^{2}$ $1{,}03\times10^{3}$ $8{,}90\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$9{,}63\times10^{5}$	$1{,}20\times10^{6}$
Lack 1_4	0	$9{,}50\times10^{2}$ $1{,}03\times10^{3}$ $1{,}03\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$9{,}93\times10^{5}$	
Lack 1_1	2	$6{,}39\times10^{4}$ $5{,}46\times10^{4}$ $5{,}74\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$5{,}68\times10^{7}$	
Lack 1_2	2	- $4{,}17\times10^{4}$ $4{,}17\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$4{,}31\times10^{7}$	
Lack 1_3	2	$6{,}30\times10^{4}$ $6{,}20\times10^{4}$ $6{,}76\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$6{,}42\times10^{7}$	$5{,}47\times10^{7}$
Lack 1_4	2	$5{,}74\times10^{4}$ $5{,}33\times10^{4}$ $6{,}11\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$5{,}93\times10^{7}$	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_5	2	$5{,}74x10^4$ $5{,}37x10^4$ $5{,}93x10^4$	10^3 10^3 10^3	$5{,}68x10^7$	
Lack 1_1	3	$1{,}07x10^5$ $1{,}27x10^5$ $1{,}31x10^5$	10^3 10^3 10^3	$1{,}22x10^8$	
Lack 1_2	3	$1{,}34x10^5$ $1{,}39x10^5$ $1{,}28x10^5$	10^3 10^3 10^3	$1{,}374x10^8$	
Lack 1_3	3	$1{,}53x10^5$ $1{,}48x10^5$ $1{,}57x10^5$	10^3 10^3 10^3	$1{,}53x10^8$	$1{,}36x10^8$
Lack 1_4	3	$1{,}40x10^5$ $1{,}28x10^5$ $1{,}31x10^5$	10^3 10^3 10^3	$1{,}33x10^8$	
Lack 1_5	3	$1{,}36x10^5$ $1{,}16x10^5$ $1{,}29x10^5$	10^3 10^3 10^3	$1{,}2x10^8$	
Lack 1_1	6	$1{,}41x10^5$ $1{,}33x10^5$ $1{,}29x10^5$	10^3 10^3 10^3	$1{,}34x10^8$	
Lack 1_2	6	$1{,}22x10^5$ $1{,}38x10^5$ $1{,}26x10^5$	10^3 10^3 10^3	$1{,}29x10^8$	
Lack 1_3	6	$1{,}43x10^5$ $1{,}50x10^5$ $1{,}53x10^5$	10^3 10^3 10^3	$1{,}43x10^8$	$1{,}35x10^8$
Lack 1_4	6	$1{,}20x10^5$ $1{,}13x10^5$ $1{,}30x10^5$	10^3 10^3 10^3	$1{,}21x10^8$	
Lack 1_5	6	$1{,}18x10^5$ $1{,}10x10^5$ $1{,}18x10^5$	10^3 10^3 10^3	$1{,}15x10^8$	

Tabelle 53: Belastungstest Bakterien in der Richtrezeptur für Weißlacke nach Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$1{,}82x10^3$ $2{,}21x10^3$ $2{,}35x10^3$	10^3 10^3 10^3	$2{,}13x10^6$	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_2	0	2,54x10³ 2,24x10³ 2,19x10³	10³ 10³ 10³	2,32x10⁶	
Lack 1_3	0	2,28x10³ 2,44x10³ 2,38x10³	10³ 10³ 10³	2,37x10⁶	
Lack 1_4	0	2,47x10³ 2,81x10³ 2,41x10³	10³ 10³ 10³	2,56x10⁶	2,36x10⁶
Lack 1_5	0	2,62x10³ 2,44x10³ 2,26x10³	10³ 10³ 10³	2,44x10⁶	

Tabelle 54: Belastungstest Bakterien in der Richtrezeptur für Lasuren nach Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	1,36x10³ 1,30x10³ 1,42x10³	10³ 10³ 10³	1,36x10⁶	
Lack 1_2	0	1,38x10³ 1,47x10³ 1,31x10³	10³ 10³ 10³	1,38x10⁶	
Lack 1_3	0	1,34x10³ 1,37x10³ 1,45x10³	10³ 10³ 10³	1,39x10⁶	1,32x10⁶
Lack 1_4	0	1,26x10³ 1,06x10³ -	10³ 10³ 10³	1,16x10⁶	
Lack 1_5	0	1,43x10³ 1,32x10³ 1,18x10³	10³ 10³ 10³	1,31x10⁶	

Ab Woche 1 waren weder Kolonien noch Wachstum zu verzeichnen.

Tabelle 55: Belastungstest Bakterien in der Richtrezeptur für Vorlacke nach Alterung

Probe		Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert
Lack 1_1		0	9,70x10² 9,20x10² 1,07x10³	10³ 10³ 10³	9,90x10⁵	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_2	0	$1{,}41\times10^{3}$ $1{,}53\times10^{3}$ $1{,}27\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}42\times10^{6}$	
Lack 1_3	0	$1{,}64\times10^{3}$ $1{,}69\times10^{3}$ $1{,}73\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}69\times10^{6}$	$1{,}42\times10^{6}$
Lack 1_4	0	$1{,}53\times10^{3}$ $1{,}40\times10^{3}$ $1{,}47\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}47\times10^{6}$	
Lack 1_5	0	$1{,}38\times10^{3}$ $1{,}50\times10^{3}$ $1{,}78\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}55\times10^{6}$	
Lack 1_1	1	$2{,}40\times10^{2}$ $3{,}40\times10^{2}$ $3{,}50\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$3{,}10\times10^{5}$	
Lack 1_2	1	$6{,}50\times10^{2}$ $7{,}50\times10^{2}$ $6{,}20\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$6{,}72\times10^{5}$	
Lack 1_3	1	$5{,}60\times10^{2}$ $4{,}50\times10^{2}$ $4{,}10\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$4{,}73\times10^{5}$	$4{,}85\times10^{5}$
Lack 1_4	1	$5{,}00\times10^{1}$ $8{,}00\times10^{1}$ $4{,}00\times10^{1}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$5{,}67\times10^{4}$	
Lack 1_5	1	$6{,}00\times10^{1}$ $6{,}00\times10^{1}$ $1{,}50\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$9{,}90\times10^{4}$	
Lack 1_1	2	$4{,}63\times10^{4}$ $4{,}91\times10^{4}$ $5{,}00\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$4{,}85\times10^{7}$	
Lack 1_2	2	$8{,}70\times10^{4}$ $1{,}00\times10^{5}$ $7{,}59\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$8{,}77\times10^{7}$	
Lack 1_3	2	$3{,}52\times10^{4}$ $3{,}15\times10^{4}$ $3{,}80\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$3{,}49\times10^{7}$	$4{,}17\times10^{7}$
Lack 1_4	2	$3{,}43\times10^{4}$ $3{,}52\times10^{4}$ $2{,}96\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$3{,}30\times10^{7}$	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_5	2	$5{,}56\times10^{4}$ $5{,}65\times10^{4}$ $5{,}28\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$5{,}49\times10^{7}$	
Lack 1_1	3	$1{,}06\times10^{5}$ $1{,}06\times10^{5}$ $1{,}28\times10^{5}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}13\times10^{8}$	
Lack 1_2	3	$1{,}10\times10^{5}$ $1{,}01\times10^{5}$ $1{,}06\times10^{5}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}06\times10^{8}$	
Lack 1_3	3	$1{,}06\times10^{5}$ $1{,}18\times10^{5}$ $1{,}31\times10^{5}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}18\times10^{8}$	$1{,}12\times10^{8}$
Lack 1_4	3	$1{,}13\times10^{5}$ $1{,}18\times10^{5}$ $1{,}04\times10^{5}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}11\times10^{8}$	
Lack 1_5	3	$1{,}06\times10^{5}$ $1{,}19\times10^{5}$ $7{,}96\times10^{4}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}01\times10^{8}$	
Lack 1_1	6	$1{,}50\times10^{5}$ $1{,}63\times10^{5}$ $1{,}44\times10^{5}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}52\times10^{8}$	
Lack 1_2	6	$1{,}27\times10^{5}$ $1{,}45\times10^{5}$ $1{,}50\times10^{5}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}41\times10^{8}$	
Lack 1_3	6	$1{,}20\times10^{5}$ $1{,}12\times10^{5}$ $1{,}31\times10^{5}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}21\times10^{8}$	$1{,}38\times10^{8}$
Lack 1_4	6	$1{,}30\times10^{5}$ $1{,}42\times10^{5}$ $1{,}34\times10^{5}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}35\times10^{8}$	
Lack 1_5	6	$1{,}33\times10^{5}$ $1{,}22\times10^{5}$ $1{,}38\times10^{5}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}31\times10^{8}$	

Tabelle 56: Belastungstest Hefen in der Richtrezeptur für Weißlacke vor Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$9{,}60\times10^{2}$ $1{,}75\times10^{3}$ $1{,}66\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}46\times10^{6}$	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_2	0	$1{,}30\times10^{3}$ $1{,}50\times10^{3}$ $2{,}07\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}62\times10^{6}$	
Lack 1_3	0	$2{,}02\times10^{3}$ $2{,}11\times10^{3}$ $2{,}01\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}05\times10^{6}$	$1{,}66\times10^{6}$
Lack 1_4	0	$1{,}20\times10^{3}$ $1{,}24\times10^{3}$ $1{,}41\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}28\times10^{6}$	
Lack 1_5	0	$1{,}80\times10^{3}$ $1{,}56\times10^{3}$ $2{,}27\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}88\times10^{6}$	
Lack 1_1	1	$4{,}20\times10^{2}$ $4{,}90\times10^{2}$ $7{,}00\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$5{,}35\times10^{5}$	
Lack 1_2	1	$4{,}10\times10^{2}$ $5{,}20\times10^{2}$ $6{,}30\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$5{,}20\times10^{5}$	
Lack 1_3	1	$6{,}40\times10^{2}$ $7{,}30\times10^{2}$ $7{,}60\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$7{,}10\times10^{5}$	$5{,}10\times10^{5}$
Lack 1_4	1	$2{,}10\times10^{2}$ $4{,}30\times10^{2}$ $2{,}90\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$3{,}10\times10^{5}$	
Lack 1_5	1	$3{,}20\times10^{2}$ $3{,}10\times10^{2}$ $7{,}90\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$4{,}73\times10^{5}$	
Lack 1_1	2	$6{,}20\times10^{2}$ $5{,}80\times10^{2}$ $7{,}70\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$6{,}57\times10^{5}$	
Lack 1_2	2	$6{,}30\times10^{2}$ $6{,}90\times10^{2}$ $9{,}40\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$7{,}53\times10^{5}$	
Lack 1_3	2	$9{,}40\times10^{2}$ $7{,}60\times10^{2}$ $7{,}50\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$8{,}17\times10^{5}$	$7{,}42\times10^{5}$
Lack 1_4	2	$7{,}90\times10^{2}$ $9{,}60\times10^{2}$ $1{,}03\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$9{,}27\times10^{5}$	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_5	2	$5{,}70\times10^{2}$ $4{,}70\times10^{2}$ $6{,}40\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$5{,}60\times10^{5}$	
Lack 1_1	3	$2{,}03\times10^{3}$ $1{,}82\times10^{3}$ $2{,}18\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}01\times10^{6}$	
Lack 1_2	3	$2{,}22\times10^{3}$ $2{,}46\times10^{3}$ $2{,}72\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}47\times10^{6}$	
Lack 1_3	3	$2{,}43\times10^{3}$ $2{,}02\times10^{3}$ $2{,}21\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}22\times10^{6}$	$2{,}62\times10^{6}$
Lack 1_4	3	$2{,}02\times10^{3}$ $2{,}19\times10^{3}$ $2{,}04\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}08\times10^{6}$	
Lack 1_5	3	$2{,}13\times10^{3}$ $2{,}29\times10^{3}$ $2{,}35\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}28\times10^{6}$	
Lack 1_1	6	$8{,}20\times10^{2}$ $8{,}30\times10^{2}$ $9{,}00\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$8{,}50\times10^{5}$	
Lack 1_2	6	$9{,}80\times10^{2}$ $8{,}30\times10^{2}$ $9{,}00\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$9{,}03\times10^{5}$	
Lack 1_3	6	$1{,}09\times10^{3}$ $1{,}22\times10^{3}$ $1{,}20\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}76\times10^{6}$	$9{,}74\times10^{5}$
Lack 1_4	6	-	-	-	
Lack 1_5	6	$8{,}00\times10^{2}$ $7{,}00\times10^{2}$ $1{,}06\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}06\times10^{6}$	

Tabelle 57: Belastungstest Hefen in der Richtrezeptur für Lasuren vor Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$8{,}50\times10^{2}$ $6{,}90\times10^{2}$ $8{,}70\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$8{,}03\times10^{5}$	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_2	0	$1{,}33\times10^{3}$ $1{,}20\times10^{3}$ $9{,}70\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}17\times10^{6}$	
Lack 1_3	0	$1{,}05\times10^{3}$ $1{,}27\times10^{3}$ $1{,}09\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}14\times10^{6}$	$9{,}01\times10^{5}$
Lack 1_4	0	$8{,}40\times10^{2}$ $9{,}90\times10^{2}$ $7{,}30\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$8{,}53\times10^{5}$	
Lack 1_5	0	$4{,}10\times10^{2}$ $5{,}50\times10^{2}$ $6{,}60\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$5{,}40\times10^{5}$	
Lack 1_1	1	$1{,}18\times10^{3}$ $1{,}28\times10^{3}$ $4{,}13\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}20\times10^{6}$	
Lack 1_2	1	$8{,}40\times10^{2}$ $1{,}00\times10^{3}$ $1{,}36\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}07\times10^{6}$	
Lack 1_3	1	$1{,}03\times10^{3}$ $9{,}40\times10^{2}$ $1{,}46\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}14\times10^{6}$	$1{,}47\times10^{6}$
Lack 1_4	1	$1{,}12\times10^{3}$ $1{,}11\times10^{3}$ $1{,}11\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}11\times10^{6}$	
Lack 1_5	1	$9{,}60\times10^{2}$ $1{,}04\times10^{3}$ $8{,}40\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$9{,}47\times10^{5}$	
Lack 1_1	2	$1{,}60\times10^{3}$ $2{,}07\times10^{3}$ $2{,}27\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}96\times10^{6}$	
Lack 1_2	2	$2{,}07\times10^{2}$ $1{,}60\times10^{3}$ $1{,}80\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}82\times10^{6}$	
Lack 1_3	2	$2{,}00\times10^{3}$ $2{,}20\times10^{3}$ $1{,}80\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}00\times10^{6}$	$2{,}42\times10^{6}$
Lack 1_4	2	$2{,}20\times10^{3}$ $2{,}13\times10^{3}$ $1{,}93\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}03\times10^{6}$	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_5	2	$2{,}40\times10^{3}$ $2{,}47\times10^{3}$ $2{,}40\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}09\times10^{6}$	
Lack 1_1	3	$2{,}58\times10^{3}$ $2{,}68\times10^{3}$ $3{,}29\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}85\times10^{6}$	
Lack 1_2	3	$2{,}40\times10^{3}$ $2{,}38\times10^{3}$ $2{,}95\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}58\times10^{6}$	
Lack 1_3	3	$2{,}85\times10^{3}$ $2{,}93\times10^{3}$ $2{,}88\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}89\times10^{6}$	$2{,}77\times10^{6}$
Lack 1_4	3	$1{,}53\times10^{3}$ $1{,}66\times10^{3}$ $2{,}26\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}82\times10^{6}$	
Lack 1_5	3	$2{,}45\times10^{3}$ $2{,}44\times10^{3}$ $2{,}72\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}54\times10^{6}$	
Lack 1_1	6	$1{,}15\times10^{3}$ $1{,}22\times10^{3}$ $1{,}44\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}37\times10^{6}$	
Lack 1_2	6	$1{,}67\times10^{3}$ $1{,}79\times10^{3}$ $1{,}99\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}82\times10^{6}$	
Lack 1_3	6	$1{,}72\times10^{3}$ $1{,}92\times10^{3}$ $2{,}50\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}82\times10^{6}$	$1{,}67\times10^{6}$
Lack 1_4	6	$9{,}90\times10^{2}$ $8{,}70\times10^{2}$ $6{,}70\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$8{,}43\times10^{5}$	
Lack 1_5	6	$1{,}24\times10^{3}$ $1{,}76\times10^{3}$ $2{,}07\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}96\times10^{6}$	

Tabelle 58: Belastungstest Hefen in der Richtrezeptur für Vorlacke vor Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$4{,}60\times10^{2}$ $5{,}80\times10^{2}$ $7{,}40\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$5{,}93\times10^{5}$	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_2	0	$5,70x10^2$ $9,30x10^2$ $1,09x10^3$	10^3 10^3 10^3	$8,63x10^5$	
Lack 1_3	0	$4,70x10^2$ $3,70x10^2$ $6,20x10^2$	10^3 10^3 10^3	$4,87x10^5$	$6,75x10^5$
Lack 1_4	0	$7,20x10^2$ $1,09x10^3$ $7,40x10^2$	10^3 10^3 10^3	$8,50x10^5$	
Lack 1_5	0	$4,70x10^2$ $5,50x10^2$ $7,20x10^2$	10^3 10^3 10^3	$5,80x10^5$	
Lack 1_1	1	$4,81x10^3$ $6,24x10^3$ $5,91x10^3$	10^3 10^3 10^3	$5,65x10^6$	
Lack 1_2	1	$6,46x10^3$ $5,91x10^3$ $7,00x10^3$	10^3 10^3 10^3	$6,46x10^6$	
Lack 1_3	1	$5,58x10^3$ $4,70x10^3$ $5,14x10^3$	10^3 10^3 10^3	$5,14x10^6$	$5,51x10^6$
Lack 1_4	1	$4,60x10^3$ $6,35x10^3$ $6,46x10^3$	10^3 10^3 10^3	$5,80x10^6$	
Lack 1_5	1	$4,92x10^3$ $4,92x10^3$ $4,70x10^3$	10^3 10^3 10^3	$4,85x10^5$	
Lack 1_1	2	$4,05x10^3$ $3,94x10^3$ $4,70x10^3$	10^3 10^3 10^3	$4,23x10^6$	
Lack 1_2	2	$5,25x10^2$ $5,25x10^3$ $5,69x10^3$	10^3 10^3 10^3	$5,40x10^6$	
Lack 1_3	2	$3,06x10^3$ $2,19x10^3$ $3,72x10^3$	10^3 10^3 10^3	$2,99x10^6$	$4,82x10^6$
Lack 1_4	2	$4,49x10^3$ $5,03x10^3$ $4,60x10^3$	10^3 10^3 10^3	$4,70x10^6$	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_5	2	$5{,}69\times10^{3}$ $4{,}27\times10^{3}$ $5{,}91\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$5{,}29\times10^{6}$	
Lack 1_1	3	$4{,}11\times10^{3}$ $4{,}29\times10^{3}$ $4{,}57\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$4{,}32\times10^{6}$	
Lack 1_2	3	$3{,}79\times10^{3}$ $6{,}06\times10^{3}$ $5{,}11\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$4{,}99\times10^{6}$	
Lack 1_3	3	$3{,}17\times10^{3}$ $3{,}28\times10^{3}$ $3{,}72\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$3{,}39\times10^{6}$	$4{,}23\times10^{6}$
Lack 1_4	3	$3{,}98\times10^{3}$ $4{,}92\times10^{3}$ $4{,}92\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$4{,}61\times10^{6}$	
Lack 1_5	3	$5{,}30\times10^{3}$ $5{,}30\times10^{3}$ $5{,}87\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$5{,}49\times10^{6}$	
Lack 1_1	6	$1{,}53\times10^{3}$ $2{,}16\times10^{3}$ $1{,}73\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}69\times10^{6}$	
Lack 1_2	6	$1{,}71\times10^{3}$ $1{,}93\times10^{3}$ $1{,}90\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}85\times10^{6}$	
Lack 1_3	6	$1{,}72\times10^{3}$ $2{,}07\times10^{3}$ $2{,}48\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}16\times10^{6}$	$1{,}90\times10^{6}$
Lack 1_4	6	$2{,}35\times10^{3}$ $2{,}23\times10^{3}$ $2{,}65\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}41\times10^{6}$	
Lack 1_5	6	$1{,}10\times10^{3}$ $2{,}03\times10^{3}$ $2{,}32\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}82\times10^{6}$	

Tabelle 59: Belastungstest Hefen in der Richtrezeptur für Weißlacke nach Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$2{,}30\times10^{2}$ $2{,}30\times10^{2}$ $2{,}30\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}30\times10^{5}$	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_2	0	$1{,}12\times10^{3}$ $1{,}13\times10^{3}$ $1{,}03\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}10\times10^{6}$	
Lack 1_3	0	$7{,}10\times10^{2}$ $6{,}50\times10^{2}$ $6{,}60\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$6{,}73\times10^{5}$	$9{,}00\times10^{5}$
Lack 1_4	0	$5{,}40\times10^{2}$ $6{,}50\times10^{2}$ $4{,}40\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$5{,}43\times10^{5}$	
Lack 1_5	0	$9{,}10\times10^{2}$ $7{,}00\times10^{2}$ $7{,}90\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$8{,}50\times10^{5}$	
Lack 1_1	1	$1{,}10\times10^{3}$ $1{,}01\times10^{3}$ $1{,}22\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}11\times10^{6}$	
Lack 1_2	1	$8{,}20\times10^{2}$ $6{,}80\times10^{2}$ $9{,}00\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$8{,}00\times10^{5}$	
Lack 1_3	1	$1{,}40\times10^{3}$ $1{,}43\times10^{3}$ $1{,}51\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}45\times10^{6}$	$1{,}13\times10^{6}$
Lack 1_4	1	$6{,}80\times10^{2}$ $8{,}30\times10^{2}$ $9{,}80\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$8{,}30\times10^{5}$	
Lack 1_5	1	$1{,}43\times10^{3}$ $1{,}28\times10^{3}$ $1{,}60\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}44\times10^{6}$	
Lack 1_1	2	$1{,}79\times10^{3}$ $2{,}14\times10^{3}$ $1{,}91\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}95\times10^{6}$	
Lack 1_2	2	$1{,}66\times10^{3}$ $1{,}59\times10^{3}$ $1{,}36\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}54\times10^{6}$	
Lack 1_3	2	$7{,}60\times10^{2}$ $7{,}50\times10^{2}$ $8{,}90\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$7{,}80\times10^{5}$	$1{,}75\times10^{6}$
Lack 1_4	2	$1{,}45\times10^{3}$ $1{,}78\times10^{3}$ $1{,}76\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}66\times10^{6}$	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_5	2	$9{,}50\times10^{2}$ $1{,}08\times10^{3}$ $1{,}18\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}07\times10^{6}$	
Lack 1_1	3	$2{,}31\times10^{3}$ $2{,}48\times10^{3}$ $2{,}94\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}58\times10^{6}$	
Lack 1_2	3	$1{,}83\times10^{3}$ $1{,}93\times10^{3}$ $1{,}86\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}87\times10^{6}$	
Lack 1_3	3	$2{,}60\times10^{3}$ $2{,}72\times10^{3}$ $2{,}54\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}62\times10^{6}$	$2{,}36\times10^{6}$
Lack 1_4	3	$1{,}85\times10^{3}$ $2{,}20\times10^{3}$ $2{,}46\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}17\times10^{6}$	
Lack 1_5	3	$2{,}19\times10^{3}$ $3{,}50\times10^{3}$ $3{,}83\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$3{,}17\times10^{6}$	
Lack 1_1	6	$1{,}95\times10^{3}$ $2{,}04\times10^{3}$ $2{,}13\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}04\times10^{6}$	
Lack 1_2	6	$2{,}23\times10^{3}$ $2{,}31\times10^{3}$ $2{,}70\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}41\times10^{6}$	
Lack 1_3	6	$2{,}05\times10^{3}$ $2{,}13\times10^{3}$ $2{,}65\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}28\times10^{6}$	$2{,}24\times10^{6}$
Lack 1_4	6	$1{,}35\times10^{3}$ $1{,}45\times10^{3}$ $1{,}83\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}54\times10^{6}$	
Lack 1_5	6	$2{,}10\times10^{3}$ $2{,}42\times10^{3}$ $2{,}59\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}37\times10^{6}$	

Tabelle 60: Belastungstest Hefen in der Richtrezeptur für Vorlacke nach Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$8{,}80\times10^{2}$ $7{,}80\times10^{2}$ $5{,}60\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$7{,}40\times10^{5}$	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_2	0	$4{,}20\times10^{2}$ $5{,}90\times10^{2}$ $6{,}10\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$5{,}40\times10^{5}$	
Lack 1_3	0	$3{,}80\times10^{2}$ $4{,}00\times10^{2}$ $6{,}40\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$4{,}73\times10^{5}$	$4{,}93\times10^{5}$
Lack 1_4	0	$4{,}00\times10^{2}$ $4{,}60\times10^{2}$ $3{,}40\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$4{,}00\times10^{5}$	
Lack 1_5	0	$3{,}00\times10^{2}$ $3{,}70\times10^{2}$ $2{,}60\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$3{,}10\times10^{5}$	
Lack 1_1	1	$2{,}41\times10^{3}$ $3{,}28\times10^{3}$ $3{,}61\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}95\times10^{6}$	
Lack 1_2	1	$5{,}47\times10^{3}$ $4{,}27\times10^{3}$ $5{,}36\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$5{,}03\times10^{6}$	
Lack 1_3	1	$7{,}50\times10^{2}$ $1{,}01\times10^{3}$ $1{,}00\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$9{,}20\times10^{5}$	$3{,}12\times10^{6}$
Lack 1_4	1	$9{,}00\times10^{2}$ $1{,}28\times10^{3}$ $1{,}21\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}13\times10^{6}$	
Lack 1_5	1	$2{,}95\times10^{3}$ $3{,}39\times10^{3}$ $3{,}28\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$3{,}21\times10^{6}$	
Lack 1_1	2	$2{,}82\times10^{3}$ $2{,}66\times10^{3}$ $2{,}82\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}77\times10^{6}$	
Lack 1_2	2	$2{,}10\times10^{3}$ $2{,}02\times10^{3}$ $2{,}15\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}09\times10^{6}$	
Lack 1_3	2	$2{,}91\times10^{3}$ $3{,}31\times10^{3}$ $2{,}70\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}97\times10^{6}$	$2{,}61\times10^{6}$
Lack 1_4	2	$3{,}17\times10^{3}$ $3{,}13\times10^{3}$ $3{,}44\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$3{,}25\times10^{6}$	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_5	2	$1{,}70\times10^{3}$ $2{,}20\times10^{3}$ $2{,}04\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}99\times10^{6}$	
Lack 1_1	3	$4{,}17\times10^{3}$ $4{,}36\times10^{3}$ $4{,}36\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$4{,}29\times10^{6}$	
Lack 1_2	3	$2{,}63\times10^{3}$ $2{,}84\times10^{3}$ $2{,}95\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}81\times10^{6}$	
Lack 1_3	3	$5{,}25\times10^{3}$ $3{,}72\times10^{3}$ $5{,}03\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$4{,}67\times10^{6}$	$3{,}92\times10^{6}$
Lack 1_4	3	$3{,}61\times10^{3}$ $3{,}72\times10^{3}$ $4{,}16\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$3{,}83\times10^{6}$	
Lack 1_5	3	$2{,}63\times10^{3}$ $2{,}41\times10^{3}$ $3{,}28\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}77\times10^{6}$	
Lack 1_1	6	$1{,}83\times10^{3}$ $2{,}24\times10^{3}$ $2{,}97\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}35\times10^{6}$	
Lack 1_2	6	$7{,}80\times10^{2}$ $7{,}20\times10^{2}$ $9{,}20\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$8{,}07\times10^{5}$	
Lack 1_3	6	$1{,}53\times10^{3}$ $1{,}58\times10^{3}$ $1{,}90\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}67\times10^{6}$	$2{,}01\times10^{6}$
Lack 1_4	6	$1{,}44\times10^{3}$ $1{,}69\times10^{3}$ $1{,}71\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}61\times10^{6}$	
Lack 1_5	6	$1{,}42\times10^{3}$ $1{,}63\times10^{3}$ $1{,}84\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}63\times10^{6}$	

Tabelle 61: Belastungstest Hefen in der Richtrezeptur für Lasuren nach Alterung

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_1	0	$9{,}50\times10^{2}$ $7{,}90\times10^{2}$ $6{,}20\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$7{,}87\times10^{5}$	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_2	0	$9{,}60\times10^{2}$ $8{,}90\times10^{2}$ $1{,}04\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$9{,}63\times10^{5}$	
Lack 1_3	0	$6{,}30\times10^{2}$ $7{,}60\times10^{2}$ $7{,}70\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$7{,}50\times10^{5}$	$7{,}60\times10^{5}$
Lack 1_4	0	$8{,}60\times10^{2}$ $6{,}00\times10^{2}$ $7{,}20\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$7{,}27\times10^{5}$	
Lack 1_5	0	$6{,}60\times10^{2}$ $5{,}90\times10^{2}$ $5{,}60\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$6{,}03\times10^{5}$	
Lack 1_1	1	$8{,}60\times10^{2}$ $8{,}90\times10^{2}$ $9{,}80\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$9{,}10\times10^{5}$	
Lack 1_2	1	$7{,}50\times10^{2}$ $9{,}50\times10^{2}$ $1{,}13\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$9{,}43\times10^{5}$	
Lack 1_3	1	$6{,}00\times10^{2}$ $5{,}20\times10^{2}$ $5{,}10\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$5{,}43\times10^{5}$	$7{,}99\times10^{5}$
Lack 1_4	1	$7{,}80\times10^{2}$ $9{,}20\times10^{2}$ $9{,}50\times10^{2}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$8{,}83\times10^{5}$	
Lack 1_5	1	$8{,}40\times10^{2}$ $9{,}90\times10^{2}$ $1{,}04\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$9{,}57\times10^{5}$	
Lack 1_1	2	$1{,}82\times10^{3}$ $1{,}72\times10^{3}$ $1{,}90\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}91\times10^{6}$	
Lack 1_2	2	$1{,}98\times10^{3}$ $2{,}09\times10^{3}$ $2{,}29\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$2{,}12\times10^{6}$	
Lack 1_3	2	$1{,}70\times10^{3}$ $1{,}52\times10^{3}$ $1{,}91\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}71\times10^{6}$	$1{,}88\times10^{6}$
Lack 1_4	2	$1{,}86\times10^{3}$ $1{,}79\times10^{3}$ $1{,}93\times10^{3}$	10^{3} 10^{3} 10^{3}	$1{,}86\times10^{6}$	

Probe	Zeit (Wochen)	Gezählte Zellen	Verdünnungsfaktor	Zellzahl/ml (Mittelwert)	Zellzahl/ml (Mittelwert Farbe)
Lack 1_5	2	$1{,}67 \times 10^3$ $1{,}77 \times 10^3$ $2{,}17 \times 10^3$	10^3 10^3 10^3	$1{,}87 \times 10^6$	
Lack 1_1	3	$2{,}04 \times 10^3$ $2{,}22 \times 10^3$ $2{,}62 \times 10^3$	10^3 10^3 10^3	$2{,}29 \times 10^6$	
Lack 1_2	3	$3{,}30 \times 10^3$ $2{,}52 \times 10^3$ $2{,}84 \times 10^3$	10^3 10^3 10^3	$2{,}92 \times 10^6$	
Lack 1_3	3	$2{,}15 \times 10^3$ $2{,}32 \times 10^3$ $2{,}28 \times 10^3$	10^3 10^3 10^3	$2{,}25 \times 10^6$	$2{,}49 \times 10^6$
Lack 1_4	3	$2{,}84 \times 10^3$ $2{,}23 \times 10^3$ $2{,}34 \times 10^3$	10^3 10^3 10^3	$2{,}47 \times 10^6$	
Lack 1_5	3	$2{,}74 \times 10^3$ $2{,}95 \times 10^3$ $2{,}63 \times 10^3$	10^3 10^3 10^3	$2{,}77 \times 10^6$	
Lack 1_1	6	$1{,}78 \times 10^3$ $2{,}31 \times 10^3$ $2{,}28 \times 10^3$	10^3 10^3 10^3	$7{,}60 \times 10^6$	
Lack 1_2	6	$1{,}87 \times 10^3$ $1{,}78 \times 10^3$ $1{,}93 \times 10^3$	10^3 10^3 10^3	$1{,}86 \times 10^6$	
Lack 1_3	6	$1{,}61 \times 10^3$ $1{,}51 \times 10^3$ $2{,}13 \times 10^3$	10^3 10^3 10^3	$1{,}75 \times 10^6$	$1{,}91 \times 10^6$
Lack 1_4	6	$1{,}88 \times 10^3$ $1{,}97 \times 10^3$ $1{,}70 \times 10^3$	10^3 10^3 10^3	$1{,}85 \times 10^6$	
Lack 1_5	6	$1{,}78 \times 10^3$ $1{,}98 \times 10^3$ $1{,}70 \times 10^3$	10^3 10^3 10^3	$1{,}82 \times 10^6$	

8.3 Richtrezepturen

8.3.1 Lasuren

Tabelle 62: Richtrezeptur für die Prüfung der Wirksamkeit von Topfkonservierungsmitteln in Lasuren

Komponente, chemisch	Komponente, namentlich (Beispiel)	Gewichtsteile
	vorlegen	
Wasser	Wasser	462,5
	langsam zugeben	
Natrium – Polyacrylat, 45%	Dispex AA 4145 (BASF)	3,0
Polyether Polyurethanverdicker, 20%	Rheolate 212 (Elementis)	25,0
	mischen	
Silikonfreies Additiv, 50%	Silco Wet D-504/PEG (Silcona GmbH & Co.KG)	0,5
Silikonentschäumer, >96%	Byk 024 (Byk)	2,0
Polyethersiloxan-Copolymer Emulsion ca 24%	Tego Airex 902 w (Evonik Industries AG)	2,0
Reinacrylatdispersion, MFT<3°C	Acronal LR 9014 45% (BASF) Sondercharge ohne Konservierung	460,0
Pigmentpräparation	Pigmentpaste Kiefer	15,0
Wasser	Wasser	30,0
	nach Fertigstellung 10 min rühren	**1.000,0**
Technische Parameter		
Festkörpergehalt:	ca. 22 %	
Dichte:	ca. 1,01 g/cm3	

8.3.2 Weiß- und Buntlacke

Tabelle 63: Richtrezeptur für die Prüfung der Wirksamkeit von Topfkonservierungsmitteln in Dispersionsglanzlack

Komponente, chemisch	Komponente, namentlich (Beispiel)	Gewichtsteile
	vorlegen	
Wasser	Wasser	140,0
	langsam zugeben	
Natrium – Polyacrylat, 45%	Dispex AA 4145 (BASF)	6,5
Polyether Polyurethanverdicker, 20%	Rheolate 212 (Elementis)	17,0
Titandioxid -Pigment, Rutil	Titandioxid Titandioxid R706 (Chemours Deutschland GmbH)	200,0
	vollständig dispergieren	
Silikonfreies Additiv, 50%	Silco Wet D-504/PEG (Silcona GmbH & Co.KG)	2,0
Silikonentschäumer, >96%	Byk 024 (Byk)	2,0
Polyethersiloxan-Copolymer Emulsion ca 24%	Tego Airex 902 w (Evonik Industries AG)	2,0
Reinacrylatdispersion, MFT<3°C	Acronal LR 9014 45% (BASF) (Sondercharge ohne Konservierung)	580,0
Wasser	Wasser	50,5
	nach Fertigstellung 10 min rühren	**1.000,0**
Technische Parameter		
Festkörpergehalt:	ca. 48 %	
PVK:	ca. 17 %	
Dichte:	ca. 1,21 g/cm3	
Glanz, 60°	>65 GE (glänzend, nach EN 13300)	

8.3.3 Vorlacke

Tabelle 64: Richtrezeptur für die Prüfung der Wirksamkeit von Topfkonservierungsmitteln in Vorlacken

Komponente, chemisch	Komponente, namentlich (Beispiel)	Gewichtsteile
	vorlegen	
Wasser	Wasser	248,0
	langsam zugeben	
Natrium – Polyacrylat, 45%	Dispex AA 4145 (BASF)	5,0
Polyether Polyurethanverdicker, 20%	Rheolate 212 (Elementis)	12,0
Titandioxid -Pigment, Rutil	Titandioxid Titandioxid R706 (Chemours Deutschland GmbH)	70,0
Calcit	Omyacarb 2 (Omya)	200,0
Kreide	Industrie Spezial (Omya)	100,0
Clay	China Clay Polwhite (Imerys)	50,0
	vollständig dispergieren	
Silikonfreies Additiv, 50%	Silco Wet D-504/PEG (Silcona GmbH & Co.KG)	1,0
Silikonentschäumer, >96%	Byk 024 (Byk)	2,0
Polyethersiloxan-Copolymer Emulsion ca 24%	Tego Airex 902 w (Evonik Industries AG)	2,0
Reinacrylatdispersion, MFT<3°C	Acronal LR 9014 45% (BASF) Sondercharge ohne Konservierung	280
Wasser	Wasser	30,0
	nach Fertigstellung 10 min rühren	**1.000,0**
Technische Parameter		
Festkörpergehalt:	ca. 56 %	
Dichte:	ca. 1,40 g/cm3	