



*Projekttitel:*

## Substrat- und umgebungsspezifische Biofilme im Abfüllbetrieb

*Förderkennzeichen:*

49VF110011

*Name der Forschungsstelle(n):*

Forschungsinstitut für Bier- und Getränkeproduktion (FIBGP)

*Kontakt:*

Dipl.-Ing. (FH) Jan Fischer, [fischer@vlb-berlin.org](mailto:fischer@vlb-berlin.org)

*Bewilligungszeitraum:*

1.1.2012 – 30.9.2013

**INNO-KOM**

Gefördert durch:



Bundesministerium  
für Wirtschaft  
und Energie

aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages

# SCHLUSSBERICHT



**WISSEN  
SCHAFFT  
QUALITÄT**

## **Impressum**

### **Herausgeber:**

Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) e.V.  
Forschungskoordination - Gerhard Andreas Schreiber  
Seestraße 13, 13353 Berlin, Deutschland

Vereinsregister-Nr.: 24043 NZ, Amtsgericht Berlin-Charlottenburg

[www.vlb-berlin.org](http://www.vlb-berlin.org)

Gefördert durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages.

Alle Rechte vorbehalten, sofern nicht im Text nicht anders angegeben.

Kein Teil des Berichts darf ohne schriftliche Genehmigung des Herausgebers in irgendeiner Form reproduziert werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen in Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

All rights reserved (including those of translation into other languages).

No part of this book may be reproduced in any form.

Reg.-Nr.: VF110011

Kurztitel: Substrat- und umgebungsspezifische Biofilme im Abfüllbetrieb

Laufzeit: 01.01.2012 bis 30.09.2013

Name und Anschrift des Zuwendungsempfängers:

Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin e.V. (VLB Berlin)  
 Seestraße 13  
 DE 13353 Berlin

Zielstellung:

Um Aussagen über das individuelle Biofilm-System einer einzelnen Getränkeabfüllanlage treffen zu können, sollte eine Methode und eine Vorrichtung zur Züchtung reproduzierbarer, substrat- und umgebungsspezifischer Biofilme entwickelt werden. Die am Biofilm beteiligten Mikroorganismen sollten identifiziert werden.

Als Ergebnisform sollte ein Verfahren präsentiert werden, welches folgende Einzelziele vereinte:

1. Entwicklung einer Methode und einer Vorrichtung zur Züchtung reproduzierbarer, anlagenspezifischer Biofilme im Abfüllbetrieb.
2. Entwicklung von Methoden zur Identifizierung der am Biofilm beteiligten Mikroorganismen, mit der Herausstellung zu welchen Zeitpunkten der Biofilm-Entwicklung diese wachsen.
3. Entwicklung von Methoden zur Bewertung des von den Biofilmen ausgehenden Risikos bezüglich hygienischer Aspekte und der Gefahr der Biokorrosion

Ergebnisse:

Alle formulierten Ziele wurden zufriedenstellend erreicht. Es wurde eine Apparatur und eine Methode entwickelt zuverlässig Biofilme in Getränkeabfüllanlagen zu züchten. Ebenso konnten die am Biofilm beteiligten Mikroorganismen identifiziert werden, sofern nach heutigem Stand der Technik eine Kultivierung möglich war. Es wurden Methoden erarbeitet die Biofilme hinsichtlich hygienischer Risiken und der Gefahr von Biokorrosion zu bewerten. Weiterhin wurde eine umgebungs- und substratspezifische Biofilmmzucht beobachtet. Ein Vergleich der gezüchteten Biofilme mit wirklich an der Abfüllanlage vorkommenden Biofilmen zeigte eine große Gemeinschaft in der Zusammensetzung der beteiligten Mikroorganismen auf. Darüberhinaus wurde eine, im Rahmen von mikrobiologischen Feldversuchen mögliche, Reproduzierbarkeit der Aufzucht erreicht.

Veröffentlichungen:

Vortrag: „Spezialanalytik zur Prozessoptimierung: Biofilme – Scuffingneigung – Peripherie der Abfüllung“, R. Pahl, 99. Oktobertagung der VLB, Berlin, 09.10.2012

Vortrag: „Generación artificial de biopelículas para caracterizar el potencial de contaminación secundaria en el envasado“, R. Pahl, 4° Simposio Iberoamericano del VLB – Técnica Cervecería y del Envasado, 08.08.2013, Buenos Aires (Argentinien)

Vortrag: „Substrat- und Umgebungsspezifisches Biofilmwachstum in Abfüllanlagen“, J. Fischer, 9. VLB-Seminar für die Brau- und Getränkeindustrie in Russland, 27.11.2013, Moskau (Russland)

Artikel: „Substrate and environment specific biofilms in beverage filling plants“, R. Pahl und J. Fischer, Brauerei Forum, International Edition September 2013, S. 12-15

Übersetzung ins Deutsche: Brauerei Forum, Oktober 2013, S. 18-21

Übersetzung ins Russische: Russian Trade Magazin «Beverage Industry», 1 [97] 2014, S. 24-29

31.3.14

Datum



Projektleiter



Rechtsverbindliche Unterschrift

## Sachbericht (Schlussbericht)

zum Verwendungsnachweis

zu FuE Vorhaben

<b>Reg.-Nr.:</b>	<b>VF110011</b>
<b>FuE-Einrichtung:</b>	<b>Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) e.V.</b>
<b>Titel:</b>	<b>Substrat- und umgebungsspezifische Biofilme im Abfüllbetrieb</b>
<b>Projektlaufzeit:</b>	<b>01.01.2012 – 31.09.2013</b>

Berlin, den 31.3.14

Name und Telefonnummer des Projektleiters: **Dr.-Ing. Roland Pahl, 030 450 80 238**

Firmenstempel

*R. Pahl*

Unterschrift des Projektleiters

Rechtsverbindliche Unterschrift

Versuchs- und Lehranstalt  
für Brauerei in Berlin (VLB) e.V.  
Forschungsinstitut für  
Brauereibiotechnologie (IBZ)

**VLB**

Seitenzahl 10 von 20

## 1 Technisch-technologische Zielstellung des Vorhabens

Um Aussagen über das individuelle Biofilm-System einer einzelnen Getränkeabfüllanlage treffen zu können, ergab sich als Zielstellung dieses Forschungsvorhabens, die Entwicklung einer Methode zur Züchtung und Erforschung von substrat- und umgebungsspezifischen Biofilmen im Getränke-Abfüllbetrieb. Dabei bestand die Hauptaufgabe in der reproduzierbaren, künstlich eingeleiteten Aufzucht von Biofilmen im Umfeld von Getränkeabfüllanlagen. Diese gezüchteten Biofilme sollen jene Biofilme repräsentieren, welche real in der Abfüllanlage wachsen. Einer der Hauptgründe welcher schlussendlich zur Antragsstellung führte, war die Annahme, dass die Zusammensetzung sowie die gesamte Wachstumskinetik der Biofilme mit der Art der abgefüllten Getränke und mit dem Umgebungsbedingungen variieren. Deshalb sollten die Versuchsparameter auf die jeweiligen Gegebenheiten der verschiedenen Getränkeabfüllanlagen angepasst werden.

Die Mikroorganismen, die am Aufbau der gezüchteten Biofilme beteiligt sind, sollten identifiziert werden. Weiterhin sollte festgestellt werden zu welchen Zeitpunkten der Biofilm-Entwicklung diese wachsen.

Ziel war es, die Aufzucht der Biofilme mit einer Aufzuchtanlage zu realisieren, die bei laufendem Abfüllbetrieb in das Umfeld der Abfüllanlage gebracht wird. Den Mikroorganismen, die den Biofilm bilden, sollte dabei als Nährstoff (Substrat), das an der betreffenden Anlage momentan zur Abfüllung kommende Produkt zur Verfügung gestellt werden. Die Idee war, auf diese Weise die „natürlichen“ Wachstumsbedingungen für den Biofilm nachzustellen. Bei dieser spezifischen Züchtung der Biofilme sollten zunächst folgende Parameter variiert werden:

- Umgebung (Abfüllanlage)
- Substrat (Getränk)
- Aufstellort innerhalb der Abfüllanlage
- Jahreszeit

Auf diese Weise sollte eine Methode entwickelt werden, die es zulässt, das tatsächliche Biofilm-Risikopotenzial einer speziellen Anlage nachzuvollziehen. Dabei sollte das von den Biofilmen ausgehende Risikopotenzial zum einen hinsichtlich hygienischer Aspekte bewertet werden, zum anderen war festzustellen, inwieweit getränkerelevante Biofilme für Biokorrosion (microbially influenced corrosion,

MIC) verantwortlich sein können.

Als Ergebnisform sollte demnach ein Verfahren präsentiert werden, welches folgende Einzelziele vereint:

- Entwicklung einer Methode und einer Vorrichtung zur Züchtung reproduzierbarer, anlagenspezifischer Biofilme im Abfüllbetrieb.
- Entwicklung von Methoden zur Identifizierung der am Biofilm beteiligten Mikroorganismen, mit der Herausstellung zu welchen Zeitpunkten der Biofilm-Entwicklung diese wachsen.
- Entwicklung von Methoden zur Bewertung des von den Biofilmen ausgehenden Risikos bezüglich hygienischer Aspekte und der Gefahr der Biokorrosion

## **2 Darstellung der erzielten Vorhabensergebnisse**

### **2.1 Aufzuchtanlage**

Wie bereits in der Antragstellung erwähnt bestand die generelle Idee der Biofilmaufzucht in der Überströmung einer luftexponierten Fläche mit einer Nährlösung (Substrat). Auf diese Weise sollte eine unzureichend gereinigte Stelle der Abfüllanlage simuliert werden. Als erster Arbeitsschritt standen demnach die Planung und der Aufbau einer Apparatur im Vordergrund, die die oben genannte Methodik ermöglicht. Wesentliche Bestandteile der Apparatur sind eine Schlauchpumpe, die Biofilmaufzichtsfläche und eine Auffanggefäß für das Substrat. Gemäß Antrag wurde ein Schlauchpumpenantrieb (Typ BVP Process, Fa. Ismatec) mit dazugehörigem Pumpenkopf (Typ SB 2V, Fa. Ismatec) beschafft. Dieser zweikanalige Pumpenkopf ermöglicht den Anschluss zweier separater Schläuche. Zum Zeitpunkt der Antragsstellung wurde der große Vorteil einer zweikanaligen Förderung des Substrats in der Möglichkeit gesehen, differenzierte Strömungsbilder auf der Aufzichtsfläche zu erzeugen und somit gegebenenfalls das Biofilmwachstum zu begünstigen. Während der Forschungsarbeiten zeigten sich jedoch weitere entscheidende Nutzen, die schlussendlich essentiell für den erfolgreichen Abschluss dieses Projekts waren (siehe 2.2). Als Aufzuchtfläche wurde ein Edelstahlblech aus dem Fachhandel verwendet. Zunächst wurde bei der Materialauswahl das Hauptaugenmerk auf eine Oberflächenrauigkeit gerichtet, die den hygienischen Anforderungen des zeitgemäßen Baus von Abfüllanlagen entspricht. In diesem Fall bedeutet dieses, dass ein Mittenrauwert  $R_a$  von  $0,8 \mu\text{m}$  nicht überschritten wird, so dass Mikroorganismen erschwerte Anheftungsmöglichkeiten

vorfanden. Für die Ausbildung eines Biofilms auf der Aufzuchtfläche hätten erhöhte Mittenrauwerte eventuell gar einen positiven Effekt, doch ist ein wesentlicher Aspekt des Projekts, die Gegebenheiten in der Abfüllanlage bestmöglich nachzubilden.

Zu späteren Vorhabenszeitpunkten wurden Materialien variiert, so wurden beispielsweise Bleche verwendet, die alten Anlagenteilen entsprangen oder aber auch in Verdacht standen ein interessantes Korrosionsverhalten aufzuweisen. Die eingesetzten Materialien der einzelnen Aufzuchtversuche sind im Anhang als Versuchsparameter in den Versuchsprotokollen aufgeführt.

Als Auffang-, bzw. Vorratsgefäß für das Substrat sollte zunächst ein Kunststoffeimer zur Verwendung kommen. Als jedoch die Vorversuche zur Überprüfung des erfolgreichen Biofilmwachstums in den Räumlichkeiten der VLB abgeschlossen waren und industrielle Getränkeabfüller mit der Anfrage kontaktiert wurden, Aufzuchtversuche in ihren Betrieben zu ermöglichen wurde der Kunststoffeimer durch ein Edelstahlgefäß ersetzt. Hierzu wurde ein Normbehälter für Gastronomie Zwecke entsprechend modifiziert. Der Austausch des Gefäßes war vorrangig ästhetisch begründet, doch bot er auch hygienische Vorteile wie beispielsweise verbesserte Reinigungsmöglichkeiten und den Einsatz einer Abdeckung. In die Abdeckung wurde eine Öffnung gesägt um den Zu- und Ablauf des Substrats zu ermöglichen. Ebenfalls aus hygienischen und ästhetischen Gründen wurde die Anlage mit einer Scheibe aus Polymethylmethacrylat (Acrylglas) versehen, die sowohl die Aufzuchtfläche als auch die Öffnung des Deckels vom Vorratsgefäß abdeckte. Auf diese Weise sollte die Kontaminationsgefahr, die eventuell von der Anlage ausging (Biofilm auf der Aufzuchtfläche, kontaminiertes Substrat im Auffanggefäß) eingedämmt werden.

Die im Obigen beschriebenen Einzelkomponenten der Anlage wurden montiert, so dass ein Substratstrom vom Vorratsgefäß über die Aufzuchtfläche im Kreislauf ermöglicht wurde. In Abschnitt 2.1 werden unterschiedliche methodikbedingte Veränderungen an diesem Aufbau beschrieben und begründet. Fotos sowie Skizzen der Einzelkomponenten und vom Aufbau befinden sich im Anhang (7.1 und 7.2).

Die Anlage könnte nach dem Aufbau schnell in ihre Einzelkomponenten zerlegt werden und danach ohne große Mühen wieder aufgebaut werden. Dieses war eine der Grundvoraussetzungen, da die Anlage zum einen transportierbar sein musste, zum anderen mussten produktberührende Bauteile (Aufzuchtfläche, Pumpenschläuche und Vorratsgefäß) vor den einzelnen Versuchen sterilisiert werden. In diesem Zusammenhang sei nochmals der Vorteil der zum Einsatz kommenden Schlauchpumpe zu erwähnen, deren Arbeitsweise es ermöglichte kontaminierte Schläuche kostengünstig auszuwechseln.

Weiterhin war ein flexibler Aufbau der Anlage möglich, so dass sie beispielsweise auf einem Rollwagen aufgestellt werden konnte und somit durch kurzzeitiges Verschieben einer Behinderung der regulären Getränkeproduktion während der Versuche entgegengewirkt werden konnte.

## 2.2 Aufzuchtmethodik

Zur ersten Überprüfung der generellen Erfolgsaussichten mit der beschriebenen Apparatur einen Biofilm zu züchten wurden einfache Vorversuche in den Räumlichkeiten der VLB durchgeführt. Zu diesem Entwicklungszeitpunkt wurde einer Probenahme und späteren mikro- und molekularbiologischen Analysen keine Beachtung geschenkt. Das Substrat, in diesem Fall Bier (Pilsener Typ) wurde im Kreislauf mit beiden Pumpenkanälen über die Aufzuchtfläche gefördert und während des Versuches nicht gewechselt (Abbildung 1). Auf diese Art und Weise war bereits nach ca. 48 Stunden ein Biofilmwachstum visuell wahrzunehmen. Abbildung 11 im Anhang zeigt den deutlich ausgebildeten Biofilm nach 168 Stunden. Mit dieser eintretenden Biofilmbildung war die erste Grundvoraussetzung für ein erfolgreiches Bearbeiten des Projekts geschaffen. In weiteren derartig durchgeführten Vorversuchen wurden verschiedene Parameter gezielt variiert und deren Einfluss auf das Biofilmwachstum untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass beispielsweise geringe Fließgeschwindigkeiten und eine möglichst horizontale Ausrichtung der Aufzuchtfläche das Biofilmwachstum positiv beeinflussen. Scheinbar konnten auf diese Weise Abtragmechanismen minimiert werden. Weiterhin wurden Biofilme nach der im Vorherigen beschriebenen Methodik gezüchtet, an denen die Probenahme (2.3) und die biologische Analysen (2.4) entwickelt und optimiert wurden. Bei all diesen Versuchen wurde jedoch die Beobachtung gemacht, dass im Substrat, wenn es ohne Wechsel im Kreislauf gefördert wurde, bereits nach einer kurzen Zeit (ca. 48 bis 96 Stunden) starke Kontaminationserscheinungen sensorisch wahrnehmbar waren, wie beispielsweise Kahmhäute, Schimmelpilzbefall oder starke Geruchsveränderungen. Wie bereits erwähnt war eines der Hauptanliegen der Forschungsarbeiten, die „natürlichen“ Wachstumsbedingungen des Biofilms in der Abfüllanlage bestmöglich nachzustellen. Die Gegebenheiten in der Getränkeabfüllung machen es jedoch eher unwahrscheinlich, dort auf ein Medium zu treffen, dass derartig stark kontaminiert ist. Es war daher davon anzunehmen, dass diese Aufzuchtmethodik vermutlich mit gewissen Ungenauigkeiten einherging. Mit den ersten Versuchen an einem industriellen Standort wurde die Methodik derartig modifiziert, dass das Substrat zwar immer noch im Kreislauf gefördert wurde, nunmehr aber täglich gewechselt wurde. Diese leicht veränderte Vorgehensweise führte ebenso, wenn auch geringfügig verzögert, zuverlässig zu einem Biofilmwachstum auf der Aufzuchtfläche. Aus zwei wesentlichen Gründen wurde der tägliche Substratwechsel als geeigneter angesehen: Zum einen kann es

durch die starken Kontaminationen zu erheblichen Differenzen in der mikrobiellen Zusammensetzung der gezüchteten Biofilme im Vergleich zu „natürlich“ gewachsen kommen, zum anderen ist von einer starken Nährstoffveränderung in dem kontaminierten Substrat auszugehen. Obwohl die Aufzuchtmethodik mit Substratfluss im Kreislauf bei täglichem Wechsel als geeignete Simulation angesehen wurde, wurden weitere Überlegungen angestellt, die die natürliche Formation von Biofilmen in der Getränkeabfüllung betrafen. Hier standen vor allem Tropfmengen von Getränkeresten und Wasser oder aber auch überschäumende Medien, wie sie beispielsweise durch die Hochdruckeinspritzung bei der Bierabfüllung vorkommen, im Verdacht das Biofilmwachstum einzuleiten. Diese Medien haben gemeinsam, dass sie theoretisch zunächst nahezu unkontaminiert und „frisch“ sind. Diese Tatsache ließ wiederum die Überlegung aufkommen, eine Aufzuchtmethodik zu untersuchen, bei der das Substrat nicht mehr im Kreislauf über die Aufzuchtfläche gefördert wird, sondern aus einem Vorratsgefäß stets frisches Medium die Fläche überströmt, welches anschließend verworfen wird (siehe Abbildung 2). In einem entsprechenden Versuch zeigte sich jedoch auch nach einer Versuchszeit von drei Wochen kein visuell zufriedenstellendes Ergebnis, so wurde lediglich nur eine geringfügig dreidimensionale Biofilmbildung beobachtet, die in keinem Verhältnis zu dem Wachstum stand, welches mit den zuvor angewandten Methoden erreicht wurde. Dennoch wurde auch dieser Versuch mit mikro- und molekularbiologischen Analysen begleitet, die durchaus interpretierungswürdige und aussagekräftige Ergebnisse lieferten (Tabelle 6). Ferner wurde während des im Vorherigen beschriebenen Versuchs zusätzlich das „reale“ Biofilmwachstum im Bereich der Füllmaschine der Abfüllanlage beobachtet wobei festgestellt wurde, dass dieses weitaus schneller und ausgeprägter verlief, als das forcierte Wachstum auf der Anlage. Aus diesem Grund wurden weitere Modifikationen an der Aufzuchtmethodik eingeleitet. In einem nächsten Schritt sollte zunächst die mikrobielle Zusammensetzung, bzw. die Wachstumskinetik von gezüchteten Biofilmen verglichen werden, die zum einen eine Substratzufuhr im Kreislauf (bei täglichem Wechsel) erfahren und zum anderen stets mit frischem Medium versorgt werden (siehe Tabelle 10 und Tabelle 11). Dazu wurde der Versuchsaufbau derartig gestaltet, dass die zweikanalige Pumpe nun zwei separate Aufzuchtflächen ansteuerte bei der jeweils eine der oben erläuterten Aufzuchtmethoden angewandt wurde (siehe Abbildung 3). Diese Versuchsanordnung ermöglichte den angesprochenen Vergleich bei identisch gehaltenen Versuchsparametern wie z.B. Temperatur und Zusammensetzung der Umgebungsluft. In zwei derartig durchgeführten Versuchen war wie zu erwarten dass optisch wahrnehmbare Biofilmwachstum jeweils auf den Aufzuchtflächen ausgeprägter, bei denen das Substrat im Kreislauf gefördert wurde. Die Analyse der beteiligten Mikroorganismen zeigte dennoch nicht nur bei diesen Biofilmen ein großes Mikroorganismenwachstum auf, vielmehr wurden auch zahlreiche Organismen auf den Biofilmen nachgewiesen, die stetig mit frischem Medium versorgt

wurden, obwohl ein Biofilm visuell nur schwach erkennbar war. Eine Gegenüberstellung der Mikroorganismenzusammensetzungen, zeigte jeweils große Übereinstimmungen bei beiden Aufzuchtmethoden auf. Detaillierte Versuchsparameter und Ergebnisse sind im Anhang (7.5) aufgeführt. Aufgrund dieser erhaltenen Ergebnisse schienen beide Methoden der Biofilmzucht geeignet um die ausgegebenen Zielstellungen zu erreichen. Ein Vorteil der Methode bei der das Substrat im Kreislauf gefördert wird lag darin, dass sich innerhalb deutlich geringerer Zeitspannen ein dreidimensionaler Biofilm ausbildete. Für die praktische Durchführung der Versuche dieser Forschungsarbeiten und auch gegebenenfalls für deren zukünftige Applikation, war dieses insofern von Bedeutung, da den Produktionsbedingungen der Abfüllbetriebe Rechnung getragen werden musste. Eine Grundidee des Projekts war es die Biofilmzucht bei laufender Produktion durchzuführen. Sollte nun ein Produktionsstopp am Wochenende erfolgen, war eine Versuchsdauer von maximal fünf Tagen anzustreben. Weiterhin war laut Zielstellungen des Projekts vor allem die Identifizierung von produktschädigenden Mikroorganismen von Interesse. Da sich diese in karbonisierten Getränken aus Anaerobiern zusammensetzen, waren vor allem stark ausgebildete Biofilme interessant, da hier eine höhere Wahrscheinlichkeit besteht, dass anaerobe Bereiche enthalten sind.

Vorteile der Aufzuchtmethode, bei der das Substrat nach einmaligem Überströmen der Aufzuchtfläche verworfen wurde wurden vorrangig in einer erhöhten Praxisnähe gesehen. Dennoch kann auch unter realen Bedingungen davon ausgegangen werden, dass sich ein Biofilm nicht nur mit Getränken bildet die nahezu unkontaminiert sind. Beispielsweise kann eine Voranreicherung mit Mikroorganismen der Umgebung in zunächst nicht abfließende, stehenden Pfützen aus Getränkeresten geschehen, die anschließend zur Biofilmbildung beitragen.

Alle beschriebenen und Beobachtungen und Überlegungen führten schlussendlich zu einer finalen Modifikation der Aufzuchtmethodik, die am geeignetsten erschien, das Forschungsvorhaben erfolgreich abzuschließen. Genauer Betrachtet handelte es sich dabei um eine Kombination der zuvor angewandten Vorgehensweisen: Über dieselbe Aufzuchtfläche wurde das Substrat mit einem der beiden Pumpenkanäle im Kreislauf gefördert, während der andere Kanal das frische Getränk aus einer Vorratsflasche über die Fläche förderte. Dabei wurde das Getränk aus der Vorratsflasche im Auffanggefäß gesammelt und diente ab diesem Zeitpunkt der Substratversorgung im Kreislauf. Sowohl Vorratsflasche als auch Auffanggefäß wurden täglich gewechselt (siehe Abbildung 4). Mit der Aufzucht nach dieser Methodik sollte eine bestmögliche Simulation des „natürlichen“ Biofilmwachstums bei einer angemessenen Versuchsdauer erreicht. Sowohl visuelle Beobachtungen, als auch mikro- und molekularbiologische Ergebnisse waren in einem hohe Maße zufriedenstellend, so dass diese Aufzuchtmethodik nicht mehr verändert wurde.

Im Vergleich zu den Ideengängen, die seinerzeit während der Antragstellung angestrengt wurden, kam es naturgemäß zu einigen Veränderungen. In den Ausführungen zur Zuchtmethodik wurde schon mehrfach erwähnt, dass es nicht immer möglich war, die Versuchsdauer mit der Produktion in den Abfüllbetrieben in Einklang zu bringen. In den Betrieben, in denen die Versuche durchgeführt wurden lief die Produktion üblicherweise von Sonntagnacht bis Freitagmittag (ca. 5 Tage). Wurde nach Beendigung der Produktionswoche optisch kein befriedigendes Biofilmwachstum auf der Aufzuchtanlage beobachtet, mussten Entscheidungen getroffen werden, diesen Umstand gerecht zu werden. Eine der Grundideen während der Antragsstellung war die Biofilmzucht bei laufender Produktion durchzuführen. Aus diesem Grund wurde zunächst entschieden auf eine Substratversorgung der sich bildenden Biofilme am Wochenende zu verzichten. Einer der größten Vorteile der Lebensform Biofilm ist, dass Wasser zurückgehalten werden kann und so einem Austrocknen entgegengewirkt wird. Trockneten die noch nicht vollständig ausgebildeten Biofilme dennoch über das Wochenende aus, so wurde davon ausgegangen das die entstandene Schicht aus totem Zellmaterial und anderen organischen Substanzen auf der Aufzuchtfläche eine Nährgrundlage für sich anschließendes Biofilmwachstum bot und der Versuch fortgesetzt werden konnte. Diese Arbeitsweise spiegelte durchaus die angenommenen, realen Wachstumsbedingungen von Biofilmen in Getränkeabfüllanlagen wieder, jedoch wurde eine Unterbrechung der Versuche als nicht ideal angesehen. Aufgrund dessen wurde zu einem späteren Projektzeitpunkt beschlossen sich jedenfalls teilweise während der Biofilmzucht von der strikten Begleitung der Getränkeproduktion zu trennen und die Versuche am Wochenende weiterlaufen zu lassen, selbst wenn ein Produktionsstopp erfolgte. Eine Probenahme war in diesen Zeiträumen unglücklicherweise nicht möglich, da die Betriebe geschlossen und ein Zutritt nicht möglich war. Zu diesem Projektzeitpunkt wurde ausschließlich die Aufzuchtmethodik angewandt bei der die Substratversorgung sowohl im Kreislauf als auch durch Überströmung mit frischem Getränk erfolgte. Durch die dadurch entstandene Vermischung von verbrauchtem und (beinahe) unverbrauchtem Substrat im Auffanggefäß konnte hier augenscheinlich einer starken Kontamination entgegengewirkt werden, da die in zuvor durchgeführten Versuchen Beobachtungen, wie z.B. Geruchsveränderungen, Kahmhäute und Schimmelpilzbefall ausblieben, obwohl kein Substratwechsel vorgenommen wurde.

Der erste Teil, der im Rahmen des Forschungsprojekts durchgeführten Versuche, fand an der Abfülllinie einer Brauerei statt, später wurden Versuche bei einem Produzenten verschiedener kohlenensäurehaltiger und alkoholfreier Getränke durchgeführt. Wie bereits erwähnt sollte als Biofilmsubstrat genau jenes Getränk verwendet werden, welches zur Zeit der Aufzucht an der entsprechenden Anlage abgefüllt wurde. In der gängigen Betriebspraxis wird aber auf den wenigsten Anlagen nur eine einzige Getränkesorte abgefüllt, ferner variieren die Abfüllpläne von Woche zu Woche. Es ist demnach

anzunehmen, dass auch die Mikroorganismenzusammensetzung sowie die Wachstumskinetik der Biofilme von Woche zu Woche variiert. Ein Ziel der Forschungsarbeiten bestand darin, eine Methode zu entwickeln, reproduzierbare Biofilme zu erhalten, die die Biofilme der Abfüllanlage repräsentieren. Zur Überprüfung des Erreichens dieses Ziels war ein Vergleich von mehreren Biofilmen notwendig, die unter ein und denselben Wachstumsbedingungen gezüchtet wurden. Die Einhaltung gleicher Versuchsparameter, bei variierenden Abfüllplänen in der Kombination mit dem Anspruch genau jenes Getränk als Substrat zu verwenden, welches zur gerade zur Abfüllung kam war praktisch gesehen nicht möglich. In der frühen Projektphase, in der ausschließlich Aufzuchtversuche in Brauereien durchgeführt wurden und demnach Bier zur Abfüllung kam, wurde aus oben aufgeführten Gründen ausschließlich eine Sorte Bier, Pilsener Brauart als Nährsubstrat verwendet, auch wenn Biersorten abgefüllt wurden, die sich hiervon geringfügig unterschieden. Geringe Abweichungen der Eigenschaften von verschiedenen Biersorten als Nährlösung von Mikroorganismen mussten in Kauf genommen werden. Hier ist vor allem, aufgrund der antibiotischen Wirkung, der Hopfengehalt des Bieres zu erwähnen, ferner variieren Nährstoffe mit dem Restextrakt (unvergorene Kohlenhydrate). Dennoch ist hervorzuheben, das Bier trotz seiner Sortenvielfalt ein sehr homogenes Medium ist was seine Eigenschaft als Nährboden für Mikroorganismen betrifft. Aus diesem Grund schien eine erfolgreiche Bearbeitung des Projekts trotz dieser Einschränkung nicht gefährdet.

Wurde Bier noch als homogenes Nährmedium angesehen, war dieses bei der Sortenvielfalt der abgefüllten Getränke der Anlage des Abfüllers bei dem weitere Versuche durchgeführt wurden nicht mehr möglich. Das Portfolio reichte von Getränken, die unter dem Verdacht standen das Biofilmwachstum sehr zu begünstigen wie beispielsweise Apfelschorle (hoher Gehalt an leicht verstoffwechselbaren Kohlehydraten) bis hinzu Getränken, bei denen angenommen wurde, dass sie möglicherweise gar eine eindämmende Wirkung auf das Biofilmwachstum haben könnten wie z.B. Cola (niedriger pH Wert) oder Bitter Lemon (chininhaltig). Mit der im Antrag ausgegebenen Zielstellung vor Auge, die eine Wiederholung von Aufzuchtversuchen mit gleichen Parametern, in diesem Fall gleicher Substratgabe, notwendig machte, war es nicht möglich den zu züchtenden Biofilmen immer das Substrat zur Verfügung zu stellen, welches gerade Abgefüllt wurde. Dazu war die Varianz in den Abfüllplänen zu groß. Um dennoch eine Wiederholbarkeit der Versuche zu ermöglichen bei einer bestmöglichen Orientierung an der momentanen Abfüllung wurde ein standardisierter Abfüllplan entwickelt, dem ein Studium der Abfüllpläne mehrerer Wochen zugrunde lag. Ein besonderes Augenmerk wurde hier nicht nur auf Substrate geworfen, die für das Biofilmwachstum förderlich erschienen, sondern auch auf Getränke, die unter Umständen das Biofilmwachstum eindämmen können (siehe vorherige Ausführungen). Der standardisierte Abfüllplan bestimmte Reihenfolge und Art, der den Biofilmen als

Nährsubstrat gegebenen Getränke und wird im Anhang als Versuchsparameter des jeweiligen Aufzuchtversuchs aufgeführt.

Von der Versuchsplanung, wie sie zur Zeiten der Antragsstellung aufgestellt wurde, musste aufgrund aller in diesem Abschnitt erläuterten Herausforderungen (Methodenentwicklung, längere Versuchslaufzeiten, variierende Abfüllpläne) im Sinne der Zielstellung des Projekts leicht abgewichen werden. So konnte der Untersuchung des Einflusses der Jahreszeit auf die Biofilmbildung nicht die geplante Aufmerksamkeit entgegengebracht werden. Ähnlich verhielt es sich mit der Erforschung von Differenzen im Biofilmwachstum bei Variation des Aufstellortes innerhalb einer Abfüllanlage. Da anders als zunächst geplant die beiden industriellen Standorte, bei denen Versuche durchgeführt wurden, nicht dieselben Getränkesorten abfüllten, wurden zur Untersuchung der Standortabhängigkeit bei gleichbleibendem Substrat eine Vielzahl von Versuchen im Technikum der VLB durchgeführt. Hier wurde davon ausgegangen wurde, dass ähnliche Voraussetzungen in der mikrobiellen Gegebenheit der Umgebung vorherrschte wie bei den industriellen Standorten. Um dieses sicherzustellen wurde teilweise eine laufende Produktion simuliert. Generell ist zu erwähnen, dass deutlich mehr Versuche durchgeführt wurden, wie es im Antrag vorgesehen war.

Es wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglichte zuverlässig Biofilme im Getränkeabfüllbetrieb zu züchten. Inwieweit diese Biofilme reproduzierbar, substrat- und umgebungsspezifisch waren wird im Abschnitt 2.5 diskutiert. Eine Übersicht über die verschiedenen Versuchsparameter (z.B. Standort, Substratgabe und Jahreszeit) wird an entsprechender Stelle im Anhang aufgeführt (siehe 7.5).

### 2.3 Probenahme während der Biofilmzucht

Die Herausforderung in der Probenahme bestand darin, kontinuierlich aussagekräftige Aliquote des Biofilms zu entnehmen und diesen dabei nicht entscheidend in seinem Wachstum zu behindern oder gar zu zerstören. Um dieses zu realisieren, wurde für jede einzelne Probenahme eine entsprechende Stelle auf der Aufzuchtfläche markiert. Diese Probenahmestellen verliefen zunächst vertikal, von oben nach unten, entsprechend der zeitlichen Reihenfolge der Beprobung eines Aufzuchtversuchs. Aufgrund der räumlichen Ausprägung des Biofilms erschien es später jedoch geeigneter, die Probenahmestellen horizontal, am unteren Ende der Aufzuchtfläche verlaufen zu lassen. Die Beprobung erfolgte mit einer Impföse, die über die entsprechende Probenahmestelle, vertikal von oben nach unten gezogen wurde. Das Probenmaterial wurde anschließend in 10 ml sterile physiologische Kochsalzlösung (0,85 % NaCl in dest. Wasser) ausgeschüttelt und innerhalb von 20 Stunden weiterverarbeitet.

Je nach Fortschritt des Biofilmwachstums wurde bei Bedarf eine geeignete Verdünnung der Probe für die weitere Probenanalyse angelegt.

#### 2.4 Identifizierung der am Biofilm beteiligten Mikroorganismen

##### *Speziesspezifische Charakterisierung der Mikroflora im gezüchteten Biofilm unabhängig von ihrer quantitativen Verteilung mittels einer ungezielten Speziesidentifikation*

Um eine Praxistauglichkeit des Verfahrens zu erreichen, sollte eine Methode zur Identifizierung von Mikroorganismen entwickelt werden, die sich an Standardmethoden der Getränkeindustrie orientiert. Daher wurde auf klassische mikrobiologische Verfahren mit Voll- und Selektivnährmedien mit anschließender molekularbiologischer Identifizierung zurückgegriffen. Die Auswahl von Selektivnährmedien sollte eine grobe Einteilung der am Biofilm beteiligten Mikroorganismen ermöglichen, die anschließend mit der molekularbiologischen Identifizierung verifiziert werden sollte. Für eine spätere Applikation des gesamten Verfahrens (Biofilmzucht und Analyse) ist es eventuell ausreichend nur auf klassische, mikrobiologische Analysen zurückzugreifen. Zur Überprüfung der Erfüllung der ausgegebenen Zielstellung war es jedoch notwendig diese durch molekularbiologische Untersuchungen zu ergänzen. Aufgrund des nachstehend erläuterten, vergleichsweise aufwendigen Verfahrens und der Vielzahl an Mikroorganismen, die zunächst mit klassischen, mikrobiologischen Verfahren kultiviert wurden, konnten nicht alle Organismen einer molekularbiologischen Untersuchung unterzogen werden. Es musste sich daher für den molekularbiologischen Nachweis auf Mikroorganismen beschränkt werden, die beispielsweise aufgrund stetiger Wiederkehr oder eines möglichen produktschädigenden Charakters von besonderem Interesse waren.

In Tabelle 22 sind die zur mikrobiologischen Analyse der Biofilm-Proben verwendeten Nähragar mit ihren Eigenschaften aufgelistet. Je 200 µl der Biofilm-Proben, bzw. einer geeigneten Verdünnungsstufen der jeweiligen Probe, wurden auf dem jeweiligen Nähragar ausplattiert. Mit fortlaufender Ausbildung des Biofilms wurden höhere Verdünnungsstufen notwendig um einzelne Kolonien für die Identifizierung zu erhalten. Einzelne Kolonien, vor allem auffällig wiederkehrende Kolonieformen wurden nochmals separat auf frischem Nähragar isoliert, bzw. ausgestrichen, um die Reinheit der zu identifizierenden Kolonie zu gewährleisten. Die jeweiligen Inkubationsbedingungen für die jeweils zu erwartenden Mikroorganismen auf dem entsprechenden Nähragar sind Tabelle 23 zu entnehmen.

Für eine eindeutige Identifizierung der jeweils isolierten Mikroorganismen wurden die isolierten Kolonien (vor allem immer wiederkehrende Mikroorganismen bzw. Kolonieformen) mittels

molekularbiologischen Verfahren charakterisiert. Hierfür wurde eine PCR mit unspezifischen Primern mit anschließender Sequenzierung und Sequenzvergleich von mit im Internet verfügbaren Datenbanken (BLAST-Search) durchgeführt.

Die Extraktion der DNA aus den jeweiligen Mikroorganismen erfolgte nach Schnellverfahren („quick and dirty“), um ein schnelles Verfahren zur Analyse einer hohen Anzahl von Mikroorganismen zu gewährleisten. Um die DNA der Hefen zu extrahieren, wurde Zellmaterial der Reinkultur vom Agar mit 500-600 µl bidestilliertem, sterilem Wasser in einem Eppendorf-Gefäß homogenisiert und anschließend im Thermomixer für 10 Minuten bei 95 °C inkubiert. Die Hefesuspension konnte anschließend direkt für die PCR verwendet werden.

Für eine „quick and dirty“-Isolierung der DNA aus Bakterien konnten zwei verschiedene Methoden angewendet werden. Für die Lyse der Bakterien aus den Biofilmen denen Bier als Substrat diente wurde folgende Methode verwendet (Methode a): Zellmaterial einer Reinkultur wurde mit 600 µl bidestilliertem, sterilem Wasser in einem Eppendorf-Gefäß, welches bis 500 µl mit 0,2 µm Glasperlen befüllt war, homogenisiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit den Glasperlen für 15 Minuten bei höchster Umdrehung gevortext und anschließend für 10 Minuten bei 95 °C erhitzt um eine Lyse der Zellen zu gewährleisten. Im Laufe des Projektes wurde eine schnellere Methode etabliert und für die Lyse der Bakterien aus den Biofilmen verwendet, deren Substratversorgung durch alkoholfreie Getränke geschah (Methode b). Hierfür wurde Zellmaterial einer Reinkultur in 50 µl TE+0,1% Triton-X100-Puffer gelöst, homogenisiert und für fünf Minuten bei 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet wurde nochmals mit 50 µl des TE+0,1% Triton-X100-Puffers versetzt, gevortext und 10 Minuten im Thermomixer bei 99 °C inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz erneut 5 Minuten bei 12000 g zentrifugiert und der gewonnene Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und für die PCR verwendet. Die Sequenzen der verwendeten unspezifischen Primerpaare für die Identifizierung von unbekanntem Mikroorganismen sind in Tabelle 24 dargestellt.

Für die Identifizierung von Hefen aus den Bier-Biofilmen wurde das ITS1/4- und für die Hefen aus den Soft-Drink-Biofilmen das NL1/4-Primerpaar verwendet. Bei beiden Primerpaaren handelte es sich um unspezifische Hefe-Primer, die Bereiche der rRNA-Gene amplifizieren und zur Identifizierung von unbekanntem Hefen verwendet werden können. Für die Identifizierung von Bakterien aus dem Bier-Biofilm wurde das 8F/1492R(I)- und für die Bakterien aus dem Soft-Drink-Biofilm das 1237F/1492R(I)-Primerpaar verwendet. Bei beiden Primerpaaren handelt es sich um unspezifische Bakterien-Primer, die Bereiche der 16S-rRNA-Gene amplifizieren. Die PCR-Ansätze wurden in 96 well-Platten durchgeführt, um in kurzer Zeit einen hohen Durchsatz zu ermöglichen. Die jeweiligen PCR-Bedingungen sind Tabelle 25 (Pipettierschema) und Tabelle 26 (PCR-Bedingungen) zu entnehmen.

Die Bildung von PCR-Produkten wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Anschließend wurden die Proben zur Sequenzierung an den Dienstleister „LGC-genomics“ versandt. Der Abgleich der erhaltenen Sequenzen erfolgte mit einer im Internet zugänglichen Datenbank (NCBI-BLAST).

Es wurde wie geplant eine Methode zur Identifizierung der am Biofilm beteiligten Mikroorganismen entwickelt, die sich an den in der Getränkeindustrie üblichen Verfahren orientiert und diese gezielt mit molekularbiologischen Methoden ergänzt.

## 2.5 Vergleich der Biofilme hinsichtlich Reproduzierbarkeit sowie Umgebungs- und Substratspezifität

Hauptziel des Forschungsprojekts war es eine Methode zu erschaffen, die es möglich macht, reproduzierbare, substrat- und Umgebungsspezifische Biofilme zu züchten. Im Vorherigen wurden die beschrittenen Wege beschrieben um zum einen zuverlässig Biofilme zu züchten und zum anderen die daran beteiligten Mikroorganismen zu identifizieren. Mit einer Gegenüberstellung dieser Mikroorganismen und deren Wachstumskinetik soll nun an ausgewählten Versuchen beschrieben werden inwieweit es möglich war, die im Antrag ausgegebenen Ziele hinsichtlich Reproduzierbarkeit und Spezifität zu erreichen. Da sich die Entwicklung der Aufzuchtmethodik als schwieriger darstellte als zu Zeiten der Antragsstellung angenommen, muss im Folgenden teilweise ein Vergleich von Biofilmen vorgenommen werden, die nicht unter denselben Wachstumsbedingungen gezüchtet wurden. Ferner kam die finale Aufzuchtmethodik erst in einer späten Projektphase zum Einsatz, weswegen sich die folgende Diskussion zu größten Teil auf diesen Projektzeitraum bezieht. Um Dennoch Aussagen über die Abhängigkeit von Substrat und Standort auf das Biofilmwachstum treffen zu können, werden auch Ergebnisse von Versuchen herangezogen bei denen das Hauptaugenmerk noch auf die Entwicklung der Aufzuchtmethodik gerichtet war.

Um zunächst die Reproduzierbarkeit zu bewerten werden die Ergebnisse der Versuche 10 und 11 gegenübergestellt, die jeweils unter denselben Aufzuchtbedingungen durchgeführt wurden. Beide Versuche wurden im Sommer bei einem Produzenten karbonisierter, alkoholfreier Getränke durchgeführt. Sämtliche Versuchsparameter sind in Tabelle 13 und Tabelle 14 aufgeführt, zur besseren Übersicht ist in Tabelle 18 eine Gegenüberstellung der Ergebnisse gegeben. In beiden Versuchen wurden die ersten Mikroorganismen in der Probe identifiziert, die nach 120 Stunden genommen wurde. Es handelte sich dabei jeweils um die Hefen *Candida picinguabensis* und *Torulaspota delbrueckii*. Diese beiden Hefen wurden in beiden Fällen über die gesamte Versuchsdauer nachgewiesen. In den nächsten genommen Proben (nach 144 Stunden) wurde neben den obengenannten Hefen jeweils das Essigsäurebakterium *Gluconobacter oxydans* identifiziert. *Candida intermedia* tauchte in Versuch 11 nach

144 Stunden und in Versuch 10 nach 240 Stunden das erste Mal auf. Das Bakterium *Gluconobacter cerinus* ist der einzige Organismus der in Versuch 10 nachgewiesen wurde und nicht in Versuch 11 auftrat, jedoch wurden wie schon erwähnt andere Bakterien der Gattung *Gluconobacter* nachgewiesen. Auf der anderen Seite wurden in Versuch 11 der Pilz *Aureobasidium pullulans*, Hefen der Gattung *Hanseniaspora* und das Milchsäurebakterium *Lactobacillus plantarum* als einzige Organismen beobachtet, die nicht in Versuch 10 auftraten. Alles in allem wurde in diesen beiden Versuchen eine Gemeinsamkeit hinsichtlich Mikroorganismenarten und deren Wachstumskinetik festgestellt, die die Erwartungen bei der Antragsstellung übertraf. Versuche 10 und 11 waren die einzigen Untersuchungen bei denen sowohl Reihenfolge und Art der Substratgabe, Standort, Jahreszeit und Probenahmezeitpunkt übereinstimmten und zusätzlich die Aufzuchtmethode angewandt wurde, die als zielführend angesehen wird. Um dennoch auszuschließen, dass die großen Gemeinsamkeiten in diesen Versuchen rein zufälliger Natur sind wird im Folgenden eine Gegenüberstellung der Ergebnisse von Versuchen 13 und 14 angestrengt (siehe Tabelle 19). Beide Versuche wurden im Herbst im Technikum der VLB Berlin durchgeführt. Als Substrate kamen verschiedene alkoholfreie Getränke zum Einsatz, die sich in Art und Reihenfolge leicht unterschieden. In beiden Fällen war Apfelschorle das meist eingesetzte Substrat. Die Zeitpunkte der Probenahmen waren versetzt, so dass nur die Mikroorganismenarten verglichen werden können, deren Wachstumskinetik jedoch nicht. Trotz dieser Differenzen in den Zuchtparametern lassen sich in beiden Biofilmen große Übereinstimmungen erkennen, die für eine Reproduzierbarkeit der entwickelten Methode sprechen. So wurde in beiden Versuchen in jeweils allen genommenen Proben die Hefe *Candida sorboxylosa* wiedergefunden. Dieses gilt im ähnlichen Maße für die Hefe *Hanseniaspora uvarum*, deren Nachweis nur in einem Fall ausblieb. Weiterhin wurden die Essigsäurebakterien *Acetobacter pasteurians* und *Acetobacter peroxydans* in beiden Biofilmen beobachtet. Unterschiede in den Zusammensetzungen der Organismen sind vor allem in verschiedenen Arten der Gattung *Candida* auszumachen, so wurden in Versuch 13 neben *Candida sorboxylosa*, deren Wachstum auch stetig in Versuch 14 zu beobachten war, die Arten *Candida stellata* und *Candida sojae* nachgewiesen. Die Brauereihefe *Saccharomyces cerevisiae* sowie das Bakterium *Gluconobacter frateurii* hingegen kamen nur in Versuch 14 vor. Insgesamt wird deutlich, dass durchaus von einer sehr zufriedenstellenden Reproduzierbarkeit in der Biofilmzucht gesprochen werden kann. Dafür müssen allerdings die Wachstumsparameter nahezu identisch gehalten werden. Eine Betrachtung der Ergebnisse aller Versuche zeigt, dass Abweichungen in der Wachstumskinetik und Zusammensetzung der Mikroorganismen mit Variation der Versuchsparameter zunimmt. Die Aufzuchtmethodik die schlussendlich angewandt wurde zeigte hinsichtlich der Reproduzierbarkeit die besten Ergebnisse. An dieser Stelle ist die generelle Schwierigkeit zu Erwähnen in mikrobiologischen Feldversuchen exakt

dieselben Ergebnisse zu erhalten.

Zur Bewertung, inwieweit die erhaltenen Biofilme eine Substrat-, bzw. Umgebungspezifität aufweisen wird sich im Folgenden einer stark vereinfachten Darstellung der Ergebnisse bedient. So werden die identifizierten Mikroorganismen der einzelnen Versuche lediglich aufgelistet, dem zeitlichen Auftreten und der Häufigkeit ihres Erscheinens wird keine Rechnung getragen.

Eine Auflistung der identifizierten Mikroorganismen aller Versuche, in denen Bier (Pilsner Typ) als Substrat zum Einsatz kam ist in Tabelle 20 gegeben. Es werden acht Versuche an insgesamt 2 Standorten betrachtet, wobei die Versuche 7 und 8 aufgeteilt werden, weil hier jeweils zwei verschiedene Biofilme gezüchtet wurden (siehe 2.2). Auf dem ersten Blick fällt auf, dass vor allem Essigsäurebakterien nachgewiesen wurden, die in sechs von acht Versuchen vorkamen. Hervorzuheben sind hier die Arten *Acetobacter cerevisiae*, *Acetobacter indonesiensis*, *Acetobacter lovaniensis*, *Acetobacter persicus*, *Gluconobacter frateurii* und *Gluconobacter oxydans*. Milchsäurebakterien, vor allem *Lactobacillus casei* und *Lactococcus lactis* (in einem Fall auch *Lactobacillus plantarum*) wurden ebenfalls an beiden Standorten mehrfach nachgewiesen. Erwähnenswert ist dieses speziell vor dem Hintergrund ihres potentiell bis obligat schädlichen Charakters, was das Verderben von Bier betrifft. In allen Versuchen die im Technikum der VLB durchgeführt wurden, wurden zahlreiche Bakterien der Familie Enterobacteriaceae in verschiedenen Arten der Gattungen *Enterobacter* und *Klebsiella* nachgewiesen, in den Versuchen am Standort der industriellen Brauerei hingegen nur ein einziges Mal. Als Vertreter der Hefen stechen verschiedene Arten der Gattungen *Candida* und *Pichia* hervor, deren Auftreten fortwährend an beiden Standorten beobachtet wurde.

An dieser Stelle sei nochmals in Erinnerung gerufen, dass die oben diskutierten Versuche meist noch im Rahmen der Entwicklung der Aufzuchtmethodik durchgeführt wurden und aus diesem Grund die erhaltenen Ergebnisse unter Vorbehalt betrachtet werden sollten. Anders verhält es sich bei den Ergebnissen, die zu einer späteren Projektphase erhalten wurden, als keine Veränderungen an der Aufzuchtmethodik mehr vorgenommen wurden. Tabelle 21 fasst die gefundenen Organismen dieser Versuche zusammen (dem zeitlichen Auftreten und der Häufigkeit des Erscheinens wird erneut keine Beachtung geschenkt). Es handelt sich um die Versuche, die beim Abfüller alkoholfreier, karbonisierter Getränke durchgeführt wurden und deren Wiederholungen im VLB Technikum mit denselben Substraten. Geringe Abweichungen in den Versuchsparametern (z.B. Reihenfolge der Substratgabe) werden an dieser Stelle vernachlässigt. Im Vergleich zu den im Obigen betrachteten Versuchen bei denen Bier als Substrat verwendet wurde kann bei diesen Versuchen von einer weitaus homogeneren Mikroorganismenverteilung gesprochen werden, was sich zunächst durch eine deutlich geringere Artenvielfalt der nachgewiesenen Organismen zwischen den Versuchen ausdrückt. Essigsäurebakterien

der Gattungen *Acetobacter* oder *Gluconobacter* wurden in allen durchgeführten Aufzuchtversuchen nachgewiesen. Weiterhin wurden stets Hefen der Gattung *Candida* in den Versuchen an beiden Standorten beobachtet, wobei die Arten *Candida intermedia* und *Candida picinguabensis* die vorherrschenden Arten beim industriellen Abfüller waren, wohingegen im Technikum der VLB *Candida sorboxylosa* verstärkt wuchs. Die Hefe *Torulaspota delbrueckii* wurde mehrfach beim industriellen Abfüller nachgewiesen, in den Versuchen an der VLB Berlin jedoch nicht ein einziges Mal. Der einzige Organismus der mit übereinstimmender Gattung und Art an beiden Standorten vorkam war die Hefe *Hanseniaspora uvarum*. Betrachtet man dieses Ergebnis unter Beachtung der ausgegebenen Zielstellung eines substrat- und umgebungsspezifischen Biofilmwachstums kann diese Hefe als Organismus angesehen werden, der unabhängig vom Standort ,repräsentativ für Biofilme ist, die unter Verwendung von alkoholfreien Erfrischungsgetränken gedeihen. Auf der anderen Seite kann beispielsweise die Hefe *Candida intermedia* als Mikroorganismus angesehen werden, der charakteristisch für Biofilme eines bestimmten Standorts ist. Er wurde nur in Biofilmen gefunden, die bei dem industriellen Abfüller alkoholfreier Getränke gezüchtet wurden, dort jedoch mehrfach in allen durchgeführten Versuchen. Diese Beispiele machen deutlich, dass eine substrat- und umgebungsspezifische Biofilmzucht erreicht wurde. Dieses kann auch durch einen Vergleich der Ergebnisse aller Versuche (insgesamt drei Standorte, Bier und alkoholfreie Getränke als Substrat) bestätigt werden. *Acetobacter pasteurianus* beispielsweise wurde lediglich in Biofilmen wiedergefunden, die im Technikum der VLB wuchsen. Nichtsdestotrotz wurde dieses Bakterium mehrfach nachgewiesen und das unter Verwendung verschiedener Substrate. Als typische Biofilmbakterien in Brauereien können unter anderem *Acetobacter cerevisiae* oder *Acetobacter persicus* angesehen werden, die standortunabhängig mehrfach in Biofilmen gedeihen, die mit Bier als Substrat gezüchtet wurden, jedoch nicht in Biofilmen auftraten, bei denen alkoholfreie Getränke der Nährstoffversorgung dienten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine substrat- und umgebungsspezifische Biofilmzucht erreicht wurde, jedoch stets eine Kombination dieser beiden Faktoren betrachtet werden sollte. Zusätzlich hatten andere Wachstumsparameter wie z.B. die Methodik der Aufzucht einen großen Einfluss. Eine, im Rahmen von mikrobiologischen Feldversuchen mögliche, Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde bei bestmöglicher Gleichhaltung aller entscheidenden Wachstumseinflüsse erzielt.

## 2.6 Vergleich von gezüchteten Biofilmen mit „realen“ Biofilmen an der Abfüllanlage

Grundidee des Forschungsprojekts war es, mit der forcierten Biofilmzucht an der Abfüllanlage, das „reale“ Biofilmwachstum zu simulieren. Noch nicht zu Zeiten der Antragsstellung, jedoch bei der Durchführung der Forschungsarbeiten, kam aus diesem Grund die Idee auf, die gezüchteten Biofilme hinsichtlich ihrer Mikroorganismenzusammensetzung mit solchen zu vergleichen, die auf „natürliche“ Weise an der Anlage wuchsen. Während der Aufzuchtversuche 4 und 6 in der industriellen Brauerei wurde im Bereich der Füllmaschine mehrfach ein Biofilmwachstum beobachtet. Die dreidimensional ausgeprägten Biofilme wurden analog zu den gezüchteten Biofilmen beprobt und die beteiligten Mikroorganismen identifiziert. Die Ergebnisse sind zusammen mit den dazugehörigen Versuchsprotokollen im Anhang aufgeführt (siehe 7.5). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass von diesen „realen“ Biofilmen nur die Mikroorganismen in einem ausgereiften Studium abgebildet wurden, ihre Entstehung konnte nicht beobachtet werden. Die in den Versuchsprotokollen angegebenen Probenahmezeitpunkte entsprechen den Zeitpunkten an denen die Probenahme an den gezüchteten Biofilmen erfolgte.

Zwei „natürliche“ Biofilme wurden während des Aufzuchtversuchs 4 untersucht. Ein Vergleich der hier identifizierten Mikroorganismen, mit denen des Biofilms, der zum selben Zeitpunkt gezüchtet wurde zeigt erhebliche Übereinstimmungen auf. Im ersten Biofilm wurden *Acetobacter cerevisiae* und *Acetobacter persicus* nachgewiesen, beide lassen sich auch im gezüchteten Biofilm wiederfinden. Von den im zweiten Biofilm nachgewiesenen zehn Mikroorganismen wurden sechs im dazugehörigen Aufzuchtversuch identifiziert, wobei jeweils Gattung und Art übereinstimmte.

Während Versuch 6 wurden insgesamt vier ausgereifte, „reale“ Biofilme beprobt. Eine Gegenüberstellung der Mikroorganismen der natürlichen Biofilme mit denen aus Biofilmen der Aufzuchtversuche ergab auch hier große Übereinstimmungen. Beispielfhaft wird an dieser Stelle Biofilm I näher betrachtet (siehe Tabelle 6, Tabelle 7, Tabelle 8 und Tabelle 9). Von den nachgewiesenen Essigsäurebakterien fand sich *Acetobacter orientalis* sowohl im natürlichen als auch im gezüchteten Biofilm (Versuch 6) wieder. *Acetobacter cerevisiae*, *Acetobacter indonesiensis* und *Acetobacter persicus* wurden zwar nicht im zeitgleich durchgeführten Versuch nachgewiesen, traten jedoch in anderen, in dieser Brauerei durchgeführten Versuchen, fortwährend auf. Einziges Essigsäurebakterium welches lediglich im realen Biofilm vorkam war *Asaia krungthepensis*. Die Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Wickerhamomyces anomalus* wurden sowohl im natürlichen als auch im gezüchteten Biofilm identifiziert. Das Milchsäurebakterium *Lactococcus lactis*, welches im natürlichen Biofilm wuchs, wurde nicht in Versuch 6 nachgewiesen, jedoch wurde ein Wachstum beispielsweise in Versuch 4 beobachtet.

Gleiches gilt für Bakterien der Gattung *Pseudomonas*. Als einzige Bakteriengattung, die über alle Versuche hinweg betrachtet nur im „realen“ Biofilm identifiziert wurde ist *Staphylococcus* zu nennen.

Insgesamt wird deutlich, dass die entwickelte Methode der forcierten Biofilmzucht eine hohe Vergleichbarkeit mit real stattfindendem Biofilmwachstum hatte. Damit wurde eines der Grundanliegen des Forschungsprojekts erfüllt.

## 2.7 Produktschädliche Mikroorganismen

Anfangs sollte die Beurteilung der in den Biofilmen identifizierten Mikroorganismen hinsichtlich ihres produktschädlichen Charakters theoretischer Natur sein. Genauer ausgedrückt wurden die gefundenen Mikroorganismen mit Organismen verglichen, deren Produktschädlichkeit beispielsweise durch die dem Projekt zugehörige Literaturrecherche bekannt war. Naturgemäß musste in diesem Fall zwischen Bier und den eingesetzten alkoholfreien Getränken als Nährmedien unterschieden werden. Da im Sinne des Projekts stets das Getränk als Substrat verwendet wurde welches zur Zeit der Aufzuchtversuche zur Abfüllung kam, diente dieses auch als Referenz zur Beurteilung der Produktschädlichkeit der Mikroorganismen.

Zunächst erfolgt nun eine Betrachtung der Biofilme denen Bier als Substrat diente. Einige der wenigen Bakterien, die ein Verderb von Bier bewirken können sind bestimmte Arten der Milchsäurebakterien. Von den nachgewiesenen Organismen der Bier-Biofilme sticht hier zuallererst *Lactobacillus casei* hervor, dessen Wachstum in mehreren Aufzuchtversuchen beobachtet wurde. Dieses Bakterium gilt als „obligat“ bierschädlich, was bedeutet das es in abgefülltem Bier, mit allen seinen Wachstumsunterdrückenden Eigenschaften (z.B. anaerobes Milieu, geringes Nährstoffangebot, antibiotische Hopfeninhaltsstoffe), gedeihen kann und beispielsweise für Trübungen und Geschmacksfehler sorgt. Andere identifizierte Milchsäurebakterien waren *Lactococcus lactis* oder *Lactobacillus plantarum*, denen eine „potentielle“ Bierschädlichkeit bescheinigt wird. Sie können nur in Bier wachsen, wenn bestimmte Voraussetzungen erfüllt sind wie in diesem Fall ein sehr geringer Gehalt an Hopfenbitterstoffen. In diesem Zusammenhang sei der Verdacht geäußert, dass sich potentiell schädliche Mikroorganismen in Biofilmen durch den ständigen Kontakt mit dem Getränk durch Adaption zu obligat schädlichen Organismen verändern können. Die mehrfach nachgewiesene gärfähige Hefe *Torulaspota delbrueckii* kann nur dann im Bier wachsen wenn verstoffwechselbare Kohlenhydrate vorhanden sind, wie es in Bier vorkommt welches nicht endvergoren ist. Weiterhin wurden die Hefen *Sacchaomyces cerevisiae* und *Saccharomyces pastorianus* (alias *Sachharomyces carlsbergensis*) mehrfach gefunden. Bei diesen Hefen ist davon auszugehen, dass es sich um Betriebshefen handelt, die beispielsweise nicht vollständig durch die

Filtration entfernt wurden oder naturgemäß im Brauereiumfeld vorkommen. Der in einem Versuch kultivierte Pilz *Aureobasidium pullulans* wird aufgrund seiner Ähnlichkeit mit Hefen von einigen Experten als bierschädlich angesehen.

Die Voraussetzungen für ein Wachstum von Mikroorganismen in den alkoholfreien Getränken, die als Biofilmsubstrat verwendet wurden, sind im Vergleich zu Bier vollkommen andere. Als Beispiele sind hier vor allem ein hoher Gehalt an verstoffwechselbaren Zuckern oder aber auch das Fehlen von Alkohol und Hopfeninhaltsstoffen als wachstumsunterdrückende Faktoren aufzuführen. Wurden dem Milchsäurebakterium *Lactobacillus plantarum* und der Hefe *Torulasporea delbrueckii* im Bezug auf Bier noch eine eingeschränkte Schädlichkeit nachgesagt, so muss in dem Fall der Soft Drinks von einer erhöhten Gefahr ausgegangen werden. Beide Organismen wurden mehrfach nachgewiesen.

Diese Ausführungen verdeutlichen die Möglichkeit, die in den Biofilmen nachgewiesenen Mikroorganismen bezüglich ihres produktschädlichen Charakters einzustufen. Um noch detailliertere Aussagen treffen zu können wurde neben der theoretischen Beurteilung das jeweils verwendete Substrat zur Erzeugung des Biofilms angeimpft. Hier sollte es nur den produktschädlichen Mikroorganismen möglich sein sich zu vermehren und dadurch produktschädigende Eigenschaften anzuzeigen (z.B. Trübung des Produktes, Bodensatzbildung). Augenscheinlich ging jedoch in diesem Fall die Probenverarbeitung oftmals mit einer Sauerstoffaufnahme der Getränke einher, was sich durch den wiederholten Nachweis von Essigsäurebakterien in den Proben ausdrückte. Essigsäurebakterien sind obligate Aerobier deren Wachstum, in den für das Projekt relevanten karbonisierten Getränken, unterdrückt sein sollte. Für eine spätere Applikation der Methode sind in diesem Fall noch weitere Modifikationen notwendig. Nichtsdestotrotz konnten einige gewinnbringende Beobachtungen angestellt werden, so konnten z.B. die oben angesprochenen potentiell bierschädlichen Bakterien *Lactococcus lactis* und *Lactobacillus plantarum* nur auf dem Nähragar nachgewiesen werden, nicht aber in Bier.

Alles in allem wurden Methoden entwickelt, die es zulassen das Risikopotential von Biofilmen unter hygienischen Aspekten zu bewerten. Für den konkreten Anwendungsfall sollten gegebenenfalls noch Veränderungen an der Methodik erfolgen.

## 2.8 Biokorrosion

Gemäß Antrag sollte die Bewertung der Biofilme hinsichtlich eines gesonderten Risikos Korrosion zu bewirken oder zu fördern rein theoretischer Natur sein. Dazu sollten die nachgewiesenen Biofilm-Mikroorganismen auf Eigenschaften wie beispielsweise die Sekretion korrosionsfördernder Metaboliten überprüft werden. In diesem Fall sind zunächst die fortwährend nachgewiesenen Milch- und

Essigsäurebakterien zu nennen, die naturgemäß eine Säurekorrosion beeinflussen können. Dennoch bleibt zu hinterfragen, inwieweit hier die Konzentrationen ausreichend sind die Passivschichten, der in der Getränkeabfüllung eingesetzten Stähle, anzugreifen. In der projektbegleitenden Literaturrecherche wurden als besonders gefährliche Mikroorganismen sulfatreduzierende Bakterien sowie eisen- und manganoxidierende Bakterien herausgestellt, denen es auch möglich ist Passivschichten von Edelstählen zu zerstören. Keine Vertreter dieser Bakterien wurden in den gezüchteten Biofilmen nachgewiesen.

Um weitere Aussagen treffen zu können inwieweit die entwickelte Methodik eingesetzt werden kann um Biokorrosion zu untersuchen wurden Versuche durchgeführt, die zu Zeiten der Antragstellung nicht in diesem Maße geplant waren. Hier standen Untersuchungen der Aufzuchtflächen nach Biofilmbewuchs im Vordergrund. Dazu wurde ein weiterer Aufzuchtversuch durchgeführt bei dem als Aufzuchtfläche unlegierter, verzinkter Stahl eingesetzt wurde. Solch ein Stahl findet zwar üblicherweise in der Getränkeabfüllung keine Verwendung, doch wurde angenommen, dass sich mögliche Korrosionserscheinungen hier aufgrund fehlender Schutzfunktionen verstärkt bemerkbar machen. Die Identifizierung der beteiligten Mikroorganismen wurde in diesem Fall nicht berücksichtigt. Nachdem auf die Aufzuchtfläche über einen Zeitraum von ca. drei Wochen massives Biofilmwachstum einwirkte konnten zunächst optisch erhebliche Materialveränderungen betrachtet werden (siehe 7.8). Es wurde ein Materialabtrag von bis zu 40 % (gemessen an der Blechdicke) festgestellt. Zusätzlich wurde der Mittenrauwert  $R_a$  an definierten Positionen auf der Aufzuchtfläche, jeweils vor und nach Biofilmbewuchs bestimmt. Hier konnten nach Biofilmwachstum teilweise Werte ermittelt werden, die im Vergleich zu den Ausgangswerten beinahe zehnfach erhöht waren ( $R_a$  0,13  $\mu\text{m}$  zu  $R_a$  1,22  $\mu\text{m}$ ).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass neben der theoretischen Bewertung der Biofilme hinsichtlich des Korrosionsrisikos auch Methoden erforscht wurden dieses experimentell zu bestimmen. Nichtsdestotrotz muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass die untersuchte Oberfläche nicht dem Standard entspricht, der im Getränkeabfüllanlagenbau verwendet wird. Weiterhin gilt zu hinterfragen inwiefern nicht der gezüchtete Biofilm die Korrosion einleitete, sondern vielmehr das als Substrat eingesetzte Getränk. In diesem Fall wurde Apfelschorle verwendet, die nicht zuletzt durch die als Konservierungsmittel zugesetzte Zitronensäure, ein saures Medium darstellt. Insgesamt ist das Thema Biokorrosion zu komplex um es innerhalb der im Antrag geplanten Arbeitszeit angemessen zu durchleuchten (siehe hierzu auch Abschnitt 4.3).

### 3 Bewertung der erzielten Ergebnisse

#### 3.1 Bewertung der erzielten Ergebnisse in Gegenüberstellung mit den Zielsetzungen des Antrages

Im Folgenden werden die im Antrag ausgegebenen Einzelziele den tatsächlich erzielten Ergebnissen gegenübergestellt.

##### 3.1.1 Entwicklung einer Methode und einer Vorrichtung zur Züchtung reproduzierbarer, anlagenspezifischer Biofilme im Abfüllbetrieb

Wie in Abschnitten 2.1 und 2.2 ausführlich beschrieben wurde sowohl eine Apparatur als auch eine Methodik entwickelt, die es zunächst zuließ zuverlässig Biofilme aufzuziehen. Ferner wurde eine, im Rahmen von mikrobiologischen Feldversuchen mögliche, Reproduzierbarkeit der Aufzucht erreicht. Darüber hinaus konnte eine Umgebungs-, wie auch eine Substratspezifität der Biofilmzucht beobachtet werden (siehe 2.5). Dieses Forschungsziel kann somit als vollständig erreicht angesehen werden.

Einschränkungen zu den im Antrag geplanten Arbeitsschritten sind vor allem in der nicht vollständig berücksichtigten Herausstellung des jahreszeitlichen Einflusses auf die Biofilmbildung zu finden. Weiterhin wurde anders als vorgesehen niemals der Standort der Biofilmzucht innerhalb eines Abfüllbetriebs variiert. Beides kann durch den, im Vergleich zum Antrag geplanten, stark erhöhten Arbeitsaufwand erklärt werden, der schlussendlich notwendig war um die Aufzuchtmethodik im Sinne der ausgehenden Zielstellung zu entwickeln. In diesem Zusammenhang sind leichte, notwendige Verschiebungen in den Arbeitspaketen zu nennen.

Nicht im Antrag vorgesehen war ein Vergleich von gezüchteten Biofilmen mit solchen, die real an der Abfüllanlage vorkommen (siehe 2.6). Im Laufe der Forschungsarbeiten erschien ein solcher Vergleich jedoch äußerst sinnvoll. Die sich hier gezeigt hohe Vergleichbarkeit der forcierten Biofilmzucht mit real stattfindendem Biofilmwachstum unterstreicht die Anwendbarkeit der entwickelten Methodik.

### 3.1.2 Entwicklung von Methoden zur Identifizierung der am Biofilm beteiligten Mikroorganismen, mit der Herausstellung zu welchen Zeitpunkten der Biofilm-Entwicklung diese wachsen

In Abschnitt 2.4 ist detailliert erläutert welche Arbeitsschritte unternommen wurden dieses Ziel zu erreichen. Dabei wurde wie geplant eine Methode zur Identifizierung der am Biofilm beteiligten Mikroorganismen entwickelt, die sich an den in der Getränkeindustrie üblichen Verfahren orientiert und diese gezielt mit molekularbiologischen Methoden ergänzt. Einschränkend ist hier die generelle Problematik mikrobieller Analysen zu erwähnen, die sich dadurch ergibt, dass nur ein gewisser Teil der Mikroorganismen nach heutigem Stand der Technik kultivierbar ist. Aufgrund des vergleichsweise aufwendigen und kostenintensiven Verfahrens der molekularbiologischen Identifizierung der Biofilm-Mikroorganismen konnten nicht alle Organismen dieser Untersuchung unterzogen werden, die zunächst mit klassischen, mikrobiologischen Verfahren kultiviert wurden. Es musste sich daher für den molekularbiologischen Nachweis auf Mikroorganismen beschränkt werden, die beispielsweise aufgrund stetiger Wiederkehr oder eines möglichen produktschädigenden Charakters von besonderem Interesse waren. Trotz dieser Einschränkungen wurde das im Antrag ausgegebene Ziel erreicht.

### 3.1.3 Entwicklung von Methoden zur Bewertung des von den Biofilmen ausgehenden Risikos bezüglich hygienischer Aspekte und der Gefahr der Biokorrosion

In Abschnitt 2.7 werden Beispiele gegeben wie die laut Antrag vorgesehene, theoretische Bewertung, der im Biofilm identifizierten Mikroorganismen hinsichtlich ihres produktschädlichen Charakters durchgeführt wurde. Im Einzelfall kann durch eine entsprechende Literaturrecherche eine Einteilung der Mikroorganismen erfolgen. Um noch detailliertere Aussagen treffen zu können wurde neben der theoretischen Beurteilung das jeweils verwendete Substrat zur Erzeugung des Biofilms angeimpft. Hier sollte es nur den produktschädlichen Mikroorganismen möglich sein sich zu vermehren und dadurch produktschädigende Eigenschaften anzuzeigen (z.B. Trübung des Produktes, Bodensatzbildung). Augenscheinlich kam es jedoch hierbei zu Schwierigkeiten in der Probenverarbeitung, da teilweise obligat aerobe Mikroorganismen in den karbonisierten Getränken wuchsen und somit eine Produktschädlichkeit nicht gegeben ist.

Analog zur theoretischen Beurteilung des produktschädigenden Charakters der Mikroorganismen wurde auch eine Einstufung hinsichtlich der erhöhten Gefahr von Biokorrosion vorgenommen (siehe 2.8). Anders als im Antrag vorgesehen wurden zusätzlich Untersuchungen an den mit Biofilmen bewachsenen Oberflächen durchgeführt, die teils erhebliche Korrosionserscheinungen offenbarten. Hier muss

allerdings einschränkend erwähnt werden, dass Materialien zum Einsatz kamen die nicht den Standardmaterialien der Getränkeabfüllung entsprachen. Nichtsdestotrotz können die hier entwickelten Methoden auch für die Beurteilung von abfüllanlagenrelevanten Materialien herangezogen werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Methoden entwickelt wurden, die es zulassen das Risikopotential von Biofilmen unter hygienischen Aspekten und der Gefahr von Biokorrosion zu bewerten. Für den konkreten Anwendungsfall sollten gegebenenfalls noch Veränderungen an den Methoden erfolgen.

### 3.2 Bezugnahme auf die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

An dem abgeschlossenen Projekt wirkten mit dem Projektleiter und dem hauptsächlich durchführenden Ingenieur zwei Mitarbeiter der Gruppe A mit. Weiterhin war eine Laborfachkraft am Projekt beteiligt.

Der Projektleiter war neben seiner betreuenden und beratenden Funktion im Verlauf des gesamten Projektes besonders wichtig durch seine guten Kontakte in die Brau- und Getränkeindustrie sowie zu wissenschaftlichen Kreisen im In- und Ausland. Dies ermöglichte beispielsweise Getränkeabfüller zu finden, in deren Räumlichkeiten Versuche durchgeführt werden konnten, die für das Projekt essentiell waren. Weiterhin bot er stets Gelegenheit, das laufende Vorhaben bereits während der Durchführung in den entsprechenden Kreisen bekannt zu machen. Er organisierte Veröffentlichungsgelegenheiten und lieferte wertvolle Mitarbeit und Unterstützung bei der Erarbeitung von Vorträgen, Berichten und Präsentationen. Ohne seinen Arbeitsbeitrag im erfolgten Umfang wäre die Durchführung des Vorhabens so nicht möglich gewesen.

Der durchführende Ingenieur war mit der Gesamtkoordination aller Aspekte rund um die einzelnen Arbeitspakete betraut. So oblag ihnen die Planung und Abwicklung der durchgeführten Versuche sowie die Beschaffung vorhabenbezogener Geräte, Materialien oder Dienstleistungen. Die wichtigsten Tätigkeiten bestanden in der Entwicklung der Aufzuchtmethodik und den mikro- und makrobiologischen Analysen. Darüber hinaus war er unter anderem für die projektbegleitenden Berichte verantwortlich, erstellte vorhabenbezogene Präsentationen und hielt Vorträge.

Am Arbeitsintensivsten waren die Entwicklung der Aufzuchtmethodik und die dazugehörige Identifizierung der beteiligten Mikroorganismen. Im Laufe des Projekts stellte sich heraus, dass sich von der im Antrag aufgestellten Versuchsplanung teilweise verabschiedet werden musste. Dieses geschah jedoch im Sinne der ausgegeben Ziele, die auf diese Weise äußerst zufriedenstellend erreicht werden konnten. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die geleistete Arbeit in Umfang und Form notwendig für einen erfolgreichen Abschluss des Projekts war.

### 3.3 Bezugnahme auf die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Personalausgaben als größte Position des zahlenmäßigen Nachweises ergeben sich aus den oben aufgeführten Tätigkeiten und waren gemäß der Zielsetzung des Antrages erforderlich

Als Einzelgeräte, die projektbezogen angeschafft wurden sind der Schlauchpumpenantrieb und der dazugehörige Pumpenkopf zu nennen, deren Kauf jedoch unvermeidlich war, um das Vorhaben überhaupt durchzuführen. Im Vergleich zu den Personalkosten können die Ausgaben hier jedoch beinahe vernachlässigt werden. Gleiches gilt für beispielsweise auch für Materialien und in Auftrag gegebene Dienstleistungen (PCR Sequenzierung).

## 4 Darstellung der Innovationspotenziale und Applikationsmöglichkeiten

### 4.1 Wissenschaftliche und wirtschaftliche Bedeutung, Anwendungspotential, Anwendungsbereiche in der mittelständischen Wirtschaft

Die wirtschaftliche Bedeutung der Forschungsergebnisse sind prinzipiell dieselben, die schon bei der Antragstellung zusammengetragen wurden. Die entwickelte Methodik kann zuallererst als Instrument genutzt werden, das Hygienekonzept in Getränkeabfüllbetrieben zu verbessern und so zu einer Erhöhung der biologischen Sicherheit von Lebensmitteln beitragen. Die damit verbundenen wirtschaftlichen Aspekte liegen auf der Hand: Durch kontaminierte Produkte hervorgerufene Imageschäden beim Verbraucher, Rückrufaktionen und Verstöße gegen die Lebensmittelhygiene-Verordnung gehen stets mit immensen wirtschaftlichen Verlusten einher. Weiterhin würden sich durch Nutzung der Biofilmaufzuchtmethode zur gezielten Optimierung der Reinigungs- und Desinfektionsstrategie erhebliche Einsparungspotenziale bezüglich Personal- und Zeitaufwand, Reinigungs- und Desinfektionsmitteln sowie Wasser und Energie ergeben.

Die wissenschaftliche Bedeutung des Forschungsvorhabens lag vor allem in dem bisher noch nicht verfolgten Ansatz einer spezifischen, individuellen Untersuchung von Biofilmen einschließlich ihrer Entstehung. Die im Antrag aufgestellte Vermutung, dass Bildung und Entstehung von Biofilmen stark mit Umweltparametern wie Umgebungsluft und Substrat variieren wurde bestätigt. Weiterhin kann die entwickelte Methodik für wissenschaftliche Untersuchungen herangezogen werden um so das Wissen um Biofilme und deren Wachstum weiter voranzutreiben. Dieses bestätigen schon allein die jetzt erhaltenen Forschungsergebnisse, die genau genommen lediglich zur Methodenentwicklung vorgesehen

waren, doch bereits generelle Aussagen über das Biofilmwachstum in Getränkeabfüllanlagen zulassen. Als Beispiel sei hier die mehrfach beobachtete Primärbesiedelung durch Essigsäurebakterien zu nennen. Die Möglichkeit die Forschungsergebnisse zur Vertiefung des Wissens über Biokorrosion zu verwenden werden in Abschnitte 4.3 näher erörtert.

Als Anwendungsbereich in der mittelständischen Wirtschaft wird vorrangig die schon erläuterte Möglichkeit von Getränkeabfüllbetrieben angesehen, die entwickelte Methode zur Verbesserung des Hygienekonzepts und zur gezielten Optimierung der Reinigungs- und Desinfektionsstrategie zu nutzen. An dieser Stelle ist nochmals zu erwähnen, dass die Getränkeindustrie in Deutschland, im speziellen Brauereien und Mineralbrunnen, im Wesentlichen mittelständisch geprägt ist. Ein großes Interesse an den Forschungsergebnissen wurde nicht zuletzt durch die große Bereitschaft der Abfüller deutlich, projektbezogene Untersuchungen in ihren Betrieben zu ermöglichen. Ferner können die erzielten Ergebnisse von Herstellern von Reinigungs- und Desinfektionsmitteln dazu genutzt werden, maßgeschneiderte Reinigungskonzepte für einzelne Abfüller zu entwickeln. Inwieweit Anlagenbauer durch fundiertes Wissen über Biokorrosion und deren Entstehung beispielsweise entsprechende Modifikationen an Materialien vornehmen können, kann gegebenenfalls in sich anschließenden, auf dem jetzigen Projekt aufbauenden Vorhaben erforscht werden.

#### 4.2 Darlegung der Ergebnisverwertung (eigene Nutzung, Technologietransfer, Know-how-Verkäufe u.a.)

Wie in Abschnitt 0 angegeben wurden schon zum jetzigen Zeitpunkt zahlreiche Artikel und Vorträge zum Vorhaben veröffentlicht. Dabei wurden die zahlreichen Kanäle der VLB Berlin im In- und Ausland genutzt um entsprechende Informationen, bzw. Ergebnisse zu transferieren. An dieser Stelle ist das große Interesse hervorzuheben, welches die Veröffentlichungen hervorriefen. Die Vorhabenergebnisse werden auch in Zukunft durch die der VLB gegebenen Möglichkeiten des Technologietransfers publiziert. Beispielhaft sind hier Seminare, Fachartikel, Beratungstätigkeiten und universitäre Lehrstühle zu nennen. Neben dem eigenen Nutzen das Wissen um Biofilme zu fundieren kann eine Applikationsmöglichkeit seitens der VLB Berlin das Anbieten einer Dienstleistung sein. Dazu können Versuche analog zu denen des Vorhabens durchgeführt werden um so z.B. Getränkeabfüllern einen neuartigen Beratungsservice anzubieten.

### 4.3 Perspektive und Chancen für sich anschließende Entwicklungsarbeiten

Schon im Antrag wurden Beispiele für Möglichkeiten von sich anschließenden Entwicklungsarbeiten genannt, bei denen die hier entwickelte Methodik eine Grundlage bilden kann. Es wurden folgende, teils experimentelle Ansätze zur Bekämpfung aufgezählt:

- Gezielte Bekämpfung der Primärbesiedler und deren Begleitorganismen.
- Enzymatische oder chemische Zerstörung der EPS-Matrix.
- Oberflächenmodifikationen der Abfüllanlage.
- Störung der Kommunikation der Mikroorganismen („Quorum Sensing“) mit chemischen Stoffen.
- Monitoring Systeme, die auf der Identifikation bestimmter Mikroorganismen beruhen.

Gerade vor dem Hintergrund des erfolgreichen Abschluss dieses Projekts wird deutlich, dass diesen Ansätzen, ausgehend von der entwickelten Methode der Biofilmzucht, nachgegangen werden sollte. Dabei kann die erreichte reproduzierbare, substrat- und umgebungsspezifische Aufzucht von entscheidender Bedeutung sein.

Während der Arbeiten des jetzigen Vorhabens stellte sich zudem heraus, dass der Themenkomplex Biokorrosion ein höchst interessantes Forschungsgebiet bildet. Wiederum ausgehend von der hier entwickelten Methodik der Biofilmzucht können beispielsweise ausgiebige Untersuchungen an Oberflächen erfolgen. Hier ist der Einsatz eines Elektronen-Raster-Mikroskops naheliegend um auch schon geringe Korrosionserscheinungen, induziert von Biofilmen, beobachten zu können. Auch Untersuchungen der atomaren Zusammensetzung der Oberflächen nach Biofilmbewuchs sind denkbar. Insgesamt wird deutlich, dass das entwickelte Verfahren eine exzellente Basis für zahlreiche sich anschließende Vorhaben der industriellen Forschung und Entwicklung bilden kann.

## 5 Angaben zu erworbenen bzw. angemeldeten Schutzrechten für Vorhabensergebnisse

Es wurden keine Patente oder Schutzrechte angemeldet.

## 6 Zusammenstellung aller erfolgten bzw. geplanten Veröffentlichungen

Folgende Veröffentlichungen sind bereits erfolgt:

- Vortrag: „Spezialanalytik zur Prozessoptimierung: Biofilme – Scuffingneigung – Peripherie der Abfüllung“, R. Pahl, 99. Oktobertagung der VLB, Berlin, 09.10.2012
- Vortrag: „Generación artificial de biopelículas para caracterizar el potencial de contaminación secundaria en el envasado“, R. Pahl, 4° Simposio Iberoamericano del VLB – Técnica Cervecera y del Envasado, 08.08.2013, Buenos Aires (Argentinien)
- Vortrag: „Substrat- und Umgebungsspezifisches Biofilmwachstum in Abfüllanlagen“, J. Fischer, 9. VLB-Seminar für die Brau- und Getränkeindustrie in Russland, 27.11.2013, Moskau (Russland)
- Artikel: „Substrate and environment specific biofilms in beverage filling plants“, R. Pahl und J. Fischer, Brauerei Forum, International Edition September 2013, S. 12-15
  - Übersetzung ins Deutsche: Brauerei Forum, Oktober 2013, S. 18-21
  - Übersetzung ins Russische: Russian Trade Magazin «Beverage Industry», 1 [97] 2014, S. 24-29

Folgende Veröffentlichung ist derzeit geplant:

- Poster: "Substrate and environment-specific cultivation of biofilms in filling lines", Eingereicht: FoodMicro 2014, Nantes (Frankreich)

## 7 Anhang

### 7.1 Skizzen Aufzuchtanlage / Aufzuchtmethodik

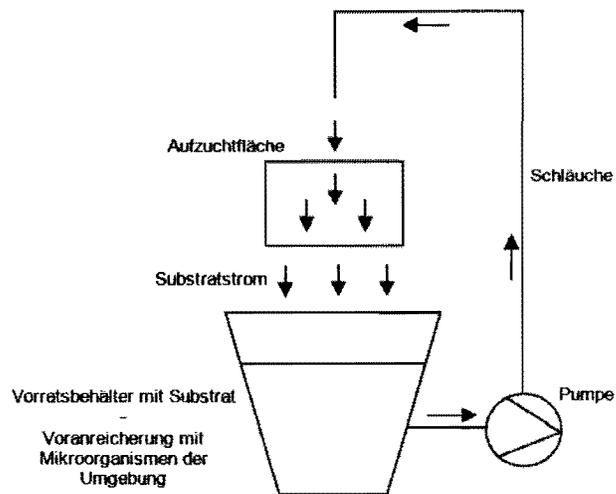


Abbildung 1: Aufzuchtmethodik – Substratfluss im Kreislauf

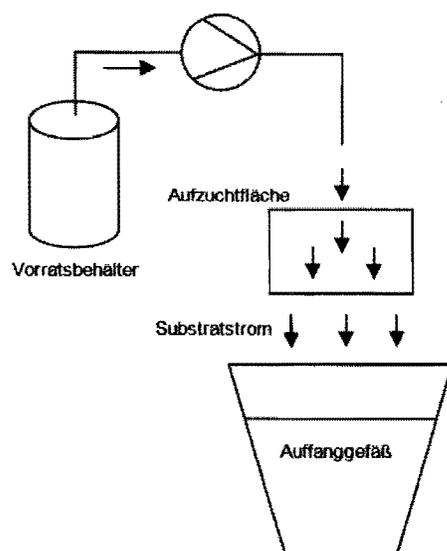


Abbildung 2: Aufzuchtmethodik – Überströmung mit frischem Substrat

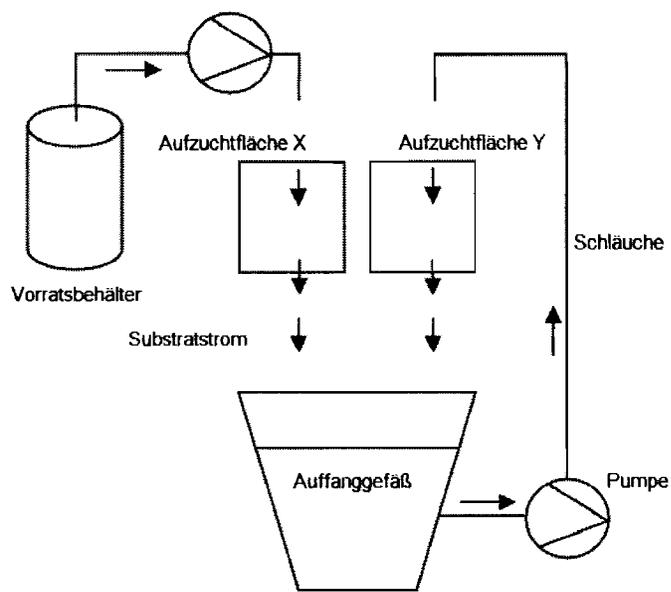


Abbildung 3: Aufzuchtmethodik – Substratfluss im Kreislauf + Überströmung mit frischem Substrat (2 Platten)

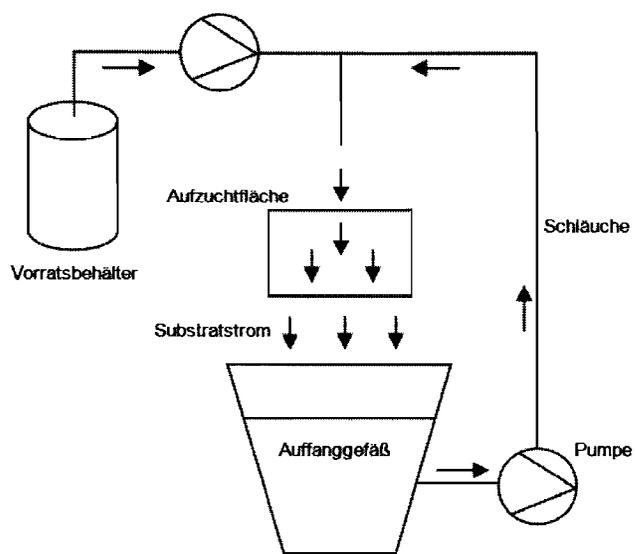


Abbildung 4: Aufzuchtmethodik – Substratfluss im Kreislauf + Überströmung mit frischem Substrat (1Platte)

## 7.2 Beispielbilder Aufzuchtanlage



Abbildung 5: Aufzuchtanlage im Bereich der Füllmaschine – Brauerei

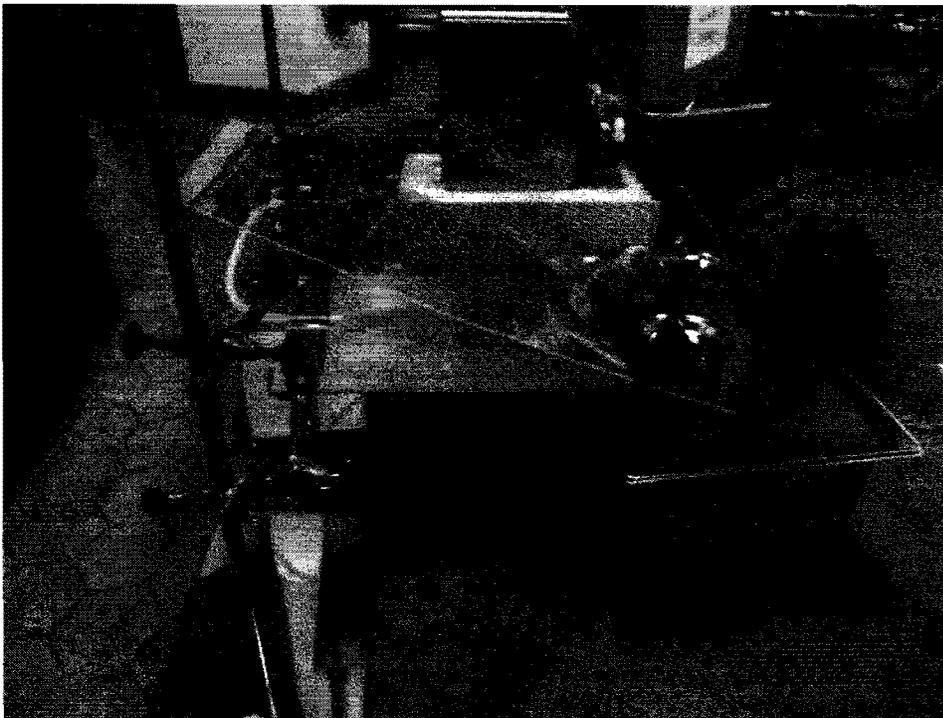


Abbildung 6: Beispielbild 1 Aufzuchtanlage

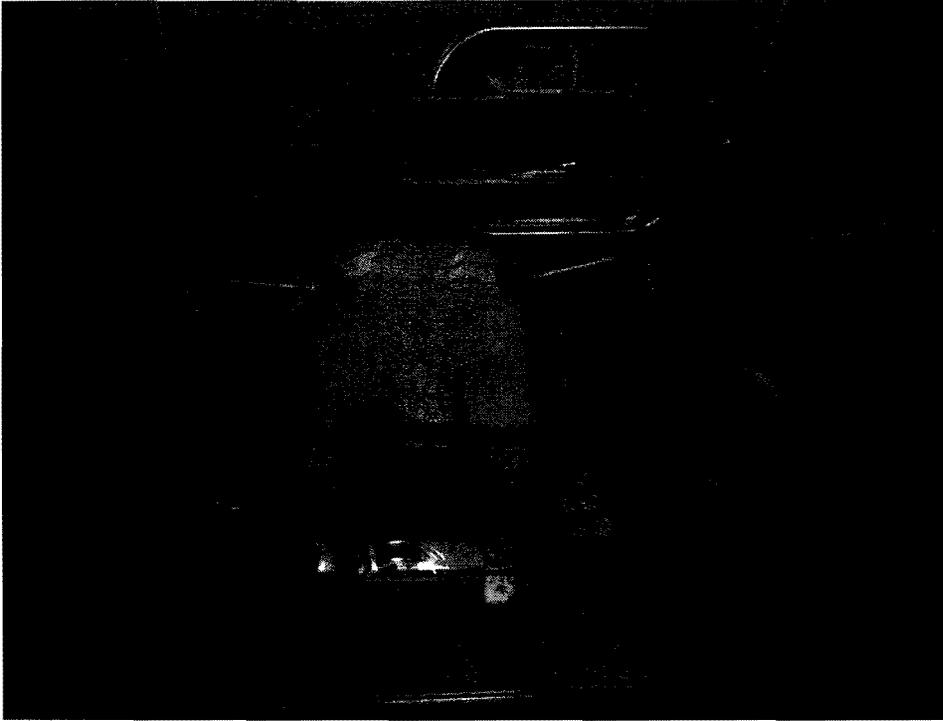


Abbildung 7: Beispielbild 2 Aufzuchtanlage

### 7.3 Biofilentwicklung auf der Aufzuchtanlage – Vorversuch

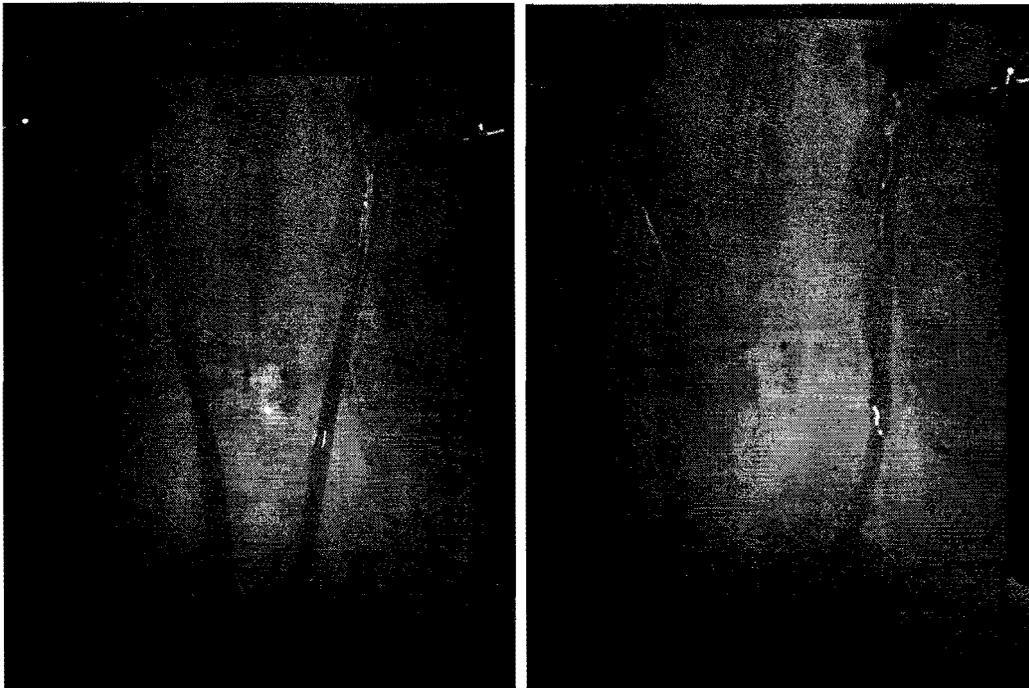


Abbildung 8: Biofilmwachstum nach 0 h (l.) und 24 h (r.)

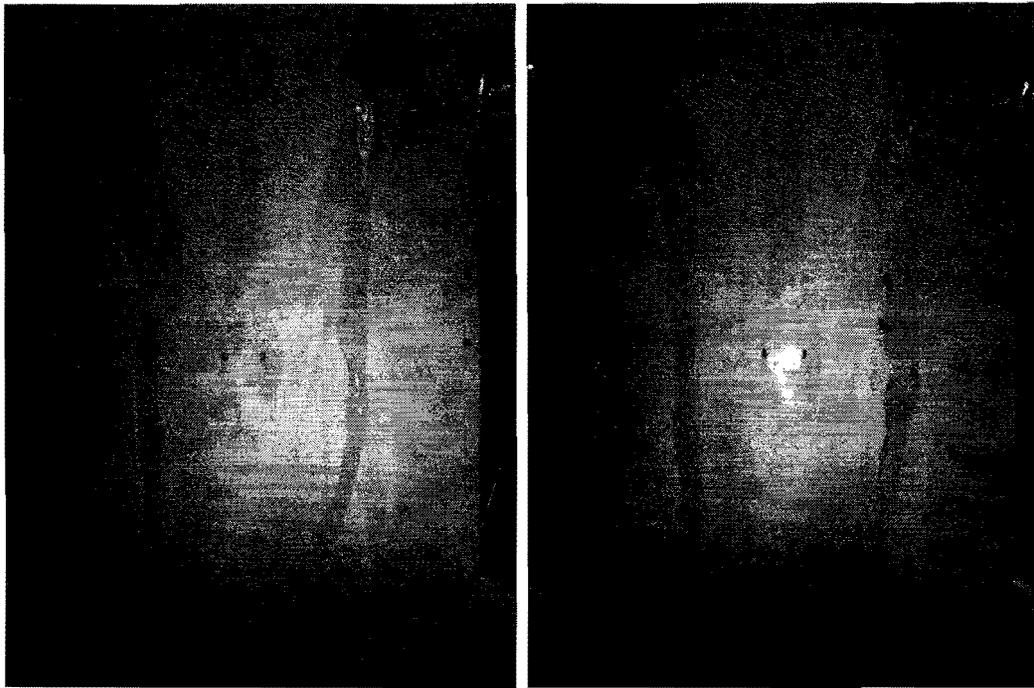


Abbildung 9: Biofilmwachstum nach 48 h (l.) und 72 h (r.)

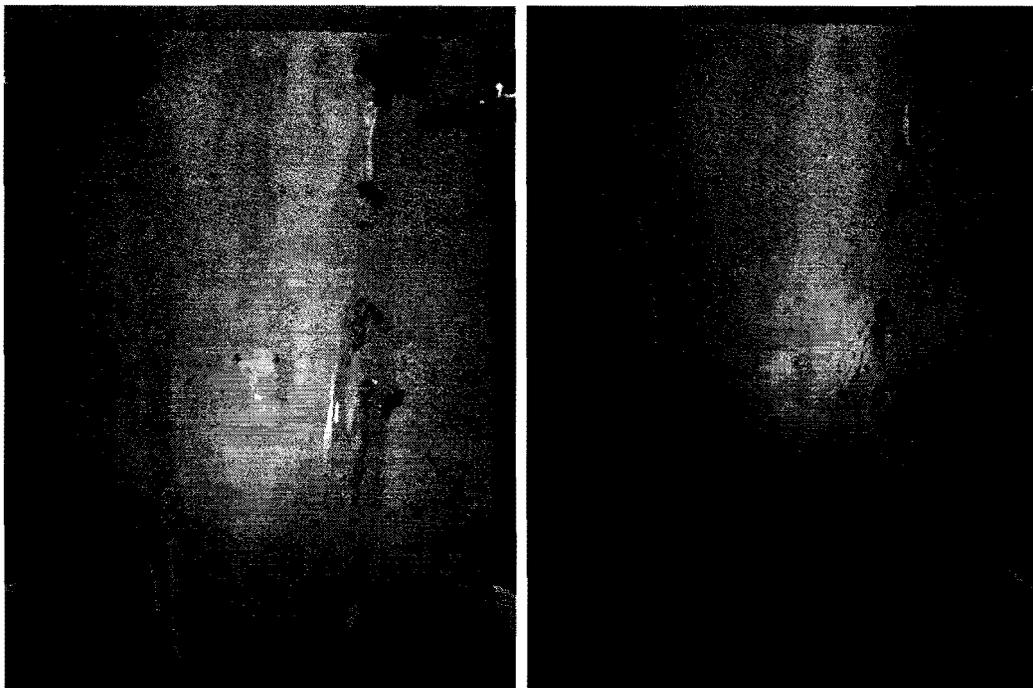


Abbildung 10: Biofilmwachstum nach 96 h (l.) und 168 h (r.)

#### 7.4 Beispiele für ausgebildete Biofilme auf der Aufzuchtanlage

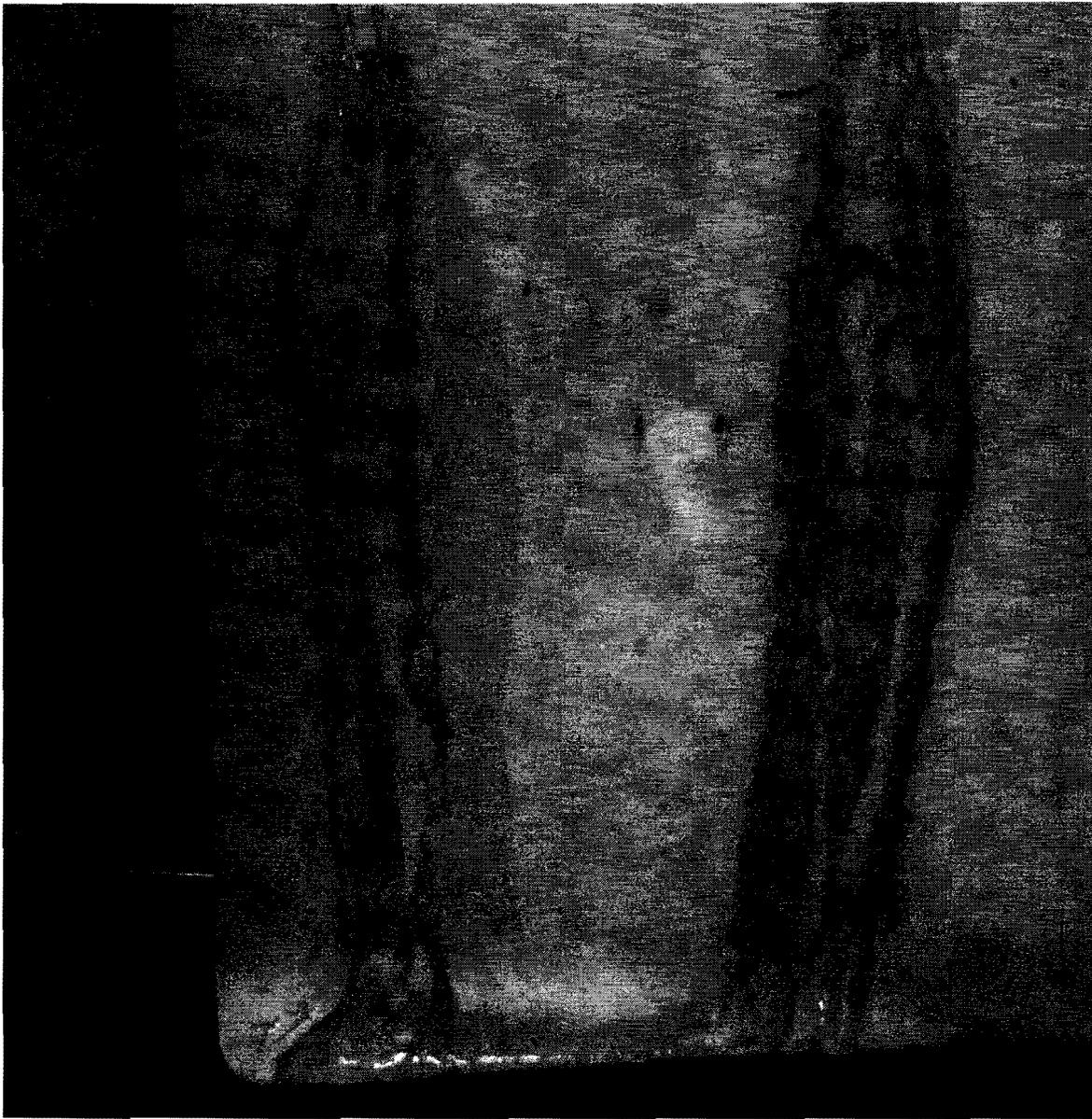


Abbildung 11: Biofilm nach 168h – Vorversuch

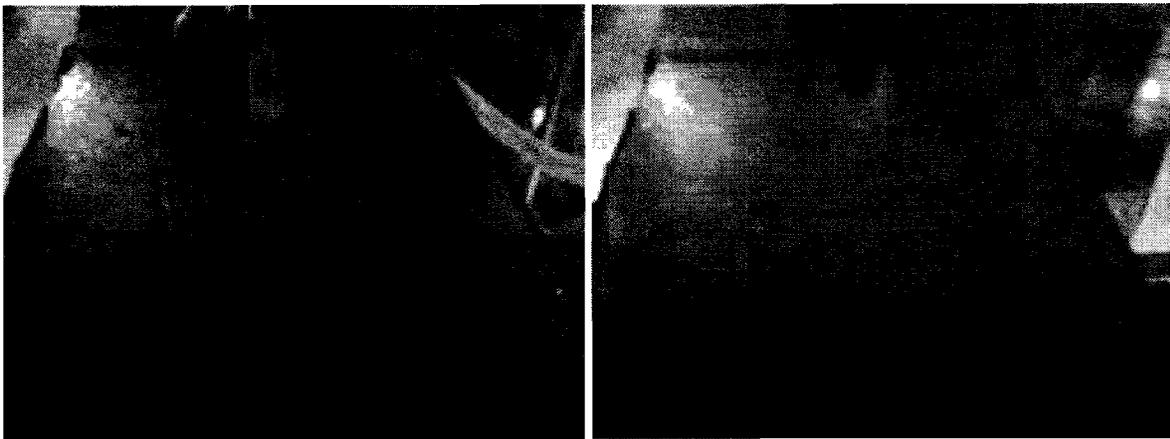


Abbildung 12: Biofilm Versuch 10 nach 240 h (l.) und 336 h (r.)

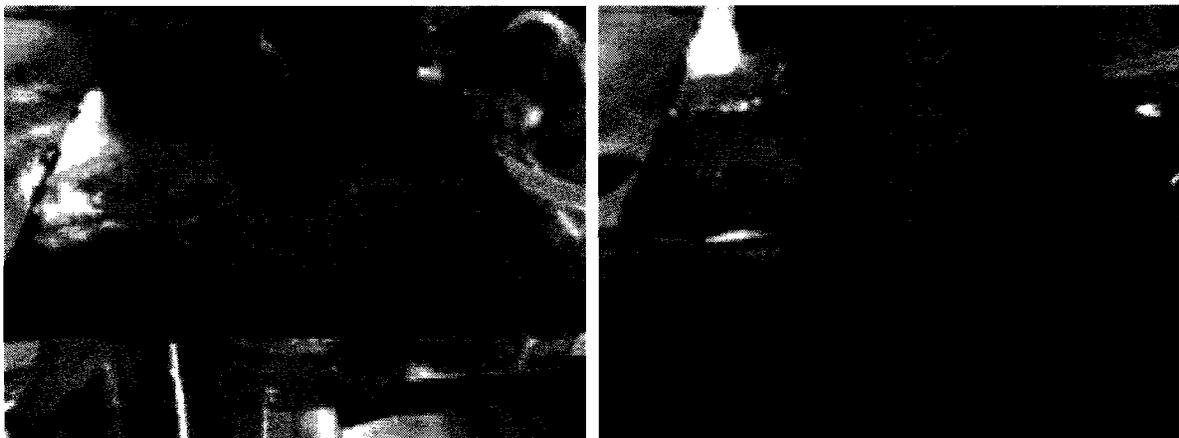


Abbildung 13: Biofilm Versuch 11 nach 240 h (l.) und 336 h (r.)

## 7.5 Versuchsprotokolle

Tabelle 1: Versuchsprotokoll Versuch 1

### Versuch 1

Jahreszeit: Sommer 2012  
Standort: Standort III (Technikum VLB Berlin)

Aufzuchtmethode: Substrat im Kreislauf; kein Substratwechsel  
Substrat: Bier (Pilsener Typ)  
Versuchsdauer: 5 Tage

Aufzuchtfläche: Edelstahl (Fachhandel)

Probenahme Nr.	Zeit [h]	Identifizierte Mikroorganismen (PCR)
0	0	
1	24	<i>Acetobacter indonesiensis</i> <i>Acetobacter syzygii</i>
2	48	<i>Acetobacter cerevisiae</i> <i>Acetobacter persicus</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>
3	72	<i>Acetobacter cerevisiae</i> <i>Acetobacter persicus</i>
4	96	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Lactobacillus casei</i>
5	120	<i>Acetobacter lovaniensis</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Enterobacter ludwigii</i> <i>Pseudomonas maltophilia</i>

Tabelle 2: Versuchsprotokoll Versuch 2

Versuch 2

Jahreszeit: Sommer 2012  
 Standort: Standort III (Technikum VLB Berlin)  
 Aufzuchtmethode: Substrat im Kreislauf; kein Substratwechsel  
 Substrat: Bier (Pilsener Typ)  
 Versuchsdauer: 4 Tage  
 Aufzuchtfläche: Edelstahl (Fachhandel)

Probenahme Nr.	Zeit [h]	Identifizierte Mikroorganismen (PCR)
0	0	
1	24	<i>Acetobacter cerevisiae</i> <i>Acetobacter persicus</i>
2	48	<i>Lactobacillus casei</i>
3	72	
4	96	<i>Acetobacter indonesiensis</i> <i>Acetobacter sp.</i> <i>Enterobacter sp.</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Pantoea agglomerans</i> <i>Pseudomonas oryzihabitans</i> <i>Pseudomonas sp.</i>

Tabelle 3: Versuchsprotokoll – Versuch 3

Versuch 3

Jahreszeit: Sommer 2012  
 Standort: Standort III (Technikum VLB Berlin)

Aufzuchtmethode: Substrat im Kreislauf; kein Substratwechsel  
 Substrat: Bier (Pilsener Typ)  
 Versuchsdauer: 7 Tage

Aufzuchtfläche: Edelstahl (Fachhandel)

Probenahme Nr.	Zeit [h]	Identifizierte Mikroorganismen (PCR)
0	0	
1	24	<i>Klebsiella sp.</i> <i>Raoultella sp.</i>
2	48	
3	72	<i>Klebsiella sp.</i> <i>Kluyvera cochleae</i> <i>Morganella morganii</i>
4	96	
5	120	keine Probenahme
6	144	keine Probenahme
7	168	<i>Enterobacter sp.</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Providencia stuartii</i> <i>Pseudomonas maltophilia</i>

Tabelle 4: Versuchsprotokoll – Versuch 4

Versuch 4

Jahreszeit: Sommer 2012  
 Standort: Standort I (Industrieller Abfüller - Brauerei)

Aufzuchtmethode: Substrat im Kreislauf; Substratwechsel  
 Substrat: Bier (Pilsener Typ)  
 Versuchsdauer: 8 Tage  
 Bemerkungen: Produktionsstopp Tage 6 und 7 - kein Substratwechsel, keine Probenahme

Aufzuchtfläche: Edelstahl (Fachhandel)

Probenahme Nr.	Zeit [h]	Identifizierte Mikroorganismen (PCR)	"realer" Biofilm I	"realer" Biofilm II
0	0			
1	24	<i>Acetobacter cerevisiae</i>		
2	48		<i>Acetobacter cerevisiae</i> <i>Acetobacter persicus</i>	
3	72	<i>Acetobacter lovaniensis</i> <i>Gluconobacter frateurii</i>		
4	96	<i>Acetobacter persicus</i> <i>Pichia anomala</i> <i>Wickerhamomyces anomalus</i>		
5	120	keine Probenahme, kein Substratwechsel		
6	144	keine Probenahme, kein Substratwechsel		
7	168	<i>Acetobacter lovaniensis</i> <i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Pichia fermentans</i> <i>Pichia kluyveri</i> <i>Pichia membranifaciens</i> <i>Pseudomonas fragi</i>		<i>Acetobacter cerevisiae</i> <i>Acetobacter orientalis</i> <i>Acetobacter persicus</i> <i>Acinetobacter sp.</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Enterobacter ludwigii</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Leuconostoc citreum</i> <i>Sphingomonas yabuuchiae</i> <i>Wickerhamomyces anomalus</i>
8	192	<i>Acetobacter cerevisiae</i> <i>Acetobacter orientalis</i> <i>Acetobacter persicus</i> <i>Candida xylopsaci</i> <i>Pichia anomala</i> <i>Pichia fermentans</i> <i>Pichia kluyveri</i> <i>Pichia kudriavzevii</i> <i>Wickerhamomyces anomalus</i>		

Tabelle 5: Versuchsprotokoll – Versuch 5

Versuch 5

Jahreszeit: Sommer 2012  
 Standort: Standort I (Industrieller Abfüller - Brauerei)

Aufzuchtmethode: Substrat im Kreislauf; Substratwechsel  
 Substrat: Bier (Pilsener Typ)  
 Versuchsdauer: 4 Tage  
 Bemerkungen:

Aufzuchtfläche: Edelstahl (Fachhandel)

Probenahme Nr.	Zeit [h]	Identifizierte Mikroorganismen (PCR)
0	0	
1	24	
2	48	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3	72	<i>Aureobasidium proteae</i> <i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Candida sp.</i> <i>Pichia kluyveri</i> <i>Pichia membranifaciens</i> <i>Saccharomycetales sp.</i>
4	96	<i>Candida sp.</i> <i>Candida xylopsi</i> <i>Issatchenkia orientalis</i> <i>Pichia kudriavzevii</i> <i>Pichia membranifaciens</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomycetales sp.</i> <i>Saccharomycetes sp.</i> <i>Torulasporea delbrueckii</i>

Tabelle 6: Versuchsprotokoll – Versuch 6, Teil 1

Versuch 6

Jahreszeit: Sommer 2012  
 Standort: Standort I (Industrieller Abfüller - Brauerei)

Aufzuchtmethode: Überströmung mit frischem Substrat  
 Substrat: Bier (Pilsener Typ)  
 Versuchsdauer: 17 Tage  
 Bemerkungen: Produktionsstopp Tage 6,7 + 13,14 Trockenlaufen, keine Probenahme

Aufzuchtfläche: Edelstahl (Fachhandel)

Probenahme Nr.	Zeit [h]	Identifizierte Mikroorganismen (PCR)
0	0	
1	24	
2	48	<i>Acetobacter orientalis</i> <i>Basidiomycete sp.</i> <i>Candida pinguobensis</i> <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Rhodotorula sp.</i> <i>Sporobolomyces caprasmae</i>
3	72	<i>Acetobacter orientalis</i> <i>Basidiomycete sp.</i> <i>Bulleromyces albus</i> <i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Rhodotorula sp.</i> <i>Sporobolomyces coprosmae</i>
4	96	<i>Acetobacter orientalis</i> <i>Wickerhamomyces anomolus</i>
5	120	keine Probenahme, Trockenlaufen
6	144	keine Probenahme, Trockenlaufen
7	168	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Tabelle 7: Versuchsprotokoll – Versuch 6, Teil 2

Versuch 6

Jahreszeit: Sommer 2012  
 Standort: Standort I (Industrieller Abfüller - Brauerei)

Aufzuchtmethode: Überströmung mit frischem Substrat  
 Substrat: Bier (Pilsener Typ)  
 Versuchsdauer: 17 Tage  
 Bemerkungen: Produktionsstopp Tage 6,7 + 13,14 Trockenlaufen, keine Probenahme

Aufzuchtfläche: Edelstahl (Fachhandel)

Probenahme Nr.	Zeit [h]	Identifizierte Mikroorganismen (PCR)
8	192	<i>Candida tropicalis</i> <i>Gluconobacter frateurii</i>
9	216	<i>Acetobacter cibinogensis</i> <i>Klebsiella sp.</i> <i>Raoultella sp.</i>
10	240	<i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Paracoccus yeei</i> <i>Wickerhamomyces anomalus</i>
11	264	<i>Clavispora lusitaniae</i> <i>Gluconobacter frateurii</i>
12	288	keine Probenahme, Trockenlaufen
13	312	keine Probenahme, Trockenlaufen
14	336	<i>Gluconobacter frateurii</i>
15	360	<i>Gluconobacter frateurii</i>
16	384	<i>Acetobacter lovaniensis</i> <i>Gluconobacter frateurii</i>
17	408	<i>Acetobacter akinawensis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

**Tabelle 8: Versuchsprotokoll – Versuch 6, Teil 3**

Versuch 6

Jahreszeit: Sommer 2012  
 Standort: Standort I (Industrieller Abfüller - Brauerei)

Aufzuchtmethode: Überströmung mit frischem Substrat  
 Substrat: Bier (Pilsener Typ)  
 Versuchsdauer: 17 Tage  
 Bemerkungen: Produktionsstopp Tage 6,7+ 13,14 Trockenlaufen, keine Probenahme

Aufzuchtfläche: Edelstahl (Fachhandel)

Probenahme Nr.	Zeit [h]	"realer" Biofilm I	"realer" Biofilm II	"realer" Biofilm III	"realer" Biofilm IIII
0	0				
1	24				
2	48	<i>Acetobacter cerevisiae</i> <i>Acetobacter indonesiensis</i> <i>Acetobacter orientalis</i> <i>Acetobacter persicus</i> <i>Acetobacter sp.</i> <i>Asaia krungthepensis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Staphylococcus wameri</i> <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Candida sp.</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Pseudomonas cedrina</i>		
3	72				
4	96				
5	120				
6	144				
7	168				

Tabelle 9: Versuchsprotokoll – Versuch 6, Teil 4

Versuch 6

Jahreszeit: Sommer 2012  
 Standort: Standort I (Industrieller Abfüller - Brauerei)

Aufzuchtmethode: Überströmung mit frischem Substrat  
 Substrat: Bier (Pilsener Typ)  
 Versuchsdauer: 17 Tage  
 Bemerkungen: Produktionsstopp Tage 6,7 + 13,14 Trockenlaufen, keine Probenahme

Aufzuchtfläche: Edelstahl (Fachhandel)

Probenahme Nr.	Zeit [h]	"realer" Biofilm I	"realer" Biofilm II	"realer" Biofilm III	"realer" Biofilm III
8	192				
9	216			<i>Acetobacter lovaniensis</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter johnsonii</i> <i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Candida sp.</i> <i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Rouletella sp.</i> <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Aureobasidium proteae</i> <i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Dipodascus australiensis</i> <i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Kluyvera ascorbata</i> <i>Pseudomonas maltophila</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Saccharomyces sp.</i> <i>Stenotrophomonas sp.</i>
10	240				
11	264				
12	288				
13	312				
14	336				
15	360				
16	384				
17	408				

Tabelle 10: Versuchsprotokoll – Versuch 7

Versuch 7

Jahreszeit: Winter 2012/2013  
 Standort: Standort III (Technikum VLB Berlin)

Aufzuchtmethode: Kreislauf, Substratwechsel (X) + Überströmung mit frischem Substrat (Y) auf 2 Aufzuchtflächen  
 Substrat: Bier (Pilsener Typ)  
 Versuchsdauer: 18 Tage  
 Bemerkungen: Produktionsstopp Tage 6,7 + 13,14 Trockenlaufen, keine Probenahme

Aufzuchtfläche: Edelstahl (Fachhandel)

Probenahme Nr.	Zeit [h]	Identifizierte Mikroorganismen (PCR) X	Identifizierte Mikroorganismen (PCR) Y
0	0		
1	24	<i>Pichia sp.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
2	48	<i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Acetobacter lovaniensis</i> <i>Candida sp.</i>
3	72	<i>Candida sp.</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Pichia occidentalis</i>	<i>Candida inconspicua</i> <i>Candida sp.</i> <i>Pichia membranifaciens</i> <i>Pichia occidentalis</i> <i>Pichia sp.</i>
4	96	<i>Bulleromyces albus</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Candida sp.</i> <i>Chryseobacterium hispanicum</i> <i>Klebsiella sp.</i> <i>Pichia occidentalis</i> <i>Pichia sp.</i> <i>Pseudomonas fragi</i>
5	120	keine Probenahme, Trockenlaufen	keine Probenahme, Trockenlaufen
6	144	keine Probenahme, Trockenlaufen	keine Probenahme, Trockenlaufen
7	168	<i>Klebsiella sp.</i> <i>Pichia sp.</i>	<i>Lactobacillus casei</i> <i>Pantoea citrea</i> <i>Pantoea punctata</i>
8	192	<i>Acetobacter lovaniensis</i>	
9	216	<i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Saccharomyces pastorianus</i>	
10	240	<i>Pichia sp.</i>	<i>Klebsiella sp.</i> <i>Raoultella ornithinolytica</i>
11	264		<i>Acetobacter cerevisiae</i> <i>Acetobacter indonesiensis</i> <i>Acetobacter persicus</i> <i>Candida sp.</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Kluyvera ascorbata</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Leuconostoc citreum</i> <i>Pantoea citrea</i> <i>Pantoea punctata</i> <i>Pichia sp.</i>
12	288	keine Probenahme, Trockenlaufen	keine Probenahme, Trockenlaufen
13	312	keine Probenahme, Trockenlaufen	keine Probenahme, Trockenlaufen
14	336	<i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Gluconobacter hansenii</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Paracoccus yeai</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>
15	360	<i>Acetobacter lovaniensis</i> <i>Candida sp.</i> <i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Pichia sp.</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>
16	384	<i>Candida sp.</i> <i>Pichia sp.</i>	<i>Candida sp.</i> <i>Pichia sp.</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>
17	408	<i>Pichia anomala</i> <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	<i>Ewingella americana</i> <i>Pichia sp.</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>
18	432	<i>Candida sp.</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>

Tabelle 11: Versuchsprotokoll – Versuch 8

Versuch 8

Jahreszeit: Winter 2012/2013  
 Standort: Standort III (Technikum VLB Berlin)

Aufzuchtmethode: Kreislauf, Substratwechsel (X) + Überströmung mit frischem Substrat (Y) auf 2 Aufzuchtflächen  
 Substrat: Bier (Pilsener Typ)  
 Versuchsdauer: 18 Tage  
 Bemerkungen: Produktionsstopp Tage 6,7 + 13,14 Trockenlaufen, keine Probenahme

Aufzuchtfläche: Edelstahl (Fachhandel)

Probenahme Nr.	Zeit [h]	Identifizierte Mikroorganismen (PCR) X	Identifizierte Mikroorganismen (PCR) Y
0	0		
1	24	<i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Gluconobacter oxydans</i>	<i>Acetobacter lovaniensis</i> <i>Gluconobacter frateurii</i>
2	48	<i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Gluconobacter oxydans</i>	
3	72	<i>Acetobacter lovaniensis</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Pichia occidentalis</i>	<i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Pichia membranifaciens</i>
4	96	<i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Pseudomonas psychrophila</i>	<i>Acetobacter persicus</i> <i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Pichia occidentalis</i>
5	120	keine Probenahme, Trockenlaufen	keine Probenahme, Trockenlaufen
6	144	keine Probenahme, Trockenlaufen	keine Probenahme, Trockenlaufen
7	168	<i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Pseudomonas psychrophila</i> <i>Saccharomyces pastorianus</i>	<i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Pantoea punctata</i>
8	192	keine Probenahme, Ausfall der Pumpe	keine Probenahme, Ausfall der Pumpe
9	216	<i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Kluyvera ascorbata</i> <i>Pichia membranifaciens</i> <i>Pseudomonas fragi</i> <i>Pseudomonas psychrophila</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Pseudomonas psychrophila</i> <i>Pseudomonas sp.</i>
10	240	<i>Acetobacter indonesiensis</i> <i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Pseudomonas fragi</i> <i>Pseudomonas psychrophila</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Paracoccus yeii</i> <i>Pichia guilliermondii</i> <i>Pseudomonas psychrophila</i> <i>Zygoascus steatolyticus</i>
11	264	<i>Acetobacter indonesiensis</i> <i>Enterobacter amnigenus</i> <i>Erwinia sp.</i> <i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Pseudomonas psychrophila</i>	<i>Enterobacter amnigenus</i> <i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Pseudomonas psychrophila</i> <i>Pseudomonas sp.</i>
12	288	keine Probenahme, Trockenlaufen	keine Probenahme, Trockenlaufen
13	312	keine Probenahme, Trockenlaufen	keine Probenahme, Trockenlaufen
14	336	<i>Acetobacter indonesiensis</i> <i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Kluyvera ascorbata</i> <i>Pseudomonas psychrophila</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Gluconobacter frateurii</i>
15	360	<i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Gluconobacter oxydans</i>	<i>Erwingella americana</i> <i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Pseudomonas psychrophila</i>
16	384	<i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Erwingella americana</i> <i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Pseudomonas psychrophila</i>
17	408	<i>Acetobacter sp.</i> <i>Aurantimonas okamirensis</i> <i>Brevundimonas sp.</i> <i>Chryseobacterium massiliae</i> <i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Gluconobacter oxydans</i>	<i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Pseudomonas psychrophila</i>
18	432	<i>Erwinia sp.</i> <i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Gluconobacter sp.</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Ochrobactrum sp.</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i> <i>Acetobacter pasteurianus</i> <i>Brevundimonas nasdae</i> <i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Ochrobactrum sp.</i>

Tabelle 12: Versuchsprotokoll – Versuch 9

Versuch 9

Jahreszeit: Sommer 2013  
 Standort: Standort II (Industrieller Abfüller - Alkoholfreie Getränke)

Aufzuchtmethode: Kreislauf + Überströmung mit frischem Substrat auf einer Aufzuchtfläche  
 Substrat: Apfelschorle, Cola, Iso-Drink, Bitter Lemon  
 Versuchsdauer: 8 Tage  
 Bemerkungen: Produktionsstopp Tage 5,6,7 Substratversorgung im Kreislauf

Aufzuchtfläche: Edelstahl (Fachhandel)

Probenahme Nr.	Zeit [h]	Substrat	Identifizierte Mikroorganismen (PCR)
0	0	Apfelschorle	
1	24	Apfelschorle → Cola	
2	48	Cola → Iso-Drink	
3	72	Iso-Drink → Apfelschorle	
4	96	Apfelschorle	keine Probenahme
5	120	Apfelschorle	keine Probenahme
6	144	Apfelschorle	keine Probenahme
7	168	Apfelschorle → Bitter-Lemon	<i>Acetobacter sp.</i> <i>Candida intermedia</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Gluconobacter cerinus</i> <i>Gluconobacter sp.</i>
8	192	Bitter-Lemon → Versuchs- abbruch	<i>Candida intermedia</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Gluconobacter cerinus</i> <i>Gluconobacter sp.</i>

Tabelle 13: Versuchsprotokoll – Versuch 10

Versuch 10

Jahreszeit: Sommer 2013  
 Standort: Standort II (Industrieller Abfüller - Alkoholfreie Getränke)

Aufzuchtmethode: Kreislauf + Überströmung mit frischem Substrat auf einer Aufzuchtfläche  
 Substrat: Apfelschorle, Cola, Iso-Drink, Bitter Lemon  
 Versuchsdauer: 14 Tage  
 Bemerkungen: Produktionsstopp Tage 2,3 + 9,10 Substratversorgung im Kreislauf

Aufzuchtfläche: Edelstahlblech aus Füllmaschine

Probenahme Nr.	Zeit [h]	Substrat	Identifizierte Mikroorganismen (PCR)
0	0	Apfelschorle	
1	24	Apfelschorle	keine Probenahme
2	48	Apfelschorle	keine Probenahme
3	72	Apfelschorle → Cola	
4	96	Cola → Iso-Drink	
5	120	Iso-Drink → Apfelschorle	<i>Candida pinguabensis</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i>
6	144	Apfelschorle → Bitter-Lemon	<i>Candida pinguabensis</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i>
7	168	Bitter-Lemon → Apfelschorle	<i>Candida pinguabensis</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i> <i>Gluconobacter oxydans</i>
8	192	Apfelschorle	keine Probenahme
9	216	Apfelschorle	keine Probenahme
10	240	Apfelschorle → Cola	<i>Candida intermedia</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i>
11	264	Cola → Iso-Drink	<i>Candida intermedia</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i>
12	288	Iso-Drink → Apfelschorle	<i>Candida intermedia</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i>
13	312	Apfelschorle → Bitter-Lemon	<i>Candida intermedia</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Gluconobacter cerinus</i> <i>Gluconobacter sp.</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i>
14	336	Bitter-Lemon → Versuchs Abbruch	<i>Candida intermedia</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Gluconobacter cerinus</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i>

Tabelle 14: Versuchsprotokoll – Versuch 11

Versuch 11

Jahreszeit: Sommer 2013  
 Standort: Standort II (Industrieller Abfüller - Alkoholfreie Getränke)

Aufzuchtmethode: Kreislauf + Überströmung mit frischem Substrat auf einer Aufzuchtfläche  
 Substrat: Apfelschorle, Cola, Iso-Drink, Bitter Lemon  
 Versuchsdauer: 17 Tage  
 Bemerkungen: Produktionsstopp Tage 2,3 + 9,10 + 16,17 Substratversorgung im Kreislauf

Aufzuchtfläche: Edelstahlblech aus Füllmaschine

Probenahme Nr.	Zeit [h]	Substrat	Identifizierte Mikroorganismen (PCR)
0	0	Apfelschorle	
1	24	Apfelschorle	keine Probenahme
2	48	Apfelschorle	keine Probenahme
3	72	Apfelschorle → Cola	
4	96	Cola → Iso-Drink	
5	120	Iso-Drink → Apfelschorle	<i>Candida pinguabensis</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i>
6	144	Apfelschorle → Bitter-Lemon	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Candida intermedia</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i>
7	168	Bitter-Lemon → Apfelschorle	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Candida intermedia</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i>
8	192	Apfelschorle	keine Probenahme
9	216	Apfelschorle	keine Probenahme
10	240	Apfelschorle → Cola	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Candida intermedia</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i>
11	264	Cola → Iso-Drink	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Candida intermedia</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i>
12	288	Iso-Drink → Apfelschorle	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Candida intermedia</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i>
13	312	Apfelschorle → Bitter-Lemon	<i>Candida intermedia</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Hanseniaspora sp.</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i>
14	336	Bitter-Lemon → Apfelschorle	<i>Candida intermedia</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i>
15	360	Apfelschorle	keine Probenahme
16	384	Apfelschorle	keine Probenahme
17	408	Apfelschorle → Versuchs- abbruch	<i>Candida intermedia</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Torulaspota delbrueckii</i>

Tabelle 15: Versuchsprotokoll – Versuch 12

Versuch 12

Jahreszeit: Herbst 2013  
 Standort: Standort III (Technikum VLB Berlin)

Aufzuchtmethode: Kreislauf + Überströmung mit frischem Substrat auf einer Aufzuchtfläche  
 Substrat: Apfelschorle, Cola, Iso-Drink, Bitter Lemon  
 Versuchsdauer: 7 Tage  
 Bemerkungen: Produktionsstopp Tage 6,7 Substratversorgung im Kreislauf

Aufzuchtfläche: Edelstahlblech aus Füllmaschine

Probenahme Nr.	Zeit [h]	Substrat	Identifizierte Mikroorganismen (PCR)
0	0	Apfelschorle	
1	24	Apfelschorle → Cola	
2	48	Cola → Iso-Drink	
3	72	Iso-Drink → Bitter-Lemon	
4	96	Bitter-Lemon → Apfelschorle	
5	120	Apfelschorle	<i>keine Probenahme</i>
6	144	Apfelschorle	<i>keine Probenahme</i>
7	168	Apfelschorle → Versuchs- abbruch	<i>Pichia membranifaciens</i> <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Rhodotorula muciklaginosa</i> <i>Gluconobacter sp.</i>

Tabelle 16: Versuchsprotokoll – Versuch 13

Versuch 13

Jahreszeit: Herbst 2013  
 Standort: Standort III (Technikum VLB Berlin)

Aufzuchtmethode: Kreislauf + Überströmung mit frischem Substrat auf einer Aufzuchtfläche  
 Substrat: Apfelschorle, Cola, Iso-Drink, Bitter Lemon  
 Versuchsdauer: 7 Tage  
 Bemerkungen: Produktionsstopp Tage 2,3 Substratversorgung im Kreislauf

Aufzuchtfläche: Edelstahlblech aus Füllmaschine

Probenahme Nr.	Zeit [h]	Substrat	Identifizierte Mikroorganismen (PCR)
0	0	Apfelschorle	
1	24	Apfelschorle	keine Probenahme
2	48	Apfelschorle	keine Probenahme
3	72	Apfelschorle → Cola	<i>Acetobacter pasteurianus</i> <i>Candida sorboxylosa</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i>
4	96	Cola → Iso-Drink	<i>Candida sorboxylosa</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i>
5	120	Iso-Drink → Apfelschorle	<i>Acetobacter peroxydans</i> <i>Candida sorboxylosa</i> <i>Candida stellata</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i>
6	144	Apfelschorle → Bitter-Lemon	<i>Candida sorboxylosa</i> <i>Candida stellata</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i>
7	168	Bitter-Lemon → Versuchs- abbruch	<i>Acetobacter peroxydans</i> <i>Candida sojae</i> <i>Candida sorboxylosa</i> <i>Candida stellata</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i>

Tabelle 17: Versuchsprotokoll – Versuch 14

Versuch 14

Jahreszeit: Herbst 2013  
 Standort: Standort III (Technikum VLB Berlin)

Aufzuchtmethode: Kreislauf + Überströmung mit frischem Substrat auf einer Aufzuchtfläche

Substrat: Apfelschorle, Iso-Drink

Versuchsdauer: 4 Tage

Bemerkungen:

Aufzuchtfläche: Edelstahlblech aus Füllmaschine

Probenahme Nr.	Zeit [h]	Substrat	Identifizierte Mikroorganismen (PCR)
0	0	Apfelschorle	
1	24	Apfelschorle	<i>Candida sorboxylosa</i>
2	48	Apfelschorle	<i>Candida sorboxylosa</i> <i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3	72	Apfelschorle → Iso-Drink	<i>Candida sorboxylosa</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i>
4	96	Iso-Drink → Versuchs- abbruch	<i>Acetobacter pasteurianus</i> <i>Acetobacter peroxydans</i> <i>Candida sorboxylosa</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

7.6 Tabellen zu Vergleichszwecken

Tabelle 18: Vergleich Versuche 10 und 11

Probenahme Nr.	Zeit [h]	Substrat	Identifizierte Mikroorganismen (PCR) V10	Identifizierte Mikroorganismen (PCR) V11
0	0	Apfelschorle		
1	24	Apfelschorle	keine Probenahme	keine Probenahme
2	48	Apfelschorle	keine Probenahme	keine Probenahme
3	72	Apfelschorle → Cola		
4	96	Cola → Iso-Drink		
5	120	Iso-Drink → Apfelschorle	<i>Candida pinguabensis</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i>	<i>Candida pinguabensis</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i>
6	144	Apfelschorle → Bitter-Lemon	<i>Candida pinguabensis</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Candida intermedia</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i>
7	168	Bitter-Lemon → Apfelschorle	<i>Candida pinguabensis</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Candida intermedia</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i>
8	192	Apfelschorle	keine Probenahme	keine Probenahme
9	216	Apfelschorle	keine Probenahme	keine Probenahme
10	240	Apfelschorle → Cola	<i>Candida intermedia</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Candida intermedia</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i>
11	264	Cola → Iso-Drink	<i>Candida intermedia</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Candida intermedia</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i>
12	288	Iso-Drink → Apfelschorle	<i>Candida intermedia</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i> <i>Candida intermedia</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i>
13	312	Apfelschorle → Bitter-Lemon	<i>Candida intermedia</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Gluconobacter cerinus</i> <i>Gluconobacter sp.</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i>	<i>Candida intermedia</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Hanseniaspora sp.</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i>
14	336	Bitter-Lemon → Bitter-Lemon	<i>Candida intermedia</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Gluconobacter cerinus</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i>	<i>Candida intermedia</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i>
15	360	Apfelschorle	Versuch beendet	keine Probenahme
16	384	Apfelschorle	Versuch beendet	keine Probenahme
17	408	Apfelschorle → Versuchs- abbruch	Versuch beendet	<i>Candida intermedia</i> <i>Candida pinguabensis</i> <i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i>

Tabelle 19: Vergleich Versuche 13 und 14

Probenahme Nr.	Zeit [h]	Substrat	Identifizierte Mikroorganismen (PCR)
0	0	Apfelschorle	
1	24	Apfelschorle	keine Probenahme
2	48	Apfelschorle	keine Probenahme
3	72	Apfelschorle → Cola	<i>Acetobacter pasteurianus</i> <i>Candida sorboxylosa</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i>
4	96	Cola → Iso-Drink	<i>Candida sorboxylosa</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i>
5	120	Iso-Drink → Apfelschorle	<i>Acetobacter peroxydans</i> <i>Candida sorboxylosa</i> <i>Candida stellata</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i>
6	144	Apfelschorle → Bitter-Lemon	<i>Candida sorboxylosa</i> <i>Candida stellata</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i>
7	168	Bitter-Lemon → Versuchs- abbruch	<i>Acetobacter peroxydans</i> <i>Candida sojae</i> <i>Candida sorboxylosa</i> <i>Candida stellata</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i>

Probenahme Nr.	Zeit [h]	Substrat	Identifizierte Mikroorganismen (PCR)
0	0	Apfelschorle	
1	24	Apfelschorle	<i>Candida sorboxylosa</i>
2	48	Apfelschorle	<i>Candida sorboxylosa</i> <i>Gluconobacter frateurii</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3	72	Apfelschorle → Iso-Drink	<i>Candida sorboxylosa</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i>
4	96	Iso-Drink → Versuchs- abbruch	<i>Acetobacter pasteurianus</i> <i>Acetobacter peroxydans</i> <i>Candida sorboxylosa</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Tabelle 20: Auflistung der identifizierten Mikroorganismen mit Bier als Biofilmsubstrat

Versuch 1 VLB	Versuch 2 VLB	Versuch 3 VLB	Versuch 7a VLB	Versuch 7b VLB	Versuch 8a VLB	Versuch 8b VLB
<i>Acetobacter cerevisiae</i>	<i>Acetobacter cerevisiae</i>	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Acetobacter lovaniensis</i>	<i>Acetobacter cerevisiae</i>	<i>Acetobacter indonesiensis</i>	<i>Acetobacter lovaniensis</i>
<i>Acetobacter indonesiensis</i>	<i>Acetobacter indonesiensis</i>	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Bulleromyces albus</i>	<i>Acetobacter indonesiensis</i>	<i>Acetobacter lovaiensis</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
<i>Acetobacter lovaniensis</i>	<i>Acetobacter persicus</i>	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Candida sp.</i>	<i>Acetobacter lovaniensis</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>	<i>Acetobacter persicus</i>
<i>Acetobacter persicus</i>	<i>Acetobacter sp.</i>	<i>Kluyvera cochleae</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Acetobacter persicus</i>	<i>Aurantimonas altamirensis</i>	<i>Brevundimonas nasdae</i>
<i>Acetobacter syzygii</i>	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Gluconobacter frateurii</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Brevundimonas sp.</i>	<i>Enterobacter amnigenus</i>
<i>Acinetobacter colcoaceticus</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Gluconobacter hansenii</i>	<i>Candida inconspicua</i>	<i>Chryseobacterium massiliae</i>	<i>Erwingella americana</i>
<i>Enterobacter ludwigii</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Providencia stuartii</i>	<i>Gluconobacter oxydans</i>	<i>Candida sp.</i>	<i>Enterobacter amnigenus</i>	<i>Gluconobacter frateurii</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Pseudomonas maltophilia</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Chryseobacterium hispanicum</i>	<i>Erwinia sp.</i>	<i>Gluconobacter oxydans</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Pseudomonas oryzae</i>	<i>Raoultella sp.</i>	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Gluconobacter frateurii</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>		<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Ewingella americana</i>	<i>Gluconobacter oxydans</i>	<i>Ochrobactrum sp.</i>
			<i>Paracoccus yeii</i>	<i>Gluconobacter frateurii</i>	<i>Gluconobacter sp.</i>	<i>Pantoea punctata</i>
			<i>Pichia anomala</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Paracoccus yeii</i>
			<i>Pichia accidentalis</i>	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>
			<i>Pichia sp.</i>	<i>Kluyvera ascorbata</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>
			<i>Saccharomyces pastorianus</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Kluyvera ascorbata</i>	<i>Pichia accidentalis</i>
			<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Ochrobactrum sp.</i>	<i>Pseudomonas psychrophila</i>
			<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>
				<i>Pantoea citrea</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Zygoascus steatolyticus</i>
				<i>Pantoea punctata</i>	<i>Pichia accidentalis</i>	
				<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Pseudomonas fragi</i>	
				<i>Pichia occidentalis</i>	<i>Pseudomonas psychrophila</i>	
				<i>Pichia sp.</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	
				<i>Pseudomonas fragi</i>	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	
				<i>Raoultella ornithinolytica</i>		
				<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
				<i>Yarrowia lipolytica</i>		

Versuch 4 Brauerei	Versuch 5 Brauerei	Versuch 6 Brauerei				
<i>Acetobacter cerevisiae</i>	<i>Aureobasidium proteae</i>	<i>Acetobacter cibinogensis</i>				
<i>Acetobacter lovaniensis</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Acetobacter lovaiensis</i>				
<i>Acetobacter orientalis</i>	<i>Candida sp.</i>	<i>Acetobacter okinawensis</i>				
<i>Acetobacter persicus</i>	<i>Candida xylopsaci</i>	<i>Acetobacter orientalis</i>				
<i>Candida xylopsaci</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>	<i>Basidiomycete sp.</i>				
<i>Gluconobacter frateurii</i>	<i>Pichia kluyveri</i>	<i>Bulleromyces albus</i>				
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Pichia kudriavzevii</i>	<i>Candida picinguobensis</i>				
<i>Pichia anomala</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Candida tropicalis</i>				
<i>Pichia fermentans</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Clavispora lusitanae</i>				
<i>Pichia kluyveri</i>	<i>Saccharomyces sp.</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>				
<i>Pichia kudriavzevii</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	<i>Gluconobacter frateurii</i>				
<i>Pichia membranifaciens</i>		<i>Klebsiella sp.</i>				
<i>Pseudomonas fragi</i>		<i>Paracoccus yeii</i>				
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>		<i>Raoultella sp.</i>				
		<i>Rhodotorula sp.</i>				
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
		<i>Sporobolomyces coprosmae</i>				
		<i>Wickerhamomyces anomalus</i>				

Tabelle 21: Auflistung der identifizierten Mikroorganismen mit alkoholfreien Getränken als Biofilmsubstrat

Versuch 9 - AFG Abfüller	Versuch 10 - AFG Abfüller	Versuch 11 - AFG Abfüller
<i>Acetobacter sp.</i>	<i>Candida intermedia</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>
<i>Candida intermedia</i>	<i>Candida picinguabensis</i>	<i>Candida intermedia</i>
<i>Candida picinguabensis</i>	<i>Gluconobacter cerinus</i>	<i>Candida picinguabensis</i>
<i>Gluconobacter cerinus</i>	<i>Gluconobacter oxydans</i>	<i>Gluconobacter oxydans</i>
<i>Gluconobacter sp.</i>	<i>Gluconobacter sp.</i>	<i>Hanseniaspora sp.</i>
	<i>Torulasporea delbrueckii</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Torulasporea delbrueckii</i>

Versuch 12 - VLB	Versuch 13 - VLB	Versuch 14 - VLB
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
<i>Gluconobacter sp.</i>	<i>Acetobacter peroxydans</i>	<i>Acetobacter peroxydans</i>
<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Candida sojae</i>	<i>Candida sorboxylosa</i>
<i>Rhodotorula muciklaginosa</i>	<i>Candida sorboxylosa</i>	<i>Gluconobacter frateurii</i>
	<i>Candida stellata</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

## 7.7 Mikro- und Molekularbiologische Analysen

Tabelle 22: Nährmedien für den Nachweis von den am Biofilm beteiligten Mikroorganismen

Nähragar	Nachweis für	Selektivität durch
Standtard I	Vollmedium (im speziellen für Bakterien)	-
Würze	Vollmedium (im speziellen Für Hefen)	-
ENDO	Enterobacteriaceae (E. coli und coliforme Mikroorganismen), Pseudomonas	gram (+)-Bakterien gehemmt durch Natriumsulfit und Fuchsin
Yeast-Glucose-Chloramphinecol	Hefen	Antibiotikum Chloramphinicol gegen Bakterien
Glutamat-Stärke-Phenolrot-Agar (GSP)	Pseudomonaden und Aeromonaden	Nährstoffe Glutamat und Stärke, andere Keime können diese Nährstoffe nicht verwerten
Orangen-Serum	säuretolerante Mikroorganismen	schach selektiv
Lysin	nicht-Saccharomyces Hefen	Lysin als einzige Stickstoffquelle, kann von <i>Saccharomyces</i> -Hefen nicht verwertet werden
VLB-S7	Milchsäurebakterien	Antibiotikum Cycloheximid gegen Hefen

Tabelle 23: Inkubationsbedingungen der jeweiligen Nährmedien für den Nachweis von den am Biofilm beteiligten Mikroorganismen

Nähragar	Inkubationsbedingungen
Standtard I	aerob, 26 °C, 1 d
Würze	aerob, 26 °C, 2 d
ENDO	aerob, 26 °C, 1 d
Yeast-Glucose-Chloramphinecol	aerob, 26 °C, 2 d
Glutamat-Stärke-Phenolrot-Agar (GSP)	aerob, 26 °C, 2 d
Orangen-Serum	aerob, 26 °C, 2 d
Lysin	aerob, 26 °C, 5 d
VLB-S7	anaerob, 26 °C, 7 d

Tabelle 24: Unspezifische Primerpaare für die Identifizierung von Mikroorganismen

Primerpaare		Sequenz 5' --> 3'	Identifizierung von
forward	NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	Hefen
reverse	NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	
forward	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	Hefen
reverse	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	
forward	1237F	GGGCTACACACGYGCWAC	Bakterien
reverse	1492R (I)	GGTTACCTTGTTACGACTT	
forward	8F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	Bakterien
reverse	1492R (I)	GGYTACCTTGTTACGACTT	

Tabelle 25: Pipettierschema für die jeweiligen PCR-Ansätze

Konzentration der Primer	Primerpaar	Taq PCR Mastermix (2x) (Affymetrix)	Primer		DNA	bidet. Wasser
			forward	reverse		
10 pmol/µl	ITS1/4	17,5 µl	3 µl	3 µl	2	9,5 µl
	NL1/4	17,5 µl	3 µl	3 µl	3	8,5 µl
	8F/1492R(I)	17,5 µl	3 µl	3 µl	2	9,5 µl
	1237F/1492R(I)	17,5 µl	3 µl	3 µl	5	6,5 µl

Tabelle 26: PCR-Bedingungen für die jeweiligen Primerpaare

Primerpaar	initiale Denaturierung		Denaturierung		Annealing		Elongation		finale Elongation		Zyklen
	T	t	T	t	T	t	T	t	T	t	
ITS1/4	95 °C	3 min	95 °C	45 sec	53 °C	40 sec	72 °C	1 min	72 °C	5 min	31
NL1/4	95 °C	3 min	95 °C	45 sec	54,5 °C	1 min	72 °C	1 min	72 °C	5 min	35
8F/1492R(I)	95 °C	3 min	95 °C	54 sec	53 °C	45 sec	72 °C	2 min	72 °C	5 min	37
1237F/1492R(I)	95 °C	3 min	95 °C	45 sec	54,5 °C	1 min	72 °C	1 min	72 °C	5 min	35

## 7.8 Biokorrosion

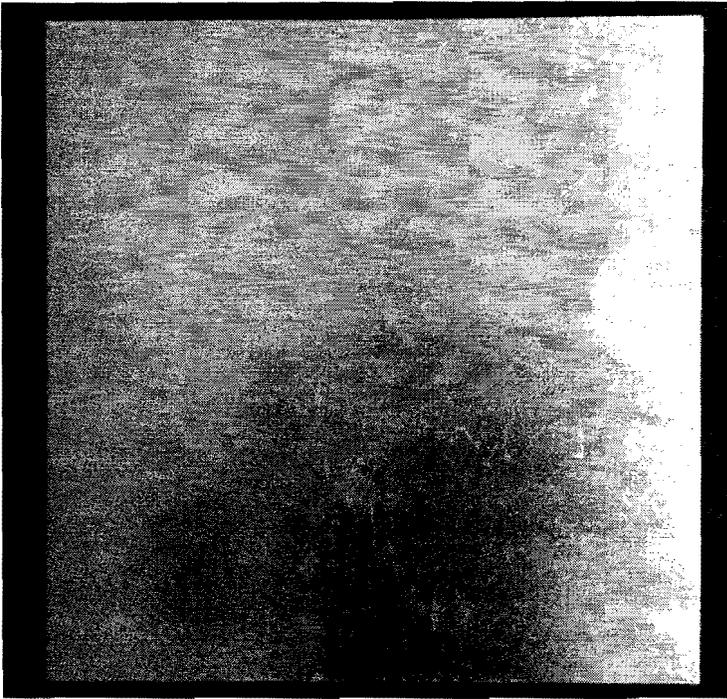


Abbildung 14: Aufzuchtfläche vor Biofilmbewuchs

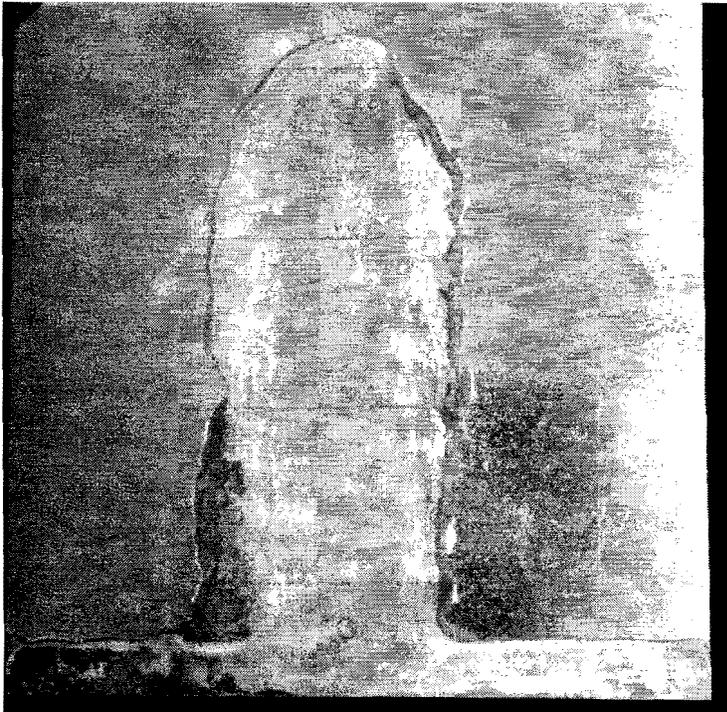


Abbildung 15: Aufzuchtfläche nach Biofilmbewuchs (gereinigt)



Abbildung 16: Korrosionserscheinungen nach Biofilmbewuchs



Abbildung 17: Biofilm auf der Aufzuchtfläche