



*Projekttitel:*

# Mikrobiologisch beeinflusste Korrosion in Getränkeabfüllanlagen

*Förderkennzeichen:*

49VF150011

*Name der Forschungsstelle(n):*

Forschungsinstitut für Bier- und Getränkeproduktion (FIBGP)

*Kontakt:*

Dr.-Ing. Roland Pahl, pahl@vlb-berlin.org

*Bewilligungszeitraum:*

1.3.2016 – 28.2.2018

**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.:** VF150011  
**Kurztitel:** Mikrobiologisch beeinflusste Korrosion in Getränkeabfällanlagen  
**Laufzeit:** 01.03.2016 bis 28.02.2018

Name und Anschrift des Zuwendungsempfängers

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

**Zielstellung:**

*Entwicklung von Methoden zur Untersuchung des Gefährdungspotentials von Biofilmen in Abfällanlagen hinsichtlich mikrobiell beeinflusster Korrosion (MIC, Biokorrosion).*

Ausgehend von einer bereits erforschten Methode zur substrat- und umgebungsspezifischen Biofilmaufzucht in Getränkeabfällanlagen sollten hochlegierte Edelstahloberflächen mit Biofilmen bewachsen werden und anschließend auf Korrosionserscheinungen überprüft werden. Dazu wurden Parameter wie Materialabtrag und Veränderungen der Oberflächenbeschaffenheit – insbesondere der Rauheit analysiert. Mittels Rasterelektronenmikroskopie wurden topografische Korrosionseinflüsse untersucht und atomare Veränderungen an den Metallen mit energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) ermittelt. Begleitend wurde die Mikroflora des Biofilms mit modernen molekularbiologischen Methoden (Next-Generation-Sequencing) bestimmt, wobei eine besondere Beachtung Mikroorganismen galt, die möglicherweise Korrosionsprozesse fördern. Ebenso sollten korrosionsrelevante Bestandteile in den EPS-Schichten der Biofilme ermittelt werden.

**Ergebnisse:**

Hinsichtlich der Entwicklung von Methoden kann von einem positiven Projektergebnis gesprochen werden. Die Zielstellungen, die bezüglich der Ausarbeitung von geeigneten Verfahren zur Beurteilung der Gefahr von Biokorrosion in Getränkeabfällanlagen im Antrag formuliert wurden (z.B. Kontrollversuche, REM/EDX Analytik, F-AAS oder „Next-Generation-Sequencing“) wurden erreicht. Darüber hinaus wurden mit einem gezielten Animpfen des Biofilmsystems sowie dem Einsatz eines digitalen Mikroskops Methoden erarbeitet, die über die Zielstellung des Forschungsantrags hinausgehen. Der Umstand, dass anders als in den Zielen des Antrags formuliert, keine Biokorrosion in den Projektversuchen erzielt werden konnte kann kontrovers diskutiert werden. Hinsichtlich möglicher Unzulänglichkeiten in den angewandten Methoden ist anzumerken, dass aufgrund ihrer Zeitintensität, Versuche nur in einem limitierten Umfang durchgeführt werden konnten, sodass nur wenige Parameter variiert werden konnten und auf teils auf Mehrfachbestimmungen verzichtet werden musste. Da jedoch in vorangegangenen Projekten gezeigt wurde, dass die angewandte Biofilmbauzucht das reale Biofilmbauwachstum in Abfällhallen sehr realitätsgetreu abbildet kann davon ausgegangen werden, dass die Gefahr der Biokorrosion hier eine untergeordnete Rolle spielt.

**Veröffentlichungen:**

**Vortrag:** „Mikrobiologie und Hardware in Abfällanlagen – Wechselseitige Beziehungen“; Pahl R., 103. Brau- und Maschinentechnische Arbeitstagung, Soest, 2016

**Vortrag:** „How are microbiological life forms affecting our high-tech working environment – Thoughts beyond hygienic design“, Fischer J., SzTF (Universität Krakau), Kocierz, Polen, 2016

**Artikel:** Pahl R., Fischer J.: „Wechselseitige Beziehungen – Mikrobiologie und Hardware in Abfällanlagen“, Brauindustrie 8, 2016

**Vortrag:** „Implementierung fortschrittlich(st)er Methoden zur Überwachen von Abfällprozessen, 50. Technologisches Seminar, Weihenstephan, 2017

**Vortrag:** „Mikrobiologische Korrosion in Abfällanlagen“, Pahl R., Sitzung des Technisch-Wissenschaftlicher-Ausschuss (TWA) im Rahmen der 104. Brau- und Maschinentechnischen Arbeitstagung, München 2017

Berlin, 29.08.2018

Datum



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

Seestraße 13 / 13353 Berlin

Projektleiter

Rechtsverbindliche Unterschrift

# Sachbericht (Schlussbericht)

zum Verwendungsnachweis

zu FuE Vorhaben

<b>Reg.-Nr.:</b>	<b>49VF150011</b>
<b>FuE-Einrichtung:</b>	<b>Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) e.V.</b>
<b>Titel:</b>	<b>Mikrobiologisch beeinflusste Korrosion in Getränkeabfüllanlagen</b>
<b>Projektlaufzeit:</b>	<b>01.03.2016 bis 28.02.2018</b>

Berlin, den 29.08.2018

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



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

Seestraße 13 / 13353 Berlin

Firmenstempel

Unterschrift des Projektleiters

Rechtsverbindliche Unterschrift

## **1. Technisch-technologische Zielstellung des Vorhabens**

*Entwicklung von Methoden zur Untersuchung des Gefährdungspotentials von Biofilmen in Abfüllanlagen hinsichtlich mikrobiell beeinflusster Korrosion (MIC, Biokorrosion).*

Ausgehend von einer bereits erforschten Methode zur substrat- und umgebungsspezifischen Biofilmaufzucht in Getränkeabfüllanlagen sollten hochlegierte Edelstahloberflächen mit Biofilmen bewachsen werden und anschließend auf Korrosionserscheinungen überprüft werden. Dazu wurden Parameter wie Materialabtrag und Veränderungen der Oberflächenbeschaffenheit – insbesondere der Rauheit analysiert. Mittels Rasterelektronenmikroskopie wurden topografische Korrosionseinflüsse untersucht und atomare Veränderungen an den Metallen mit energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) ermittelt. Das dazu benötigte Gerät wurde im Rahmen des Programms INNO-KOM-Ost IZ130013 erworben.

Begleitend wurde die Mikroflora des Biofilms molekularbiologisch bestimmt, wobei eine besondere Beachtung Mikroorganismen galt, die möglicherweise Korrosionsprozesse fördern. Ebenso sollten korrosionsrelevante Bestandteile in den EPS-Schichten der Biofilme ermittelt werden.

Sollten in den Untersuchungen biologische Korrosionsphänomene beobachtet werden, sollten diese mit der dazugehörigen Mikroflora der Biofilme, der eingesetzten Materialien, sowie mit den chemisch/physikalischen Untersuchungsergebnissen in Beziehung gebracht werden, so dass Aufschlüsse über die jeweilige Korrosionskinetik möglich sind.

Um Biokorrosionseigenschaften verschiedener Materialien oder Oberflächenbehandlungen zu ermitteln, sollen zudem Versuche durchgeführt werden, bei denen entsprechende Wachstumsparameter derartig beeinflusst werden, dass ein definiertes Korrosionspotenzial von den Biofilmen ausgeht.

Es war vorgehesehen, dass die aus dem Vorhaben erhaltenen Ergebnisse wichtige Erkenntnisse liefern sollen, die unter anderem in der technischen Betriebsberatung eingesetzt werden können. Eine spätere Applikation der Methodik sollte wertvolle Informationen für Getränkeproduzenten beim Kauf neuer Anlagen liefern sowie von Anlagenbauern dazu genutzt werden ihre Materialien und Oberflächen zu überprüfen, bzw. Neuentwicklungen zu erforschen.

Als Ergebnisform sollten Verfahren präsentiert werden, die das Erreichen der folgenden Einzelziele ermöglichen:

- Entwicklung von Methoden zur Erforschung der Gefahr durch MIC in Getränkeabfüllanlagen
- Ermittlung der individuellen Biokorrosionsgefahr einer bestimmten Anlage bei Produktion bestimmter Getränke
- Entwicklung von Methoden zur Prüfung der mikrobiologischen Korrosionsbeständigkeit verschiedener Materialien nach Bewuchs mit getränkerelevanten Biofilmen

Dabei soll das Forschungsprojekt der Beantwortung folgender Fragestellungen dienen:

1. Beurteilung der generellen Gefahr von mikrobiologisch beeinflusster Korrosion in der Getränkeabfüllung unter Berücksichtigung aller dort herrschenden Bedingungen, einschließlich Materialien und Mikroflora.
2. Untersuchung ob Oberflächen, die zuvor (mikroskopisch) mikrobiell angegriffen wurden, eine erneute Besiedelung durch Biofilme begünstigen (z.B. durch Erhöhung der Rauheit).
3. Beurteilung des Einflusses des Standorts der Abfülllinie, bzw. der dort produzierten Getränke auf MIC.
4. Beurteilung verschiedener Materialien (Edelstahlsorte, Oberflächenbehandlung) hinsichtlich ihres Verhaltens gegenüber getränkeabfüllrelevanter Biokorrosion.
5. Beurteilung von beobachteten mikrobiologischen Korrosionsphänomenen unter Berücksichtigung der dazugehörigen Mikroflora sowie chemisch/physikalischen Untersuchungen um Rückschlüsse auf den jeweiligen Korrosionsmechanismus zuzulassen.

Im Fokus der Forschungsarbeiten standen dabei vor allem Entwicklung und Etablierung von Methoden, die unter den Punkten 1 bis 5 zusammengefassten Fragestellungen zu beantworten.

## 2. Darstellung der erzielten Vorhabensergebnisse

### 2.1 Generelle Aufzuchtmethodik

Die grundlegende Methodik der Biofilmmontage wurde in einem vorangestellten Forschungsprojekt (INNO-KOM OST VF110011) erforscht und konnte für die Experimente des jetzigen Vorhabens eingesetzt werden. Über eine Aufzuchtfläche (z.B. Edelstahlblech) wird ein Nährsubstrat gefördert, welches gemäß den Forschungsinhalten aus einem Getränk besteht. Nach Überströmung der Aufzuchtfläche wird das Getränk in einem Reservoir aufgefangen. Die Substratversorgung erfolgt wahlweise über ein Vorratsgefäß mit „frischem“ Medium oder aus dem Reservoir als „verbrauchtes“ Medium. Eine gleichzeitige Versorgung mit frischem sowie gebrauchtem Medium hat sich im vergangenen Projekt als besonders zielführend erwiesen. Auf diese Art und Weise ist zum einen eine durchgängige Zufuhr von Nährstoffen gesichert, zum anderen kann sich das Medium im Reservoir mit Mikroorganismen aus der Umgebung anreichern. Das Biofilmwachstum findet spontan auf dem Aufzuchtblech statt. Unter Anwendung dieser Methodik konnten im vorherigen Projekt Biofilme gezüchtet werden, die in ihrer mikrobiologischen Zusammensetzung sowie ihrer Wachstumskinetik eine hohe Gemeinsamkeit mit real an Getränkeabfülllinien wachsenden Biofilmen haben. Abbildung 1 skizziert die Aufzuchtmethodik während Abbildung 2 beispielhaft ein mit Biofilm bewachsenes Edelstahlblech zeigt.

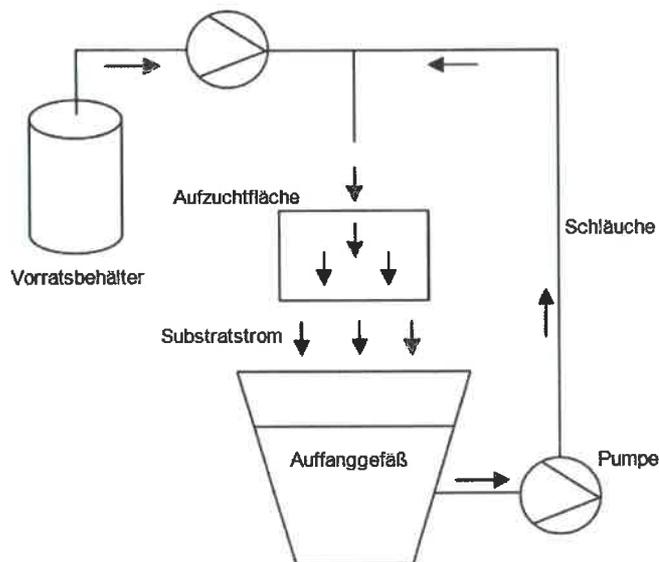


Abbildung 1: Schema Biofilmaufzucht



Abbildung 2: Beispielbild Biofilmaufzucht

## 2.2 Kontrollversuche

Die im Rahmen des Projekts durchgeführten Versuche mussten von Kontrollversuchen begleitet werden um den tatsächlichen mikrobiologischen Einfluss von Korrosionserscheinungen herauszustellen und dass dieser nicht etwa aus anderen Faktoren, wie z.B. Säuren in den als Nährsubstrat verwendeten Getränken, resultiert.

Aus diesem Grund bestand das erste Ziel des Projekts in der Entwicklung einer Methodik zum Durchführen dieser Kontrollversuche. Dazu wurde die unter 2.1 beschriebene Aufzuchtmethodik dahingegen modifiziert, dass zwei parallel laufende Biofilmaufzuchtexperimente mit identischen Parametern durchgeführt wurden, wobei in jeweils einem der Versuchsansätze ein Biozid, bzw. biologisches Stabilisierungsmittel zugesetzt wurde. Auf diese Weise sollte im vergleichenden Kontrollversuch das Biofilmwachstum unterdrückt werden so dass der tatsächliche mikrobiologische Einfluss von Korrosionserscheinungen herauszustellen ist. So können Abgrenzungen zu nicht-biologischen Korrosionsursachen (z.B. Säuren in den als Nährsubstrat verwendeten Getränken) vollzogen werden.

Als Biozid wurde zunächst ein Präparat mit quaternären Ammoniumsubstanzen (Quasa, Fa. Sapura) verwendet. Trotzdem hier das Biofilmwachstum erfolgreich unterbunden wurde, zeigte sich dieses Produkt als nur bedingt anwendbar, da es gleichzeitig zu Ausfällungen und Ablagerungen auf den Aufzuchtflächen kam. In anschließenden Versuchen wurde der Gebrauch von Kaliumsorbitat erprobt, welches sich als geeigneter Stabilisierungszusatz herausstellte da das Biofilmwachstum ohne versuchsbeeinflussende Nebenwirkungen unterdrückt wurde. Dieses wurde für Bier und verschiedene alkoholfreie Getränke beobachtet.

Mit der erfolgreichen Entwicklung der Methodik der Kontrollversuche wurde ein Grundstein für eine erfolgreiche Projektdurchführung gelegt. Darüber hinaus, kann dieses Verfahren zukünftig für eine Vielzahl von Experimenten verwendet werden, in denen der rein mikrobiologische Einfluss von Biofilmen herausgestellt werden soll. Abbildung 7 im Anhang (Abschnitt 7.2) zeigt ein nicht-bewachsenes Blech des Kontrollversuchs in Gegenüberstellung des Blechs des eigentlichen Versuches.

## 2.3 Analytik

### 2.3.1 Probenvorbereitung

Nach Beendigung der Aufzuchtversuche wurden zunächst Aliquote der Biofilm-EPS Schicht den Aufzuchtplatten entnommen, so dass ausreichend Material für die mikrobiologischen Untersuchungen sowie die Analysen zur Bestimmung der Eisenionen und organischen Säuren zur Verfügung stand. Konnten die entsprechenden Untersuchungen nicht sofort durchgeführt werden, wurden die Biofilmproben teilweise eingefroren.

Zur Untersuchung der Edelstahlbleche (REM/EDX, physikalische Methoden) mussten diese zunächst gereinigt werden. Um eine bestmöglichen praktischen Bezug herzustellen, musste sich bei dieser Reinigung an den üblichen Reinigungsverfahren der Füllmaschinenaußenreinigung orientiert werden. In den meisten Fällen werden ausschließlich automatisierte Reinigungsprozesse angewandt, eine händische, mechanische Reinigung wird nur sehr selten durchgeführt. Aus diesem Grund wurden die Aufzuchtbleche zunächst grob unter fließendem Wasser von dem Biofilm-EPS Schicht befreit und anschließend in einer Laborspülmaschine gereinigt. Nur wenn danach noch grobe Verunreinigungen sichtbar waren, wurden diese mit weitergehenden mechanischen Maßnahmen entfernt.

### 2.3.2 Rasterelektronen Mikroskopie (REM) und Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)

Bei der Projektplanung während der Antragstellung wurde die REM / EDX Technik als Hauptanalysetool für die Projektarbeiten vorgesehen. Mit der Raster-Elektronenmikroskopie sollten kleinste MIC-bedingte, topografische Veränderungen an den Aufzuchtblechen erkennbar gemacht werden. Mittels EDX sollten Veränderungen auf atomarer Ebene untersucht werden, die beispielsweise aus Angriffen auf die Passivschichten der Edelstahlbleche resultieren.

Um den relevanten Projektmitarbeitern Grundlagen zur Bedienung der Gerätschaften (Jeol JSM-6610) sowie gezieltes Wissen für die speziellen Fragestellungen des Forschungsprojekts

anzueignen wurde zunächst eine entsprechende Schulung durch einen externen Dienstleister durchgeführt.

Aufgrund der Größe der Prüfkörper (Edelstahlbleche) von 15 cm x 15 cm war es nicht möglich, diese vollständig im Mikroskop bei minimal notwendiger Auflösung sowie Vergrößerung zu betrachten. Die als Beispiel aufgeführten Abbildungen Abbildung 3 und Abbildung 4 zeigen Bilder mit einer vergleichsweise geringen Vergrößerung eines Faktors von 430. Demnach wird eine Fläche von ca.  $7 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$  dargestellt. Bezogen auf die Gesamtfläche des Aufzuchtblechs von  $225 \text{ cm}^2$  müssten über 300.000 entsprechende Fotos aufgenommen werden um das Blech vollständig abzubilden. Im diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass sich zwar Live-Bilder mit dem REM darstellen lassen und diese eventuell auch erste Hinweise auf Korrosionserscheinungen zulassen, zum Erstellen von Bildern mit der in z.B. Abbildung 3 dargestellten Qualität jedoch Aufnahmezeiten von mehreren Minuten notwendig sind. Zur mikroskopischen Analyse musste sich also auf einige Bereiche mit besonderer Relevanz beschränkt werden. Dazu wurden zunächst die Regionen auf den Blechen markiert, die mit Biofilm bewachsen waren. Darüber hinaus wurden auffällige Stellen markiert (z.B. Verfärbungen), bei denen eine hohe Wahrscheinlichkeit des Auftretens von biologischen Korrosionserscheinungen vermutet wurde. Die Bleche wurden vor- und nach den Aufzuchtversuchen elektronenmikroskopisch untersucht. Um potentielle Biokorrosion zu beurteilen wurden bewachsene Regionen mit Regionen auf den Prüfkörpern verglichen an denen kein biologisches Wachstum stattfand. Bei diesen Beobachtungen wurden stets die Bleche der Kontrollversuche denen der tatsächlichen Versuchskörper gegenübergestellt. Als besonders hilfreich erwies sich dabei die Möglichkeit zwischen Sekundärelektronenkontrast („SEI“; mit Everhart-Thornley-Detektor) und Rückstreuielektronenkontrast („REF“ oder „BSE“) als Abbildungsverfahren wählen zu können. Bilder mit Sekundärelektronenkontrast haben im Allgemeinen eine höhere Auflösung, während Rückstreuielektronenkontrastbilder andere Informationen, wie beispielsweise erste Hinweise auf die chemische Natur des Objekts beinhalten können. In vielen Fällen konnte so durch einfaches Umschalten des Detektors (von SEI auf BSE) sichtbar gemacht werden, ob mikroskopisch beobachtete Auffälligkeiten eine Korrosionsrelevanz hatten oder aus anderen, nicht korrosionsbedingten Ursachen resultierten (z.B. organische Verunreinigungen). Beispielhaft hierfür sind die Abbildungen Abbildung 3 und Abbildung 4 aufgeführt, die eine REM Darstellung desselben Abschnitts eines Edelstahlblechs zeigen, jedoch unter Verwendung der unterschiedlichen Detektoren (Abbildung 3 Sekundärelektronenkontrast; Abbildung 4 Rückstreuielektronenkontrast).

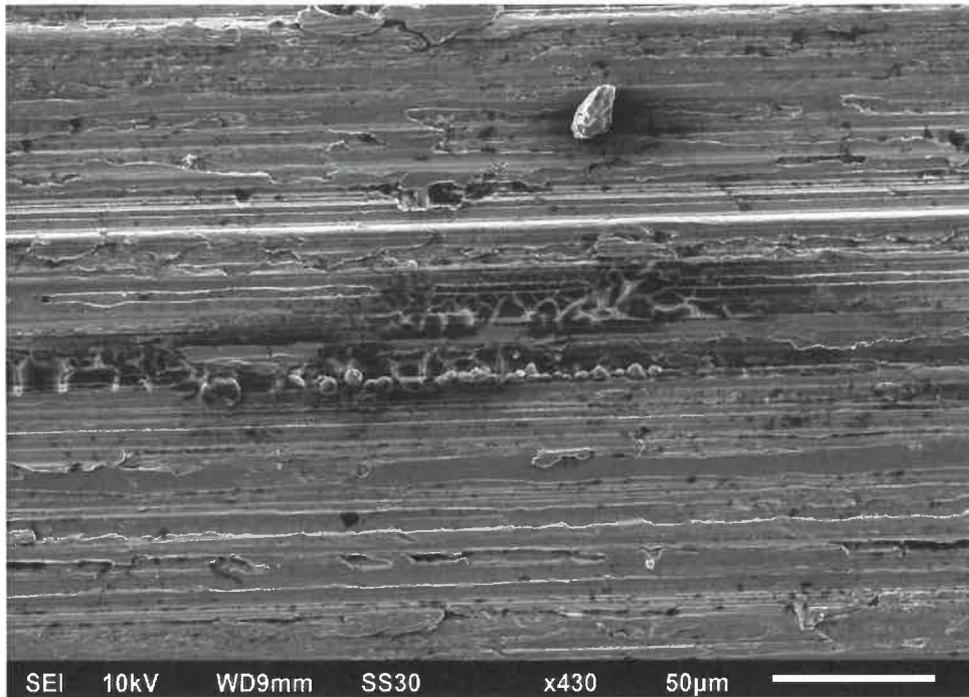


Abbildung 3: REM Aufnahme mit Sekundärelektronenkontrast

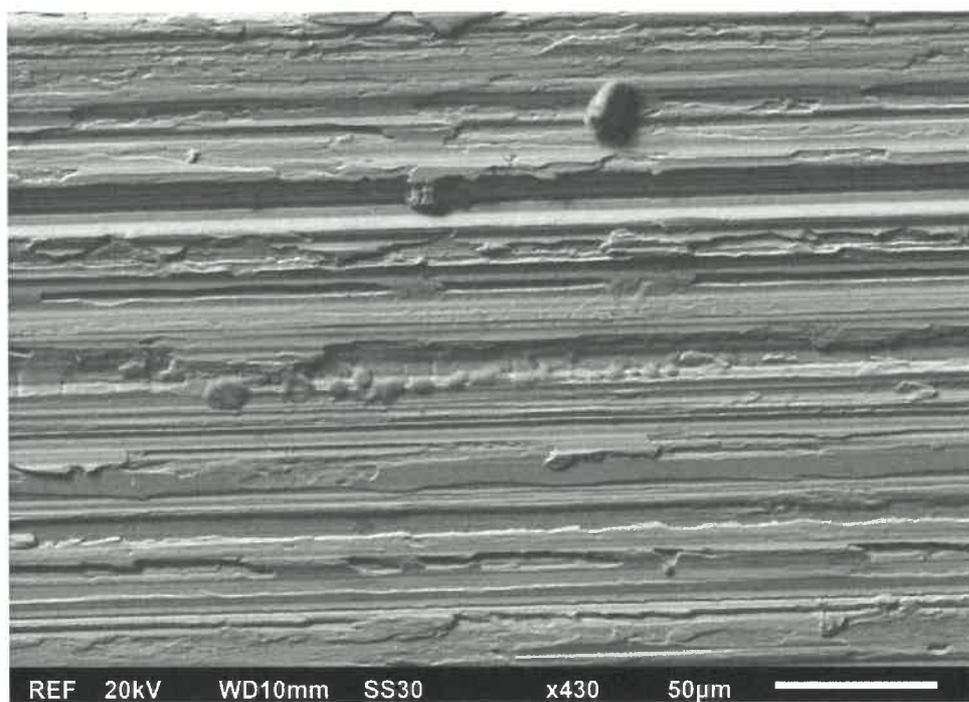


Abbildung 4: REM Aufnahme mit Rückstreuelektronenkontrast

Da es sich bei den Edelstahlblechen nicht um Isolatoren (Nichtleiter) handelte, konnte auf eine spezielle Probenvorbereitung (Goldspütern) verzichtet werden. Diese Tatsache, dass es sich um Edelstahlprüfkörper handelte war auch förderlich für die zu wählende Beschleunigungsspannung (sowohl für die Rasterelektronenmikroskopie als auch für die EDX Analytik), da hier bei relativ hohen Spannungen von meist 20 kV gearbeitet werden konnte. Unter Verwendung dieser hohen Beschleunigungsspannungen lassen sich einfacher fokussierte Darstellungen

erreichen. Für die EDX Untersuchungen wurde diese Spannung jedoch teilweise reduziert (im Rahmen zwischen 5 kV und 15 kV), da bei zu hoch gewählter Spannung die Möglichkeit bestand, dass nicht wie gewünscht die Oberfläche analysiert wurde sondern darunterliegende Schichten.

Generell zeigte sich auch das energiedispersive Röntgenstreuungsspektroskopie-Modul des Rasterelektronenmikroskops als wertvolles Instrument zur Beurteilung von möglichen Korrosionsphänomenen. Nach Beendigung der jeweiligen Versuche wurde zunächst überprüft ob der Biofilmbewuchs zu signifikanten quantitativen und qualitativen Veränderungen in der elementaren Zusammensetzung der Oberflächen führte, z.B. durch den Angriff der Passivschichten. Dazu wurde stichprobenartig und punktuell die atomare Zusammensetzung verschiedener Stellen auf den Metalloberflächen bestimmt und diese mit Untersuchungen verglichen, die auf Blechen ohne vorherigen, biologischen Bewuchs gemacht wurden.

Weiterhin wurde die EDX Technik eingesetzt um Auffälligkeiten auf den Metallblechen genauer zu untersuchen. Abbildung 8 zeigt die elektronenmikroskopische Darstellung eines visuellen Befunds auf dem Blech nach Biofilmbewuchs und anschließender Reinigung. Zur genaueren Bewertung wurde ein EDX-Mapping angestellt in dem die vorkommenden Elemente in unterschiedlichen Farben dargestellt werden (Abbildung 9). Das erhöhte Vorkommen von Kohlenstoff welches in dem Mapping blau dargestellt wird, weist darauf hin, dass es sich bei der auffälligen Stelle nicht etwa um ein Korrosionsphänomen handelt sondern vielmehr um eine organische Verschmutzung.

### 2.3.3 Einfache physikalische Analytik

Hauptaugenmerk in den Untersuchungen, die hier als einfache physikalische Analytik zusammengefasst werden, galt der Bestimmung einer möglichen biokorrosionsbedingten Erhöhung der mittleren Rauheit ( $R_a$ ) mit einem entsprechenden Messgerät (INNOVATEST TR-100). Dieses Messgerät nutzt einen piezoelektrischen Sensor, der mit einer Diamantspitze die zu messende rauhe Oberfläche feinfühlig abtastet. Im zu erwartendem Rauheitsbereich  $R_a$  von 0,10 bis 2,5  $\mu\text{m}$  wird dabei eine Einzelmessstrecke von 0,8 mm abgefahren. Um eine korrosionsbedingte Erhöhung der mittleren Rauheit nach Biofilmbewuchs untersuchen zu können, mussten Messungen jeweils vor und nach den Aufwuchsversuchen durchgeführt werden, an Stellen auf den Blechen, die auch tatsächlich mit Biofilm bewachsen waren. Eine vollständige Abbildung der mittleren Rauheit der Edelstahlbleche (Abmaße 15 cm x 15 cm) wäre ideal gewesen, jedoch mit dem eingesetzten Instrument nicht realisierbar, da lediglich eindimensionale Messstrecken von 0,8 mm erfasst werden konnten. Aus diesem Grunde mussten jeweils vor Versuchsbeginn Messpunkte auf den Blechen definiert werden, die auch nach Versuchsende

wieder beprobt wurden. Dazu musste die lokale Ausbildung des Biofilmwachstums auf den Aufzuchtflächen in einem gewissen Rahmen vorausgesagt werden. Im Rahmen der Versuche wurden dazu zunächst „Rauheitskarten“ erstellt (siehe Abbildung 5), die eine Dokumentation der Veränderung der mittleren Rauheit ermöglichen. Auf diese Weise wurde eine Methode entwickelt, die eine Untersuchung von biokorrosionsbedingten Rauheitsveränderungen ermöglicht. In einer späteren Projektphase wurden zudem weitere Methoden zur Analyse der mittleren Rauheit erforscht (siehe Abschnitt 2.6).

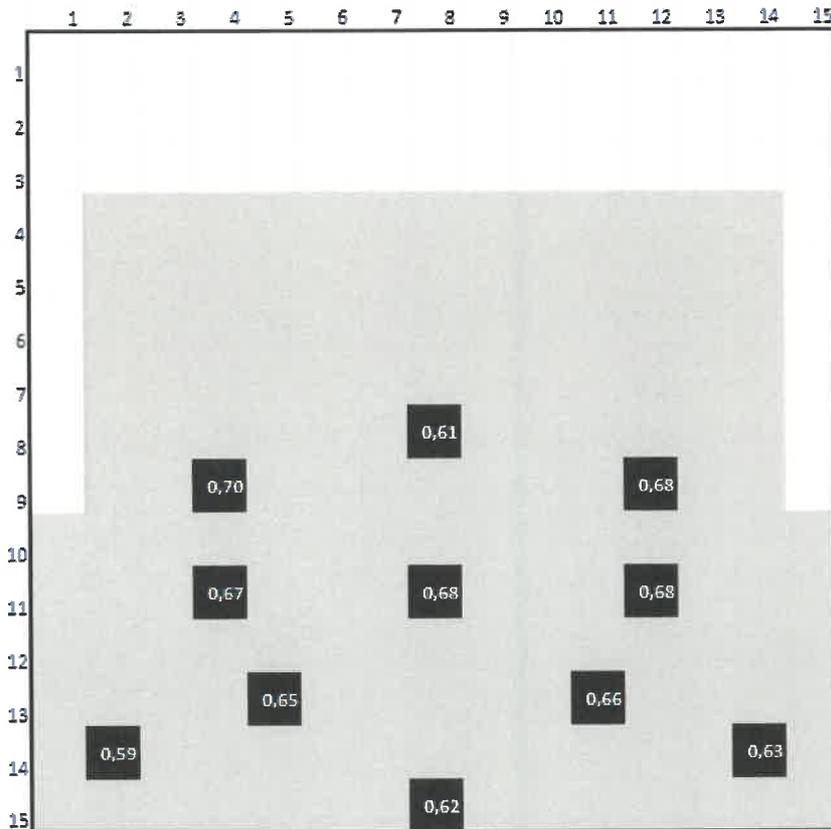


Abbildung 5: Beispiel für "Rauheitskarte"

Die weiteren Bestandteile dieses Arbeitspakets dienen der gravimetrischen Bestimmung des Materialabtrags mit einer Analysenwaage (Fa. Sartorius) sowie einer Blechdickenmessung mit einem Dickenmessgerät (Fa. Kroeplin). Dazu wurden die Bleche jeweils vor und nach den Versuchen gewogen, bzw. ausgemessen.

#### 2.3.4 Eisenionen

Mittels Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie (F-AAS) sollten Eisenionen in den EPS-Schleimschichten der Biofilme als Korrosionsprodukte nachgewiesen werden. In diesem Arbeitspaket war zunächst die Entwicklung einer entsprechenden Methodik notwendig, da die F-

AAS Technik bisher für gänzlich andere Untersuchungen angewandt wurde (z.B. Rosteigenschaften von Kronenkorken in der Verpackungsprüfung). Hierzu wurden definiert Biofilm-Aliquote entnommen und diese in Salzsäure (25 %) überführt. Als Referenz wurde Substrat aus den Ausganggefäßen der Kontrollversuche und das jeweilige Getränk ohne weitere Behandlung verwendet. Nach 48 Stunden wurde ein festgelegter Anteil des Überstands erneut in Salzsäure überführt. Bevor die Lösung in die Kanüle des F-AAS Geräts gebracht wurde, wurde diese über einen Blaubandfilter filtriert um sicherzustellen, dass keinerlei Feststoffe in eingebracht werden. An dieser Stelle ist anzumerken, dass höhere Konzentrationen an Eisenionen in den Biofilmprouben – im Vergleich zum Kontrollversuch, bzw. zum jungfräulichen Getränk – nachgewiesen wurden, selbst wenn visuell oder in anderen analytischen Methoden (z.B. REM/EDX) keine Korrosionserscheinungen beobachtet werden konnten.

### 2.3.5 Organische Säuren

Zur Bestimmung der organischen Säuren konnte das ursprünglich einzusetzende Verfahren der VLB „ZL-IC-OSG“, welches sich der Ionenaustausch Chromatographie bedient, aufgrund defekter Bestandsgerätschaften nicht zum Einsatz kommen. Anstelle dessen wurde zum einen mit spezifischen Testkits auf relevante Säuren getestet. Zum anderen wurde die titrierbare Gesamtsäure (Citronensäure) bestimmt. Zum Durchführen der Analysen wurden Biofilmaliquote entnommen und in den entsprechenden Getränken soweit möglich gelöst. Der Gehalt an Säuren wurde mit Proben aus dem Substrat Auffangbecken der Kontrollversuche sowie mit unbehandelten Getränken verglichen. In der Regel wurden in den Biofilmprouben deutlich höhere Werte festgestellt als in den Referenzuntersuchungen.

### 2.3.6 Identifizierung der Mikroorganismen mittels „Next-Generation-Sequencing“

Für die Analyse von Biofilmen gibt es verschiedenste Methoden. Dabei ist wohlmöglich die klassische kulturelle Analyse am weitesten verbreitet und bekannt. Hier können unspezifische und spezifische Nährmedien zur Kultivierung der an dem jeweiligen Biofilm beteiligten Mikroorganismen herangezogen und isoliert werden. Diese Methode ist leicht umsetzbar, bringt jedoch auch Nachteile mit sich. Der Einsatz von spezifischen Nährmedien zur Kultivierung von z. B. spezifischen Gattungen kann auch zu Fehlinterpretationen führen, wenn die jeweiligen Kolonien nicht genauer analysiert werden, da auch Nicht-Zielkeime sich auf diesen Medien vermehren können. So konnten z. B. auf ENDO-Agar, ein Medium zur Kultivierung von *Escherichia coli* und coliformen Keimen auch Hefen nachgewiesen werden. Ebenso können Nicht-Saccharomyces-Hefen auf VLB-S7-Agar wachsen. VLB-S7-Agar dient ursprünglich der

Kultivierung von Milchsäurebakterien. Hefen sollten durch den Zusatz des Antibiotikums Cycloheximid unterdrückt werden. Etwaige Resistenzen und unspezifisches Wachstum erschweren die Isolierung von manchen Mikroorganismen aus einem Biofilm. Auch können Mikroorganismen, die in geringen Konzentrationen vorkommen, nur schwer isoliert werden. Ebenso können Mikroorganismen im VBNC (viable but not culturable)-Stadium nicht nachgewiesen werden. Diese Mikroorganismen sind „am Leben“ aber zum jeweiligen Zeitpunkt nicht auf Nährmedien kultivierbar. Auch lassen sich manche Mikroorganismen nur schwer kultivieren, wie z. B. die Gattung *Thiobacillus*, als Bakterium, welches häufig in Zusammenhang mit Biokorrosion gebracht wird.

Kultivierungs-unabhängige Methoden zum Nachweis von Mikroorganismen können zum Teil die Nachteile der kulturellen Analyse umgehen. Mittels Real-Time-PCR können anhand von spezifischen Sonden gezielt Mikroorganismen anhand ihrer spezifischen DNA nachgewiesen werden. Hier werden jedoch lediglich die gezielten Mikroorganismen detektiert, wenn diese auch in einer ausreichend hohen Konzentration vorliegen. Die Nachweisgrenzen liegt hier meist erfahrungsgemäß bei  $10^3$  Zellen/ml. Liegen diese in einer geringeren Konzentration vor, können sie auch nicht direkt mittels Real-Time-PCR nachgewiesen werden.

Das Next Generation Sequencing sollte hier all die Nachteile umgehen und möglichst alle am Biofilm beteiligten Mikroorganismen nachweisen. Anhand dieser Mikrobiomanalyse kann das Risikopotential eines Biofilms sowohl für das jeweilige Produkt als auch für die Anlagen am besten abgeschätzt werden. Hefen und Bakterien können anhand von universellen Sequenzen auf ihrer DNA identifiziert werden. Dazu werden für die Bakterien die 16S-Sequenz und bei den Hefen/Pilze die ITS-Sequenz herangezogen.

Für die Analyse im Projekt wurde am Ende der Anzucht des jeweiligen Biofilms eine Probe entnommen. Die Gesamt-DNA der Probe (DNA von allen in der Probe befindlichen Mikroorganismen) wurde mit dem *NucleoSpin Soil-Kit* von *Macherey:Nagel* isoliert. Die Probe wurde auf Hefen und Bakterien mittels Next Generation Sequencing bei dem Dienstleister *LGC-Genomics* analysiert.

Als Beispiel sind die Ergebnisse der Versuche 1, 3, 4-2, 5-1 und 5-2 im Folgenden dargestellt.

Die Abbildung 26 bzw. Abbildung 27 (siehe Anhang Abschnitt 7.3) zeigt jeweils ein Säulendiagramm mit der Präsenz bzw. Verteilung von Mikroorganismen (Bakterien bzw. Hefen/Pilze) in den jeweiligen Proben. Die entsprechenden Legenden zu den Säulendiagrammen mit den jeweiligen prozentualen Anteilen der jeweiligen Mikroorganismen in dem Biofilm können der Tabelle 3 (Bakterien) bzw. Tabelle 4 (Hefen/Pilze) (im Anhang Abschnitt 7.3) entnommen werden. Es ist zu erkennen, dass Probe 1 die größte Diversität im Mikrobiom aufweist. Während die Proben 3, 4-2, 5-1 und 5-2 mit mehr als 99% das Essigsäurebakterium *Gluconobacter* als

Hauptvertreter der Bakterien im Biofilm aufweisen, konnten in der Probe 1 mehrere verschiedene Bakterien nachgewiesen werden. Als Hauptvertreter der Essigsäurebakterien wurde *Acetobacter* nachgewiesen. Mit einem geringeren Anteil konnten weitere Essigsäurebakterien der Gattungen *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter* und *Komagataibacter* in dieser Probe nachgewiesen werden. Weiterhin waren Milchsäurebakterien der Gattung *Lactobacillus* vertreten. Weitere Bakterien waren mit einem Anteil < 1% vertreten.

Hinsichtlich der Präsenz von Hefen wurde in den Proben 5-1 und 5-2 mit ca. 98 % als Hauptvertreter *Wickerhamomyces* nachgewiesen. Probe 4-2 zeigte ebenfalls mit 91 % *Wickerhamomyces* als Hauptvertreter. Daneben wurde mit 8 % Hefen der Gattung *Candida* nachgewiesen. Probe 1 weist mit jeweils ca. 40-45 % Hefen der Gattung *Candida* und *Wickerhamomyces* auf. Zusätzlich wurden hier auch Hefen der Gattung *Pichia* nachgewiesen.

Die unterschiedliche Diversität der Mikroorganismen in den jeweiligen Proben liegt an den unterschiedlichen Substraten und Kultivierungsbedingungen der jeweiligen Biofilme.

Neben diesen molekularbiologischen Methoden, wurden die Biofilme teilweise auch mit klassischer, mikrobiologischer Analytik untersucht. Dazu wurden die EPS Schichten in Wasser überführt, verdünnt und auch verschiedenen Selektivmedien ausgestrichen. Der Titer der differenzierbaren Kolonien wurde bestimmt und deren Aussehen makroskopisch beschrieben. Tabelle 5 (Anhang Abschnitt 7.4) zeigt beispielhaft die Ergebnisse einer solchen Untersuchung. Dabei wurden die auf Standard I Agar und Endo Agar gewachsenen Kolonien einzeln und mikroskopisch (Lichtmikroskop) untersucht (siehe Abbildung 28 im Anhang Abschnitt 7.4)

## 2.4 Aufzuchtversuche

Mit den in Abschnitt 2.3 dargestellten Analysen stand ein umfangreicher Methodenkatalog zur Verfügung um die nachfolgend beschriebenen Aufzuchtversuche zu begleiten.

In Tabelle 1 sind die im Rahmen des Projekts durchgeführten Versuche aufgelistet. Eine nähere Beschreibung dieser Versuche erfolgt in den folgenden Absätzen. Im Anhang Abschnitt 7.2 (Abbildungen Abbildung 10: Biofilmwachstum in 3 Stufen (Versuch 8) bis Abbildung 14 sind beispielhaft Bilder aufgeführt, die das Biofilmwachstum während der Versuche dokumentieren. REM Bilder der Bleche sowie EDX Analysen sind ebenfalls im Anhang, Abschnitt 7.2 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht Projektversuche

Versuch #	Aufzuchtintervall	Substrat	Blech	Ort	Anmerkung
1	2 Wochen	Bier (Pilsener)	1.4307	VLB Technikum alt I	Kontrollversuch - Quasa
2	2 Wochen	Bier (Pilsener)	1.4307	VLB Technikum alt I	Kontrollversuch - Kalium-sorbat
3	2 Wochen	Apfelschorle	1.4307	VLB Technikum alt I	Kontrollversuch - Kalium-sorbat
4-1	2 Wochen	Bier (Pilsener)	1.4307	VLB Technikum alt I	Basisversuch 1
4-2	2 Wochen	Bier (Pilsener)	1.4307	VLB Technikum alt I	Basisversuch 1
4-3	2 Wochen	Bier (Pilsener)	1.4307	VLB Technikum alt I	Basisversuch 1
5-1	2 Wochen	Apfelschorle	1.4307	VLB Technikum alt I	Basisversuch 2
5-2	2 Wochen	Apfelschorle	1.4307	VLB Technikum alt I	Basisversuch 2
5-3	2 Wochen	Apfelschorle	1.4307	VLB Technikum alt I	Basisversuch 2
6	4 Wochen	Eistee Pfirsich	1.4307	VLB Technikum alt II	Basisversuch 3
7	6 Wochen	Sirup „Kirsche“	1.4307	VLB Technikum alt II	Basisversuch 4
8	4 Wochen	Bier (Pilsener)	1.4016	VLB Technikum alt II	Materialvariation 1
9	4 Wochen	Apfelschorle	1.4016	VLB Technikum alt II	Materialvariation 2
10	4 Wochen	Bier (alkoholfrei)	1.4016	VLB Technikum alt II	Materialvariation 3
11	6 Wochen	Bier (alkoholfrei)	1.4016	VLB Technikum alt II	<i>P. fluorescens</i>
12	4 Wochen	Bier (alkoholfrei)	1.4016	VLB Technikum alt II	<i>D. vulgaris</i>
13	3 Wochen	Bier (alkoholfrei)	1.4016	VLB Technikum alt II	<i>A. ferrooxidans</i>
14	3 Wochen	Bier (alkoholfrei)	1.4016	VLB Technikum neu I	vorbehandelt
15	2 Wochen	Bier (alkoholfrei)	Stahl - unleg.	VLB Technikum neu II	Methodenevaluation

Wie in der Versuchsplanung des Antrags vorgesehen wurden im Zuge des Arbeitspakets 3 zunächst Versuche im Technikum der VLB Berlin nach folgendem Schema durchgeführt:

Analytik (Aufzuchtflächen, inkl. Kontrollversuch)

→

Biofilmzucht (2 Wochen) → Analytik (Aufzuchtflächen, inkl. Kontrollversuch / EPS-Matrix)

→

Biofilmzucht (2 Wochen) → Analytik (Aufzuchtflächen, inkl. Kontrollversuch / EPS-Matrix)

→

Biofilmzucht (2 Wochen) → Analytik (Aufzuchtflächen, inkl. Kontrollversuch / EPS-Matrix)

Als Aufzuchtfläche kamen Edelstahlbleche (1.4307, geschliffen, Ra ca. 0,8 µm) zum Einsatz.

In einem ersten Versuch (Versuch 4) wurde als Nährsubstrat Bier (Pilsener Typ) verwendet, in einem zweiten Versuch (Versuch 5) kam Apfelschorle zum Einsatz. Die beiden Versuche verliefen dabei wie geplant (Biofilmwachstum auf den Stahlblechen, kein Wachstum im Kontrollversuch), jedoch ließen sich mit der begleitenden Analytik keine signifikanten Korrosionserscheinungen nachweisen.

Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, wurde in einem ersten Schritt von dem obigen Schema abgewichen indem je Versuch nur noch ein Aufzuchtintervall appliziert wurde, dieses jedoch deutlich länger gewählt wurde (4-6 Wochen, Versuche 6 und 7). Auf diese Weise sollte der Biofilm länger auf das Metall „einwirken“. Da gerade anaerobe Mikroorganismen laut Literatur zu den typischen Korrosionsorganismen zählen (z.B. Sulfat reduzierende Bakterien), können diese in aeroben Systemen wie Getränkeabfüllanlagen nur in anaeroben Nischen existieren. Untere Areale in den EPS Schichten von Biofilmen bilden z.T. anaerobe Bereiche und damit Lebensräume für anaerobe Organismen. Die Verlängerung der Aufzuchtintervalle macht eine große Problemstellung in der Durchführung der Projektarbeiten deutlich: Um den Erfolg einer Versuchsparmetrierung, der sich im Sinne des Projekts beispielsweise in dem Erzeugen einer mikrobiell beeinflussten Korrosion ausdrückt, bemessen zu können waren sehr zeitintensive Versuche notwendig (2 – 6 Wochen). Aufgrund der naturgemäß begrenzten Projektlaufzeit musste sich daher auf die Durchführung ausgewählter Versuche beschränkt werden. Ebenso konnten wünschenswerte Wiederholungen von Versuchen nicht durchgeführt werden. Gerade vor dem Hintergrund eines spontanen, in Teilen vom Zufall beeinflussten Biofilmwachstums wären idealerweise Mehrfachdurchführungen der Versuche anzustreben.

Weiterhin wurden in dieser Projektphase die eingesetzten Substrate variiert um auf diese Weise Biokorrosion zu fördern. Da bereits in vorangegangenen Projekten bestätigt wurde, dass die Art des Substrats einen Einfluss auf die Mikroflora des Biofilms hat sollte so die Wahrscheinlichkeit des Auftretens korrosionsrelevanter Biofilmbewohner erhöht werden. Ähnliches

gilt für die Wahl des Standorts des Biofilmwachstums, welcher ebenfalls – wenn auch im geringeren Ausmaß – einen Einfluss auf die Mikroorganismenverteilung in der EPS Schicht ausübt. Aus diesem Grund wurde der Aufzuchtstandort zunächst innerhalb des Technikums der VLB (altes Technikum, bevor Firmenumzug) variiert.

Nichtdestotrotz konnten in den hier eingesetzten Kombinationen der Versuchsparameter (Nährsubstrat, Versuchsstandort, Aufzuchtintervall) im Rahmen in dieser ersten Projektphase keine Biokorrosion beobachtet werden, so dass von der bei der Antragstellung erstellten Versuchsplanung abgewichen werden musste. Dieses spiegelte sich zunächst in der Wahl des Materials der Aufzuchtfläche wider. Wurde im Vorrangegangenen stets Stahl der Sorte 1.4307 verwendet, der als Edelstahl mit sehr guter Korrosionsbeständigkeit angesehen werden kann und im Fachmaschinenbau der Getränkeindustrie weitreichende Verwendung findet, sollte für die nachfolgenden Versuche ein Edelstahl eingesetzt werden, der eine geringere Korrosionsbeständigkeit aufwies, so dass die Bildung mikrobiell beeinflusster Korrosion gefördert werden sollte. Im Sinne der ausgegebenen Projektziele wurde jedoch gefordert, dass die zu wählende Stahlsorte die Mindestanforderungen erfüllt, die an Stähle für die Getränkeindustrie zu stellen sind und auch laut den gängigen Standards (z.B. EHEDG, Dokument 8 [1]) dort eingesetzt wird. Für die weiteren Projektversuche wurden daher Edelstahlbleche der Sorte 1.4016 eingesetzt. Stahlsorte 1.4016 ist ein nichtrostender, ferritischer Chromstahl ohne Nickelzusatz mit einer leicht geringeren Korrosionsbeständigkeit als der standardmäßig verwendete 1.4307 (PREN 16,0 – 18,0 bei 1.4016 vs. 17,5 – 21,1 bei 1.4307).

Mit den neuen Stahlblechen wurden zunächst drei Korrosionsversuche durchgeführt (Versuche 8 bis 10), jeweils mit Bier (Pilsener), Apfelschorle und alkoholfreiem Bier. Bei keinem der durchgeführten Versuche konnten biologischen Korrosionserscheinungen induziert werden. Dieser Umstand machte weiterreichende Abweichungen von der Versuchsplanung des Forschungsantrags notwendig. Wie dort schon in den Ausführungen zum technischen Risiko in Betracht gezogen wurde, sollten Möglichkeiten zur gezielten Innokulation des Aufzuchtssystems mit hinlänglich bekannten Korrosionsorganismen überprüft werden. Das Verfahren wurde zunächst mit *Pseudomonas fluorescens* erprobt. Als einfach zu kultivierender Organismus und typischer Biofilmvertreter schien dieses Bakterium geeignet, sich entsprechende Verfahren anzueignen um den Versuchsaufbau gezielt zu beimpfen. Darüber hinaus werden *Pseudomonas* Arten laut Literatur biokorrosionsfördernde Eigenschaften zugesprochen durch ihre Fähigkeit  $Fe^{3+}$  zu  $Fe^{2+}$  zu reduzieren [2]. Zur Anzucht von *Pseudomonas fluorescens* wurde Standard I Medium mit einer Gefrierkultur der VLB Stammsammlung beimpft und für drei Tage bei 30°C bebrütet. Die so erhaltene Bakteriensuspension wurde in das Biofilmaufzuchtssystem gebracht, nachdem sich ein dreidimensionaler Biofilm ausgebildet hatte (ca. nach 2 Wochen). Dazu wurde zum einen das Getränk im Substratauffangbehälter beimpft, zum anderen wurde

mit die *Pseudomonas fluorescens*-Suspension mit einer Pipette unter die EPS-Schicht des Biofilms auf dem Stahlblech gebracht. Nach einer vierwöchigen Inkubationszeit mit zusätzlicher Biofilmbildung wurden die Bleche gemäß Analytikcatalog, beschrieben in Abschnitt 2.3 untersucht. Dabei wurden keine bedeutenden biologischen Korrosionsphänomene beobachtet. Da in den anschließenden mikrobiologischen Untersuchungen *Pseudomonas fluorescens* - auch im lebendigen Zustand - wiedergefunden wurde, kann dennoch von einem erfolgreichen Versuchsergebnis gesprochen werden, da die entsprechende Methodik des gezielten Beimpfens des Biofilmaufzuchtssystems entwickelt wurde. Diese Methodik fand in nachfolgenden Versuchen mit weiteren Mikroorganismen Verwendung. In einem nächsten Versuch wurde *Desulfovibrio vulgaris* gezielt in das System eingebracht. *Desulfovibrio vulgaris* ist ein Gram-negatives, anaerobes Bakterium welches aufgrund der Sequenzierung seines Genoms häufig als Modellorganismus für sulfatreduzierende Bakterien hergenommen wird. Sulfatreduzierende Bakterien besitzen ein hohes Korrosionspotential und sind für große Schäden an technischen Systemen, vor allem in der Erdölindustrie verantwortlich. Der von den Bakterien produzierte Schwefelwasserstoff geht in Form von Hydrogensulfidionen und Wasserstoffionen in Lösung. In Folge dessen reagieren Eisenionen aus dem Metall mit den gelösten Hydrogensulfidionen zu schwer löslichem Eisensulfid, welches als schwarzer Niederschlag ausfällt. Damit stehen die Eisenionen dem Metallgitter nicht mehr zur Verfügung und sorgen für einen kontinuierlichen Lösungsdruck. Die übrigen Wasserstoff- bzw. Hydroniumionen verstärken zusätzlich den Mechanismus der Säurekorrosion. Darüber hinaus konnte in anderen Forschungsarbeiten mit *Desulfovibrio vulgaris* biologisch bedingte Korrosion forciert werden [3]. Zur Kultivierung wurde flüssiges, spezielles *Desulfovibrio* Medium mit einer Gefrierkultur aus der VLB-Stammsammlung beimpft und anaerob bebrütet. Anschließend wurde die Bakteriensuspension analog zum Versuch mit *Pseudomonas fluorescens* in die unteren (vermutlich anaeroben) EPS-Schichten eines gewachsenen Biofilms pipettiert. Trotz Zugabe dieses wesentlich biokorrosionsfördernden Organismus konnten nach Beendigung des Versuchs mit 4-Wöchiger Inkubationszeit keine biologisch bedingten Korrosionserscheinungen beobachtet werden. Mögliche Gründe hierfür werden in Abschnitt 3.1 diskutiert.

Als dritter Mikroorganismus, der gezielt in die Aufzuchtversuche gebracht wurde *Acidithiobacillus ferrooxidans* ausgewählt. Dieses säurebildende Bakterium ist dazu befähigt, reduzierte Formen des Schwefels zu Schwefelsäure umzuwandeln, die wiederum die korrosionsfördernd agiert. Auch für *Acidithiobacillus ferrooxidans* existieren Forschungsarbeiten, in denen durch Einsatz dieses Bakteriums biologische Korrosion an hochlegierten Edelstählen hervorgerufen werden konnte [4]. Zur Kultivierung dieses Organismus wurde spezielles *Acidithiobacillus ferrooxidans* Medium (DSMZ Nr. 70) mit einer Stammkultur beimpft und für 7 Tage bebrütet. Die gezielt Kontamination des Biofilmsystems erfolgte analog zu den vorherigen Versuchen. Nach

einer Versuchsdauer von 4 Wochen (nach dem Zeitpunkt des Beimpfens mit *Acidithiobacillus ferrooxidans*) waren keine biologischen Korrosionsphänomene zu beobachten.

Die beschriebenen Versuche mit definiertem Einbringen von Mikroorganismen in die Biofilme wurden von Laborversuchen begleitet, die in 2.5 beschrieben werden.

Die Tatsache, dass auch durch gezielte Kontamination der Aufzuchtversuche mit korrosionsrelevanten Organismen keine biologisch beeinflusste Korrosion erzwungen werden konnte führte dazu, dass eine weitere Variation in der Versuchsdurchführung unternommen wurde. Vor dem Hintergrund der Überlegung, dass Edelstahloberflächen in Getränkeabfällanlagen nicht nur Biofilmen ausgesetzt sind, sondern durch routinemäßige Reinigungsprozesse teilweise auch mit korrosiven Reinigungsmitteln in Kontakt kommen, sollte untersucht werden, ob eventuell Interaktionen zwischen „herkömmlicher“, reinigungsmittelbedingter Korrosion und biologisch beeinflusster Korrosion bestehen. Dazu wurde ein Edelstahlblech mit aggressivem Natriumhypochlorid (Chlorbleichlauge) vorbehandelt um eine Beanspruchung durch ein entsprechendes Reinigungsmittel zu simulieren. Reinigungsmittel, die Natriumhypochlorid enthalten werden standardmäßig in Getränkeabfällanlagen eingesetzt. Nach der Vorbehandlung des Edelstahlblechs waren erhebliche Lochkorrosionserscheinungen auszumachen. Gemäß der gängigen Aufzuchtmethodik wurde das Blech anschließend mit einem Biofilm bewachsen. Die Platte wurde im Vorfeld dieses Aufzuchtversuchs sowie nach dessen Beendigung den gängigen Analysen unterzogen wobei ein besonderes Augenmerk des bereits korrodierten Areals galt. Wie schon in den Versuchen zuvor, konnte auch bei diesem Versuch keine mikrobiell beeinflusste Korrosion eingeleitet werden. So konnten weder neue Korrosionserscheinungen beobachtet werden, noch wurde eine Vergrößerung der bereits durch das Natriumhypochlorid korrodierten Bereichs hervorgerufen. Bilder zu dieser Versuchsreihe sind im Anhang, Abschnitt 7.2 und 7.6 aufgeführt.

Um trotz ausbleibender Biokorrosion Aussagen darüber treffen zu können, ob die entwickelten Methoden geeignet dazu sind, biologische Korrosionserscheinungen in Getränkeabfällanlagen zu bewerten und damit zumindest in Teilen ein erfolgreiches Erreichen der ausgegebenen Projektziele zu erreichen, wurde ein abschließender Aufzuchtversuch auf einen Stahlblech minderer Qualität durchgeführt. Durch den Einsatz dieses Bleches, ein verzinkter, unlegierter Stahl, sollte ein weiterer Faktor geschaffen werden, die Wahrscheinlichkeit des Eintretens von Korrosionsphänomenen zu erhöhen. In diesem Zusammenhang ist allerdings zu erwähnen, dass das hier eingesetzte Material bei weitem nicht die Anforderungen erfüllt, die an Stahl zu stellen sind, der in Getränkeabfällanlagen verbaut wird. Nach zweiwöchigem spontanem Biofilmbewuchs ohne zusätzliches Beimpfen von Mikroorganismen waren deutliche Korrosionserscheinungen auf dem Blech zu erkennen (siehe Abbildung 25 in Abschnitt 7.2). Dass die

zuvor entwickelten Analysemethoden zielführend zur Beurteilung dieser Korrosionserscheinungen sind wird beispielweise durch die Darstellung in Abbildung 6 deutlich. Im EDX Mapping der Grenzfläche zwischen korrodierten und nicht-korrodierten Bereichen des Aufzuchtblechs zeigen die nicht-angegriffenen Bereiche der Oberfläche Zink als hauptsächlich vorkommendes Element (Darstellung in violett), während die angegriffenen, korrodierten Bereiche hauptsächlich Eisen aufweisen (Dargestellt in türkis). Dieses ist auf die Verzinkung des Blechs zurückzuführen, welche durch die Korrosion vollständig abgetragen wurden.

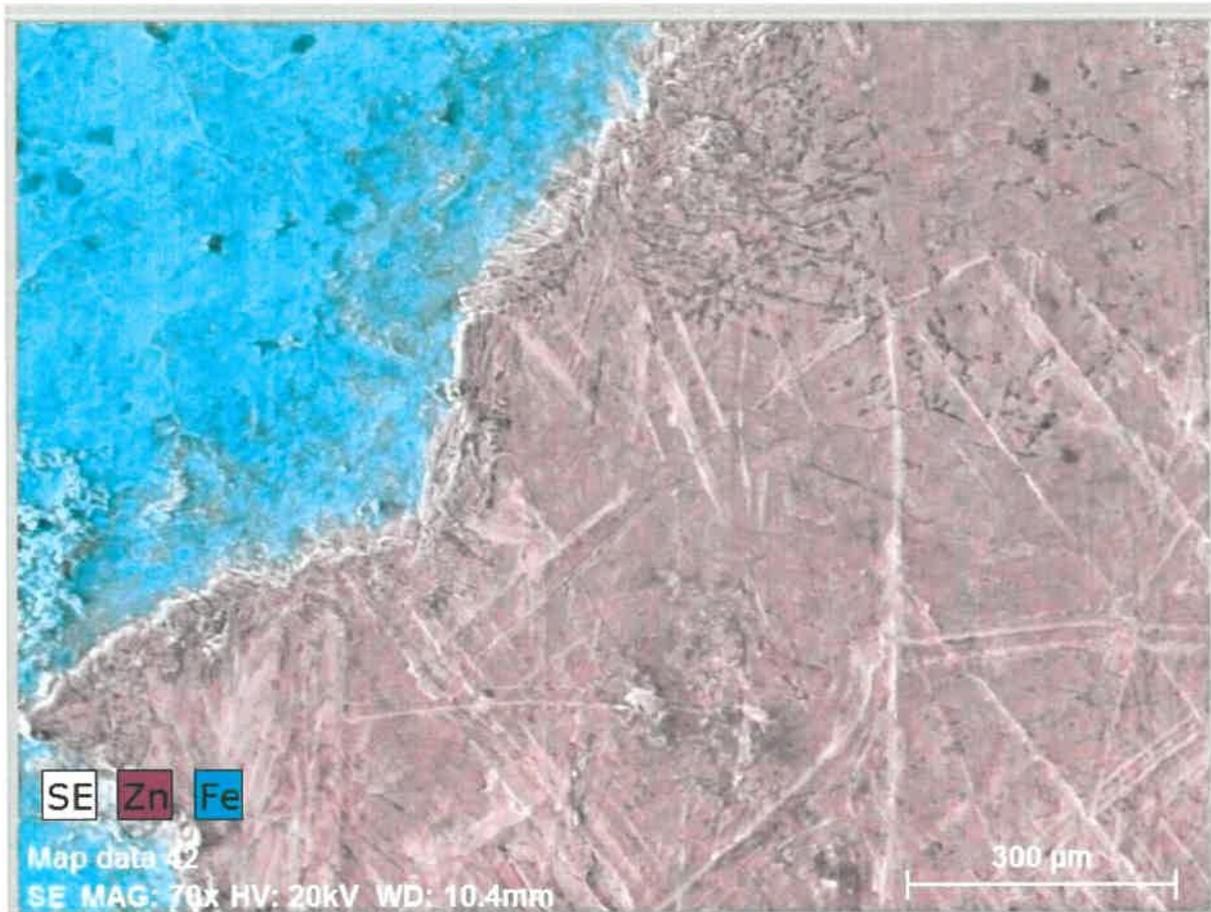


Abbildung 6: EDX Mapping des korrodierten Stahlblechs

## 2.5 Laborversuche

Die unter 2.4 beschriebenen Versuche, in denen das Biofilmsystem gezielt mit Mikroorganismen beimpft wurde, wurden teilweise von Laborversuchen begleitet um etwaige Korrosionserscheinungen gezielt einordnen zu können. Dazu wurde ein Edelstahlcoupon (1.4016) ca. zur Hälfte in eine Flüssigkeit in eine Laborflasche eingetaucht, so dass fest-flüssig-Gas-Grenzflächen entstanden und mit *Pseudomonas fluorescens* oder *Desulfovibrio vulgaris* beimpft. In parallel durchgeführten Kontrollversuchen wurden keine Mikroorganismen inokuliert. Die ge-

wählte Flüssigkeit bestand aus einem für den jeweiligen Mikroorganismus idealen Nährmedium. Anders als bei den in 2.4 beschriebenen Feldversuchen konnte weitere Wachstumsparameter (z.B. Aufzuchttemperatur) so gewählt, das für die Mikroorganismen ideale Bedingungen vorliegen. In Abschnitt 7.5 in Abbildung 29 ist der Versuchsaufbau schematisch dargestellt, während Tabelle 6 die einzelnen Versuchsparameter auflistet.

Weder auf dem eingetauchten Teil der Edelstahlstreifen noch an der Phasengrenzfläche konnte eine Biofilmbildung festgestellt werden. Die nach Versuchsende gereinigten Edelstahlstreifen wurden analog zu dem Edelstahlplatten aus den Versuchen in 2.4 analysiert. Die makroskopische Überprüfung und die Auswertung der REM Aufnahmen lieferten keinen Hinweis auf biologisch beeinflusste Korrosion.

## 2.6 Digitales Mikroskop „Keyence VHX-5000“

Mit dem digitalen Mikroskop Keyence VHX-5000 (angeschafft über „FuE-Förderung gemeinnütziger externer Industrieforschungseinrichtungen - Innovationskompetenz INNO-KOM; Modul: "Investitionszuschuss wissenschaftlich-technische Infrastruktur; IZ170016) stand ein weiteres, überaus nützliches Analysetool zur Verfügung, was zum Zeitpunkt der Antragstellung nicht bekannt war. Dieses Mikroskop lieferte eine ideale Ergänzung zum Rasterelektronenmikroskop. Besonders vorteilhaft war die im Vergleich zum REM deutlich einfachere und schnellere Handhabung, was sowohl die Probenvorbereitung als auch die eigentliche Analyse betraf. Die Möglichkeit eine zusätzliche, farbige Darstellung der Oberflächen der Edelstahlbleche zu erhalten, wie es in Abbildung 30 (Anhang, Abschnitt 7.6) dargestellt wird, konnte gewinnbringend in der Bewertung potenzieller Korrosionserscheinungen eingesetzt werden. Darüber hinaus konnten computergestützte Werkzeuge des Mikroskops genutzt werden. Beispielsweise konnte die mittlere Rauheit über eine selbstgewählte Strecke erfasst werden, sodass deutlich mehr Bereiche abgefragt werden konnten als in den ursprünglich geplanten Analysen.

Weiterhin wurde die Möglichkeit genutzt, mit dem Mikroskop Areale auf den Aufzuchtflächen dreidimensional zu vermessen. Im Beispiel des mit Natriumhypochlorid vorkorrodierten Blechs, konnte die durch Lochkorrosion hervorgerufene Beschädigung exakt ausgemessen werden. Dieses wurde jeweils vor- und nach dem Biofilmaufzuchtversuch unternommen, so dass eine etwaige, biokorrosionsbedingte Vergrößerung beurteilt werden konnte. Die dazugehörigen Bilder sind im Anhang, Abschnitt 7.6 aufgeführt.

### 3. Bewertung der erzielten Vorhabensergebnisse

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

Die Bewertung der erzielten Vorhabensergebnisse muss differenziert betrachtet werden. Im Sinne von Entwicklung von Methoden, so wie es im Antrag postuliert wird, kann durchaus von einem positiven Projektergebnis gesprochen werden. Mit dem erfolgreichen Ausarbeiten geeigneter Methoden für die Kontrollversuche, einer geeigneten Probenvorbereitung, REM und EDX Analytik, Adaption von Verfahren wie die Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie und anderer physikalischer Verfahren sowie den Einsatz modernster molekularbiologischer Methoden (Next-Generation-Sequenzierung) wurden die im Antrag formulierten Ziele allesamt erreicht. Mit dem gezielten Animpfen des Biofilmsystems mit einhergehender Laboranalytik sowie dem Einsatz des digitalen Mikroskops Keyence VHX-5000 wurden gar Methoden erarbeitet, die weit über die Zielstellung des Forschungsantrags hinausgehen. Auf der anderen Seite muss negativ bewertet werden, dass es im Rahmen der Forschungsarbeiten nicht gelungen ist mikrobiologisch beeinflusste Korrosion auf Edelstahlblechen mit Relevanz für die Getränkeabfüllung hervorzurufen. Korrosionserscheinungen konnten nur an minderwertigen Materialien hervorgerufen werden, die in dieser Form nicht in Anlagen für die Getränkeherstellung verbaut werden würden. Zur Überprüfung der ausgearbeiteten Analytik war der Einsatz dieses unlegierten Stahls jedoch ein geeignetes Mittel.

Der Umstand, dass an den beiden Edelstählen der Sorten 1.4307 und 1.4016 keine Biokorrosion hervorgerufen werden konnte, kann aus verschiedenen Blickwinkeln diskutiert werden. Als erstes muss sicherlich die Methodik infrage gestellt werden, mit der die Aufzuchtversuche durchgeführt wurden. Vorgabe im Projekt war, dass das Biofilmwachstum in Getränkeabfüllanlagen möglichst naturgetreu abgebildet werden sollte. Aus diesem Grund waren zunächst lediglich Versuche mit einem spontanen Biofilmwachstum ohne zusätzliches beimpfen von Mikroorganismen geplant. Derartige Versuche sind jedoch sehr zeitintensiv, sodass im Rahmen der Projektlaufzeit nur eine begrenzte Anzahl durchgeführt werden konnte. Da das Auftreten von korrosionsrelevanten Organismen, sofern sie nicht gezielt ins System gebracht werden, auch von Zufallsfaktoren abhängig ist, wäre das Ausbleiben von Biokorrosion möglicherweise simpel durch eine Betrachtung der Wahrscheinlichkeit zu erklären. Je mehr Versuche durchgeführt werden und je länger diese andauern, desto größer die Wahrscheinlichkeit, dass sich entsprechende Mikroorganismen im Biofilm einnisten. Speziesunabhängige Biokorrosionsfaktoren, die alleinig aus dem Bewuchs des Metalls mit einem Biofilm resultieren, wie beispielsweise die Änderung des Redoxpotenzials durch Gradientenbildung oder saure Metabo-

liten, waren im Falle der hier angestellten Untersuchungen nicht ausreichend um die korrosionsbeständigen Materialien des Fachmaschinenbaus für die Getränkeindustrie zu beschädigen. Mikroorganismen, die laut Literatur eine besonders hohe Korrosionsrelevanz haben sind häufig strikte Anaerobier wie beispielsweise sulfatreduzierende Bakterien. Es ist zwar oftmals beschrieben, dass in Biofilmen aerober Systeme wie es Getränkeabfüllanlagen sind, anaerobe Bereiche existieren, die entsprechenden Organismen Lebensraum bieten, jedoch ist die Wahrscheinlichkeit ihres Auftretens stark reduziert. Darüber hinaus müssen bei den spontanen Aufzuchtversuchen mit Mikroorganismen aus der Umgebung diese anaeroben Organismen auf irgendeine Weise in das aerobe System gelangen. In der Praxis wurde Beobachtungen gemacht, dass Sulfat reduzierende Bakterien über Brunnenwasser in die Abfüllhalle gelangten.

Die Versuche, bei denen korrosionsfördernde Mikroorganismen gezielt innokuliert wurden, waren bei der Arbeitsplanung im Antrag nicht in dieser Weise vorgesehen. Aus diesem Grund konnten sie nicht mit dem Aufwand durchgeführt werden, der scheinbar notwendig ist um erfolgreiche Ergebnisse zu produzieren. Der Umstand, dass auch diese Versuche über einen langen Zeitraum ablaufen mussten, führte dazu, dass insgesamt nur wenige Versuche durchzuführen waren und dementsprechend wenig Versuchsparameter variiert werden konnten. Bei in der Literatur beschriebenen, erfolgreichen Laborversuchen (z.B. [5]) wurden die Wachstumsbedingungen für die jeweiligen Organismen optimal gehalten. So wurde z.B. ein ideales Nährmedium verwendet, eine streng anaerobe Atmosphäre erstellt und optimale Wachstumstemperaturen ausgewählt. Bei den hier durchgeführten Versuchen wurde bewusst darauf verzichtet, da die realen Gegebenheiten in der Getränkeabfüllung bestmöglich dargestellt werden sollten.

Die gemachten Beobachtungen führen schlussendlich auch zu der Überlegung, dass biologisch beeinflusste Korrosion in Getränkeabfüllanlagen eine untergeordnete Rolle spielt. Die schlichte Anwesenheit eines Biofilms auf den hochlegierten Stählen, wie beispielsweise 1.4307 war in den Projektversuchen nicht ausreichend bleibende Korrosionserscheinungen hervorzurufen. Da in vorherigen Forschungsprojekten gezeigt wurde, dass durch die eingesetzte Aufzuchtmethodik Biofilme gezüchtet werden, die reale Biofilme in Getränkeabfüllanlagen in hohem Maße abbilden, kann davon ausgegangen werden, dass die Gefahr der Biokorrosion sehr gering ist. Generell auszuschließen ist die Gefahr jedoch nicht, da unter bestimmten Voraussetzungen auch anaerobe sulfatreduzierende Bakterien in Biofilmen von Getränkeabfülllinien auftreten können. Ohnehin bilden Biofilme hinsichtlich hygienischer Aspekte eine immense Gefahr in der Getränkeabfüllung. Der Verhinderung ihres Auftretens, bzw. ihre rückstandslose Entfernung muss höchste Priorität eingeräumt werden. Die REM/EDX Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, dass Flächen, die nach vorherigem Biofilmbewuchs gereinigt wurden, mitunter starke organische Verschmutzungen aufwiesen.

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

An dem abgeschlossenen Projekt wirkten mit dem Projektleiter vier Akademikern der Qualifikation A mit. Weiterhin waren zwei Fachkräfte mit Qualifikation C 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. 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. Darüber hinaus war er mit der Gesamtkoordination aller Aspekte rund um die einzelnen Arbeitspakete betraut. So oblag ihm die Planung und Abwicklung der durchgeführten Versuche sowie die Beschaffung vorhabenbezogener Geräte, Materialien oder Dienstleistungen. Ferner war er auch für die projektbegleitenden Berichte verantwortlich, erstellte vorhabenbezogene Präsentationen und hielt Vorträge.

Die wissenschaftlichen Mitarbeiter mit der Qualifikation A waren verantwortlich für:

- die Organisation, Durchführung und Auswertung der REM / EDX Analysen. Für diese zeitintensiven und komplexen Analysen war ein Mitarbeiter mit entsprechender Expertise notwendig;
- die Vorbereitung und Durchführung der molekularbiologischen Analysen, für die neben den beiden geplanten ein zusätzlicher Mitarbeiter der Gruppe A benötigt wurde. Die Kompetenz dieses Mitarbeiters wurde zudem für die Planung, Durchführung und Auswertung der Versuche notwendig, bei denen gezielt Mikroorganismen in den Versuchsaufbau integriert wurden.

Die zwei Mitarbeiter der Gruppe C waren unterstützend bei der eigentlichen Versuchsdurchführung tätig und führten Laboranalysen (mikrobiologisch, chemisch und physikalisch) durch.

Die geleistete Arbeit war in dem Umfang, in der sie durchgeführt wurde, notwendig. Die zeitintensiven Versuche, die zum Teil sehr komplexe Analytik sowie ein Reagieren auf nicht vorhergesehene Projekt- und Zwischenergebnisse gingen mit einem teils erheblichen Arbeitsaufwand einher. Durch die schon angesprochenen unvorhergesehenen Ergebnisse musste teilweise von der Arbeitsplanung, wie sie bei Antragstellung aufgestellt wurde abgewichen werden.

Das Vorhaben wurde unter der Maßgabe der Effizienz und Sparsamkeit durchgeführt.

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

Die Personalausgaben als größte Position des zahlenmäßigen Nachweises überschritten die geplanten Werte um 11.700,85 Euro (8,3%). Die Überschreitung ergibt sich aus in 3.2 aufgeführten Tätigkeiten und war gemäß der Zielsetzung des Projekts erforderlich.

Entsprechend lagen auch die Allgemeinen Ausgaben um 10.296,99 Euro (8,3 %) über den geplanten Werten.

Die Ausgaben für Material und Einzelgeräte lagen um 3.517,69 Euro (60 %) unter den beantragten und bewilligten Werten. Der Grund hierfür liegt in der Nutzung bereits vorhandener bzw. seit der Antragstellung für andere Projekte angeschaffter Teile und Kleingeräte (insbesondere Pumpenschläuche, Laborkleingeräte).

Die Ausgaben für Einzelgeräte und die Ausgaben für weitere Zwecke lagen im Rahmen der beantragten und bewilligten Ausgaben.

## 4. Darstellung der Innovationspotenziale und Applikationsmöglichkeiten

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

Die wissenschaftliche Bedeutung des abgeschlossenen Projekts liegt vordringlich in der erstmalig angestellten, experimentellen Bewertung der Gefahr von biologisch beeinflusster Korrosion in Getränkeabfüllanlagen. Biofilme bilden eine hinlänglich bekannte Gefahr für Getränkeabfüller, die jedoch bisher fast ausschließlich aus hygienischer Sicht beurteilt wurde. Aus der technischen Betriebsberatung, z.B. aus mikrobiologischen Revisionen ist bekannt, dass an fast jeder Getränkeabfülllinie Biofilme vorkommen. Biologisch beeinflusste Korrosion ist anderen Industriezweigen, z.B. bei der maritimen Ölgewinnung eine bekannte und ernstzunehmende Gefahr, die bereits Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten war. Im Zusammenhang mit der Getränkeabfüllung existierten jedoch nur einige wenige und vor allem theoretische Abhandlungen über die Gefahr der biologisch beeinflussten Korrosion. In den hier angestellten Forschungsarbeiten wurden zum ersten Mal praxisbezogene Experimente durchgeführt, indem getränkerelevante Biofilme auf Edelstahloberflächen gezüchtet wurden und diese anschließend weitreichenden Analysen unterzogen wurden. Aus wissenschaftlicher Sicht kann diesem Projekt demnach ein hoher Stellenwert eingeräumt werden, dessen Ergebnis

jedoch kontrovers zu diskutieren ist (siehe 3.1). Die Tatsache, dass auf den Oberflächen keine biologisch beeinflusste Korrosion erzeugt werden konnte sollte nicht zu der Annahme führen das Biokorrosion in der Getränkeabfüllung komplett zu vernachlässigen ist, mit den durchgeführten Versuchen konnte nur eine sehr geringe Stichprobenmenge abgebildet werden. Auf der anderen Seite ist zu vermuten, dass die Gefahr der Korrosion durch Biofilme im Vergleich zu hygienischen Gefahren eher vernachlässigbar ist. Aus wissenschaftlicher Sicht ist weiterhin anzumerken, dass im Projekt teils modernste „High-Tech“-Verfahren, wie z.B. das „Next-Generation-Sequencing“ zum Einsatz kamen.

Laut Literatur wird geschätzt, dass mindestens 20 % aller Korrosionsschäden an Metallen und Baustoffen mikrobiell beeinflusst sind und dass jährliche Schäden Milliardenhöhe erreichen [6]. Forschungsarbeiten, die sich mit dieser Thematik beschäftigen haben demnach stets eine wirtschaftliche Bedeutung. Wäre aus dem Projekt ein anderes Ergebnis hervorgegangen, welches Biokorrosion als große Gefahr für die Getränkeindustrie einstufen würde, wäre es an dieser Stelle selbstverständlich ein Einfaches die wirtschaftliche Bedeutung herauszustellen. Doch auch die Aussage, dass die bisher eingesetzten Materialien hinsichtlich biologischer Korrosionsphänomene scheinbar einen ausreichenden Schutz aufweisen hat eine wirtschaftliche Relevanz. Jedoch ist auch in diesem Punkt anzumerken, dass wirtschaftliche Faktoren, die sich aus Biofilmen ergeben, vor allem in hygienischen Gefahren zu suchen sind: Durch kontaminierte Produkte hervorgerufene Imageschäden beim Verbraucher, Rückrufaktionen und Verstöße gegen die Lebensmittelhygiene-Verordnung gehen stets mit immensen wirtschaftlichen Verlusten einher. Da die Getränkeindustrie in Deutschland im Wesentlichen mittelständische geprägt ist, beziehen sich die aufgeführten Punkte im großen Teil auf die mittelständische Wirtschaft.

Zwar konnten an den (abfüllanlagenrelevanten) Materialien im Forschungsprojekt keine biologischen Korrosionserscheinungen hervorgerufen werden, die dabei entwickelte Methodik ist jedoch nicht grundsätzlich in Frage zu stellen. Gerade andere Materialien als hochlegierte Edelstähle könnten mit der Technik überprüft werden und hinsichtlich ihrer biologischen Korrosionsbeständigkeit bewertet werden.

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

Schon zum jetzigen Zeitpunkt wurde eine Vielzahl an Artikeln und Vorträgen 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. Ferner werden die gewonnenen Erkenntnisse in die Betriebsberatung, beispielsweise bei Revisionen einfließen.

#### 4.3 Perspektiven und Chancen für sich anschließende Entwicklungsarbeiten

Der Umstand, dass im abgeschlossenen Projekt keine biologisch beeinflusste Korrosion auf hochlegierten Edelstahloberflächen erzeugt werden konnte wirft die Frage auf inwieweit diese Form der Korrosion eine real existente, schwerwiegende Gefahr in Getränkeabfüllanlagen darstellt. Mögliche Unzulänglichkeiten in den angewandten Methoden werden in Abschnitt 3.1 diskutiert. Da in vorangegangenen Projekten gezeigt wurde, dass mit der Biofilmaufzucht, so wie sie im Projekt durchgeführt wurde, das Biofilmwachstum an Abfülllinien sehr realitätsgetreu nachgestellt werden kann, wird davon ausgegangen dass Biokorrosion hier in der Tat eine untergeordnete Rolle spielt. Sicherlich bietet der Themenkomplex „mikrobiologische beeinflusste Korrosion“ global gesehen nach wie vor immensen Forschungsbedarf, jedoch ist in Frage zu stellen inwieweit weiterführende Forschungsaktivitäten in Zusammenhang mit der Getränkeabfüllung nachgegangen werden muss. Aus hygienischer Sicht sind Biofilme in Getränkeabfüllanlagen ohnehin nicht zu tolerieren.

Das jetzige Forschungsprojekt war bereits ein Folgeprojekt. In dem vorangegangenen Vorhaben wurde die Aufzuchtmethodik entwickelt, die hier in modifizierter Form und für einen speziellen Anwendungsfall appliziert wurde. Weiter Anwendungen bei denen die hier entwickelte Methodik eine Grundlage bilden kann stellen die folgenden teils experimentellen Ansätze zur Biofilmbekämpfung dar:

- 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.

Insgesamt bilden Biofilme und mikrobiologisch beeinflusste Korrosion Themen, die derzeit nur in Ansätzen erforscht wurden und deren weitere Untersuchung auch in Zukunft eine hohe Bedeutung eingeräumt werden wird.

## **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: „Mikrobiologie und Hardware in Abfüllanlagen – Wechselseitige Beziehungen“; Pahl R., 103. Brau- und Maschinentechnische Arbeitstagung, Soest, 2016
- Vortrag: „How are microbiological life forms affecting our high-tech working environment – Thoughts beyond hygienic design“, Fischer J., SzTF (Universität Krakau), Kocierz, Polen, 2016
- Artikel: Pahl R., Fischer J.: „Wechselseitige Beziehungen – Mikrobiologie und Hardware in Abfüllanlagen“, Brauindustrie 8, 2016
- Vortrag: „Implementierung fortschrittlich(st)er Methoden zur Überwachen von Abfüllprozessen, 50. Technologisches Seminar, Weihenstephan, 2017
- Vortrag: „Mikrobiologische Korrosion in Abfüllanlagen“, Pahl R., Sitzung des Technisch-Wissenschaftlicher-Ausschuss (TWA) im Rahmen der 104. Brau- und Maschinentechnischen Arbeitstagung, München 2017

Folgende Veröffentlichungen sind derzeit geplant:

- Artikel: Abschließende Vorstellung der erzielten Projektergebnisse in der Fachpresse, vorzugsweise „Brauwelt“.
- Vortrag: Abschließende Vorstellung der erzielten Projektergebnisse auf einer der beiden großen VLB Veranstaltungen (Oktobertagung oder Brau- und Maschinentechnischen Arbeitstagung).
- Vortrag: Abschließende Vorstellung der erzielten Projektergebnisse auf einer der internationalen VLB Veranstaltungen (z.B. Iberoamerikanisches Seminar).

## 7. Anhang

### 7.1 Literaturangaben

- [1] EHEDG (European Hygienic Engineering & Design Group), DOC 8: Gestaltungskriterien für hygienegerechte Maschinen, Apparate und Komponenten, 2. Auflage, April 2004
- [2] Coester, S. E., Cloete, T. E., Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems, Critical Reviews in Microbiology, 31: 213-232, 2005
- [3] Bakar A. A. et al.: „The Effect of Desulfovibrio Vulgaris on the Anaerobic Corrosion of Carbon Steel in Marine Environment“, Internet: URL: [https://www.researchgate.net/publication/274958449\\_The\\_Effect\\_of\\_Desulfovibrio\\_Vulgaris\\_on\\_the\\_Anaerobic\\_Corrosion\\_of\\_Carbon\\_Steel\\_in\\_Marine\\_Environment](https://www.researchgate.net/publication/274958449_The_Effect_of_Desulfovibrio_Vulgaris_on_the_Anaerobic_Corrosion_of_Carbon_Steel_in_Marine_Environment)
- [4] Ruiz E. et al.: “Effects of Thiobacillus Ferrooxidans on corrosion of AISI 4140 Steel in presence of biodiesel”; Int. J. Electrochem. Sci., 9 (2014); 5937 – 5947
- [5] RÈGE, H. von und Sand, W. (1996): Simulation mikrobiell beeinflusster Metallkorrosion (MIC) zur Prüfung von Gegenmaßnahmen. In: Materials and Corrosion 1996, 47., Internet URL:<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/maco.19960470903/full>
- [6] Flemming, H-C.: „Biofouling und Biokorrosion – die Folgen unerwünschter Biofilme“, Chemie Ingenieur Technik (67), 11/95, (1995), 1425 – 1430

7.2 Beispielabbildungen

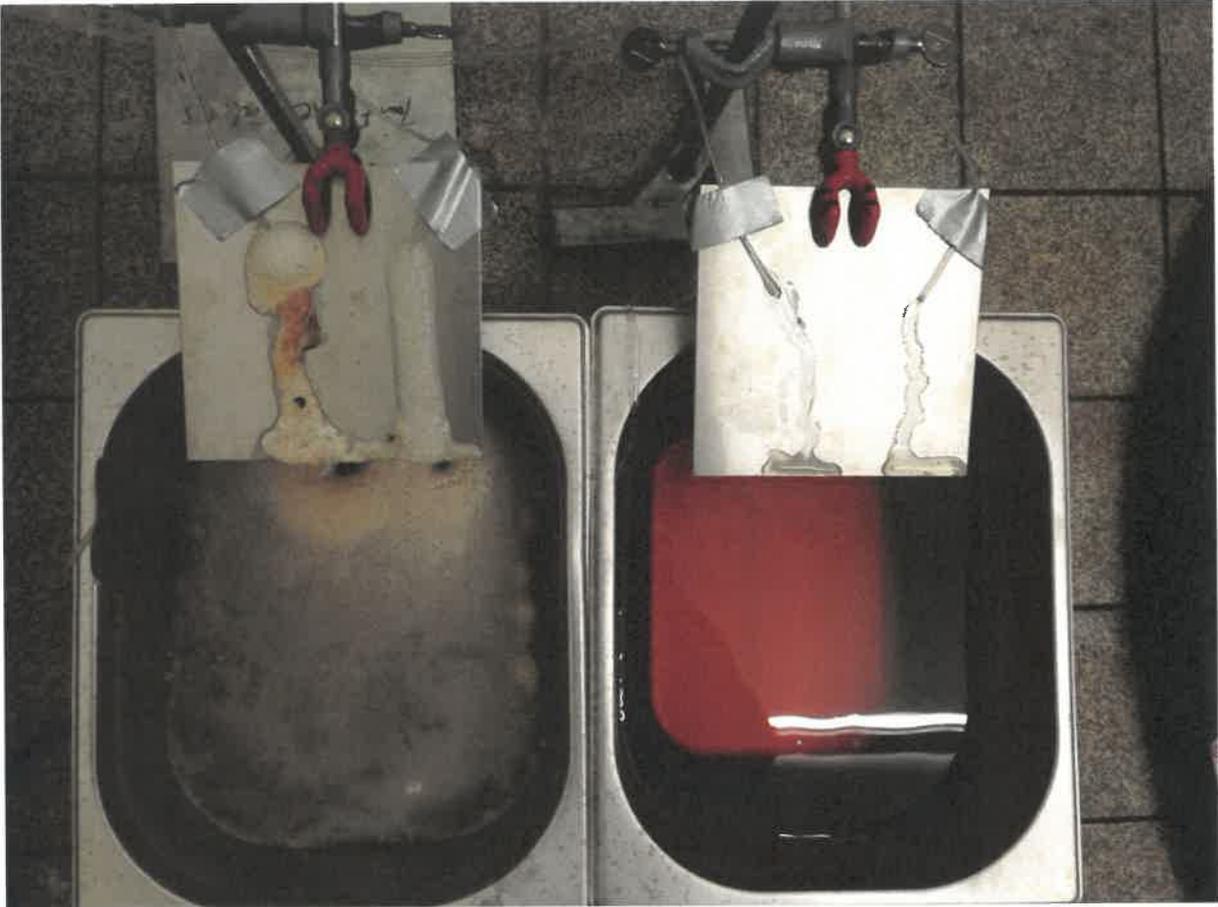


Abbildung 7: Kontrollversuch (r.) vs. eigentlicher Versuch (l.)

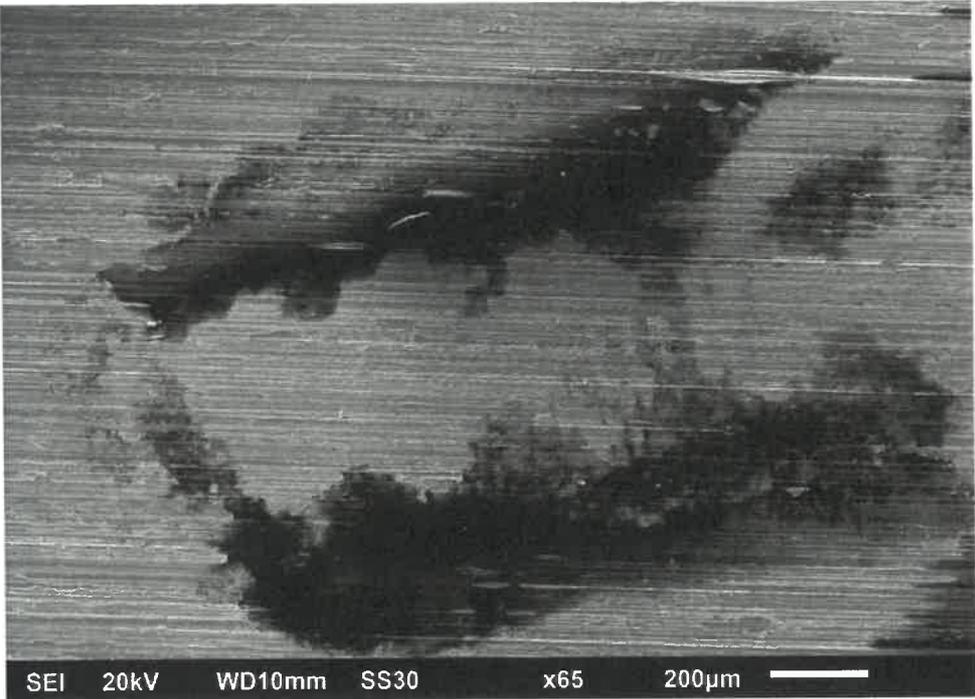


Abbildung 8: REM Aufnahme Edelstahl nach Biofilmaufzucht

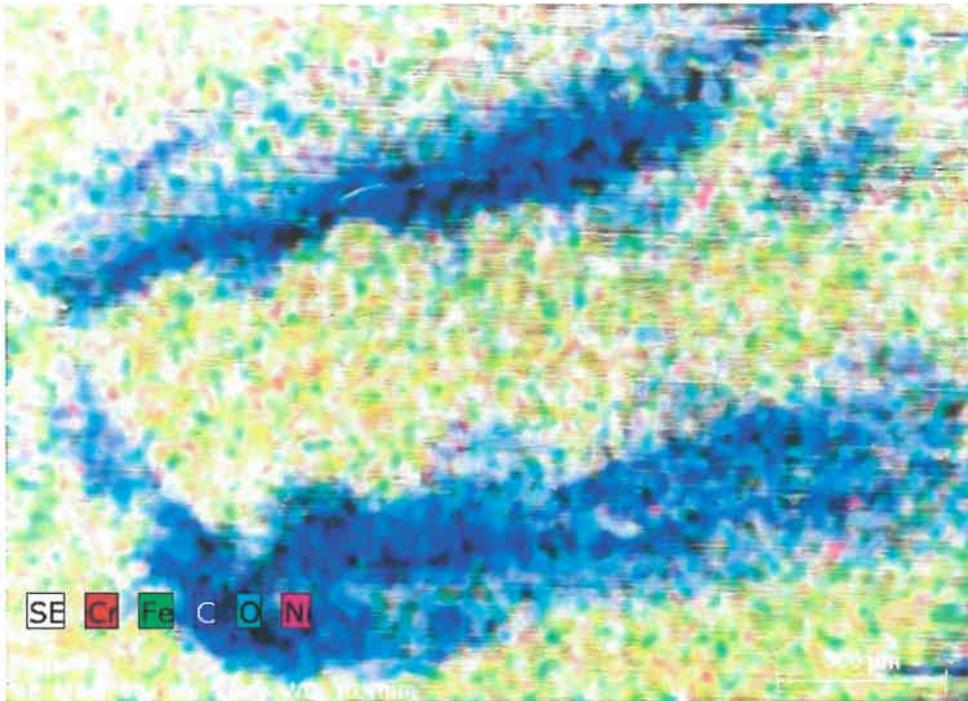


Abbildung 9: EDX Mapping Edelstahl nach Biofilmaufzucht



Abbildung 10: Biofilmwachstum in 3 Stufen (Versuch 8)



Abbildung 11: Biofilm im Endstadium des Versuchs 14



Abbildung 12: Biofilmwachstum mit Schimmelbildung (Versuch 9)

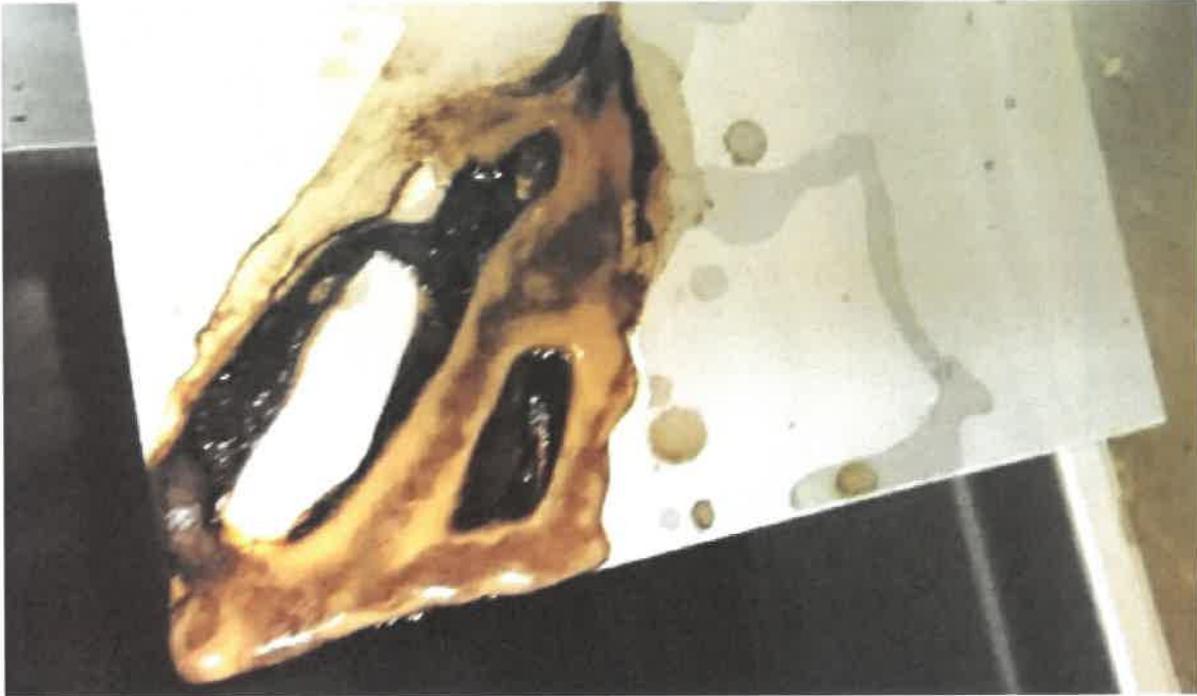


Abbildung 13: Biofilmwachstum (Versuch 12)



Abbildung 14: Biofilmwachstum (Versuch 11)

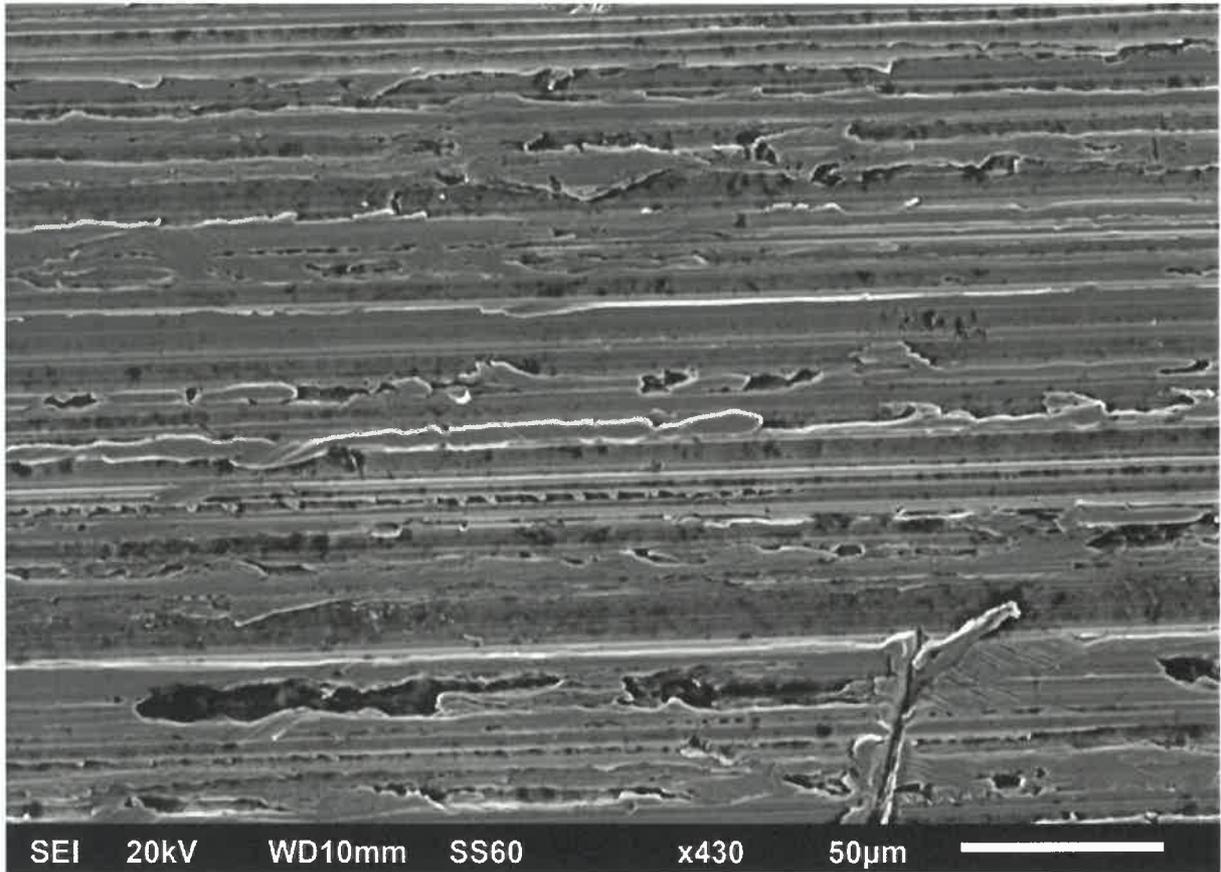


Abbildung 15: REM Aufnahme Edelstahlblech vor Biofilmbewuchs

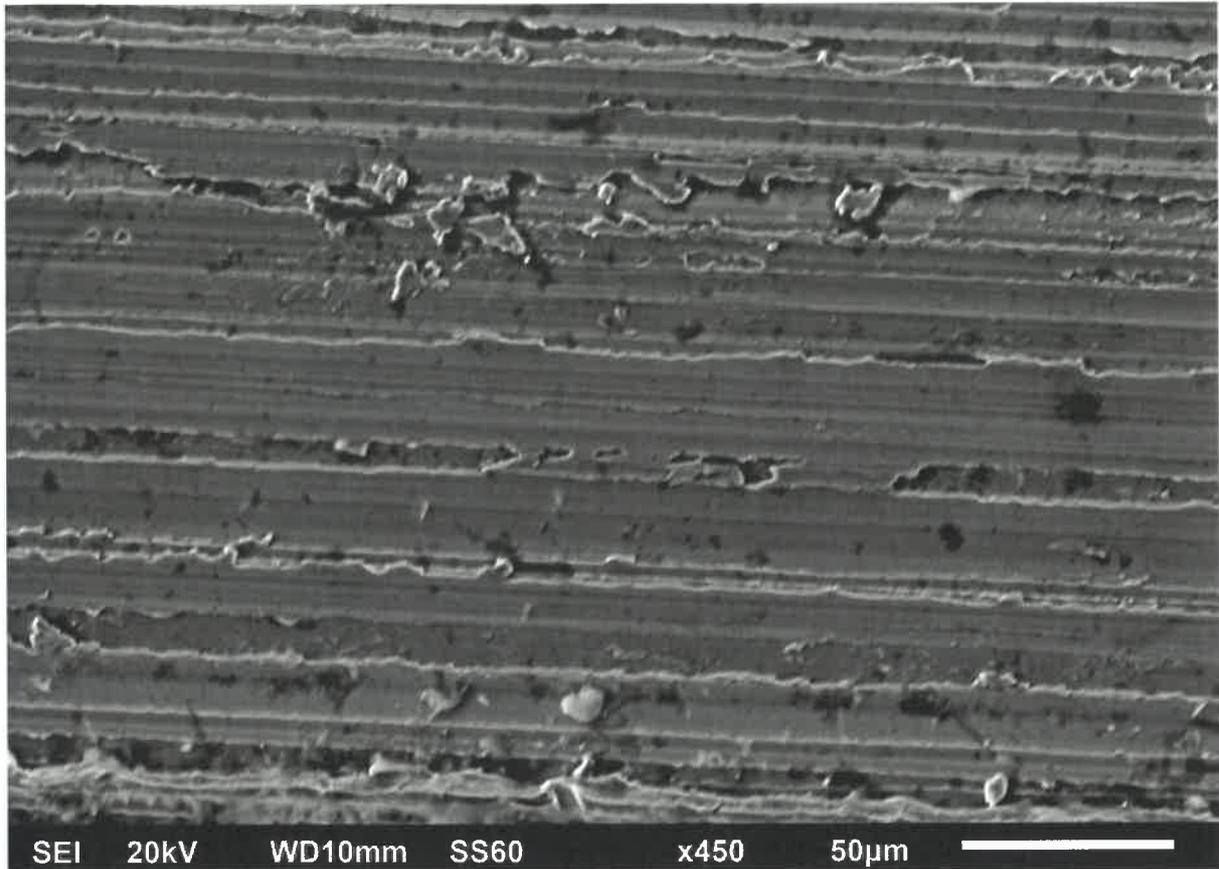


Abbildung 16: REM Aufnahme Edelstahlblech nach Biofilmbewuchs (selbes Blech wie in Abbildung 15)

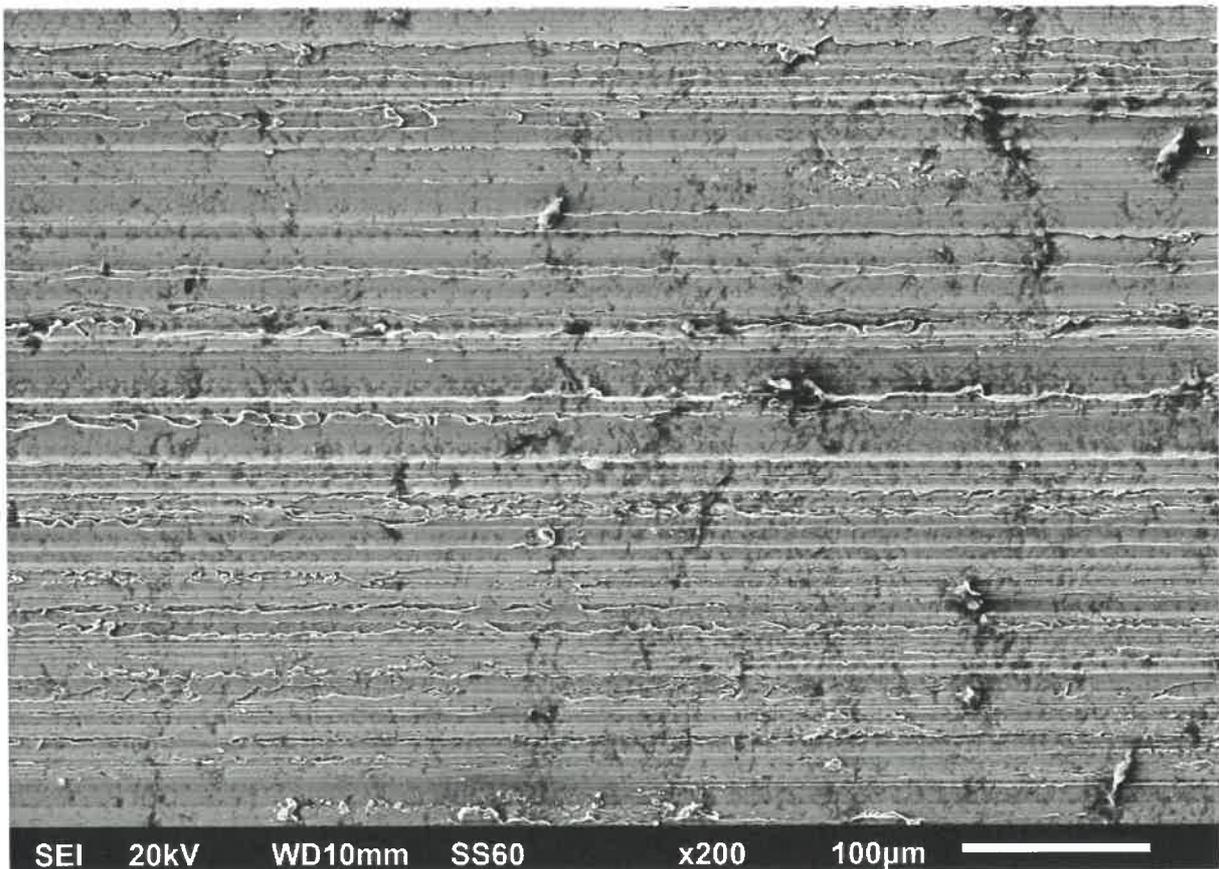


Abbildung 17: Edelstahlblech nach Biofilmbewuchs

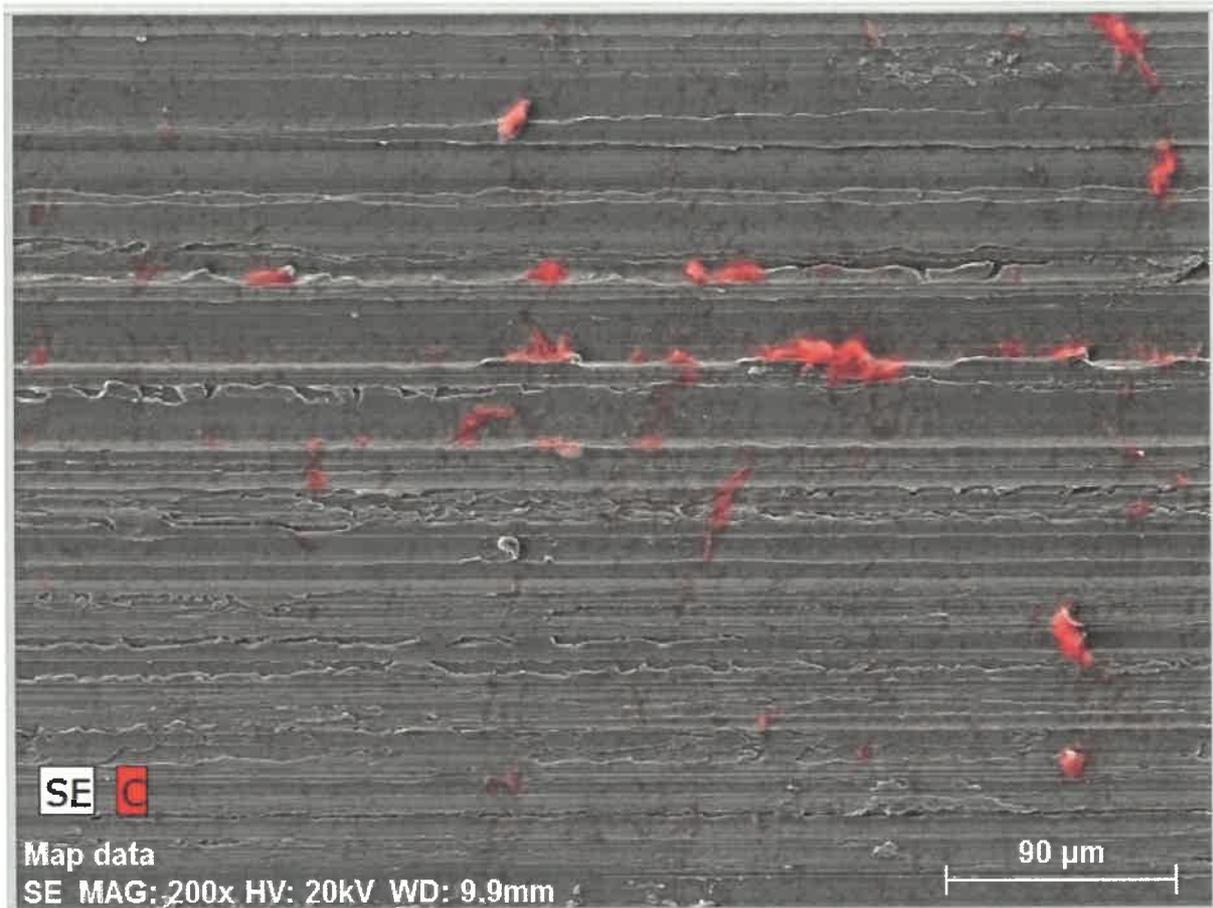


Abbildung 18: EDX Mapping des in Abbildung 17 dargestellten Ausschnitts (nur Kohlenstoff)

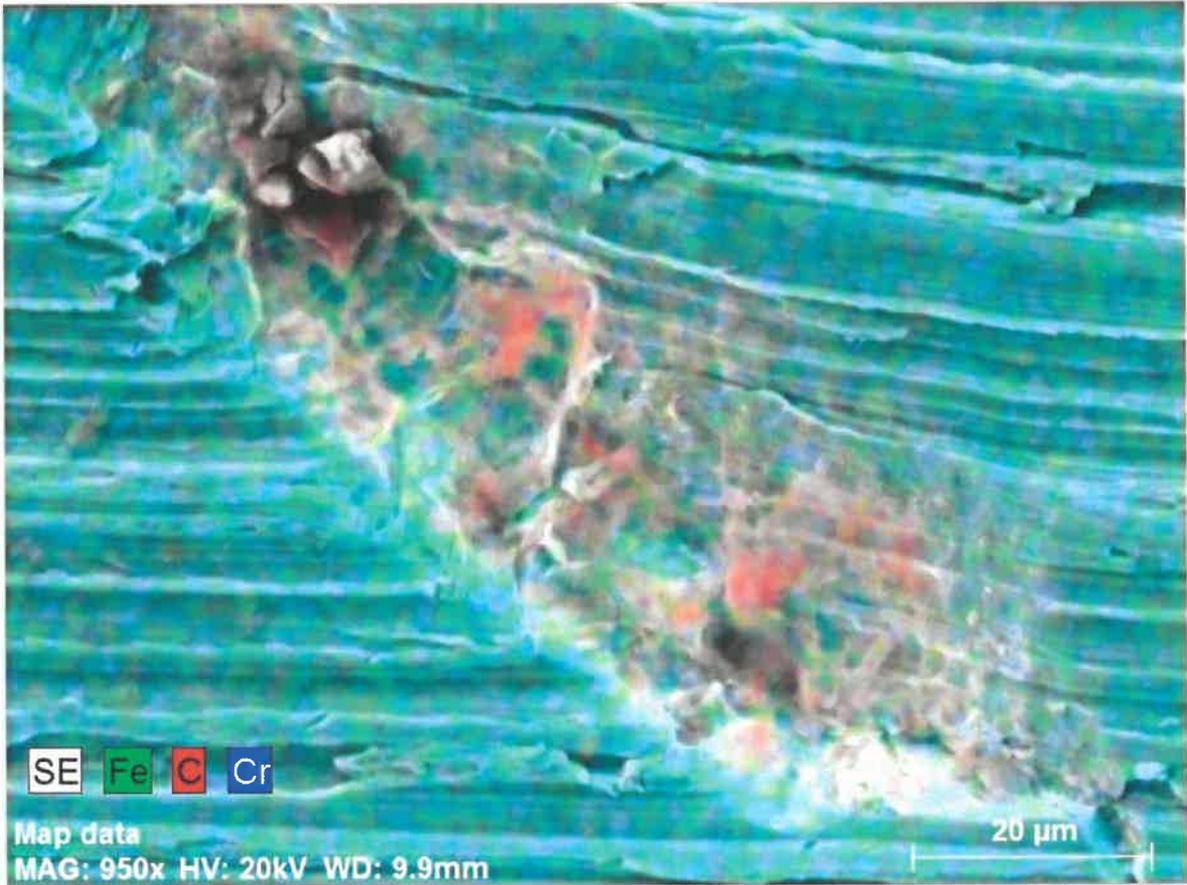


Abbildung 19: EDX Mapping eines auffälligen Bereichs

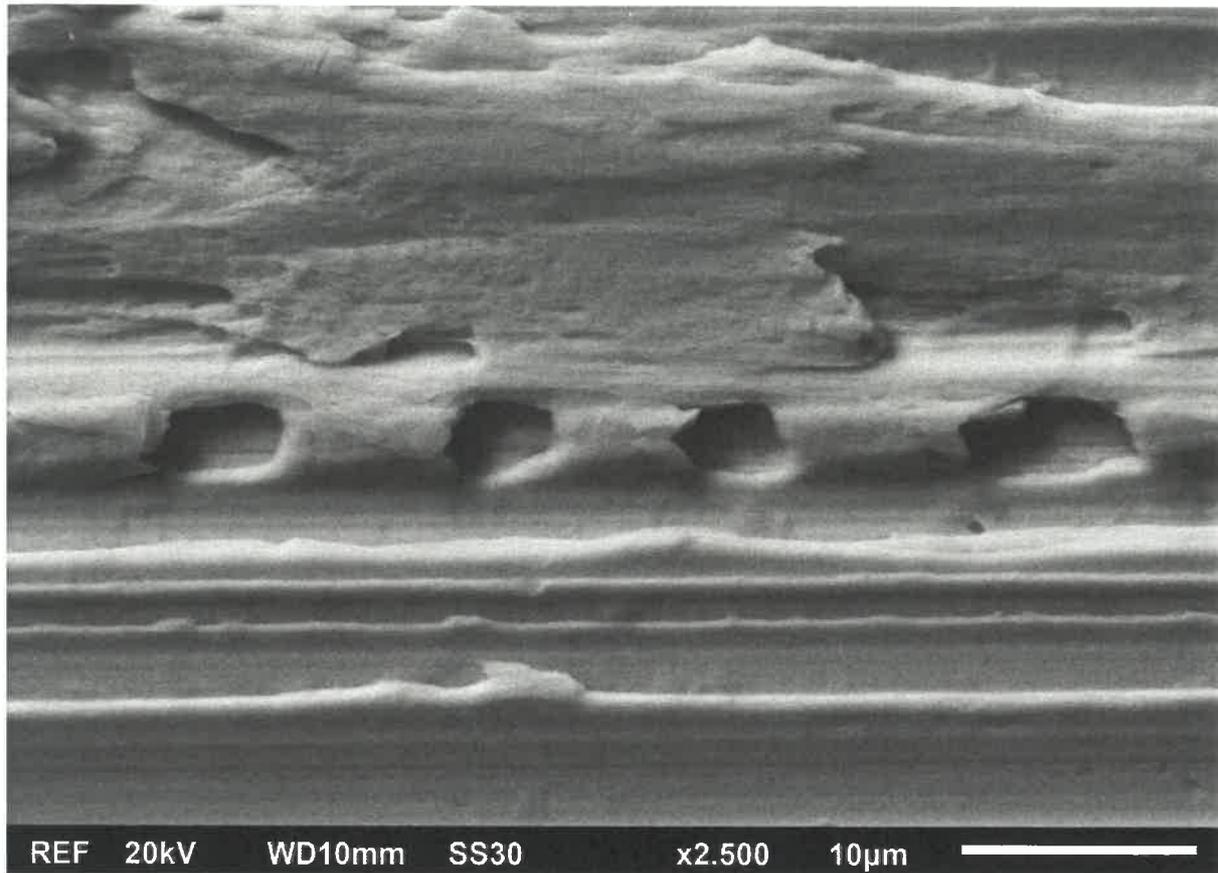


Abbildung 20: REM Darstellung eines korrosionsverdächtigen Bereichs

Tabelle 2: EDX Analyse des in Abbildung 20 dargestellten Bereich

Bruker Nano GmbH, Germany						
Quantax						
Quantifizierungs-Ergebnisse						
Massenprozent (%)						
Datum: 06.10.2016						
Spektrum	C	O	Si	Cr	Fe	Ni
791	10,94564		0,287042	2,281439	7,042838	0,624305
792	35,603		0,24913	8,250653	28,14121	7,877513
793	12,06482	0,749605		2,847349	7,58535	0,777545
794	20,41533	0,76866		4,54874	14,17875	1,161103
795	14,17564	1,260225	0,158777	2,595698	6,85591	0,487869
796	41,74304		0,31653	9,070593	31,46536	17,40448
Mittelwert	22,49125	0,926163	0,25287	4,932412	15,87824	4,722135
Sigma:	13,09977	0,289463	0,068527	3,003926	11,17556	6,837546
Sigma Mitt	5,347958	0,118173	0,027976	1,226348	4,562404	2,791416

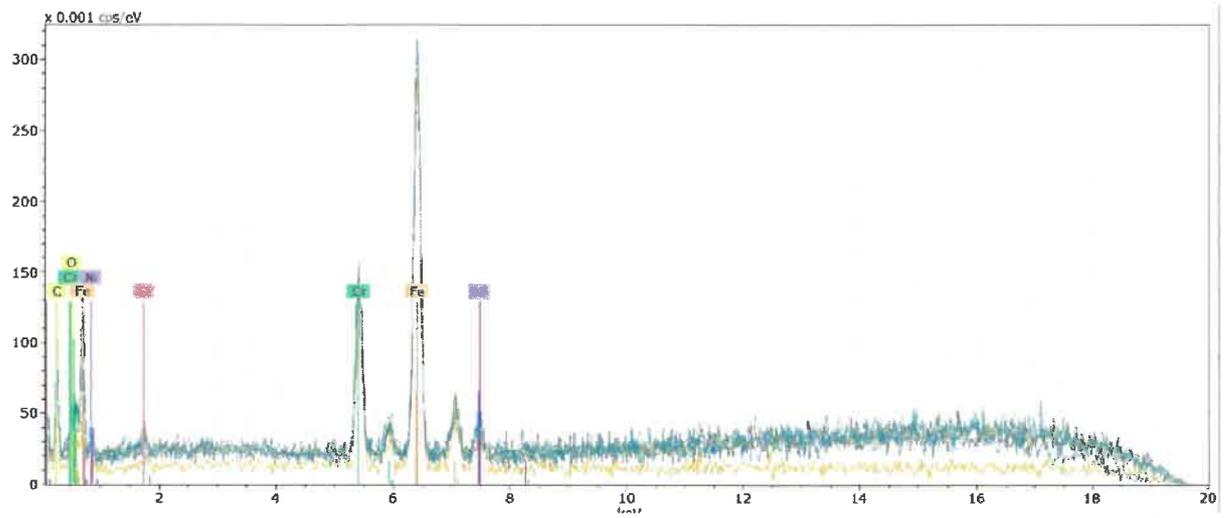


Abbildung 21: Grafische Darstellung der in Tabelle 2 aufgeführten EDX Analyse

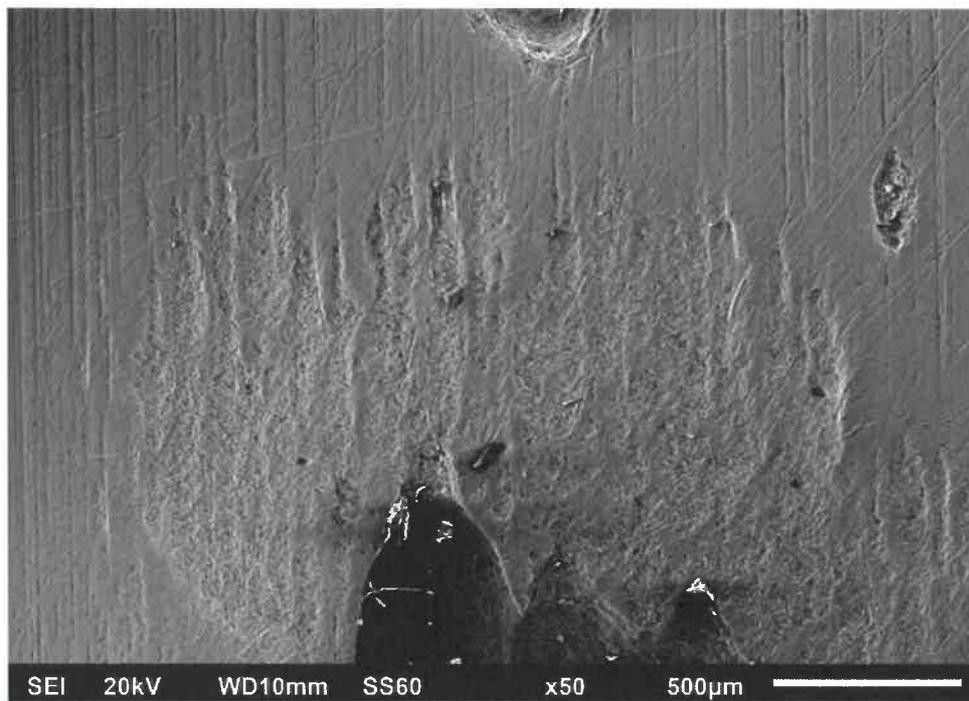


Abbildung 22: REM Darstellung von durch Natriumhypochlorid erzeugte Korrosion



Abbildung 23: REM Darstellung von durch Natriumhypochlorid erzeugte Korrosion

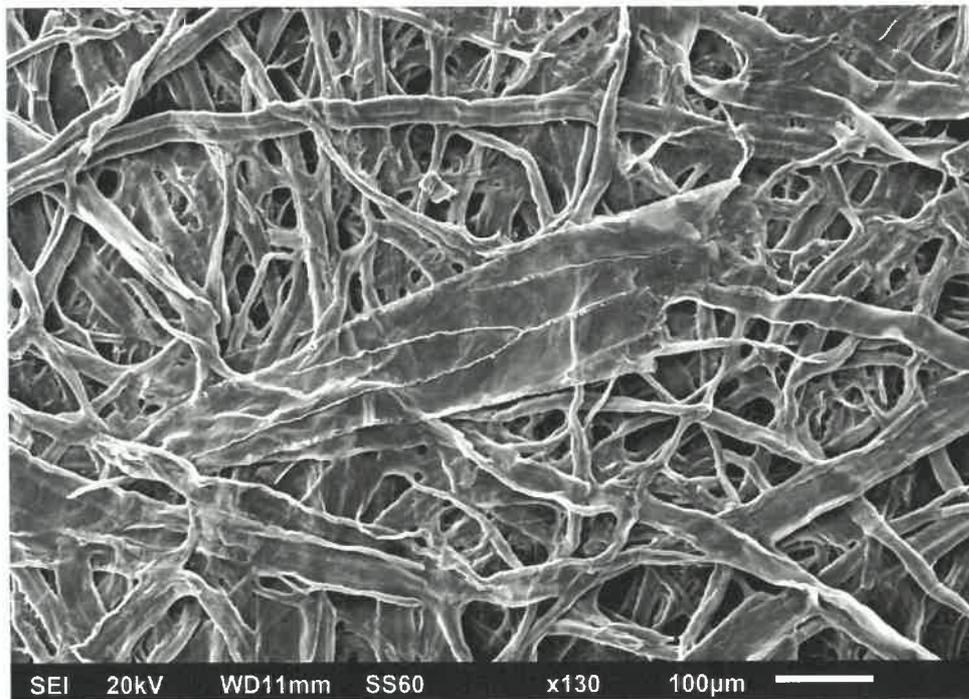


Abbildung 24: REM Darstellung von durch Natriumhypochlorid erzeugte Korrosion

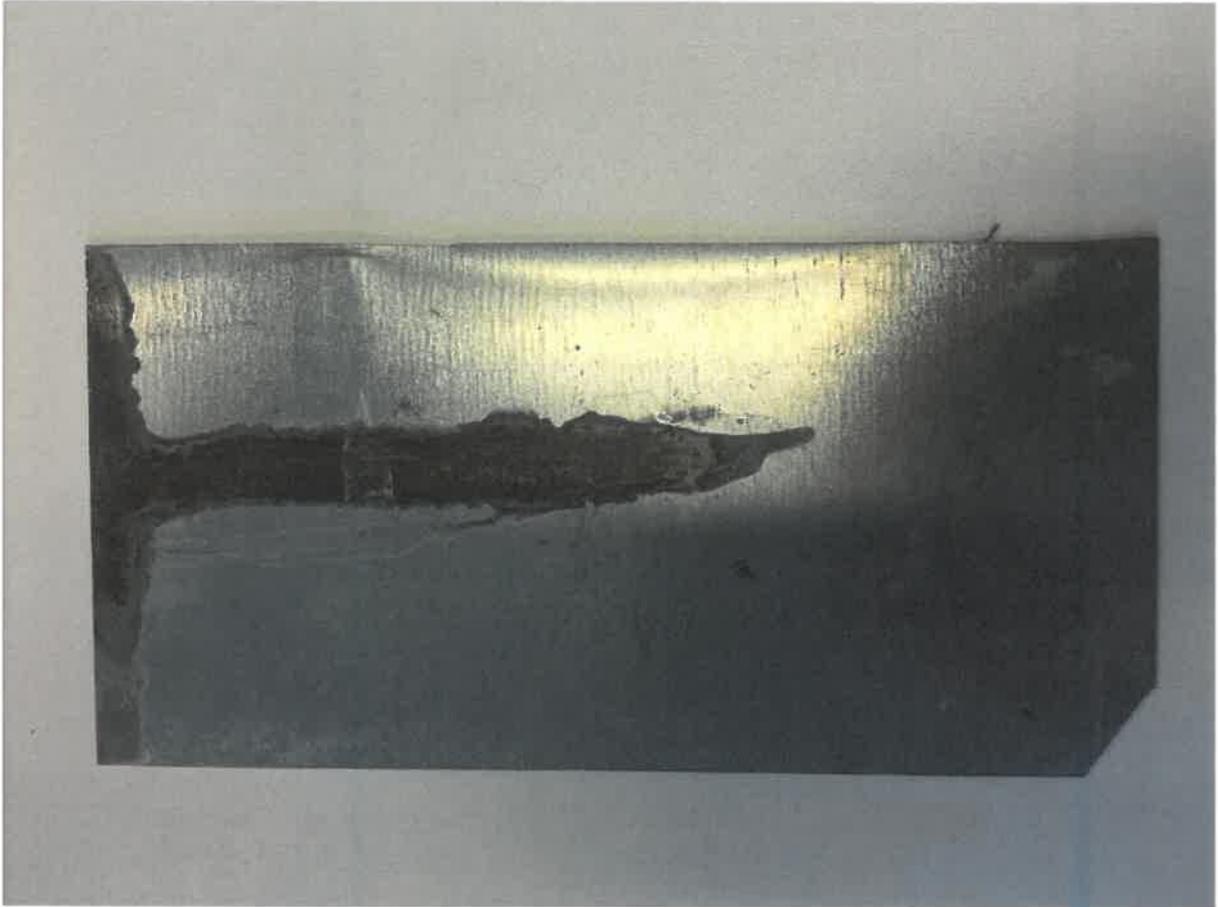


Abbildung 25: Korrodierte Stahlplatte

### 7.3 Next-Generation-Sequencing

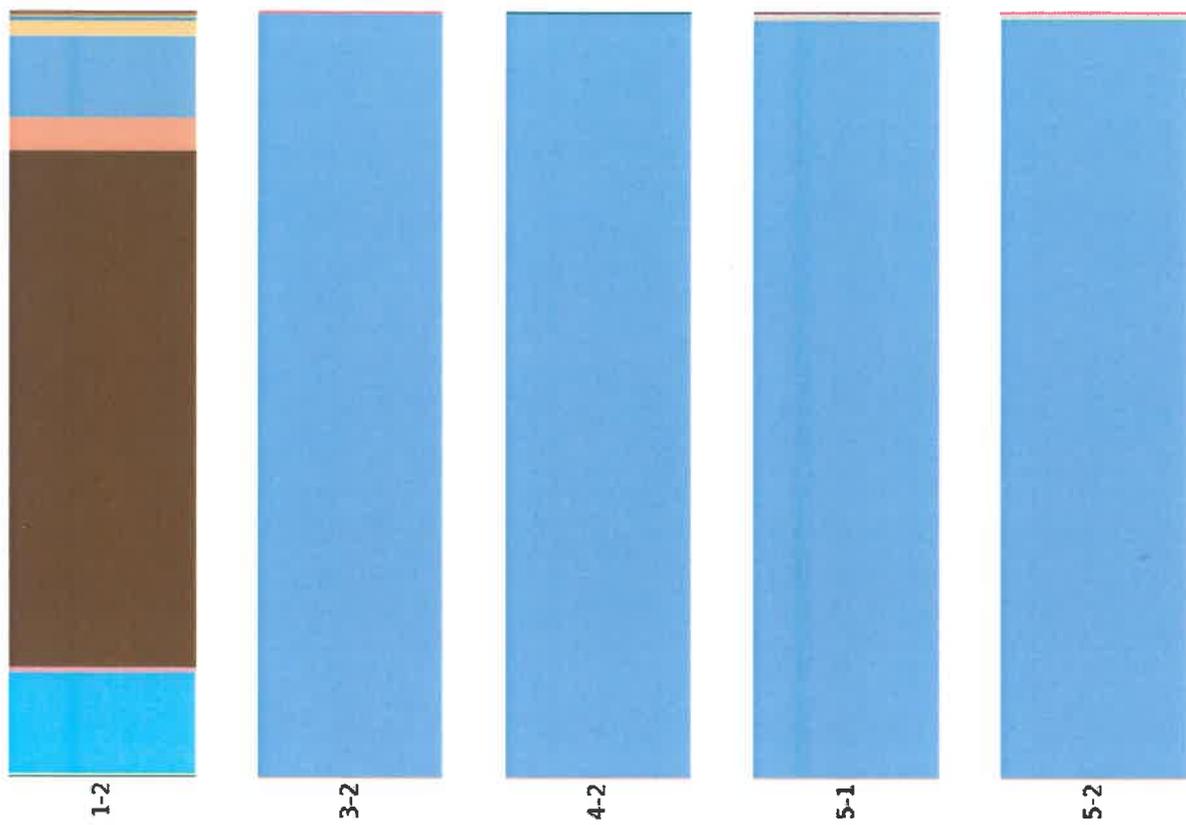


Abbildung 26: Taxa summary bar plots für die jeweiligen Proben (Bakterien)

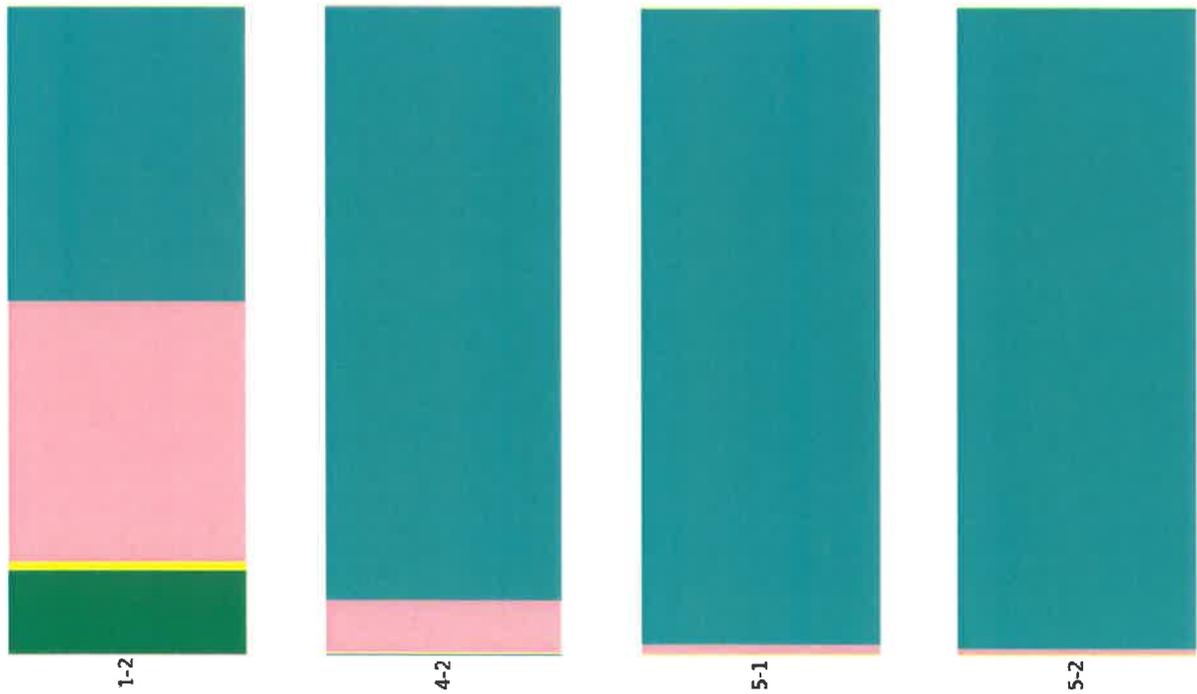


Abbildung 27: Taxa summary bar plots für die jeweiligen Proben (Hefen/Pilze)

Tabelle 3: Legende zur Abbildung 26: Taxa summary bar plots für die jeweiligen Proben (Bakterien)(Darstellung der jeweiligen Bakterien und deren prozentuale Anteil in der jeweiligen Probe)

Legend	Taxonomy	%	%	%	%	%	%
	Bacteria;Bacteroidetes;Bacteroidia;Bacteroidales;Porphyromonadaceae; <a href="#">Dysgonomonas</a>	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Bacteria;Bacteroidetes;Flavobacteriia;Flavobacteriales;Flavobacteriaceae; <a href="#">Chryseobacterium</a>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Bacteria;Bacteroidetes;Sphingobacteriia;Sphingobacteriales;Sphingobacteriaceae; <a href="#">Sphingobacterium</a>	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Bacillaceae; <a href="#">Bacillus</a>	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Planococcaceae; <a href="#">Lysinibacillus</a>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Bacillales;Planococcaceae; <a href="#">Soiibacillus</a>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae; <a href="#">Lactobacillus</a>	2.6%	13.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Bacteria;Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Leuconostocaceae; <a href="#">Leuconostoc</a>	0.1%	0.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Bacteria;Firmicutes;Clostridia;Clostridiales;Clostridiaceae_1; <a href="#">Clostridium sensu stricto 3</a>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;Acetobacteraceae; <a href="#">Acetobacter</a>	13.5%	67.5%	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%
	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;Acetobacteraceae; <a href="#">Amevamaea</a>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;Acetobacteraceae; <a href="#">Commensalibacter</a>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;Acetobacteraceae; <a href="#">Gluconacetobacter</a>	0.9%	4.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;Acetobacteraceae; <a href="#">Gluconobacter</a>	81.8%	10.6%	99.9%	100.0%	99.2%	99.1%
	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;Acetobacteraceae; <a href="#">Komagataebacter</a>	0.4%	2.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Rhodospirillales;Acetobacteraceae; <a href="#">unclassified</a>	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Bacteria;Proteobacteria;Alphaproteobacteria;Sphingomonadales;Sphingomonadaceae; <a href="#">Sphingomonas</a>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Enterobacteriales;Enterobacteriaceae; <a href="#">Morganella</a>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Enterobacteriales;Enterobacteriaceae; <a href="#">Raivella</a>	0.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.7%	0.8%
	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Enterobacteriales;Enterobacteriaceae; <a href="#">unclassified</a>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Orbales;Orbaceae; <a href="#">Orbus</a>	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Orbales;Orbaceae; <a href="#">unclassified</a>	0.1%	0.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Pseudomonadales;Pseudomonadaceae; <a href="#">unclassified</a>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria;Xanthomonadales;Xanthomonadaceae; <a href="#">Stenotrophomonas</a>	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Bacteria;Proteobacteria;Gammaproteobacteria; <a href="#">unclassified</a> ;unclassified; <a href="#">unclassified</a>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Bacteria;Proteobacteria; <a href="#">unclassified</a> ;unclassified; <a href="#">unclassified</a> ;unclassified; <a href="#">unclassified</a>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	Bacteria; <a href="#">unclassified</a> ;unclassified; <a href="#">unclassified</a> ;unclassified; <a href="#">unclassified</a>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

Tabelle 4: Legende zur Abbildung 27 Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden. (Darstellung der jeweiligen Hefen/Pilze und deren prozentuale Anteil in der jeweiligen Probe)

Legend	Taxonomy	Total %	1-2 %	4-2 %	5-1 %	5-2 %
	k_Fungi;p_Ascmycota;c_Dothideomycetes;o_Dothideales;f_Dothioraceae; <a href="#">unclassified</a>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Fungi;p_Ascmycota;c_Dothideomycetes;o_Pleosporales;f_Pleosporales_family_Incertae_sedis; <a href="#">Phoma</a>	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%
	k_Fungi;p_Ascmycota;c_Eurotiomycetes;o_Eurotiales;f_Trichocomaceae; <a href="#">Penicillium</a>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Fungi;p_Ascmycota;c_Saccharomycetes;o_Saccharomycetales;f_Deberomycetaceae; <a href="#">Myerozyma</a>	3.2%	12.9%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Fungi;p_Ascmycota;c_Saccharomycetes;o_Saccharomycetales;f_Dipodasacaceae; <a href="#">unclassified</a>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Fungi;p_Ascmycota;c_Saccharomycetes;o_Saccharomycetales;f_Pichiaceae; <a href="#">Pichia</a>	0.4%	1.3%	0.1%	0.1%	0.1%
	k_Fungi;p_Ascmycota;c_Saccharomycetes;o_Saccharomycetales;f_Saccharomycetaceae; <a href="#">Saccharomyces</a>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Fungi;p_Ascmycota;c_Saccharomycetes;o_Saccharomycetales;f_Saccharomycetales_family_Incertae_sedis; <a href="#">Candida</a>	12.7%	40.2%	8.2%	1.6%	0.9%
	k_Fungi;p_Ascmycota;c_Saccharomycetes;o_Saccharomycetales;f_Saccharomycetales_family_Incertae_sedis; <a href="#">Wickerhamomyces</a>	83.3%	45.3%	91.5%	97.8%	98.5%
	k_Fungi;p_Ascmycota;c_Saccharomycetes;o_Saccharomycetales;f_Saccharomycetales_family_Incertae_sedis; <a href="#">unclassified_Saccharomycetales</a>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Fungi;p_Ascmycota;c_Saccharomycetes;o_Saccharomycetales;f_Saccharomycetales_family_Incertae_sedis; <a href="#">unclassified</a>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Fungi;p_Ascmycota;c_Saccharomycetes;o_Saccharomycetales; <a href="#">unclassified</a>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Fungi;p_Ascmycota;c_Sordariomycetes;o_Hypocreales;f_Hypocreales_family_Incertae_sedis; <a href="#">unclassified</a>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Fungi;p_Basidiomycota;c_Microbotryomycetes;o_Microbotryomycetes_order_Incertae_sedis;f_Microbotryomycetes_family_Incertae_sedis; <a href="#">Curvibasidium</a>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Fungi;p_Basidiomycota;c_Microbotryomycetes;o_Sporidiobolales;f_Sporidiobolales_family_Incertae_sedis; <a href="#">Rhodotorula</a>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Fungi;p_Basidiomycota;c_Tremellomycetes;o_Cystoflobasidiales;f_Cystoflobasidiales; <a href="#">Cystoflobasidium</a>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Fungi;p_Basidiomycota;c_Tremellomycetes;o_Cystoflobasidiales;f_Cystoflobasidiales; <a href="#">Itersonilia</a>	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	k_Fungi; <a href="#">unclassified</a> ;unclassified; <a href="#">unclassified</a> ;unclassified; <a href="#">unclassified</a>	0.3%	0.3%	0.1%	0.5%	0.3%

## 7.4 Mikrobiologische Untersuchungen

Tabelle 5: Beispielhafte mikrobiologische Untersuchungen

Agar	Beschreibung der Kolonien	Anzahl	kbE/ml
ST1	elfenbeinfarben, konvex, rund, 1 mm	100	$1 \times 10^7$
	elfenbeinfarben, konvex, rund, 2-3 mm	50	$5 \times 10^6$
	gelb, konvex, rund, 2-3 mm	2	$2 \times 10^5$
	orange, konvex, rund, 1 mm	1	$1 \times 10^5$
MRS	bräunlich, konvex, fransig, 4-5mm	>300	$> 3 \times 10^7$
	elfenbeinfarben, konvex, rund, 1-2 mm	50	$5 \times 10^6$
Chl	elfenbeinfarben, konvex, rund, 1 mm	150	$1,5 \times 10^7$
	elfenbeinfarben, konvex, rund, 2-3 mm	150	$1,5 \times 10^7$
Endo	hellrosa, konvex, rund, 1 mm	100	$1 \times 10^7$
	violett, konvex, rund, 1 mm	50	$5 \times 10^6$
Würze	bräunlich, durchscheinend, 1-2 mm	>300	$> 3 \times 10^7$
	elfenbeinfarben, konvex, rund, 1-2 mm	100	$1 \times 10^7$

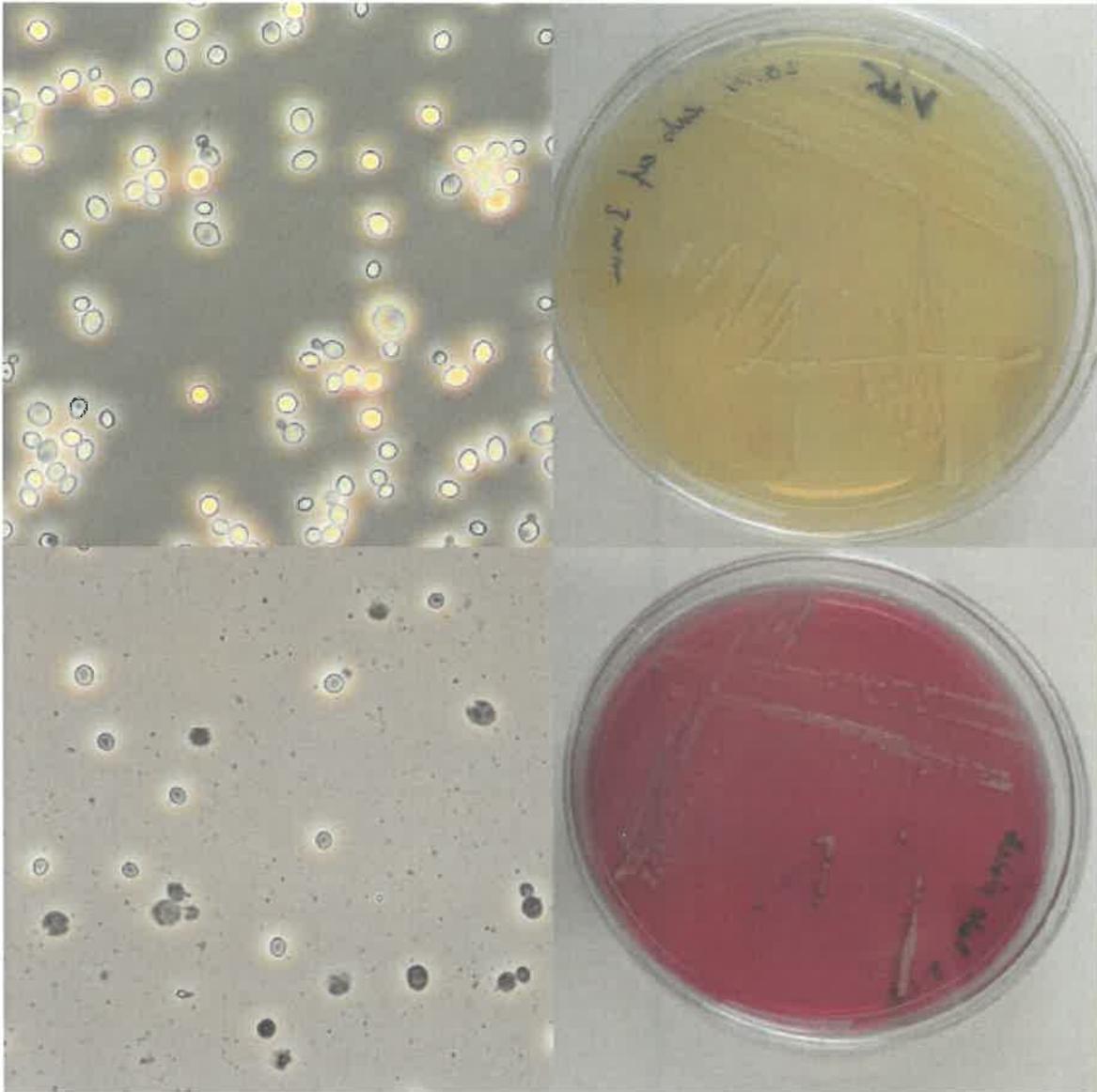


Abbildung 28: Hefen auf ST1-Agar (oben) und Endo (unten), jeweils lichtmikroskopische Darstellung (links) und Kultivierung auf Nährboden

## 7.5 Laborversuche

Tabelle 6: Übersicht Laborversuche

TV	Substrat	MO	Umgebung	Dauer
1.1	Desulfovibrio Medium	<i>D.vulgaris</i>	anaerob, 27°C	1 Woche
1.2	Desulfovibrio Medium	-	anaerob, 27°C	1 Woche
1.3	Standard 1 Medium	<i>P.fluorescens</i>	aerob, 30°C	1 Woche
1.4	Standard 1 Medium	-	aerob, 30°C	1 Woche
2.1	Desulfovibrio Medium	<i>D.vulgaris</i>	anaerob, 27°C	2 Wochen
2.2	Desulfovibrio Medium	-	anaerob, 27°C	2 Wochen
2.3	Standard 1 Medium	<i>P.fluorescens</i>	aerob, 30°C	2 Wochen
2.4	Standard 1 Medium	-	aerob, 30°C	2 Wochen

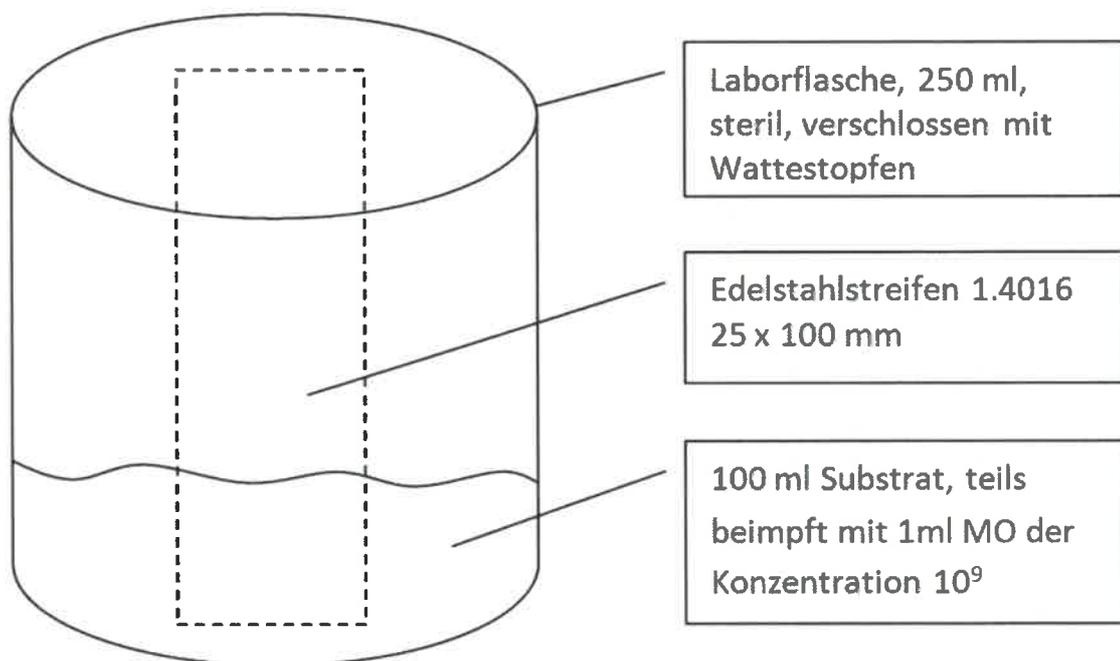


Abbildung 29: Schema Laborversuche

## 7.6 Digitales Mikroskop „Keyence VHX-5000“

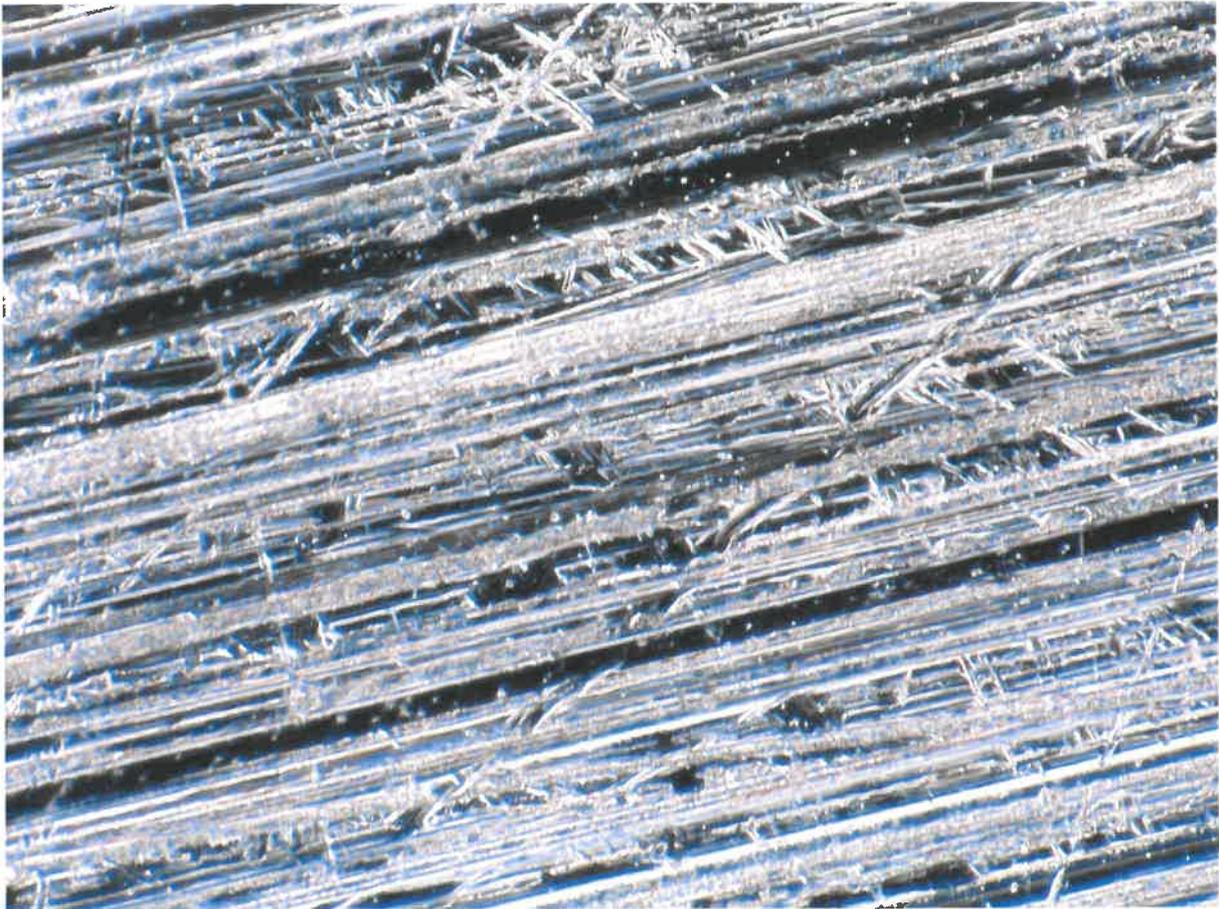


Abbildung 30: Mikroskopische Darstellung einer Edelstahlplatte

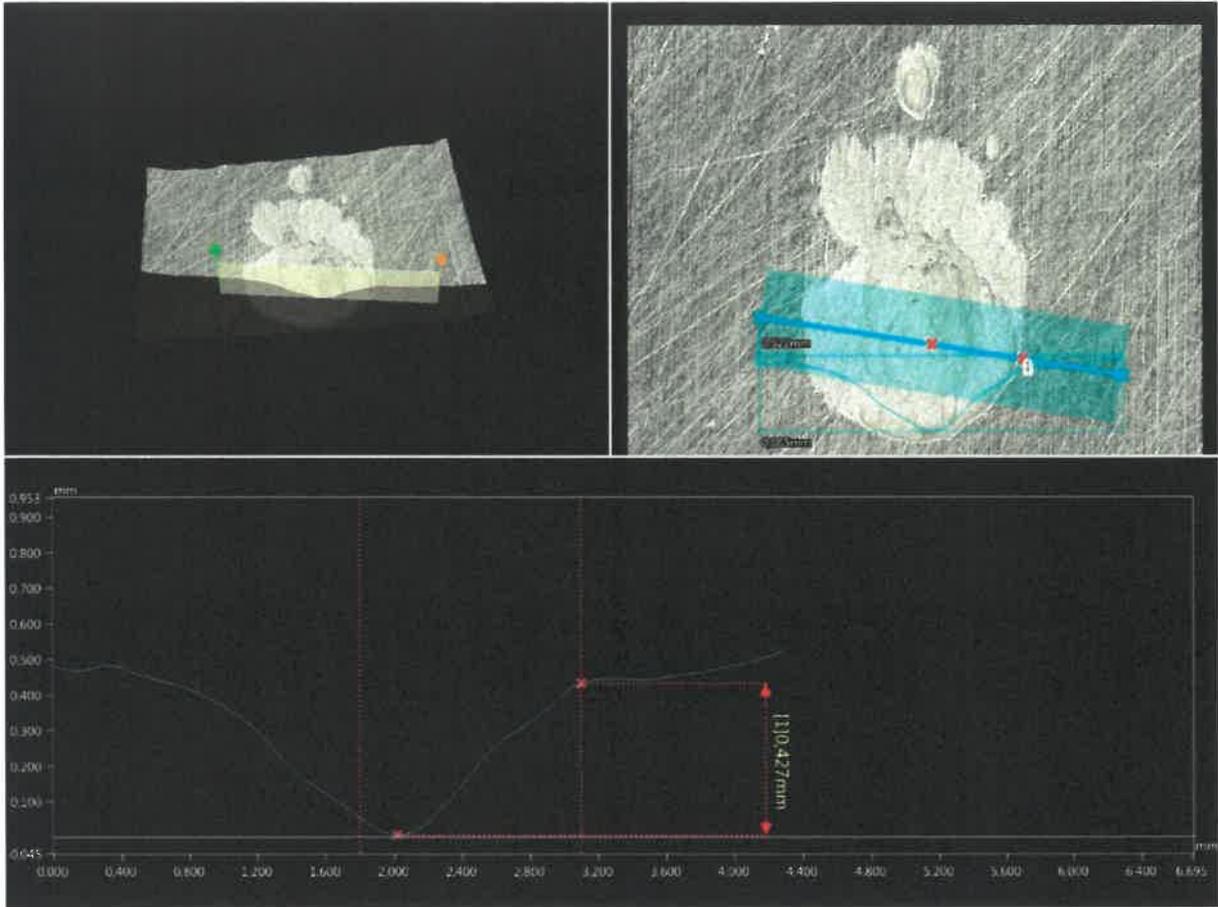


Abbildung 31: Vermessung Lochkorrosion

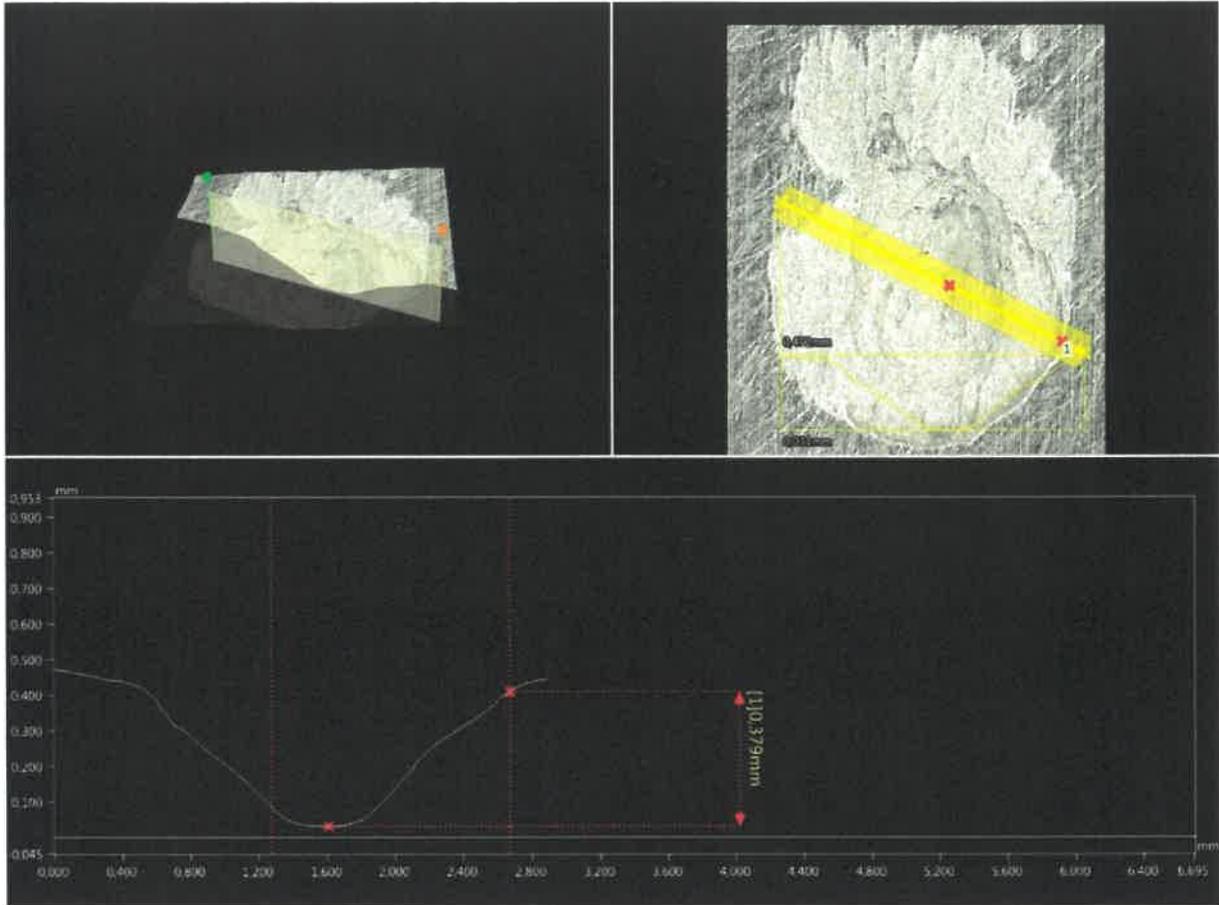


Abbildung 32: Vermessung Lochkorrosion

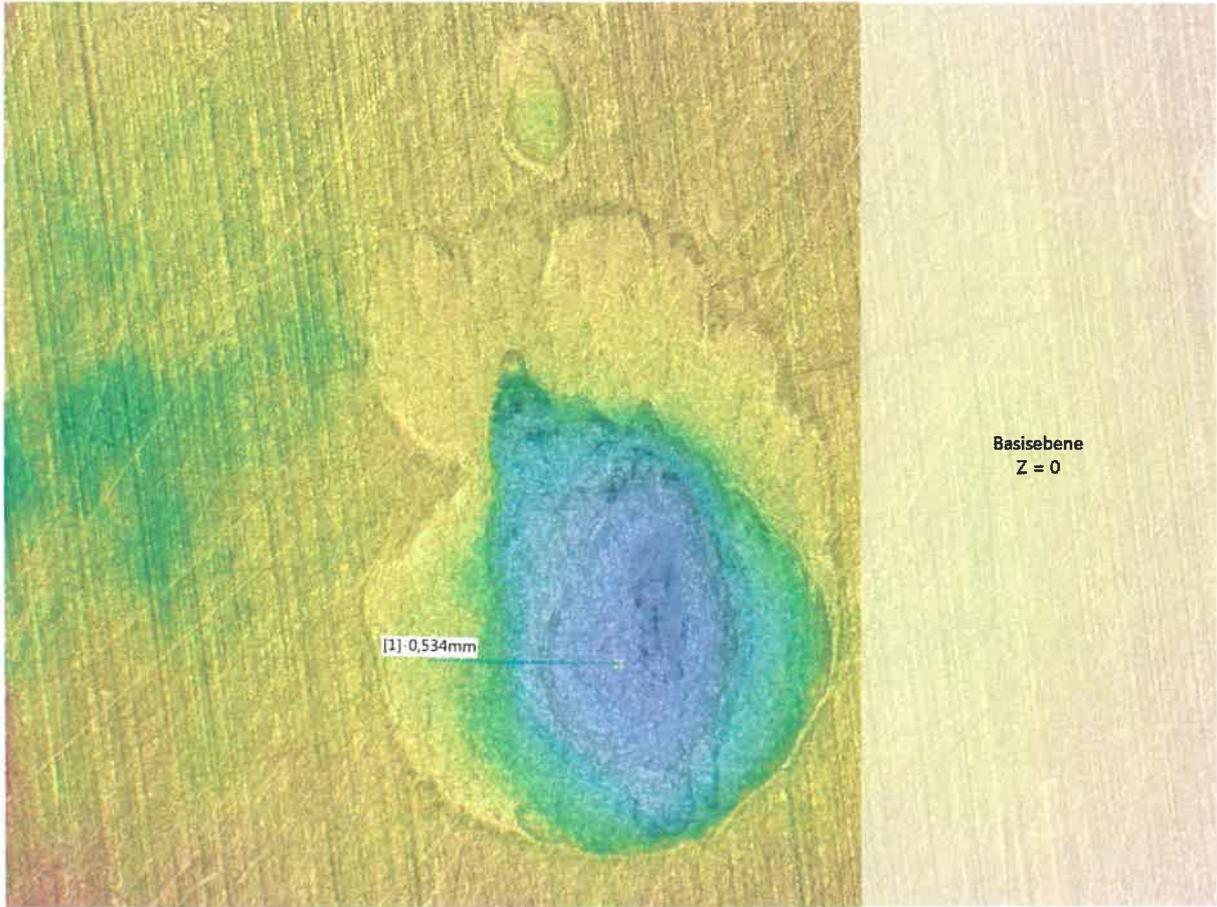


Abbildung 33: Vermessung Lochkorrosion

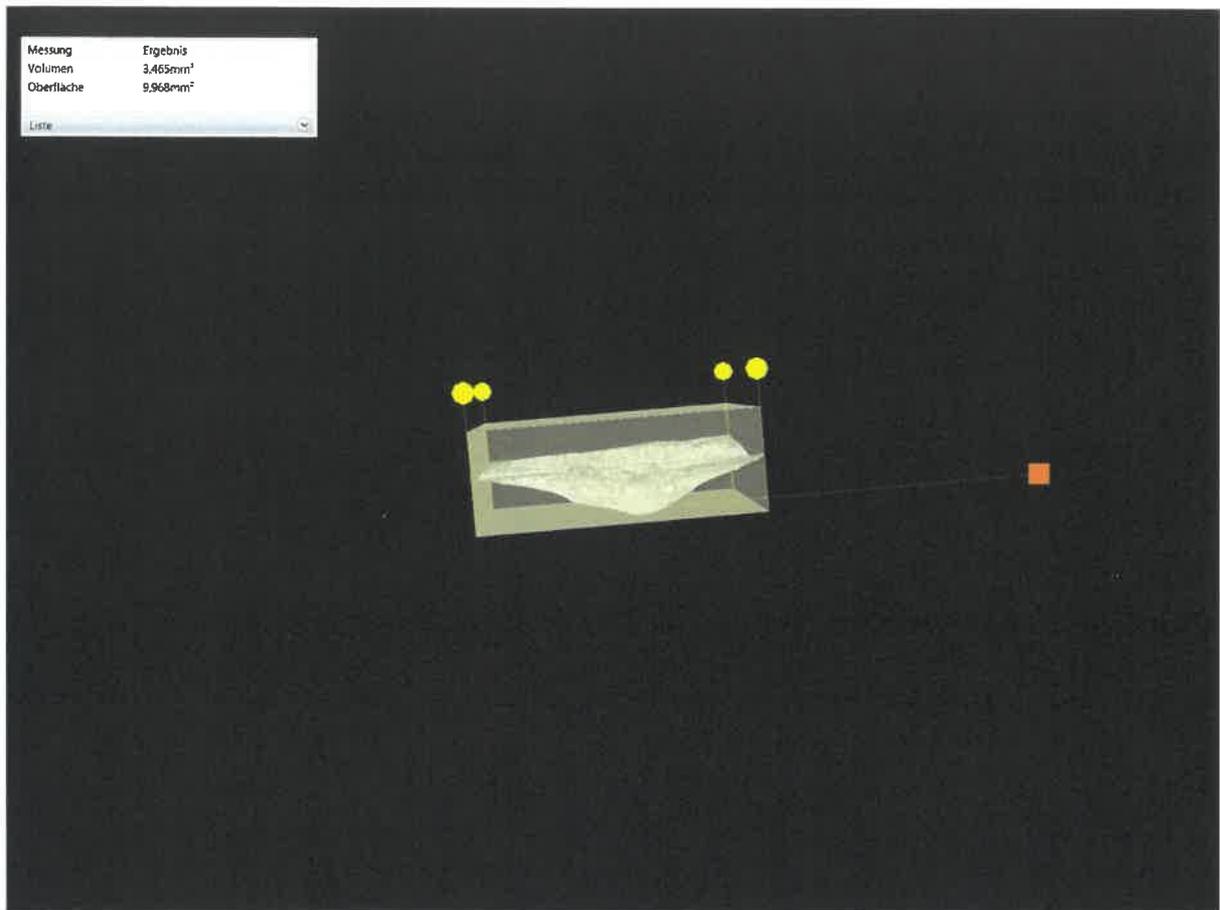


Abbildung 34: Vermessung Lochkorrosion