

DR. RALPH DERRA

Öffentlich bestellter und vereidigter  
Sachverständiger für Verpackungsmaterialien, Boden- und Luftanalysen

**ISEGA - Forschungs-  
und Untersuchungs-  
Gesellschaft mbH  
Aschaffenburg**



**ISEGA**

63704 Aschaffenburg, Postfach 100565  
63741 Aschaffenburg, Zeppelinstr. 3-5  
Germany  
Telefon +49 (0) 60 21 / 49 89-0  
Telefax +49 (0) 60 21 / 49 89-30  
E-Mail: info@isega.de  
http://www.isega.de

25.02.2014  
Dr. Dr./bie-schu

GUTACHTERLICHE STELLUNGNAHME

2420 GD 14

für Firma: Deutsche Steinzeug Cremer & Breuer AG  
Servaisstrasse  
53347 Alfter-Witterschlick

Produkt: Fliesenmuster HT Veredelung DSCB

Das von der oben genannten Firma vertriebene Produkt wurde in Anlehnung an ISO 22196:2011 auf seine antibakterielle Wirksamkeit geprüft. Als Testorganismen wurden die Keime *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* ausgewählt. Diese Organismen können bei Mensch und Tier Infektionen hervorrufen. Besonders im klinischen Bereich sind diese Keime für eine Vielzahl sekundärer infektiöser Erkrankungen verantwortlich.


Die Ergebnisse sind in dem Prüfbericht 4480/8 vom 24.07.2013 der Firma ISEGA- Forschungs- und Untersuchungs-Gesellschaft mbH Aschaffenburg enthalten.

Nach Kontakt der Testkeime mit dem oben genannten Produkt für 24 h bei 36 °C wurde bei allen gelisteten Mikroorganismen eine Reduktion der Keimzahl um 99,99 % gegenüber der Ausgangskeimzahl zu Beginn der Untersuchung nachgewiesen.

Diese Ergebnisse belegen eine sehr hohe antibakterielle Aktivität des Produkts gegenüber den getesteten Keimen.

Dieses Gutachten wurde nach bestem Wissen und Gewissen erstellt. Es umfasst 1 Seite



  
(Dr. Biester)  
Dipl.-Biologin  
Mikrobiologie

 **DAKKS**

Deutsche  
Akkreditierungsstelle  
D-PL-14160-01-01  
D-PL-14160-01-02  
D-ZE-14160-01-00

Geschäftsführer: Dr. Ralph Derra - Handelsregister HRB 3329  
Die Veröffentlichung von Ergebnissen unserer Arbeiten und Gutachten sowie die Verwendung für Werbezwecke bedürfen - nach auszugswise - unserer schriftlichen Genehmigung  
Erfüllungsort von Geschäfts: Aschaffenburg

## Prüfbericht

### Photokatalytischer Abbau von Bakterien auf HT veredelten Fliesen

**Autor:**

Dr. Kerstin Hund-Rinke

**Auftraggeber:**

Deutsche Steinzeug Cremer & Breuer AG  
Servaisstr.  
53347 Alfter-Witterschlick

**Prüfeinrichtung:**

Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie, IME  
Abteilung Ökotoxikologie  
57392 Schmallenberg

21. Oktober 2013



### Zusammenfassung

Die HT veredelte Fliese wurde im Vergleich zu einer unveredelten Fliese auf ihre photokatalytische Aktivität bezüglich Bakterienabbau nach Richtlinie ISO 27447 untersucht. Es wurden die zwei Bakterienstämme *Staphylococcus aureus* (Stamm DSM 346) und *Escherichia coli* (Stamm DSM 1576) verwendet. Die Bestrahlungsdauer betrug 4 h.

Für die photokatalytische Aktivität der veredelten Fliese wurden folgende Kennwerte errechnet (Tabelle 1):

Tabelle 1: Ergebnisse der photokatalytischen Aktivität

Probe	<i>Staphylococcus aureus</i> (Stamm DSM 346)		<i>Escherichia coli</i> (Stamm DSM 1576)	
	R <sub>L</sub>	ΔR	R <sub>L</sub>	ΔR
Veredelte Fliese	3,2	0,1	4,8	1,1
	3,2 - 4,2 <sup>*)</sup>	0,1	3,8 - 4,8 <sup>*)</sup>	1,1

<sup>\*)</sup> Berechnet, unter Berücksichtigung, dass die unverdünnte Probe der bestrahlten, veredelten Fliesen nicht untersucht worden war.

R<sub>L</sub> = photokatalytische antibakterielle Aktivität nach UV-Bestrahlung mit der Beleuchtungsstärke L

ΔR = photokatalytische antibakterielle Aktivität nach UV-Bestrahlung unter Berücksichtigung der Keimzahlen der im Dunkeln inkubierten Platten

Die Bestimmung der Keimzahlen der bestrahlten, veredelten Platten erfolgte in der ersten Verdünnungsstufe der extrahierten Bakteriensuspension. Die Keimzahlen in der unverdünnten Probe wurden nicht erfasst. Daher ergibt sich ein R<sub>L</sub>-Wert für beiden Bakterienarten im Bereich von 3. Auf den Platten der ersten Verdünnungsstufe waren keinerlei Keime zu detektieren. Es ist nicht auszuschließen, dass bei einem Ausplattieren der unverdünnten Suspensionen aufgrund der starken antimikrobiellen Aktivität ebenfalls keine Bakterienkolonien detektiert worden wären. In diesem Fall würde sich ein R<sub>L</sub>-Wert von 4,2 bzw. 4,8 ergeben. Die photokatalytische Aktivität kann somit über die in der Tabelle angegebene Spannbreite charakterisiert werden.

Es lässt sich feststellen, dass die veredelten Probekörper bereits eine Reduktion der Keimzahl ohne UV-Bestrahlung bewirkten. Somit weist die Veredelung selbst eine antibakterielle Wirkung auf. Dabei sind Unterschiede zwischen den untersuchten Bakterienstämmen festzustellen. Die Wirkung auf *S. aureus* war stärker ausgeprägt als auf *E. coli*. *S. aureus* wurde durch die Fliesenoberfläche bereits vollständig inhibiert, wohingegen bei *E. coli* noch Bakterien nachzuweisen waren. Durch die UV-Bestrahlung wurde das Wachstum von *E. coli* vollständig inhibiert. Die Fliesen weisen somit neben ihrer generellen antibakteriellen Aktivität auch noch eine antibakterielle photokatalytische Aktivität auf.

## **Inhaltsverzeichnis**

1	Hintergrund	4
2	Material und Methoden	4
2.1	Probekörper	4
2.2	Versuchsaufbau	4
2.3	Bakterienstämme	5
2.4	Versuchsdurchführung	5
2.5	Berechnung der photokatalytischen, antibakteriellen Aktivität	6
3	Ergebnisse	7
4	Validität	8
	Anhang	9

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1:	Ablaufplan der Film-Adhäsionsmethode zur Erfassung der antibakteriellen Wirkung von photokatalytisch aktiven Probekörpern	5
Abbildung 2:	Bild der Bestrahlungsapparatur	9
Abbildung 3:	Spektrale Energieverteilung der verwendeten Lichtquelle	9

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1:	Ergebnisse der photokatalytischen Aktivität	1
Tabelle 2:	Bedingungen während der Untersuchungen	7
Tabelle 4:	<i>Staphylococcus aureus</i> - Keimzahlen der einzelnen Platten im Versuch	10
Tabelle 5:	<i>Escherichia coli</i> - Keimzahlen der einzelnen Platten im Versuch	10

## Literatur

- 1) ISO 27447: Fine ceramics (advanced ceramics, advanced technical ceramics) – test method for antibacterial activity of semiconducting photocatalytic materials (2009)

Die berichteten Messungen wurden gemäß des akzeptierten Angebotes vom 07.08.2013 durchgeführt. Die ausgewerteten und dargestellten Daten wurden im Fraunhofer Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie aufgenommen. Die Messungen wurden nach den in diesem Bericht beschriebenen Methoden durchgeführt.

Laborleiterin:

21.10.2013

Datum

*K. Hund-Rinke*

---

(Dr. Kerstin Hund-Rinke)

## **1 Hintergrund**

Photokatalyse als Verfahren zur Keimreduktion auf Oberflächen ist von gesteigertem Interesse. Zum quantitativen Nachweis der Effektivität entsprechender ausgerüsteter Oberflächen steht eine Richtlinie auf ISO-Ebene (ISO 27447) zur Verfügung. Mit dieser wird die Wirkung auf pathogene Bakterien erfasst.

Bei dem Verfahren wird die antibakterielle Aktivität des photokatalytisch aktiven Materials über den Kontakt der Probekörper mit Bakterien in Gegenwart von UV-Strahlung erfasst. In Abhängigkeit des Probekörpermaterials stehen zwei Verfahrensvarianten zur Verfügung. Die Filmadhäsionsmethode wird zur Untersuchung für plattenförmige Materialien verwendet, wohingegen die Glasadhäsionsmethode für Textilien eingesetzt wird.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Probekörper**

Von der Deutschen Steinzeug Cremer & Breuer AG wurden sowohl veredelte (beschichtete) als auch unveredelte (unbeschichtete) Probekörper (Fliesen) der Größe von 5 \* 5 cm geliefert. Die Probekörper tragen die Bezeichnung

- HT veredelt (beschichtet)

bzw.

- unveredelt (unbeschichtet).

### **2.2 Versuchsaufbau**

Es wurde eine Testapparatur gemäß ISO Richtlinie ISO 27447 [1] verwendet. Die Apparatur besteht aus einer Beleuchtungsquelle unter der der Prüfkörper in einer Kammer positioniert wird. Die Lichtstärke wird mittels zwei gegeneinander verschiebbarer Lochbleche reguliert. Die Höhe der Lochbleche im Vergleich zu dem Prüfkörper ist ausreichend, Schattenbildung zu vermeiden, die in einer ungleichmäßigen Bestrahlung der Prüfkörper und damit in einer Beeinträchtigung der photokatalytischen Effektivität resultieren würde.

Strahlungsquelle: Cleo Performance 40 W-R (Philips);

Messgerät zur Erfassung der Strahlungsintensität: LUTRON UV-340A (290-390 nm)

Der Versuchsaufbau ist aus Abbildung 2 im Anhang ersichtlich.

Das Spektrum der verwendeten Fluoreszenzlampen ist im Anhang (Abbildung 3) dargestellt.

### 2.3 Bakterienstämme

Es wurden die zwei, in der Testrichtlinie für die Film-Adhäsionsmethode angegebenen Testbakterienstämme verwendet.

- *Staphylococcus aureus* (Stamm DSM 346)
- *Escherichia coli* (Stamm DSM 1576)

Die Bakterien wurden im August 2013 von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen (Braunschweig) als Kryokonserven bezogen und auf Agarplatten unter Verwendung des in der Richtlinie angegebenen Nähragars  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  angezogen. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden die Stämme zwei Mal passagiert.

### 2.4 Versuchsdurchführung

Für die Untersuchung der Probekörper der Deutschen Steinzeug Cremer & Breuer AG wurde die Filmadhäsionsmethode angewandt. Neun unveredelte und sechs veredelte Prüfkörper wurden untersucht. Das Untersuchungsschema ist aus folgender Abbildung ersichtlich.

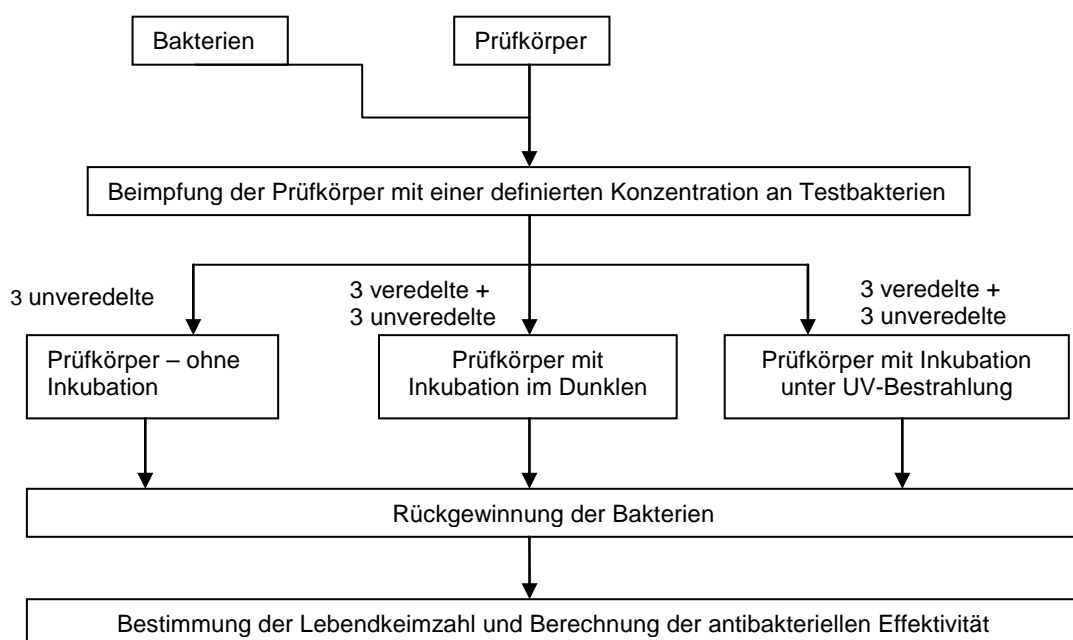


Abbildung 1: Ablaufplan der Film-Adhäsionsmethode zur Erfassung der antibakteriellen Wirkung von photokatalytisch aktiven Probekörpern

Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden die Prüfkörper konditioniert. Hierfür wurden sie mit reinem (p.A.) Ethanol ohne Vergällungs- und Stabilisierungsmittel gewaschen, mit UVA bestrahlt ( $10 \text{ W/m}^2$  bzw.  $1 \text{ mW/cm}^2$ , 20 h), mit TOC freiem Reinstwasser abgespült und unter der Sterilbank getrocknet.



Der Prüfkeim wurde in Nährlösung eingemischt, die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Bakteriensuspension rechnerisch auf einen Wert von ca.  $1,0 \cdot 10^6$  eingestellt. 0,15 mL der eingestellten Bakteriensuspension wurden pro Prüfkörper aufgegeben und diese mit einem adhäsiven Film (Office Point Germany, Nr. 3400010-50, OPTEX GmbH, Berlin) bedeckt. Diejenigen Prüfkörper, die nicht sofort für die Bestimmung der Keimzahl verwendet wurden, wurden in Petrischalen gegeben, die mit feuchten Filterpapier ausgekleidet waren, und gemäß Abbildung 1 inkubiert. Für die Bestimmung der Lebendkeimzahl in Form von koloniebildenden Einheiten wurden die Bakterien mit frisch hergestelltem sterilem SCDLP-Medium gemäß Richtlinie unter Zusatz von Polysorbat 80 (2 g/L) extrahiert und verschiedene Verdünnungsstufen in steriler physiologischer NaCl<sub>2</sub>-Lösung hergestellt. Geeignete Verdünnungsstufen wurden über das Plattengussverfahren auf ihre Keimzahl untersucht.

## **2.5 Berechnung der photokatalytischen, antibakteriellen Aktivität**

Die photokatalytische Aktivität der Probekörper berechnet sich wie folgt:

$$R_L = \log[B_L/C_L]$$

$R_L$  = photokatalytische antibakterielle Aktivität nach UV-Bestrahlung mit der Beleuchtungsstärke L

$B_L$  = Mittelwert der lebenden Bakterien der unveredelten Prüfkörper nach UV-Bestrahlung mit der Beleuchtungsstärke L

$C_L$  = Mittelwert der lebenden Bakterien der veredelten Prüfkörper nach UV-Bestrahlung mit der Beleuchtungsstärke L

$$\Delta R = \log[B_L/C_L] - \log[B_D/C_D]$$

$\Delta R$  = photokatalytische antibakterielle Aktivität nach UV-Bestrahlung unter Berücksichtigung der Keimzahlen der im Dunkeln inkubierten Platten

$B_D$  = Mittelwert der lebenden Bakterien der unveredelten Prüfkörper nach Dunkelinkubation

$C_D$  = Mittelwert der lebenden Bakterien der veredelten Prüfkörper nach Dunkelinkubation

### 3 Ergebnisse

Bei der Untersuchung herrschten die in Tabelle 2 aufgelisteten Bedingungen.

Tabelle 2: Bedingungen während der Untersuchungen

Parameter	Aktuelle Bedingungen im Test	Bedingungen laut Richtlinie
Beleuchtungsstärke	0,25 mW/cm <sup>2</sup>	0,25 mW/cm <sup>2</sup>
Beleuchtungsdauer	4 h	4 – 8 h
Temperatur während des Tests	22 °C	Keine Angabe

Auf Basis der über Verdünnungsreihen ermittelten Zellzahlen lassen sich folgende photokatalytischen Aktivität der Probekörper rechnerisch ermitteln:

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
R <sub>L</sub>	3,2	3,8
ΔR	0,1	1,1

Die Einzelwerte der Keimzahlen pro Platte sind aus Tabelle 3 (*S. aureus*) und Tabelle 4 (*E. coli*) im Anhang ersichtlich.

Die Bestimmung der Keimzahlen der bestrahlten, veredelten Platten erfolgte in der ersten Verdünnungsstufe der extrahierten Bakteriensuspension. Die Keimzahlen in der unverdünnten Probe wurden nicht erfasst. Daher ergibt sich ein R<sub>L</sub>-Wert im Bereich von 3. Auf Platten der ersten Verdünnungsstufe waren keinerlei Keime zu detektieren. Es ist nicht auszuschließen, dass bei dem Ausplattieren der unverdünnten Suspensionen aufgrund der starken antimikrobiellen Aktivität ebenfalls keine Bakterienkolonien detektiert worden wären. In diesem Fall würde sich ein R<sub>L</sub>-Wert von 4,2 bzw. 4,8 ergeben. Die photokatalytische Aktivität kann somit über folgende eine Spannbreite charakterisiert werden.

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
R <sub>L</sub>	3,2 - 4,2	3,8 - 4,8
ΔR	0,1	1,1

Es lässt sich feststellen, dass die veredelten Probekörper bereits eine Reduktion der Keimzahl ohne UV-Bestrahlung bewirkten. Somit weist die Veredelung selbst eine antibakterielle Wirkung auf. Dabei war die Wirkung auf *S. aureus* stärker ausgeprägt als auf *E. coli*. *S. aureus* wurde durch die Fliesenoberfläche bereits vollständig inhibiert, wohingegen bei *E. coli* noch Bakterien nachzuweisen waren. Durch die UV-Bestrahlung wurde das Wachstum von *E. coli* zusätzlich und damit vollständig inhibiert. Die Fliesen

weisen somit neben ihrer generellen antibakteriellen Aktivität auch noch eine antibakterielle photokatalytische Aktivität auf. Die veredelten Kontrollplatten zeigten vergleichbare Keimzahlen bei den UV-bestrahlten sowie den nicht bestrahlten und im Dunkeln gelagerten Proben, so dass der bei den veredelten Fliesen zu beobachtende Effekt keine Fehlmessung darstellt.

#### 4 Validität

Mit Ausnahme der Bakterienanzahl der unveredelten Proben nach Inokulation und vor Inkubation sind die Validitätskriterien erfüllt. Die Bakterienanzahl lag bei beiden Tests der oberen Schwelle von  $4,0 \cdot 10^5$  (*S. aureus*:  $5,1 \cdot 10^5$ ; *E. coli*:  $1,1 \cdot 10^6$ ). Da sich trotz der erhöhten Bakterienzahl sehr starke (*E. coli*) bzw. eine vollständige Elimination (*S. aureus*) der Animpfsuspension ergeben hat, wird eine Wiederholung der Untersuchung als nicht notwendig erachtet. Die weiteren Validitätskriterien, die einen direkten Rückschluss auf die Qualität der Untersuchung liefern (Streubreite der Bakterienkeimzahlen; Bakterienanzahlen der unveredelten Proben nach Licht- und Dunkelexposition), sind alle sehr gut erfüllt.

- Streubreite der Bakterienkeimzahlen der unveredelten Proben nach Inokulation:  
 $(L_{\max} - L_{\min}) / (L_{\text{mean}}) \leq 0,2$  (Ist: *S. aureus*: 0,176; *E. coli*: 0,169)  
 $L_{\max}$ : Logarithmus der maximalen lebenden Bakterienanzahl  
 $L_{\min}$ : Logarithmus der minimalen lebenden Bakterienanzahl  
 $L_{\text{mean}}$ : Logarithmus des Mittelwertes der lebenden Bakterienanzahl
- Bakterienanzahl der unveredelten Proben nach Inokulation:  
 $1,0 \cdot 10^5 - 4 \cdot 10^5$  (Ist: *S. aureus*:  $5,1 \cdot 10^5$ ; *E. coli*:  $1,1 \cdot 10^6$ )
- Bakterienanzahl der unveredelten Proben nach Lichtexposition:  
 $> 1,0 \cdot 10^3$  (Ist: *S. aureus*:  $1,8 \cdot 10^5$ ; *E. coli*:  $6,9 \cdot 10^5$ )
- Bakterienanzahl der unveredelten Proben nach Dunkelexposition:  
 $> 1,0 \cdot 10^3$  (Ist: *S. aureus*:  $1,5 \cdot 10^5$ ; *E. coli*:  $8,4 \cdot 10^5$ )

**Anhang**

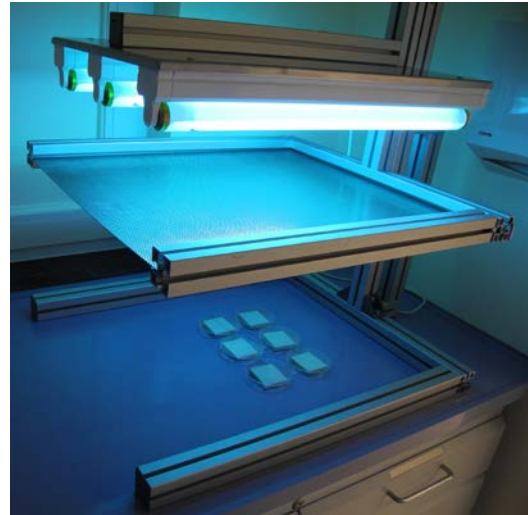


Abbildung 2: Bild der Bestrahlungsapparatur

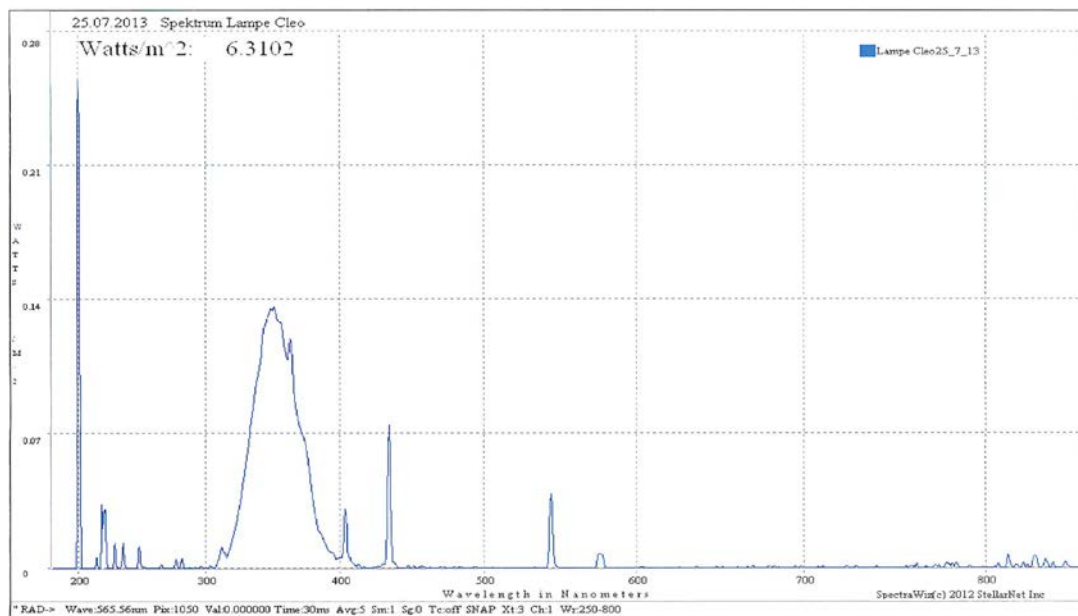


Abbildung 3: Spektrale Energieverteilung der verwendeten Lichtquelle

Tabelle 3: *Staphylococcus aureus* - Keimzahlen der einzelnen Platten im Versuch

Inkubations- bedingungen	Probe	KbE/Probe <sup>1</sup> Probe 1	KbE/Probe <sup>1</sup> Probe 2	KbE/Probe <sup>1</sup> Probe 3	Mittelwert (KbE/Probe) <sup>1</sup>	Standard- abweichung (KbE/Probe) <sup>1</sup>	RL	ΔR
Kontrolle	unveredelt	500.000	525.000	490.000	505.000	18.027,8	3,2	0,1
UV [0,25 mW/cm <sup>2</sup> ]	unveredelt	173.000	176.000	182.500	177.167	4.856,3		
	veredelt	100	100	100	100	0,0		
Dunkel	unveredelt	133.000	67.000	235.500	145.167	84.906,3		
	veredelt	100	100	100	100	0,0		

<sup>1</sup> KbE = koloniebildende Einheiten

Tabelle 4: *Escherichia coli* - Keimzahlen der einzelnen Platten im Versuch

Inkubations- bedingungen	Probe	KbE/Probe <sup>1</sup> Probe 1	KbE/Probe <sup>1</sup> Probe 2	KbE/Probe <sup>1</sup> Probe 3	Mittelwert (KbE/Probe) <sup>1</sup>	Standard- abweichung (KbE/Probe) <sup>1</sup>	RL	ΔR
Kontrolle	unveredelt	1.120.000	1.150.000	905.000	1.058.333	133.635,1	3,8	1,1
UV [0,25 mW/cm <sup>2</sup> ]	unveredelt	735.000	675.000	650.000	686.667	43.684,5		
	veredelt	100	100	100	100	0,0		
Dunkel	unveredelt	975.000	870.000	675.000	840.000	152.233,4		
	veredelt	2.600	700	950	1.417	1.032,4		

<sup>1</sup> KbE = koloniebildende Einheiten