

**Mikrobielle Biofilme in oligotrophen Systemen:
Untersuchungen zu Werkstoffeinfluss
und elektrochemischem Verhalten**

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

**zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

vorgelegt von

Arnd Bressel

aus Köln

Düsseldorf

2003

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent(in): Prof. Dr. J. W. Schultze

Korreferent(in): Prof. Dr. W.-R. Schlue

Tag der mündlichen Prüfung: 28.07.2003

„Alles Wissen und Vermehren unseres Wissens endet nicht mit
einem Schlusspunkt, sondern mit einem Fragezeichen.“

Hermann Hesse

Die vorliegende Arbeit wurde vom 01.01.1999 bis 31.01.2003 am Institut für Physikalische Chemie und Elektrochemie, Lehrstuhl II, der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt. Die Arbeiten wurden finanziell unterstützt vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des Forschungsvorhabens 02WT9862/8, der Stadtwerke Düsseldorf AG im Rahmen des Projektes 220/45199303 und der Max-Buchner-Stiftung der Dechema e. V. durch das Stipendium 2151.

Ich danke

Herrn Prof. Dr. J. W. Schultze für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die stete Unterstützung dieser Arbeit und für die Möglichkeit, Teilergebnisse auf nationalen und internationalen Tagungen darstellen zu können,

Herrn Prof. Dr. W.-R. Schluë für die freundliche Übernahme des Korreferates,

der Stadtwerke Düsseldorf AG für die finanzielle Unterstützung und insbesondere Herrn Dr. Rohms, Frau Dr. Saftic, Herrn Binder und Frau Eigen für die Betreuung des biologischen Teils der Untersuchungen und die gute Zusammenarbeit,

Wesaal Khan für die hervorragende Zusammenarbeit im BMBF-Forschungsprojekt,

Prof. G. Wolfaardt und seiner Arbeitsgruppe für den Forschungsaufenthalt an der University of Stellenbosch, Südafrika,

dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die Finanzierung der Arbeiten durch das Forschungsprojekt 02WT9862/8,

der Max-Buchner-Forschungstiftung der Dechema e. V. für die Förderung durch zwei Stipendien,

dem Arbeitskreis Prof. Schöning, FZ Jülich für die freundliche Überlassung von Mikroelektrodenarrays,

dem Arbeitskreis Prof. Flemming, insbesondere Herrn Dr. Wingender, für die Bereitstellung extrahierter bakterieller EPS

und allen Mitarbeitern des Institutes für die ausgezeichnete Atmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft.

Besonderer Dank gilt hierbei:

Marcel Merkwitz und Dirk Frauendorf für zahlreiche REM-Untersuchungen und die Hilfe bei vielen praktischen Problemen

Dipl.-Ing. Martin Schramm für die Unterstützung bei den messtechnischen und elektronischen Fragestellungen

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG | 1 |
| 2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN | |
| 2.1 Biofilme | 3 |
| 2.2 Mikrobielle Materialzersetzung..... | 8 |
| 2.3 Redoxpotential und Desinfektionswirkung | 9 |
| 2.4 Mikroskopische Verfahren | 12 |
| 2.5 Farbstoffe | 14 |
| 2.6 Quarz-Mikrowaage | 15 |
| 2.7 Elektrochemische Messungen an Biofilmen | 16 |
| 3. EXPERIMENTELLES | |
| 3.1 Biofilmanzucht unter Laborbedingungen | 19 |
| 3.2 Untersuchungen im Technikumsmaßstab | 21 |
| 3.3 Auswertungsverfahren | 25 |
| 3.4 Einfluss der Probenvorbehandlung | 29 |
| 3.5 Desinfektion | 29 |
| 3.6 Elektrochemische Messungen an Biofilmen | 32 |
| 4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION | |
| 4.1 Einfluss der Probenvorbehandlung | 38 |
| 4.2 Materialabhängigkeit der Biofilmbildung | 44 |
| 4.3 Elektrochemische Eigenschaften besiedelter Oberflächen | 56 |
| 4.4 Desinfektion von Biofilmen | 71 |
| 5. ZUSAMMENFASSUNG | 93 |
| 6. LITERATUR | 95 |

Veröffentlichungen

- J. W. Schultze, A. Bressel, *Mikrobiell induzierte Korrosion an Metallen in Trinkwasserversorgungssystemen*, in: Max-Buchner-Forschungstiftung der Dechema e. V., Forschungsförderung 2001, Anlage 1 zum Tätigkeitsbericht 2001, S. 142 - 146
- W. Khan, A. Bressel, T. Binder, H.-P. Rohns, S. Saftic, J. Schubert, R. Irmischer, J.W. Schultze, G. Wolfaardt, *Trinkwasser-Biofilme: Technologische Faktoren und Überlebensfähigkeit pathogener Keime*, in: Erfassung des Wachstums und des Kontaminationspotentials von Biofilmen in der Verteilung von Trinkwasser - Ergebnisse eines BMBF-Verbundprojektes, IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung gemeinnützige GmbH, ISBN: 0941-0961, Mülheim/Ruhr, 2003
- A. Bressel, W. Khan, T. Binder, H.-P. Rohns, S. Saftic, J. Schubert, R. Irmischer, J.W. Schultze, G. Wolfaardt, *Trinkwasser-Biofilme: Verfahren zum kontinuierlichen Monitoring für die Erfassung von Biofilmen*, in: Erfassung des Wachstums und des Kontaminationspotentials von Biofilmen in der Verteilung von Trinkwasser - Ergebnisse eines BMBF-Verbundprojektes, IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung gemeinnützige GmbH, ISBN: 0941-0961, Mülheim/Ruhr, 2003
- A. Bressel, J. W. Schultze, W. Khan, G. Wolfaardt, H.-P. Rohns, R. Irmischer, M. J. Schöning, *High resolution gravimetric, optical and electrochemical investigations of microbial biofilm formation in aqueous systems*, *Electrochim. Acta*, in Druck

Vorträge

- Lifecom 2000: AGEF Symposium „Elektrochemie und Life Sciences“, Düsseldorf, 03/2000: A. Bressel, J. W. Schultze: *Analyse von Biofilmen und ihr elektrochemisches Verhalten*
- 3rd International Symposium on Electrochemical Microsystem Technologies, Garmisch-Partenkirchen, 09/2000: A. Bressel, J. W. Schultze: *Optical detection and electrochemical behaviour of biofilms*
- International Conference on Biofouling and Materials, Dechema, Frankfurt, 06/2001: A. Bressel, J. W. Schultze, H. P. Rohns: *Biofilms in drinking water distribution - material composition and preparation influences*
- International Society of Electrochemistry, 53rd annual meeting, Symp. 6 (4. EMT), Düsseldorf, 09/2002: J. W. Schultze, A. Bressel, R. Irmischer, H.-P. Rohns: *Microbial interactions with metal surfaces: Electrochemical and CSLM investigations*

Poster

- Biofilm 2000 Celebration, Big Sky, Montana, USA, 07/2000:
S. Saftic, A. Bressel, W. Khan, G. M. Wolfaardt, J. Schubert, J. W. Schultze:
What do Bugs See? The Need to Standardize Surfaces and Surface Treatment
- American Society of Microbiology (ASM) General Meeting, Orlando, FL, USA, 05/2001:
W. Khan, A. Bressel, T. Binder, H.-P. Rohns, S. Saftic, J. W. Schultze, G. M. Wolfaardt,
J. Schubert, R. Irmischer:
Evaluation of the Biological Stability in a Large Drinking Water Distribution System
- International Specialised Conference on Biofilm Monitoring, Porto, 03/2002:
W. Khan, A. Bressel, T. Binder, H.-P. Rohns, S. Saftic, J. W. Schultze, G. M. Wolfaardt,
J. Schubert, R. Irmischer:
Monitoring of biofilm formation potential on materials relevant to the drinking water distribution industry
- ausgezeichnet mit dem Posterpreis des Scientific Comitee -

1 Einleitung und Problemstellung

Die Besiedlung wasserbenetzter Oberflächen stellt einen der grundlegenden Überlebensmechanismen von Mikroorganismen in aquatischen Systemen dar. Planktonische Bakterien werden mit organischen und anorganischen Wasserbestandteilen aus der Wasserphase durch Diffusion, Schwerkraft, Strömung des Mediums oder Eigenbewegung des Mikroorganismus an die Grenzfläche transportiert [MAR71, PER99]. Die nachfolgende Anhaftung wird durch verschiedene physikochemische Parameter der bakteriellen Zellwand (freie Oberflächenenergie, Hydrophobizität, elektrische Ladung etc.) als auch durch die Eigenschaften des Werkstoffs (chemische Zusammensetzung, physikalische Wechselwirkungen) dominiert (LOO90, PER99). Durch Vermehrung und Koloniebildung entstehen in kurzer Zeit große, in einer aus von den Bakterien sekretierten Polysacchariden aufgebauten Matrix eingebettete Zellaggregate, die durch die Vielfalt der enthaltenen Mikroorganismen auf starke Veränderungen der Umweltbedingungen effektiver als planktonische Organismen reagieren können.

Bei Analyse mikrobieller Populationen im Bereich der Umweltbiologie konnte die Entwicklung von Biofilmen nicht nur in nährstoffreichen, sondern auch in nährstoffarmen (oligotrophen) aquatischen Systemen, z. B. in klaren Bergflüssen, beobachtet werden. Hier wurde auf den Oberflächen eine deutliche Erhöhung der bakteriellen Aktivität nachgewiesen [FLE79]. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde untersucht, ob auch die Rohrleitungsnetze im Bereich der Brauch-, Trink- und Reinstwasserversorgung, bei denen eine mikrobielle Besiedlung durch den geringen Nährstoffgehalt und die Desinfektion des eingespeisten Wassers traditionell nicht erwartet wurde, durch Biofilme besiedelt werden können. Es zeigte sich, dass auch in diesen Systemen der Eintrag von Bakterien durch Betriebsstörungen zur Ausbildung einer mikrobiellen Besiedlung führen kann, die oft mit hygienischen und betrieblichen Problemen verbunden ist [OLS91, KOO95, ZAC00]. Die Reinigung besiedelter Systeme wird durch die geringere Wirkung von Desinfektionsmitteln auf diese Oberflächenfilme [LEC88, BOI97] erschwert.

Neben den hygienischen Fragestellungen sind auch die chemischen Einflüsse der Biofilme auf die besiedelten Oberflächen von starkem Interesse. Durch Stoffwechselprodukte, Zersetzung einzelner Inhaltsstoffe oder die partielle Oberflächenbedeckung kann es zur Beschädigung besiedelter Werkstoffe kommen [HOL95, FLE97, CAL98]. Während diese Phänomene im Bereich technischer Systeme bei ausgedehnten Biofilmen mit Schichtdicken über 1 mm oft beobachtet werden konnten

[FLE97, FLE00], sind die Auswirkungen dünner (Mono-) Schichten von Mikroorganismen auf das elektrochemische Verhalten besiedelter Metalloberflächen nicht umfassend geklärt.

Moderne analytische und mikroskopische Techniken konnten in den letzten 20 Jahren neue Erkenntnisse über die Prozesse an der Grenzfläche Werkstoff/Biofilm liefern. Quarzmikrowaagen werden seit 10 Jahren [NIV93, WHI96, HEL00] zur schnellen und hochempfindlichen Detektion von Besiedlungsprozessen auf Oberflächen verwendet. Der Einsatz von DNA- und membranbindenden Fluoreszenzfarbstoffen [BOU99, RAM01] erlaubt sowohl die Detektion der Bakterien als auch die in-situ Klassifizierung der Membranstabilität und Stoffwechselaktivität der Organismen. Die Kombination dieser Techniken mit der Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (SCLM) ermöglicht dreidimensionale Abbildungen der besiedelten Oberflächen mit hoher optischer Qualität und einer Auflösung im sub- μm -Bereich [CAL92, LAW91, GRI97]. Elektrochemische Messungen mit makroskopischen und mikroskopischen Elektroden zeigten Veränderungen bei Ruhepotential [LIT97, SCO98] und Korrosionsverhalten [DEX98, LIT96] der Werkstoffe durch mikrobielle Besiedlung. Als Ursachen werden der Wechsel der Korrosionsmechanismen, ein aktiver Stoffwechseleinfluss als auch katalytische Effekte bei den Elektron-Transfer-Reaktionen (ETR) an der Phasengrenze diskutiert.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Klärung der Biofilmbildung auf Oberflächen unter den Betriebsparametern eines Wasserversorgungsnetzes. Durch Kombination verschiedener optischer, spektroskopischer und elektrochemischer Methoden, der Isolation einzelner Biofilmbestandteile und Messungen an Modellsystemen werden relevante Prozesse an der Grenzfläche Biofilm/Werkstoff mit hoher Ortsauflösung charakterisiert.

Versuche mit technischen Materialien im Labor- und Technikumsmaßstab dokumentieren den Werkstoffeinfluss auf die mikrobielle Filmbildung bei unterschiedlichen Probenpräparationen und Betriebsbedingungen. Der zeitliche Verlauf der Ruhepotentiale, das Korrosionsverhalten und die Auswirkung unterschiedlicher Biofilmschichtdicken auf die Elektrodenprozesse wird durch elektrochemische Messungen analysiert. Bei der Desinfektion mit technisch relevanten Wirkstoffkonzentrationen werden abschließend die Auswirkungen auf Biofilmstruktur, -vitalität und Korrosionsprozesse untersucht.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Biofilme

2.1.1 Aufbau und Struktur von Mikroorganismen

Die Struktur und chemische Zusammensetzung der mikrobiellen Zellwand als Kontaktstelle zwischen dem Bakterium und der Umgebung bestimmt wesentlich die makroskopischen Eigenschaften der Organismen. Die aus Phospholipid-Doppelschichten zusammengesetzten Membranen begrenzen das Cytoplasma, in dem Ribosome, DNA und Zellkern eingebettet sind. Die Struktur der folgenden Schichten der mikrobiellen Hülle unterscheiden sich nach ihrer Zusammensetzung in zwei grundlegende Gruppen, die durch die Gram-Färbung mit Kristallviolett unterschieden werden können. Abb. 1 zeigt eine Schema-Zeichnung des für Umweltkeime typischen Gram-negativen Zellwandaufbaus.

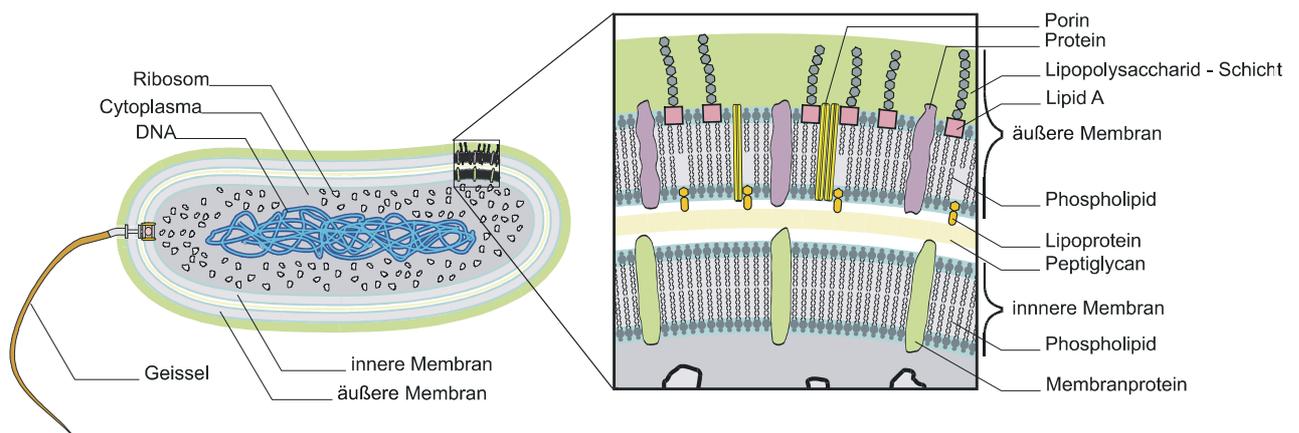


Abb. 1: Aufbau und Membranstruktur eines Gram-negativen Bakteriums (in Anlehnung an [MAD97])

Die innere Phospholipid-Membran des Gram-negativen Bakteriums wird von einer wenige nm dicken Schicht aus Peptiglycan umschlossen, die ihrerseits von einer zweiten Phospholipidmembran umgeben ist. Eingelagerte Enzyme, Porine und Proteine ermöglichen analog zur inneren Membran den selektiven Stoff- und Energietransport durch die Membran. Die äußere Membran Gram-negativer Organismen ist von einer Schicht von Lipopolysacchariden umgeben, die das Bakterium gegen Umwelteinwirkungen schützt. Diese Organismus-spezifischen Polysaccharide vernetzen bei Zugabe von Ca-Ionen partiell und vermindern so die Wirkung z. B. der enzymatischen Zerstörung der Phospholipidmembran durch Lysozym oder des selektiven Angriffs der Antikörper des Immunsystems von Wirtsorganismen durch Veränderung der Oberflächenstruktur. Auch für die Adhäsion von Mikroorganismen an Oberflächen spielen

diese Moleküle durch die vielfältigen funktionellen Gruppen eine entscheidende Rolle; einzelne Proteinkomplexe besitzen neben der Fähigkeit zur Anheftung auch enzymatische Untereinheiten, die z. B. die Spaltung von Zellulose als Nährstoff realisieren [BAY96] .

Tab. 1 [MAR01] gibt eine Übersicht über die verschiedenen Bestandteile und funktionellen Gruppen der Zellwand von Mikroorganismen.

| Verbindung | Vorkommen in Gram+ oder Gram- - Organismen | Struktur | Funktionelle Gruppen |
|---------------------------|--|--|--|
| Murein | Gram+: 20-80 nm dick Gram-: 10-15 nm dick | Peptidoglycan | Carboxyl- OH- Amino- |
| Teichonsäuren | Gram+ | Ribitol- oder Glycerolzucker-Phosphate oder einfache N-Acetylhexosamin-Phosphat-Polymere, kovalent gebunden an Peptidoglycan | Phosphat, -OH stark hydrophil anionisch |
| Teichuronsäuren | Gram+ | kovalent an Peptidoglycan gebunden | Carboxyl- anionisch |
| Lipoteichonsäuren | Gram+ | Teichonsäure (meist Polyglycerol-Phosphate) an Glycolipide gebunden, verankert in der Cytoplasmamembran | Phosphat -OH amphiphil |
| Polysaccharide | Gram+ | hier kovalent an Peptidoglycan gebunden | -OH |
| Lipide | Gram- | Glucolipide, (Phospholipide) | lipophile Gruppen oder amphiphil (apolar oder polar) |
| Lipopolysaccharide | Gram- | Lipide mit kovalent gebundenem hydrophilen Polysaccharidanteil | Alkyl- OH- Phosphat- Amino- amphiphil |
| Proteine | Gram+ Gram- | kovalent oder nicht kovalent gebunden | Carboxyl- Amino- amphiphil |

Tab. 1: Bestandteile mikrobieller Membranen [MAR01]

2.1.2 Extrazelluläre Polymere Substanzen (EPS)

Unter dem Begriff „Extrazelluläre Polymere Substanzen“ (EPS) [GEE82] werden die zur Vernetzung der einzelnen Mikroorganismen in einem Biofilm notwendigen Makromoleküle zusammengefasst. Die EPS liegt in Biofilmen als Hydrogel-Matrix vor, bei der ein Wassergehalt bis zu 98 Gew.-% ermittelt werden konnte [FLE02]. Die in der EPS enthaltenen Makromoleküle, die 50 - 90 % der im Biofilm gebundenen organischen Substanz ausmachen [NIE99], bestehen hauptsächlich aus Polysacchariden und Proteinen; zu geringeren Anteilen sind Nucleinsäuren und Lipide nachweisbar. Innerhalb der Filme führt die Einlagerung von bi- und trivalenten Kationen zur Verbrückung der als

Poly-Anionen vorliegenden Makromoleküle an den Carboxylgruppen und somit zur Stabilisierung der Gel-Matrix.

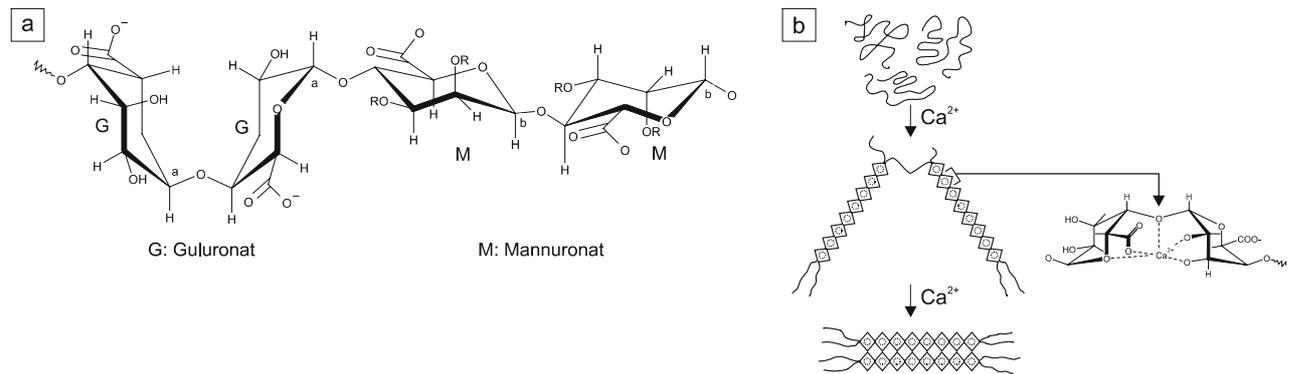


Abb. 2: a: Struktureinheit des Alginates, b: Verbrückung der Polymere durch Calcium-Ionen: „Egg-Box“-Modell [YAL88]

In den von Mikroorganismen erzeugten EPS-Filmen sind zumeist Homopolysaccharide eines Monosaccharidtyps oder regelmäßige Copolymere verschiedener Monosaccharide nachweisbar [SUT94]. Eine Ausnahme stellen die bakteriellen Alginat dar, die statistische Copolymere der Monosaccharide Mannuronat (M) und Guluronat (G) sind (Abb. 2 a). Im Unterschied zu den von Algen erzeugten Alginaten weisen bakterielle Alginat acetylierte Carboxylgruppen auf, die eine enzymatische Zersetzung der Polymere erschwert [SUT90/SUT94]. Darüber hinaus scheinen Mikroorganismen in der Lage zu sein, über die Zahl der acetylierten Gruppen der Polymere die Stärke der Vernetzung durch Calciumalginat und somit die Viskosität der erzeugten Polymermatrix gezielt zu steuern [EVA73/YAL88]. Das Alginat von *Pseudomonas aeruginosa* SG81 wird in der Forschergruppe „Physikalische Chemie von Biofilmen“ der Universität Duisburg als Modellsystem für natürliche Biofilme genutzt [GRO96] und wurde in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung der elektrochemischen Eigenschaften einer EPS-belegten Oberfläche verwendet.

2.1.3 Besiedlung von Oberflächen

Die Besiedlung von Materialoberflächen durch Mikroorganismen in wässriger Umgebung kann in fünf Phasen eingeteilt werden. Zunächst erfolgt durch Adsorption von in der Lösung vorhandenen Makromolekülen, z. B. Huminstoffen, Polysacchariden und Proteinen, die Ausbildung eines "Conditioning Film" auf der Materialoberfläche. Diese Adsorption, die im Minuten- bis Stundenzitraum stattfindet, führt zur Änderung der freien Energie und einer leicht negativen Oberflächenladung, die in den meisten Fällen die spätere Anhaftung von Mikroorganismen begünstigt.

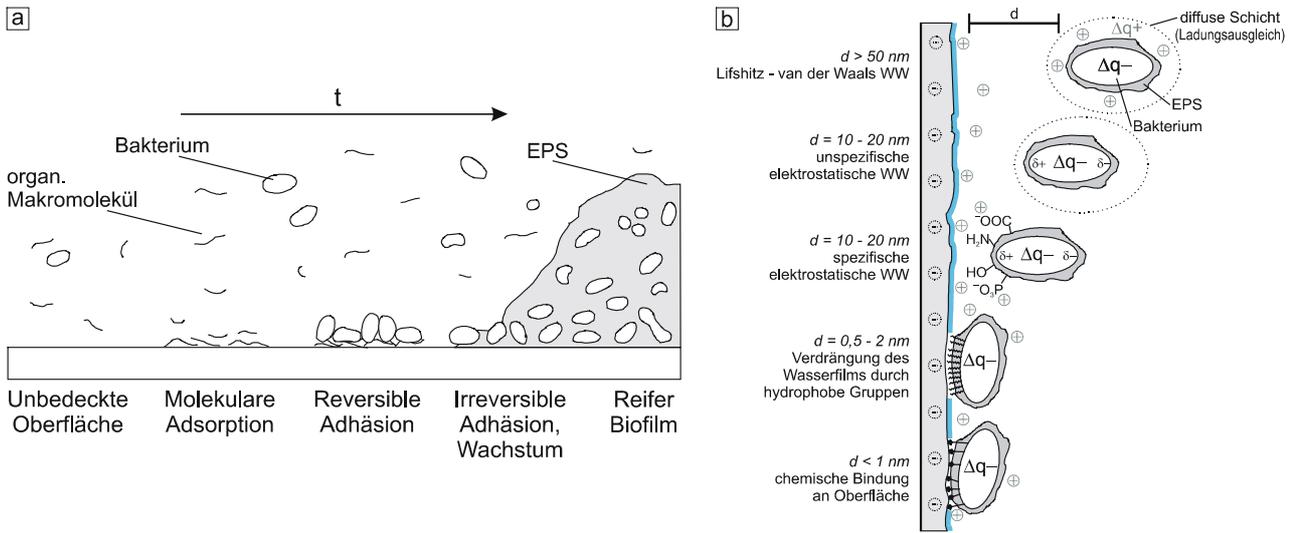


Abb. 3: a) Stadien der Besiedlung (nach [SAF97]), b) Wechselwirkungen bei der Anlagerung ([MAR01], erweitert)

Die nachfolgende Adhäsion von Bakterien auf der durch den Conditioning Film bedeckten Substratoberfläche kann analog zum Verhalten von Kolloiden in Lösung durch die Derjaguin-Landau Verwey Overbeek (DLVO)-Theorie beschrieben werden [EGI95]. Hierbei stehen repulsive, elektrostatische Kräfte der Elektrischen Doppelschicht im Gleichgewicht mit attraktiven Van-der-Waals-Kräften der Oberfläche. Die Annäherung der Bakterien an die Oberfläche wird hierbei durch geringe Oberflächenpotentiale und höhere Elektrolytkonzentrationen begünstigt [MIT90]. Während im Bereich $d > 50 \text{ nm}$ nur schwache Lifshitz - van der Waals - Wechselwirkungen auftreten [BUS90], sind im Bereich bis zu 20 nm elektrostatische Effekte bestimmend. Hierbei sind bei der Annäherung der Organismen durch makroskopische Wechselwirkungen zwischen der meist negativen Nettoladung der Bakterien und den meist ebenfalls leicht negativ geladenen Oberflächen zunächst repulsive Kräfte zu beobachten. Bei weiterer Annäherung kann jedoch auch direkte Wechselwirkung zwischen geladenen Gruppen der Bakterienoberfläche (z. B. Carboxylgruppen) und Ionen der Oberfläche beobachtet werden, die zu einer Erhöhung der Bindungsstärke beitragen können. Ein weiteres wichtiges Kriterium bei der Ansiedlung von Bakterien stellt die Hydrophobizität der Oberfläche dar [TEI89]. Durch Verdrängung des Wasserfilms zwischen Mikroorganismus und Oberfläche wird durch Aggregation hydrophober Gruppen ein energetisch günstiger Zustand erreicht und die adsorptive Bindung verstärkt. Nach Verdrängung des Wasserfilms können im Bereich $d < 1 \text{ nm}$ Wasserstoffbrücken-, Ionen- oder Ligand-Akzeptor-Bindungen zwischen Zentren der Bakterienmembran und der Oberfläche aufgebaut werden. Die möglichen Wechselwirkungen zwischen Oberflächen und Mikroorganismen bei der Primäradhäsion sind in Abb. 3 b ([MAR01], erweitert) dargestellt.

Die Anlagerung der Bakterien an die Oberfläche erfolgt zunächst reversibel, wobei die an der Grenzfläche als Conditioning Film anhaftenden Makromoleküle durch die Organismen abgeweidet werden können. Zu diesem Zeitpunkt weisen die Bakterien noch Brownsche Molekularbewegung auf und können durch geringe Änderungen bei Strömungsgeschwindigkeit oder Zusammensetzung der Lösung (z. B. durch Zugabe von 0,5 % NaCl) abgelöst werden [FLE91].

Die nachfolgende irreversible Adhäsion zeichnet sich durch den Verlust der Brownschen Molekularbewegung, die Sekretion von Extrazellulären Polymeren Substanzen (EPS) durch die Bakterien und den Aufbau von Mikrokolonien aus. Die Einbettung in die durch Calcium- und Magnesiumionen verknüpfte Polysaccharidmatrix der EPS erlaubt den Bakterien die weitgehende Tolerierung von Änderungen bei Strömungsgeschwindigkeit und chemischer Zusammensetzung. Hierbei zeigt der Biofilm Eigenschaften, die denen einer porösen Membran ähneln: neben Kanälen, die einen ungehinderten Kontakt der Lösung mit der Oberfläche ermöglichen, sind relativ dichte EPS-Strukturen vorhanden, die nur einen langsamen, diffusionskontrollierten Austausch zwischen Lösung und Oberfläche zulassen.

Nach Bildung einzelner Mikrokolonien beobachtet man eine logarithmische Wachstumsphase [FLE96] und die Bildung eines dichten, ausgeprägten Biofilms. In dieser Phase spielen Werkstoffeigenschaften nur noch eine geringere Rolle, da diese z. T. durch die EPS maskiert werden. In Abhängigkeit von Nährstoffangebot, Durchflußgeschwindigkeiten und Oberflächenmaterial kommt es zur Ausbildung von stark unterschiedlich strukturierten Biofilmen. In stark nährstoffhaltigen Systemen, z. B. in Abwasserrohren, entstehen Filme mit einer Stärke von mehr als 100 µm in Zeiträumen von Wochen bis Monaten, die durch die Diffusionskontrolle der EPS sowohl aerobe als auch anaerobe Bereiche aufweisen, die zur Ansiedlung spezialisierter Mikroorganismen führen. Betrachtet man hingegen nährstoffarme (oligotrophe) Systeme, wie sie im Bereich von Trinkwassersystemen vorliegen, so wird auch über Zeiträume von mehreren Monaten meist nur eine geringe Bewuchshöhe von wenigen Bakterienlagen erreicht. Die Biofilme weisen hier eine stark variierende Struktur auf, man beobachtet neben großen Kolonien auch unbedeckte oder von nur wenigen Bakterien besiedelte Bereiche. Die resultierende lokale Abschirmung der Oberfläche kann durch Ausbildung von Konzentrationselementen [GRI89, HEI94] zur Materialzersetzung beitragen.

2.2 Mikrobielle Materialzersetzung

Der zerstörende Einfluß von mikrobieller Besiedlung auf Oberflächen wird bei Metallen unter dem Begriff "Mikrobiell Induzierte Corrosion" (MIC), bei anderen Materialien, wie z. B. Kunststoffen, Beton oder Glas, unter dem Begriff "Biodeterioration" behandelt.

Für die MIC sind bei Bildung eines Biofilms folgende Aspekte bedeutend:

- als Folge der ungleichmäßigen Oberflächenbedeckung können sich Bedingungen entwickeln, die zur Spaltkorrosion führen [HEI94]. Durch die im Vergleich zur Kathodenfläche kleine Fläche werden an der Anode starke Korrosionserscheinungen beobachtet. Die gebildeten Metallionen diffundieren durch den bedeckenden Biofilm und werden in der EPS-Matrix gebunden oder fallen an der Oberfläche als Hydroxide/Oxide bzw. Carbonate aus.

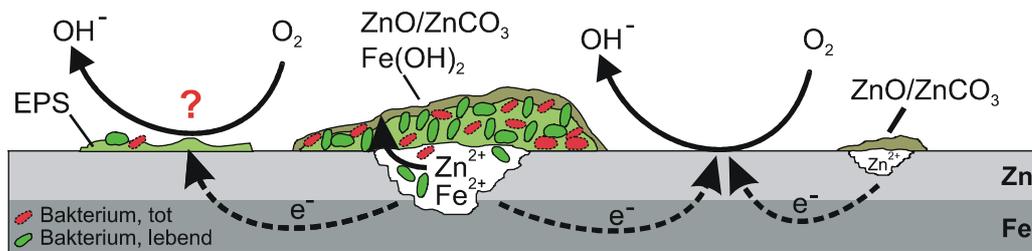


Abb. 4: Schema der MIC durch partielle Oberflächenbedeckung am Beispiel von Verzinktem Stahl

- durch Bildung und Ablagerung von Stoffwechselprodukten auf der Oberfläche kann es zu nachteiligen Auswirkungen auf den Werkstoff kommen. Eine besondere Rolle spielen hierbei die Bildung von anorganischen und organischen Säuren und die Reduktion von Sulfat zu Sulfid durch Sulfatreduzierende Bakterien (SRB). Bei Ablagerung von Eisen- und Manganverbindungen durch Mikroorganismen wurde weiterhin die Bildung von Lokalelementen und nachfolgende Kontaktkorrosion festgestellt [LIN94, LEW00].

Der Vergleich von besiedelten mit steril exponierten Proben zeigt oft deutliche Unterschiede in Struktur und Zusammensetzung der Korrosionsprodukte auf den Oberflächen (Abb. 5).

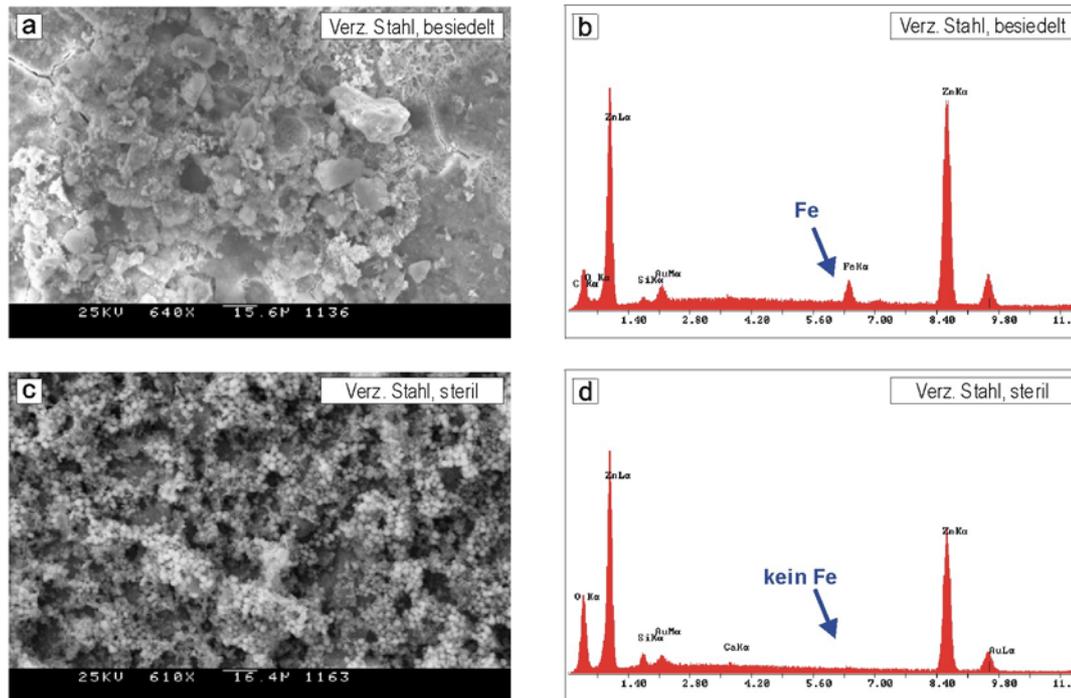


Abb. 5: Einfluss der mikrobiellen Besiedlung auf das Korrosionsverhalten von Verzinktem Stahl:
 a, b) nach Besiedlung in Flusswasser für 4 Wochen: deutliche Fe-Anteile in Korrosionsprodukten;
 c, d) nach Exposition in sterilem Flusswasser: feinkörnigere Oxidstrukturen, kein Eisenanteil nachweisbar

- bei der Biodeterioration von Kunststoffen kommt es neben der Zersetzung der Polymere durch Stoffwechselprodukte der Mikroorganismen auch zur direkten Verwertung von Inhaltsstoffen durch die besiedelnden Bakterien. Hierbei ist sowohl die Verwertung von Zusatzstoffen, wie z. B. Weichmachern (bei PVC), als auch die direkte Zersetzung der in Restkonzentrationen oder durch Depolymerisation vorhandener Monomere (z. B. bei Polyestern und Polyamiden) möglich.

2.3 Redoxpotential und Desinfektionswirkung

Die Einstellung spezifischer Redoxpotentiale spielt eine elementare Rolle bei der Energiegewinnung der Mikroorganismen beim Stoffwechsel. In mehreren Stufen wird bei der aeroben Atmung der an den umgesetzten Nährstoffen gebundene Wasserstoff reduziert und mit Luftsauerstoff zu Wasser umgesetzt (s. Abb. 6 links). Hierbei erfolgt der Elektronentransport über membrangebundene Systeme, die neben dem Elektronentransfer auch der Speicherung der durch die Ladungstrennung als Membranpotential freiwerdenden Energie zur Adenosintriphosphat (ATP)-Synthese dienen.

Diese starke Abhängigkeit der mikrobiellen Atmung von Redoxpotential und pH äußert sich auch in der Toleranz von Organismen gegenüber Veränderungen der Umgebungsbedingungen. Abb. 6 rechts zeigt eine ungefähre Einordnung der Zonen

mikrobiellen Wachstums und Überlebens für die am häufigsten in Umweltproben detektierbaren Organismen. Die Grenzen dieser Bereiche werden durch hochspezialisierte Organismen definiert, die andere Wege der Energiegewinnung (z. B. durch Nutzung des Schwefel-Zyklus oder der Generierung von Methan als Endprodukt des Stoffwechsels) ausnutzen. Eine Übersicht der korrespondierenden Redoxpaare beim Stoffwechsel einzelner Mikroorganismen zeigt Tab. 2 [JON02]. Auch die Toleranz gegenüber sehr niedrigen und sehr hohen pH-Werten kann nur für eine geringe Anzahl hochspezialisierter Populationen beobachtet werden [FLE91].

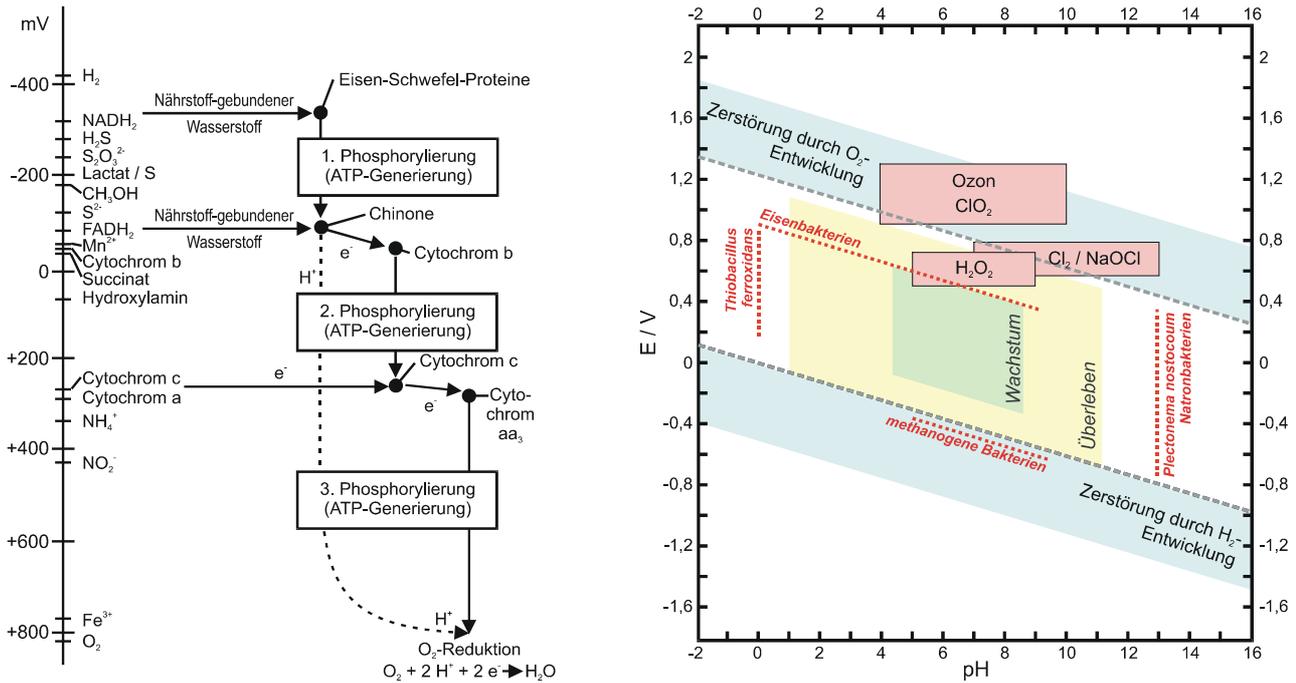


Abb. 6: Mikroorganismen und Redoxpotential: links: Potentialverlauf der Atmungskette [SAN00]; rechts: Stabilitäts- und Wachstumsbereiche von Mikroorganismen in Abhängigkeit von Redoxpotential und pH

Zur Desinfektion der Verteilungsnetze im Bereich der Trinkwasserversorgung wird hauptsächlich die oxidative Zerstörung der Zellmembranen der Organismen durch Zugabe stark Redox-aktiver Substanzen genutzt. Typische Werte für Redoxpotentiale für die im Trinkwasser nach dem DVGW-Regelwerk, Technische Regel W 291 „Reinigung und Desinfektion von Wasserverteilungsanlagen“, sind für die zugelassenen Wirkstoffkonzentrationen in Abb. 6 rechts eingetragen. Die Desinfektionswirkung wird hierbei jedoch primär für planktonische Mikroorganismen erreicht. Bakterien, die an Oberflächen oder in Biofilmen lokalisiert sind, weisen hier eine deutlich höhere Resistenz (bis zu 3000 x [LEC88]) gegenüber der oxidativen Zerstörung auf, die wahrscheinlich sowohl auf Hemmung des Transportes durch Diffusion als auch auf Zehrung der Wirkkomponente durch umgebende EPS-Schichten und Exoenzyme zurückzuführen sind [FOL96].

| Elektronenakzeptoren (Reduktion) | | Elektroendonatoren (Oxidation) | | | | | | | | | | | | |
|---|--|---|---|---|--|---|--|--|---|--|---|--|--|---|
| Oxidiertere / reduzierte Form | Redox-potential (U _{SE} ; pH 4) | Fe ⁰ / Fe ²⁺ | H ₂ / H ⁺ | Organische Moleküle / CO ₂ | CH ₄ / CO ₂ | NH ₄ ⁺ / N ₂ | S ²⁻ / S ⁰ | S ²⁻ / ISO ₂ ²⁻ | S ⁰ / ISO ₂ ²⁻ | Fe ²⁺ / Fe(OH) ₃ | NH ₄ ⁺ / NO ₂ ⁻ | NO ₂ ⁻ / NO ₃ ⁻ | Fe ²⁺ / Fe ³⁺ | Mn ²⁺ / MnO ₂ |
| O ₂ / OH ⁻ | 0.993 | | Alkaligenes eutrophica, A. paradoxus, Paracoccus denitrificans, Pseudomonas facilis, Mycobacterium phiel, Nordica, Sterptomyces, Streptosporangium, Comyebacterium autotrophicum (L287) | Pseudomonas, Bacillus, Zoogloa, Acetobacter, Bacteroides, Azobacter, Azomonas, Alcaligenes (L237), Micrococcus, Planococcus (L305) | Methylomonas, Methylococcus, Methylobacter, Methylosinus, Methylocystis (E637) | Arthrobacter (E286) | Acidianus Eriofeyi, Beggiatoa, Sulfolobus acidocaldarius, Achromatium, Thiobacillus, Thiobaculum, Thiospira (E512) | Sulfolobus, Acidianus, Beggiatoa, Thiobaculum, Achromatium, Thiobacillus, Thiobaculum (E514) | Thiobacillus thioiparis, T. helophilus, T. ferrooxidans, T. thiooxidans, T. albertis, T. thermophilica, Sulfolobus acidocaldarius, Acidianus, Thiobaculum, Thiospira (E512) | Mesophile B.: Thiobacillus ferrooxidans (E316), T. prosperus, Leptospirillum ferrooxidans, Metallotignum (E330), Thermophile B.: Sulfolobus, Thiobacillus, Acidianus (E331), Neutrophile B.: Gallionella, Leptothrix, Crenothrix, Clonothrix, Leskeella (E333) | Nitrosomonas, Nitrospira, Nitrospira (L296), Nitrosolobus, Nitrospira, Aspergillus, nitrosomonas (A321) | Nitrobacter, Nitrospira, Nitrospira (L296), Nitrosolobus, Aspergillus, nitrosomonas (A321) | Thiobacillus ferrooxidans, Leptospirillum ferrooxidans, Sulfolobus, Acidianus brierleyi, Thiobacillus thiooxidans (E391) | Arthrobacter, Hyphomicrobium manganooxidans, Pseudomonas (E393) |
| NO ₃ ⁻ / N ₂ | 0.954 | | Alkaligenes eutrophica, Paracoccus denitrificans (L287) | Thiophaea pantotropa (E267), Azobacter, Beijerinckia, Clostridium pasteurianum, Thiobacillus ferrooxidans (E270) | | | Thermostrix thioara, Thiobacillus denitrificans (E515) | Thiobacillus denitrificans (L290), Thermothrix thioara (E514) | Thiobacillus thioiparis (L290), Thermothrix thioara (E515) | Thiobacillus ferrooxidans (E316) (L290), Clostridium (G4-8) | | | | Clostridium (G4-8) |
| MnO ₂ / Mn ²⁺ | 0.818 | | | Bacillus sp., Arthrobacter, Alteromonas putrefaciens, Pseudomonas liquefaciens, Acinetobacter calcoaceticus (E395) | | | | | | | | | | |
| NO ₃ ⁻ / NO ₂ ⁻ | 0.599 | | Alcaligenes, Escherichia, Aeromonas, Enterobacter, Bacillus, Flavobacterium, Nocardia, Spirillum, Staphylococcus (A322) | | | | | | | | | | | |
| NO ₂ ⁻ / NH ₄ ⁺ | 0.581 | | Desulfovibrio, D. desulfuricans (E541) | | | | | | | | | | | |
| Fe(OH) ₃ / Fe ²⁺ | 0.466 | | Bacillus, Sulfureducens, Shewanella putrefaciens (E346) | Bacillus polymyxa, B. circulans, B. megaterium, Escherichia freundii, E. aerogenes (E343), Pseudomonas liquefaciens (E345), Gallionella ferruginosa (E355) | | | | Thiobacillus ferrooxidans, T. thiooxidans, Sulfolobus (E344) | | | | | | |
| SO ₄ ²⁻ / S ⁰ | 0.021 | | Desulfovibrio baarsi, D. desulfuricans, Desulfolomaculum, Desulfohalobium, Desulfohalobium orientis, Desulfobacter hydrogenophilus, Desulfosarcina variabilis (E541) | Desulfovibrio sp., Desulfolomaculum sp., Desulfohalobium, Desulfobacter, Desulfobacterium, Desulfohalobium, Desulfosarcina, Desulfuromonas (E518) | N. b. (E639) | | | | | | | | | |
| S ⁰ / S ²⁻ | -0.034 | | Acidianus brierleyi, Desulfovibrio (E514, E521) | Desulfovibrio desulfuricans (L417), Thermoplasma neocallitrica, Desulfuromonas acetoxidans, Desulfovibrio gigas (E538), Rhizobium, Bradyrhizobium, Frankia, Anabaena, Azobacter, Beijerinckia, Clostridium, Thiobacillus (E265), Chromatium, Rhodospirillum, Chlorodinium, Klebsiella, Azospirillum, Desulfovibrio, Desulfolomaculum u. a. (A319) | | | | | | | | | | |
| N ₂ / NH ₄ ⁺ | -0.061 | | | | | | | | | | | | | |
| CO ₂ / CH ₄ | -0.067 | Methanosarcina barkeri, Methanococcus, Methanosarcina therosinthococcus | Methanobacterium, Methanococcus vanielii, Methanosarcina barkerii (L287, E631) | | | | | | | | | | | |

Angaben in Klammern mit Prefix (A) beziehen sich Atlas und Bartha; (E) auf Seitenzahlen in Geesey und (L) auf Seitenzahlen in Laskin et al.

Tab. 2: Korrespondierende Redoxsysteme im Stoffwechselkreislauf verschiedener Mikroorganismen [JON02]

2.4 Mikroskopische Verfahren

2.4.1 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (SCLM)

Betrachtet man dreidimensionale Systeme mit klassischen Mikroskopen, so kann durch Veränderung der Fokuslage auch ein Eindruck der räumlichen Ausdehnung erhalten werden. Hierbei wird allerdings die Abbildungsqualität durch die unscharfe Abbildung von Strukturen ober- und unterhalb der Fokusebene und die Streuung und Schwächung des Lichtes durch die umliegenden Schichten stark verringert.

Das Verfahren der konfokalen Mikroskopie wurde bereits 1961 von M. Minsky am Massachusetts Institute of Technology entwickelt und patentiert. Durch die sich erst viel später entwickelnde digitale Bildverarbeitung konnte sich dieses System aber erst zum Anfang der 90er Jahre in der breiten wissenschaftlichen Anwendung durchsetzen [STL91, LIC94, CAL98]. Durch Aufnahme mehrerer Schnitte in z-Richtung und nachfolgende digitale Bildbearbeitung im Computer kann eine dreidimensionale Abbildung des untersuchten Objekts vorgenommen werden.

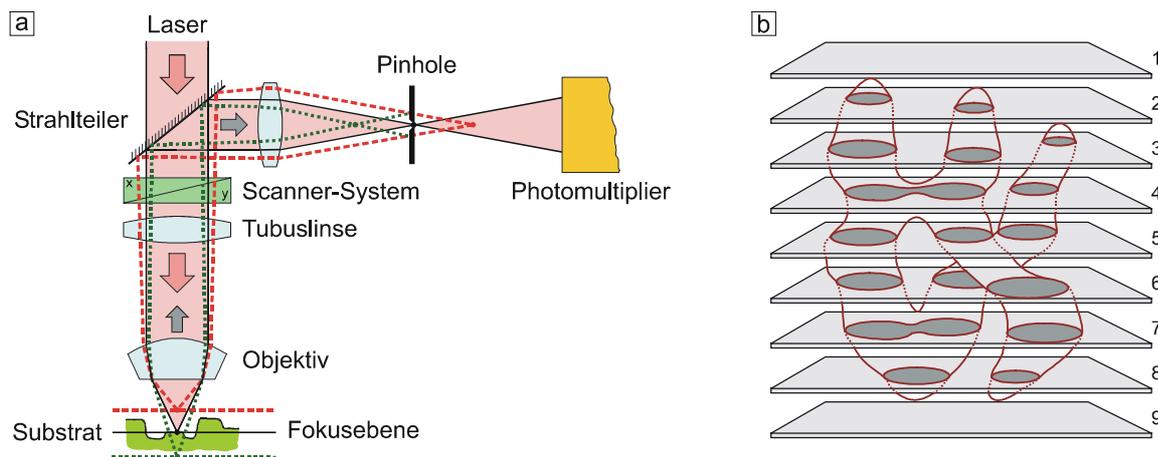


Abb. 7: a) Funktionsprinzip eines SCLM, b) Abbildung einer dreidimensionalen Struktur (nach [BOR96])

Im Gegensatz zur klassischen Fluoreszenzmikroskopie wird beim Scanning Confocal Laser Microscope (SCLM) das Anregungslicht in den Strahlengang eingespiegelt und somit in der Fokusebene auf einen Punkt gebündelt. Die dort emittierte Fluoreszenzstrahlung wird auf ein Pinhole abgebildet, das Intensitäten von Strukturen oberhalb und unterhalb der Fokusebene ausblendet. Da hiermit nur der Fokuspunkt klar abgebildet wird, wird a) die Probe mittels eines x-y-Tisches oder b) der Laserstrahl mit Hilfe von galvanometrischen Spiegeln bewegt, um eine vollständige Abbildung der Schicht zu erhalten. Hierbei hat sich das letztere Verfahren bei kommerziell erhältlichen Geräten durchgesetzt, da hiermit kurze Messzeiten möglich sind, die eine Strahlungsschädigung der empfindlichen biologischen Systeme weitestgehend ausschließen.

2.4.2 Rasterelektronenmikroskopie an Biofilmen

Die Untersuchung von Biofilmen mit elektronenmikroskopischen Verfahren stellt durch den hohen Wasseranteil der EPS-Hydrogelmatrix hohe apparative Anforderungen an das verwendete Mikroskop. Bei Verwendung von klassischen Elektronenmikroskopen zeigen sich durch die Entfernung des Wassers starke Trocknungsartefakte an den untersuchten Oberflächen [FLE02], die nur noch geringe Rückschlüsse auf die ursprüngliche Struktur der Filme zulassen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Werkstoffoberflächen mit einem Environmental-Rasterelektronenmikroskop (E-SEM, Phillips XL-30) untersucht werden, das Messungen im Niederdruckbereich (mbar) ermöglicht und somit die Struktur der hydratisierten Biofilme abbilden kann. Zusätzlich werden durch die wasserdampfgesättigte Atmosphäre Aufladungseffekte, die auf nichtmetallischen Oberflächen die Abbildung stören und meist ein Bedampfen der Probe mit Gold erfordern, wirksam unterdrückt (Abb. 8).

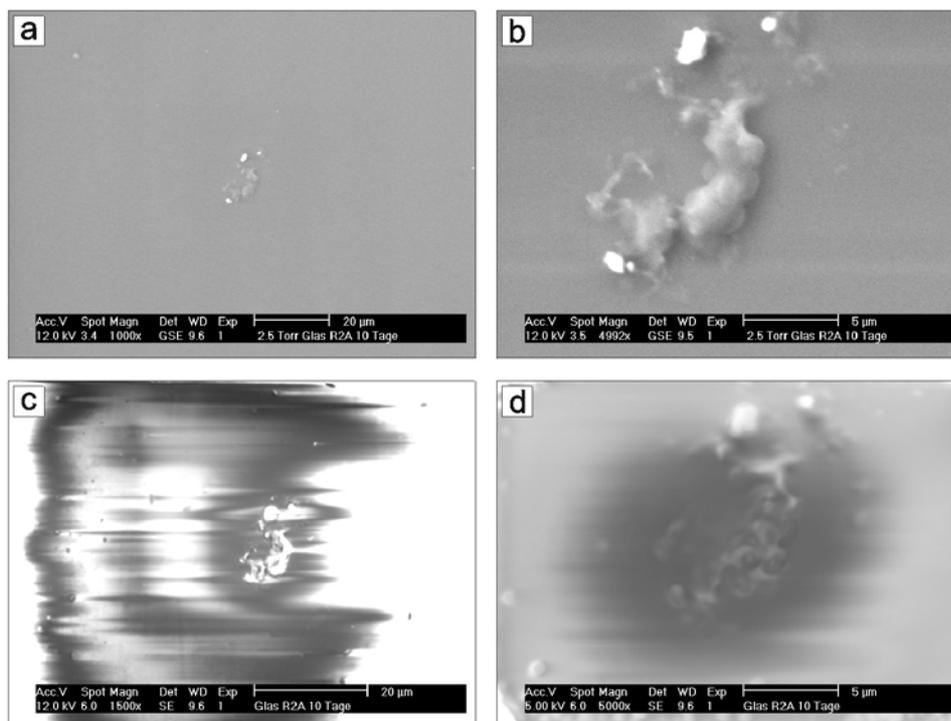


Abb. 8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer Biofilmkolonie auf Glas: a, b: Aufnahme unter Wasserdampf-atmosphäre (E-SEM); c, d: Aufnahme im Hochvakuum - Dehydratation der Probe unter Zerstörung der Struktur

Durch Kombination der verschiedenen mikroskopischen Verfahren ist eine genauere Klärung der Mechanismen der Biofilmbildung und der Einflüsse auf das Korrosionsverhalten möglich.

Während die Untersuchung im E-SEM nur die Aufsicht auf die Oxidstrukturen (hier am Beispiel von Aluminium nach 36 w Exposition in Trinkwasser) zulässt (Abb. 9 a), ermöglicht die hohe Intensität des Laserlichts die Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe

auch innerhalb der mit Bakterien durchsetzten Oxid-Cluster (Abb. 9 b), bei der lokale Veränderungen der Bakterienzahl und -vitalität ermittelt werden können. Zusätzlich kann durch dreidimensionale Erfassung der Reflektion der Oberfläche eine Abbildung des Oberflächenprofils erreicht werden, die eine zerstörungsfreie Detektion von Korrosionsschäden unterhalb der bedeckenden Oxide ermöglicht (Abb. 9 c). Eine schematische Darstellung der mit den verschiedenen Verfahren erreichbaren Informationstiefen zeigt Abb. 9 d.

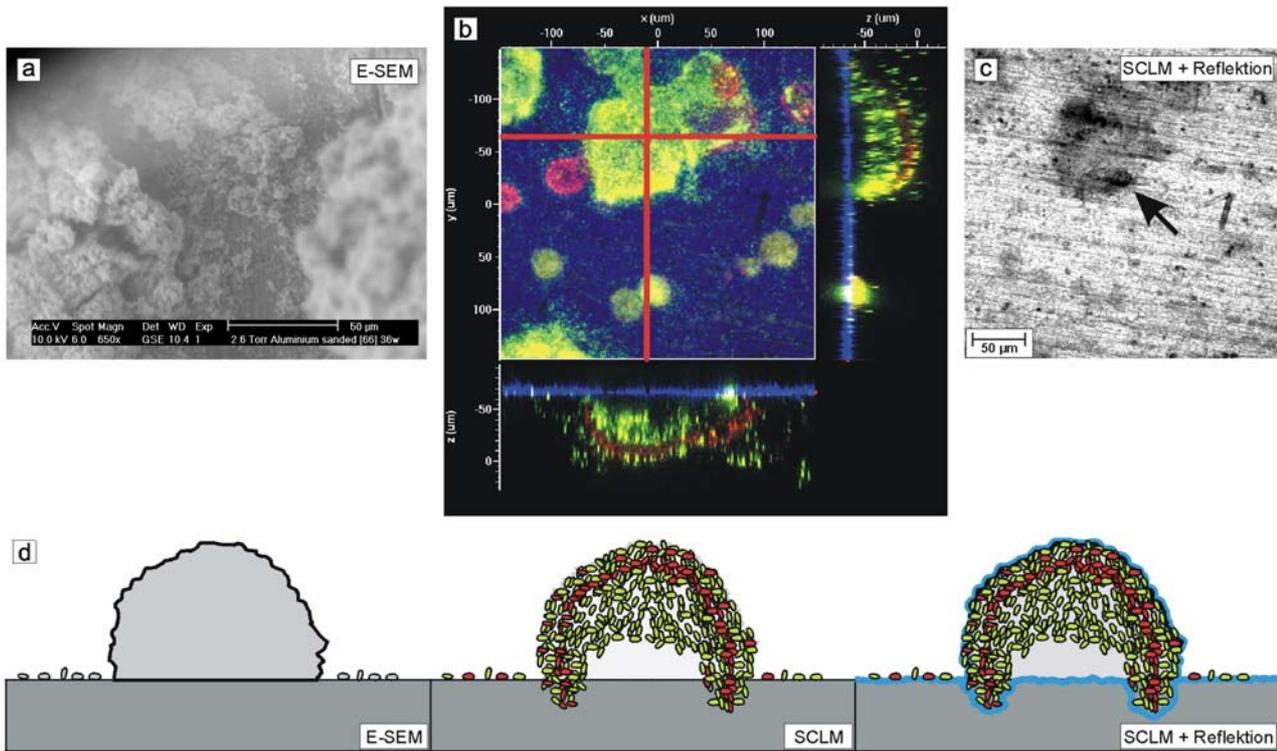


Abb. 9: Vergleich des Informationsgehaltes der mikroskopischen Verfahren: a) elektronenmikroskopische Aufnahme; b) SCLM-Aufnahme von Aluminium, Anfärben mit BacLight™ (s. Abschnitt 2.5): tot-lebend-Klassifizierung (rot/grün) innerhalb der Oxid-Cluster, Korrelation mit Reflektionskanal (blau); c) Reflektionsaufnahme der besiedelten Oberfläche - Lokalisierung der Korrosionsangriffe (Pfeil) ; d) schematischer Vergleich des Informationsgehalts

2.5 Farbstoffe

Zur Markierung von Mikroorganismen in wässriger Umgebung steht eine Vielzahl von organischen Farbstoffen zur Verfügung. Diese unterscheiden sich sowohl in der Wellenlänge von Absorption und Emission, der chemischen und photochemischen Stabilität als auch im Einfluss auf die angefärbten Organismen.

Durch die simultane Detektion und aktiv-inaktiv-Klassifikation der Mikroorganismen stellt BacLight™ z. Z. eines der aussagekräftigsten Farbstoffsysteme für Untersuchungen an Biofilmen unbekannter Zusammensetzung dar [BOU99]. Bei dem von Molecular Probes angebotenen BacLight™-System handelt es sich um eine äquimolare Mischung der an die DNA bindenden Farbstoffe SYTO-9™ und Propidiumiodid. Bei Anregung mit $\lambda = 488 \text{ nm}$

emittiert SYTO-9TM bei $\lambda = 505$ nm, Propidiumiodid bei $\lambda = 520$ nm. Beide Farbstoffe konkurrieren um die Basenkombination Pyrimidin-Purin-Pyrimidin (dT*dA·dT) [TUI95] in der DNA der markierten Bakterien (Abb. 10 b). Hierbei besitzt Propidiumiodid eine deutlich höhere Quantenausbeute bei der Fluoreszenzemission als SYTO-9TM, kann aber im Gegensatz zu diesem die intakte Membran von Bakterien nicht durchdringen. Somit erscheinen bei Verwendung des BacLightTM-Systems Bakterien mit intakter Membran bei Anregung grün, während bei Bakterien mit zerstörter Membran die Emission des Propidiumiodids überwiegt und diese rot markiert werden. Durch Bindung an die DNA der markierten Bakterien wirkt das BacLightTM-System allerdings toxisch und ist somit nicht für kontinuierliche Messungen geeignet. Bei hohen Anregungsleistungen des Lasers und wiederholter Abbildung eines Punktes müssen weiterhin Bleichungserscheinungen des Farbstoffes berücksichtigt werden.

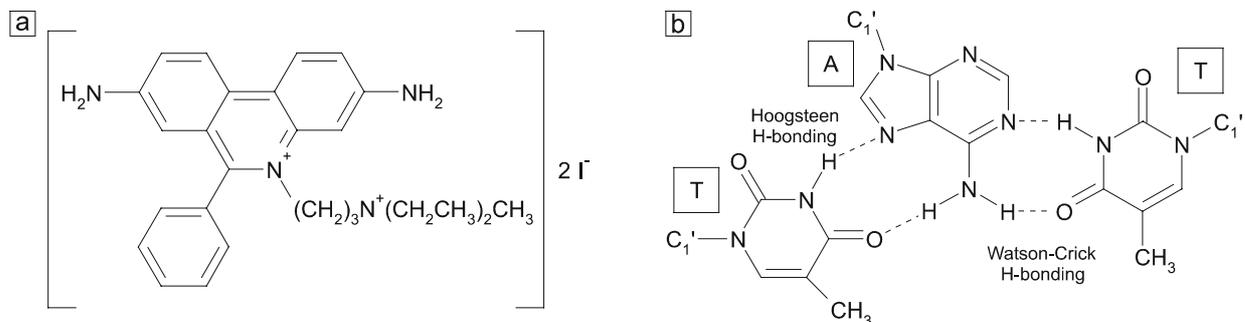


Abb. 10: a) Struktur von Propidiumiodid, b) Basenkombination (dT*dA·dT) [TUI95]

2.6 Quarz-Mikrowaage

Die lineare Massenabhängigkeit der Resonanzfrequenz von AT-geschnittenen Quarzen wurde bereits 1959 von Sauerbrey als Messprinzip für ein Wägesystem mit Empfindlichkeit im ng-Bereich genutzt. Die Erfassung der Biofilmbildung durch direkte Messung der Massenzunahme auf der Quarzoberfläche wurde von mehreren Gruppen beschrieben [NIV93, NIV95, WHI96, TIL98, HEL00] und in ersten industriellen Systemen getestet. Genauere Informationen über die auf der Oberfläche aufwachsende Schicht kann durch Erfassung der viskoelastischen Eigenschaften mit Hilfe der Quarz-Mikrowaagen-Dissipations-Messung (QCM-D) [RUD02] oder der Messung der Dämpfung der Schwingungsanregung [HAR02] erhalten werden.

Grundlage der Messung mit der Quarz-Mikrowaage ist die elektrische Anregung einer im AT-Cut geschnittenen Quarz-Scheibe zur Schwingung im MHz-Bereich. Bei Belegung der Oberfläche kommt es durch Massenzunahme des schwingenden Systems zu einer Verringerung der Schwingungsfrequenz gemäß der Gleichung von Sauerbrey (Abb. 11 c),

was bei einer Grundschiwingung von 5 MHz einer Messempfindlichkeit von ca. 20 ng / Hz im wässrigen Medium entspricht.

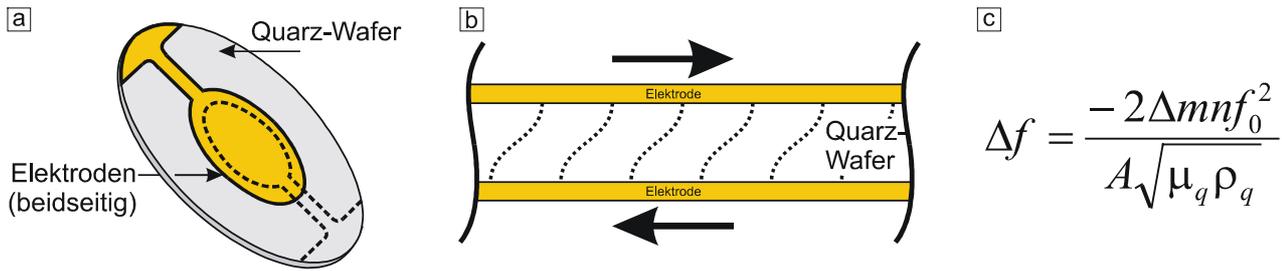


Abb. 11: Quarz-Mikrowaage: a) Aufbau Schwingquarz, b) Schwingungsanregung, c) Massenabhängigkeit von Δf

Eine Weiterentwicklung der Messtechnik stellt die Elektrochemische Quarz-Mikrowaage (E-QCM) dar [BUT92], die zusätzlich zur klassischen Massendetektion die Erfassung und Steuerung des Potentials auf der Elektrodenoberfläche des schwingenden Quarz-Wafers erlaubt.

2.7 Elektrochemische Messungen an Biofilmen

Die Detektion mikrobiologischer Besiedlung von Oberflächen ist für eine Vielzahl elektrochemischer Messverfahren, besonders im Zusammenhang mit mikrobiell induzierter Korrosion (MIC), untersucht und beschrieben worden. Hierbei kamen die Messung von Redox- und Ruhepotential, Leitfähigkeitsmessungen [NIV95], Cyclovoltametrie [VIE99], Impedanz- und Electrochemical Noise-Spektroskopie [MAN01] sowie die Rotierende Scheiben-Elektrode zur Bestimmung der Diffusionseigenschaften [TRI97] zum Einsatz. Die hierbei untersuchten Systeme sind jedoch oft durch eine Vielzahl von möglichen Prozessen (z. B. Korrosion, Abbau von technischen Schichtsystemen etc.) sehr komplex und erlauben nur selten eine eindeutige Zuordnung von Messsignalen zur mikrobiellen Besiedlung.

Der Einfluss auf den Potentialverlauf bei der Besiedlung von metallischen Oberflächen ist schematisch in Abb. 12 gezeigt. Hierbei können Veränderungen im elektrochemischen Verhalten des Werkstoffs sowohl auf eine Verschiebung des Werkstoffpotentials (①) als auch auf eine Veränderung des Potentialabfalls in der Elektrischen Doppelschicht (②) zurückgeführt werden. Zusätzlich besteht die Gefahr der Verfälschung der Messergebnisse durch Verschiebung des Bezugspotentials (③) bei mikrobieller Kontamination der Bezugselektrode.

Durch die stark heterogene Struktur der Filme, die variierende Schichtdicken von 1 - 100 μm in geringer räumlicher Distanz aufweisen kann, sind genaue Rückschlüsse auf das lokale elektrochemische Verhalten nur durch Messungen mit hoher Ortsauflösung zu erhalten.

Der Einsatz klassischer Mikroelektroden auf Basis von Glas-Kapillaren, wie er für verschiedene ausgedehnte Biofilm-Systeme beschrieben ist [BIS99, DEB98c], wird jedoch durch die filigrane Struktur (Abb. 13) der Filme in oligotrophen Systemen erschwert, die neben

kompakten Kolonien (①) auch Bereiche zeigen, die leicht durch mechanische Belastung während der Messung zerstört werden können (②).

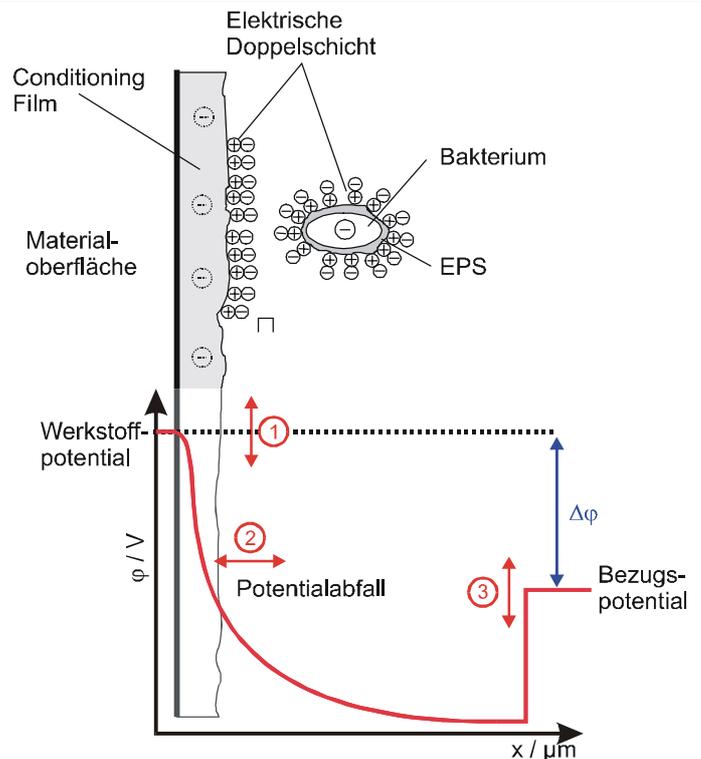


Abb. 12: Besiedlungseinfluss auf den Potentialverlauf

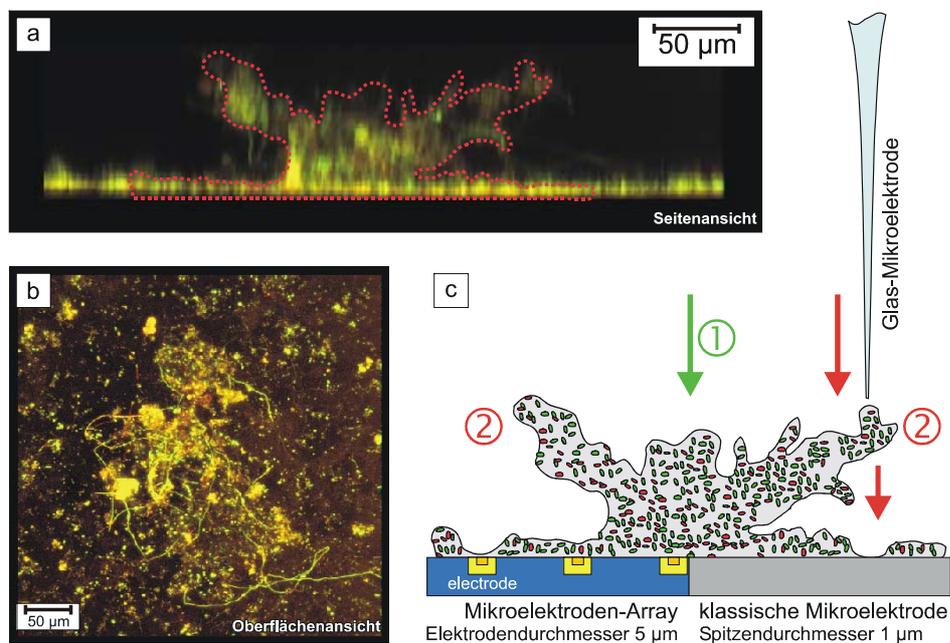


Abb. 13: Vergleich klassischer Glas-Mikroelektroden und Mikroelektrodenarrays für lokalisierte elektrochemische Messungen in Biofilmen: a, b) SCLM-Projektion eines Biofilms nach 2 Jahren; c) Vergleich der Elektrodenpositionierung: zerstörungsfreie Untersuchung durch eingebaute Mikroelektroden im Array

Als Lösung erwies sich hier der Einsatz von Mikroelektrodenarrays in Planarbauweise, die von der Arbeitsgruppe Prof. Schöning, FZ Jülich GmbH, zur Verfügung gestellt wurden (s. Abb. 29). Im Gegensatz zu Mikroelektroden, die von oben in den Biofilm eingeführt werden, erlaubten die 25 Gold-Mikroelektroden des Arrays eine Messung an der Grenzfläche Metall/Lösung ohne die Gefahr einer Deformation der Filme beim Einbringen der Elektrode. Durch die hohe Zahl von Elektroden, die identischen Aufwuchs- und Vorbehandlungsbedingungen unterlagen, konnten Vergleichsuntersuchungen ohne das Risiko von Verfälschungen bei der Präparation durchgeführt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Biofilmanzucht unter Laborbedingungen

Die Anzucht von Biofilmen unter Laborbedingungen wurde mit verschiedenen Konzentrationsstufen (1:30, 1:100) des Nährmediums R2A [REA85] durchgeführt. Hierbei wurde das Nährmedium mit einer aus Trinkwasserbiofilmen extrahierten Mischkultur geimpft (ca. 0,5 Vol%) und die Versuchsanordnung (Abb. 14 a) mit einer Peristaltikpumpe (8 ml / min) unter laminaren Strömungsbedingungen für 3 - 14 Tage im Durchfluss betrieben.

| | |
|--|----------|
| Hefeextrakt | 0.50 g/l |
| Proteose Pepton | 0.50 g/l |
| Casamino acids | 0.50 g/l |
| Glucose | 0.50 g/l |
| Lösliche Stärke | 0.50 g/l |
| Natriumpyruvat | 0.30 g/l |
| K ₂ HPO ₄ | 0.30 g/l |
| MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 0.05 g/l |

Tab. 3: Zusammensetzung des Nährmediums R2A [REA85]

Zur Untersuchung der mikrobiellen Besiedlung auf verschiedenen Werkstoffen wurden Durchflusszellen aus PMMA verwendet, bei denen die Materialcoupons in eingefrästen Kanälen mit Cyanacrylatklebstoff befestigt wurden (vgl. Abb. 17). Hierbei wurden - ausgehend von Erfahrungen aus einem Vorgängerprojekt [BRE98] - Coupons in der Größe 1 x 1 cm gewählt, um eine bearbeitungsfreie Einbringung der Materialproben in alle am Institut vorhandenen Untersuchungsverfahren und -geräte zu ermöglichen. Die Kontrolle des Bewuchses wurde durch Messung mit dem SCLM sowohl auf der Unterseite des 1 mm über der Materialprobe angebrachten Deckglases als auch auf der Couponoberfläche durchgeführt, um sowohl Informationen über den direkten Einfluss des Materials als auch über den indirekten Einfluss durch Veränderung der chemischen Zusammensetzung der Lösung (z. B. durch Korrosion der Couponoberfläche) zu erhalten. Um Störungen des Dauerbetriebs der Zellen durch die Ausbildung von größeren Luftblasen zu minimieren, wurden vier verschiedene Formen der Zuleitungskanäle, sowohl in rechtwinkliger (Abb. 14 b 1+2) als auch geneigter Form (Abb. 14 b 3+4), erstellt und im praxisnahen Durchlaufbetrieb getestet. Hierbei war nach mehrtägiger Betriebszeit kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Kanalformen zu erkennen, so dass aus

fertigungstechnischen Gründen eine rechteckige Kanalform (Abb. 14 b 1) für die weiteren Versuche gewählt wurde.

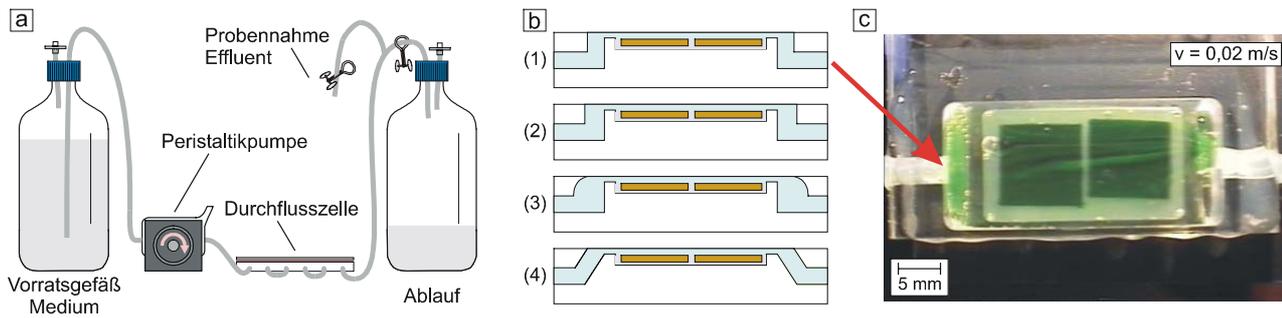


Abb. 14: a) Versuchsaufbau zur Anzucht von Biofilmen im Labor; b) Kanalquerschnitte der Durchflusszellen-Prototypen; c) Strömungsprofil des endgültigen Zellprofils bei Einschluss von Luftblasen, $v = 0,02 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$

Zur Abbildung des Strömungsverhaltens innerhalb der Zellen wurde bei verschiedenen Durchflussgeschwindigkeiten bis $0,02 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ Fluorescein in die Zelle injiziert und das Strömungsmuster mit einer Videokamera aufgezeichnet. Hierbei konnte das gewünschte gleichmäßige Strömungsverhalten auch bei Anwesenheit von Luftblasen in der Zelle (Abb. 14 c) im Video dokumentiert werden. Versuche zur Gleichmäßigkeit der mikrobiologischen Besiedlung auf den exponierten Materialoberflächen zeigten sowohl bei Besiedlung mit Zuchtbiofilmen als auch bei Inokulation mit Trinkwasser einen gleichmäßiger Bewuchs der Oberflächen.

Aufgrund der Vielzahl der Materialien wurden die im Labor verwendeten Aufbauten grundsätzlich separat vom Nährmedium, das nach den Bestimmungen der TwVO durch Autoklavieren ($121 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 h, 3 bar) sterilisiert wurde, mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Anschließend wurden die Aufbauten zusammengestellt und nach einer sterilen Vorlaufphase mit einer Mischkultur beimpft (Abb. 15).

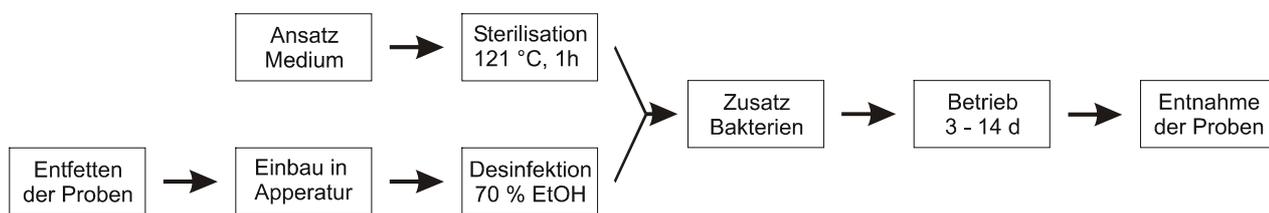


Abb. 15: Ablaufschema für Laborversuche

3.2 Untersuchungen im Technikumsmaßstab

Zur Klärung des Einflusses verfahrenstechnischer Parameter auf die Biofilmbildung wurden Werkstoffproben in verschiedenen Wasserqualitäten aus der Trinkwasseraufbereitung exponiert. Das im Bereich der Stadtwerke Düsseldorf zur Verfügung stehende Rohwasser setzt sich sowohl aus durch Filtration in Kies- und Sandschichten gereinigtem Uferfiltrat des Rheins als auch zum kleineren Teil aus Grundwasser aus dem Bereich des Bergischen Landes zusammen. Die Aufbereitung erfolgt nach dem 1961 von den SWD erstmals angewendeten „Düsseldorfer Verfahren“ (Abb. 16). Hierbei wird das Rohwasser zunächst mit 0,6 - 0,8 mg/l Ozon für 6 min versetzt, was zur Oxidation von anorganischen (Mn, Fe), organischen Bestandteilen und zur Desinfektion dient und den Sauerstoffgehalt im Wasser erhöht. Durch eine nachgeschaltete biologische Filtration in der Oberschicht der Aktivkohlefilter werden Restozon, entstandene Eisenoxide und gebildetes Permanganat durch Reduktion zu Braunstein entfernt. Gleichzeitig kann durch mikrobielle Oxidation der Gehalt an Nitrit, Ammoniumverbindungen und organischen Verbindungen gesenkt werden. Nach weiterer Reinigung des Wassers durch Adsorption organischer Inhaltstoffe an Aktivkohle wird das Wasser nach Zugabe von 1 mg/l Phosphat und 1 mg / l Silikat zur Korrosionsinhibition und Abschlußdesinfektion mit 50 - 60 µg/l Chlordioxid ins Netz abgegeben.

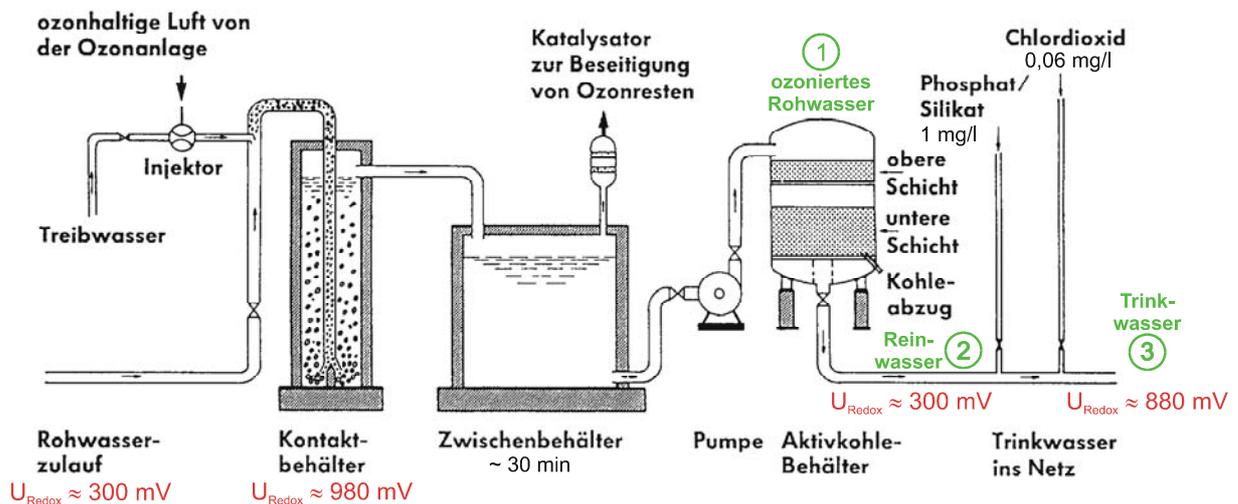


Abb. 16: Trinkwasseraufbereitung nach dem Düsseldorfer Verfahren

Zur Untersuchung der Auswirkungen der Aufbereitungsschritte auf die Besiedlung der Oberflächen wurden ozoniertes Rohwasser (①), Reinwasser (②) und Trinkwasser (③) für die Versuche verwendet (chemische Analyse siehe Tab. 4).

Material und Methoden

| Probenstelle | | PNS | Rohwasser ① | Reinwasser ② | Trinkwasser ③ |
|---|--------|-------|----------------|-----------------|------------------|
| Datum/Uhrzeit | | DAT | 17.05.01 11:00 | 17.05.01 11:30 | 17.05.01 12:10 |
| Art der Probenahme | | PNArt | drücken | drücken | drücken |
| Trübung (Aussehen), qualitativ | | TrüQl | keine | keine | keine |
| Färbung, qualitativ | | FärQl | rot | farblos | farblos |
| Bodensatz | | BoSat | nein | nein | nein |
| Geruch, qualitativ | | GerQl | stark | ohne | ohne |
| Geruchsart | | GerAr | andere | geruchlos | geruchlos |
| Ausgasung | | AusGa | nein | nein | nein |
| Temperatur | °C | Temp | 11.8 | 11.5 | 11.4 |
| pH-Wert (vor Ort gemessen) | | pHOrt | 7.03 | 6.96 | 6.96 |
| Temperatur bei Bestimmung des pH-Wertes | °C | TpH | 11.8 | 11.5 | 11.4 |
| Sauerstoff | mg/l | O2 | 6,99 | 4,8 | |
| elektrische Leitfähigkeit bei 25 °C | µS/cm | LF | 811 | 811 | 813 |
| spektraler Absorptionskoeffizient bei 254 nm | 1/m | SA254 | 0,2 | 0,96 | 0,24 |
| Färbung, spektraler Absorptionskoeffizient bei 436 nm | 1/m | SA436 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| KMnO4-Verbrauch (Oxidierbarkeit) | mg/l | CSBMn | 1,47 | 0,98 | 0,64 |
| Basekapazität bis pH 8,2 | mmol/l | KB8,2 | 0,55 | 0,63 | 0,62 |
| Temperatur bei Bestimmung der Basekapazität bis pH 8,2 | °C | TKB82 | 22,1 | 17,9 | 18,3 |
| Säurekapazität bis pH 4,3 | mmol/l | KS4,3 | 4,24 | 4,24 | 4,28 |
| Temperatur bei Bestimmung der Säurekapazität bis pH 4,3 | °C | TKS43 | 20,3 | 17,3 | 17,4 |
| Calcium | mg/l | Ca | 98 | 97 | 96 |
| Magnesium | mg/l | Mg | 12,3 | 12 | 12,1 |
| Natrium | mg/l | Na | 39 | 39 | 41 |
| Kalium | mg/l | K | 3,8 | 3,8 | 3,7 |
| Eisen, gesamt | mg/l | Fe | <0,07 | <0,07 | <0,07 |
| Mangan, gesamt | mg/l | Mn | <0,03 | <0,03 | <0,03 |
| Ammonium | mg/l | NH4 | <0,02 | <0,02 | <0,02 |
| Nitrit | mg/l | NO2 | <0,02 | <0,02 | <0,02 |
| Nitrat | mg/l | NO3 | 22,3 | 21,9 | 21,7 |
| Phosphat, gesamt | mg/l | PO4 | 0,04 | 0,09 | 1,27 |
| Kieselsäure | mg/l | SiO2 | 9,9 | 9,8 | 10,8 |
| Sulfat | mg/l | SO4 | 60 | 60 | 60 |
| Chlorid | mg/l | Cl | 80 | 80 | 80 |
| Fluorid | mg/l | F | 0,2 | 0,16 | 0,18 |
| Aluminium, gesamt | mg/l | Al | <0,01 | <0,01 | <0,01 |
| Antimon | mg/l | Sb | <0,0015 | <0,0015 | <0,0015 |
| Arsen | mg/l | As | 0,0016 | 0,0013 | 0,0013 |
| Barium | mg/l | Ba | 0,05 | 0,05 | 0,049 |
| Blei | mg/l | Pb | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| Bor | mg/l | B | 0,04 | 0,05 | 0,04 |
| Cadmium | mg/l | Cd | <0,0003 | <0,0003 | <0,0003 |
| Chrom, gesamt | mg/l | Cr | 0,021 | 0,02 | 0,02 |
| Kupfer | mg/l | Cu | 0,011 | <0,005 | <0,005 |
| Nickel | mg/l | Ni | 0,0097 | 0,0095 | 0,0095 |
| Selen | mg/l | Se | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| Quecksilber | mg/l | Hg | <0,0005 | <0,0005 | <0,0005 |
| Zink | mg/l | Zn | 0,01 | <0,005 | 0,006 |
| Thallium | mg/l | Tl | <0,002 | <0,002 | <0,002 |
| Trübung, quantitativ | TE/F | TrüQn | 1,02 | 0,34 | 0,1 |
| Geruchsschwellenwert bei 25 °C | | Ger25 | | 1 | 1 |

Tab. 4: Wasseranalyse der untersuchten Aufbereitungsstufen (Labor SWD AG)

In der Technikumsanlage (Abb. 17) wurden die Materialien Polyethylen 300 (PE), Polyvinylchlorid (PVC), VA 1.4301, VA 1.4571, Kupfer, Aluminium, Verzinkter Stahl, Teflon (PTFE), Plexiglas (PMMA) und Glas unter verschiedenen Strömungs- und Vorbehandlungsbedingungen untersucht. Die Werkstoffproben wurden dazu mit Methanol

(abs.) entfettet, mit 70 %igem Ethanol desinfiziert und sowohl direkt oder angeschliffen (600er Körnung) eingesetzt. Während die Werkstoffcoupons (Abb. 17, rechts) unter turbulenten Bedingungen ($v_{\min} = 0,5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, $R_e \approx 2700$) betrieben wurden, wurden in Durchflusszellen aus PMMA (Abb. 17, links) laminare Bedingungen ($R_e < 100$) eingestellt. Zusätzlich zur Werkstoffoberfläche wurde in diesen Durchflusszellen auch das in 1 mm Abstand zur Couponoberfläche angebrachte Deckglas untersucht, um Rückschlüsse auf Effekte durch aus dem Werkstoff austretende Stoffe ziehen zu können. Die Versuchsanlage wurde nach 6, 12, 20, 28 und 36 Wochen beprobt, wobei nach der Entnahme frische Coupons in das System eingesetzt wurden. Hierdurch ließ sich zwischen einer "Primärbesiedlung" von statistisch aus dem Wasser transportierten Mikroorganismen und der "Sekundärbesiedlung" der Werkstoffe in bereits an die Materialien adaptierter Umgebung unterscheiden.

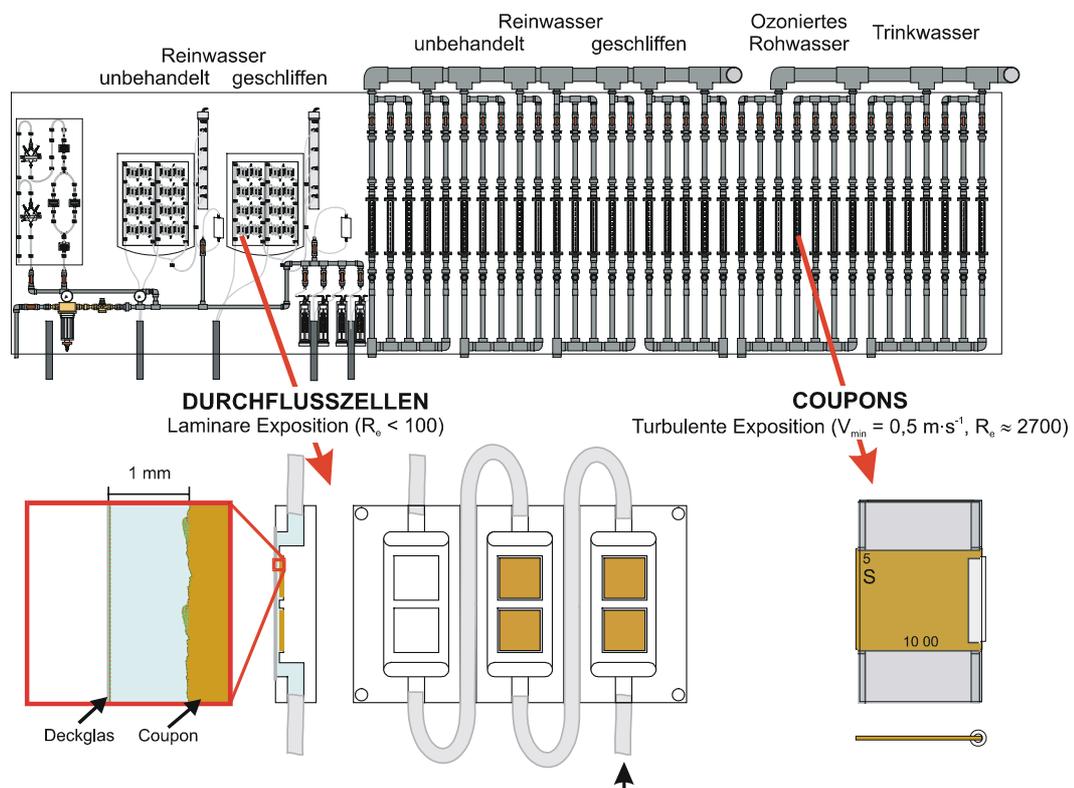


Abb. 17: Technikumsanlage zur Untersuchung von Wassertypen und Werkstoffeinfluss

Die in den Durchflusszellen montierten Coupons wurden nach dem Anfärben des einzelnen Kanals mit BacLight™ mit dem konfokalen Scanning Laser-Mikroskop (SCLM) sowohl auf der Werkstoffprobe als auch auf dem gegenüberliegenden Deckglas untersucht (Abb. 18, vgl. Abs. 3.3.1).

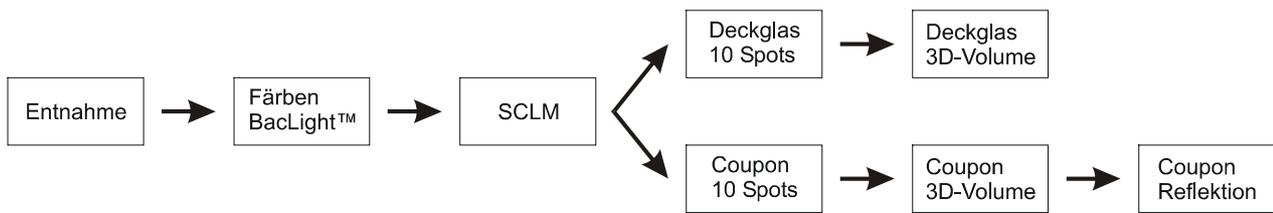


Abb. 18: Schematischer Ablauf der Analyse der Durchflusszellen aus der Technikumsanlage

Bei der Beprobung der turbulent exponierten Werkstoffproben kamen neben der konfokalen Mikroskopie weitere Analyseverfahren zum Einsatz. Bei jeder Beprobung wurden jeweils 2 Coupons je Werkstoff und Vorbehandlung entnommen. Ein Coupon wurde mit BacLight™ (Molecular Probes, Inc.) angefärbt und mit dem SCLM auf Oberflächenbedeckung sowie in größeren zeitlichen Abständen im Elektronenmikroskop (Philips XL-30 E-SEM) optisch und auch röntgenspektroskopisch (EDAX Phoenix Pro) untersucht. Die auf der Oberfläche des zweiten Coupons aufgewachsenen Mikroorganismen wurden im Ultraschallbad abgelöst und mit klassischen mikrobiologischen Verfahren untersucht. Hierbei wurde die Gesamtzellzahl mikroskopisch nach Filtration und Anfärben mit Acridin-Orange ermittelt, die Zahl der Koloniebildenden Einheiten auf R2A-Agar bestimmt und der Gehalt an Adenosin-Triphosphat (ATP) photometrisch detektiert (Abb. 19).

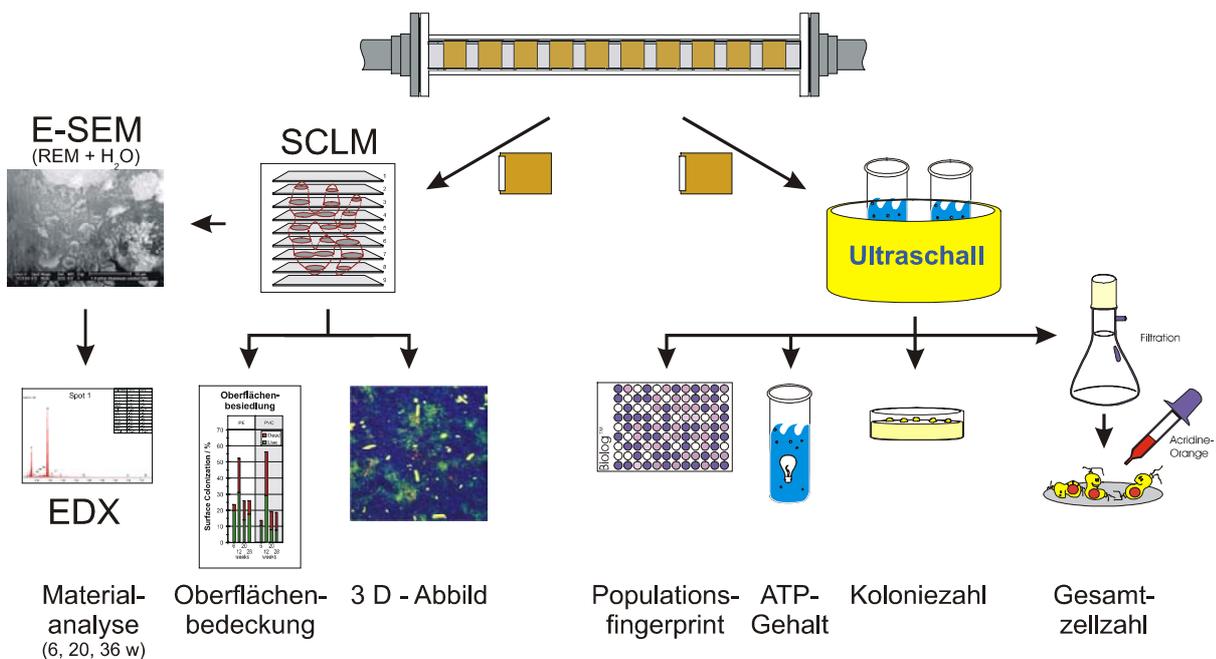


Abb. 19: Schematischer Ablauf der Analyse turbulently exponierter Coupons aus der Technikumsanlage: Übersicht über die Untersuchungsmethoden

3.3 Auswertungsverfahren

3.3.1 Konfokale Mikroskopie

Zur Charakterisierung der mikrobiologischen Besiedlung auf den Oberflächen wurden die Proben nach Anfärben mit dem Dead/Live-Farbstoffsystem BacLight™ unter dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop PCM2000 (Nikon GmbH) untersucht. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Softwarepaket EZ 2000 Viewer (Coord Automatisierung, NL) für 3D-Aufnahmen und der Auswertungssoftware ScionImage™ (Scioncorp, Ltd.) zur Berechnung von Oberflächenbedeckungsgraden. Hierbei wurde für jeweils 10 Aufnahmen der Werkstoffoberfläche mit einer Kantenlänge von 300 µm (Nikon Wasserimmersionsobjektiv 40 x, N.A. 0.8) der Flächenanteil angefärbter Organismen für zwei Farbkanäle bestimmt.

Um Verfälschungen auf rauen Oberflächen zu minimieren, wurden Bereiche außerhalb der Fokusebene mit einem Makro automatisch detektiert und bei der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt (Abb. 20).

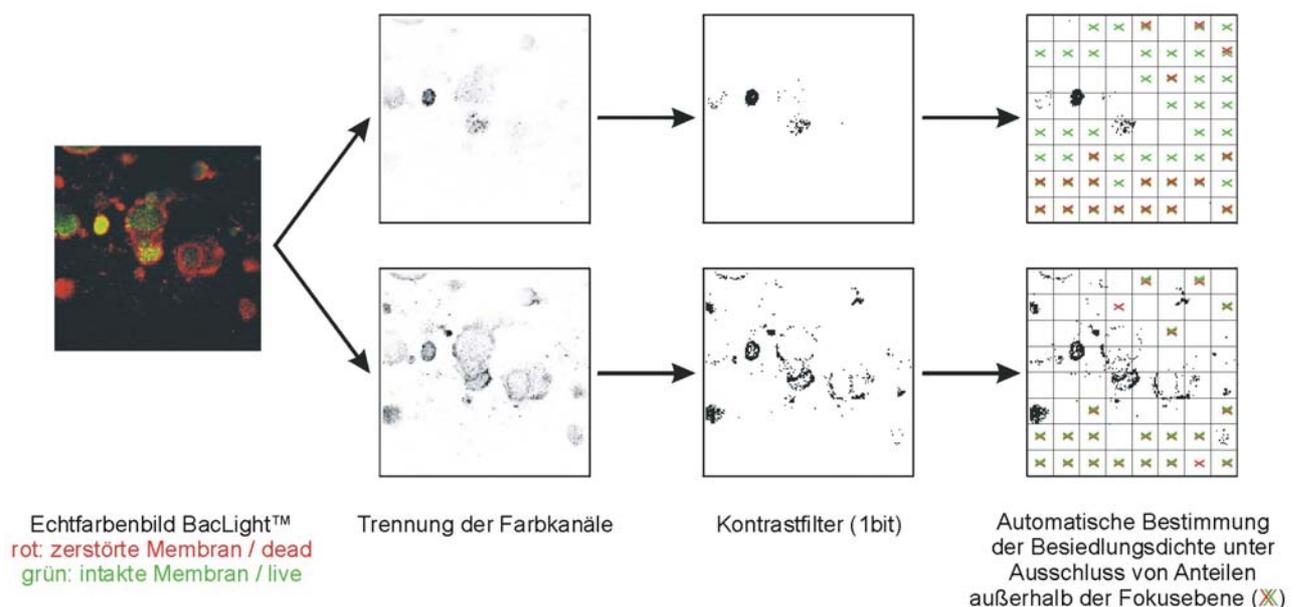


Abb. 20: Auswertung des besiedelten Flächenanteils auf rauen Oberflächen mit ScionImage™

Die dreidimensionale Struktur der Biofilme wurde für jeden Werkstoffcoupon an einem repräsentativen Messpunkt dokumentiert (s. Abb. 21). Den aufgezeichneten Fluoreszenzsignalen des Farbstoffs (grün: intakte Membran / live (a), rot: zerstörte Membran / dead (b)) wurde zusätzlich das Reflektionsbild der Oberfläche im dritten Farbkanal (c) überlagert, so dass eine Korrelation zwischen der Materialstruktur und der Besiedlung möglich war.

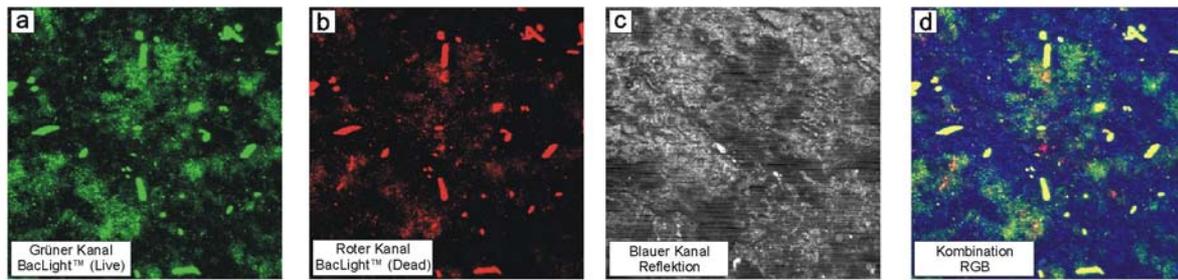


Abb. 21: Kombination der Fluoreszenz- und Reflektionsaufnahmen zur 3D-Projektion der Oberflächen

3.3.2 ATP-Bestimmung

Die Bestimmung des Adenosin-Triphosphat-Gehaltes (ATP) als Maß für die Zellaktivität wurde mit dem Lumac Biocounter M1500 Light und den entsprechenden Eichstandards durchgeführt. Das Prinzip der Messung beruht auf der Luciferin-Luciferase-Biolumineszenz-Reaktion, wobei die freigesetzte Lichtmenge der ATP-Konzentration proportional ist.

3.3.3 Zellzahlbestimmung

3.3.3.1 *Koloniebildende Einheiten (KBE)*

Die Proben und ihre verschiedenen Verdünnungsstufen wurden nach der Drigalski-Spatel-Methode auf R2A-Agar (Oxoid) ausplattiert und nach 10 Tagen Inkubation bei 20°C ausgewertet.

3.3.3.2 *Gesamtzellzahl*

Die Proben (1 – 10 ml) wurden über ein 0,2 µm Polycarbonfilter (Millipore) filtriert und mit einer Lösung von 160 mg/l Acredine Orange (AO, Sigma) für 15 min überschichtet. Anschliessend wurde die AO-Lösung abfiltriert und das Präparat mit 5 ml sterilem Wasser gespült. Der trockene Filter wurde auf einen Objektträger mit Immersionsöl gelegt, ein weiterer Tropfen Öl auf das Filter gegeben und das Präparat mit einem Deckglas abgedeckt. Die Auswertung erfolgte durch mikroskopische Auszählung bei 1000-facher Vergrößerung unter einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss).

3.3.4 Populationsfingerprint

Zur Charakterisierung der Veränderungen der mikrobiellen Population wurden Nährstoffverwertungsmuster mit Hilfe von Biolog™ GN2-MicroPlate™-Mikrotiterplatten (Biolog™ Inc.) (Abb. 22) der einzelnen Proben-Suspensionen erstellt. Diese zur Charakterisierung von Bakterien-Reinkulturen entwickelten Platten verfügen über

95 verschiedene organische Substanzen, die von Mikroorganismen als Kohlenstoffquelle für den Stoffwechsel genutzt werden können. Hierbei stehen Titerplatten sowohl für Gram-positive wie auch Gram-negative Bakterien zur Verfügung, die sich in der Auswahl der verwendeten Testsubstanzen unterscheiden. Für die hier durchgeführten Untersuchungen wurden die für Gram-negative Mikroorganismen geeigneten Platten ausgewählt, da diese Bakterienklasse die überwiegende Mehrheit der in den Filmen aufzufindenden Bakterien darstellt. Für die Reihenuntersuchungen in der Technikumsanlage wurden darüber hinaus Biolog™ EcoLog™-MicroPlate™-Mikrotiterplatten verwendet, die eine für Umweltproben optimierte Auswahl von 32 der auf den GN2-MicroPlates™ angebotenen Nährstoffe anbieten und drei Vergleichsmessungen pro Probe bei geringerem Kostenaufwand ermöglichen [CHO99].

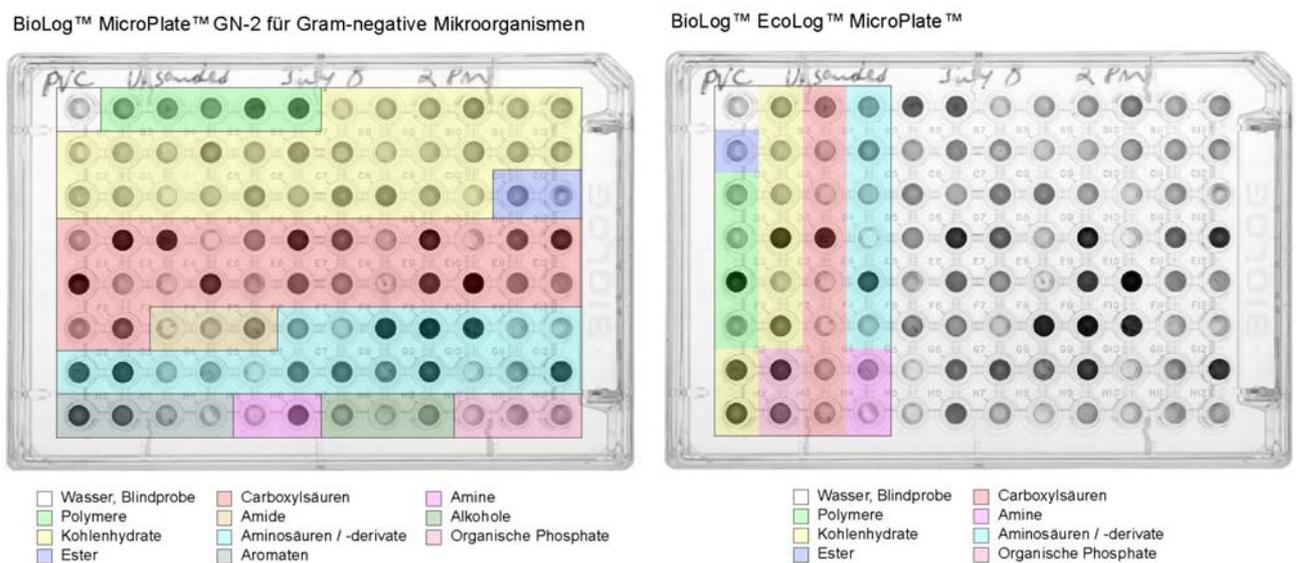


Abb. 22: Biolog™-Mikrotiterplatten - Übersicht über die angebotenen Nährstoffsorten:
links: GN2-MicroPlate™; rechts: EcoLog™-MicroPlate™

Die Indikation erfolgt hierbei über den Redoxfarbstoff Tetrazoliumviolett (3-(1-Naphtyl)-Diphenyltetrazoliumchlorid), der bei Redoxreaktionen durch Stoffwechselaktivität innerhalb der Lösung irreversibel in 3-(1-Naphtyl)-Diphenylformazan umgelagert wird [RÖM93]. Zur Kontrolle ist hierbei ein Kanal der Mikrotiterplatte nur mit dem Farbstoff gefüllt, der bei direkter Reaktion des Farbstoffs mit der zugesetzten Bakterienlösung das Versagen des Auswertungsverfahrens anzeigt.

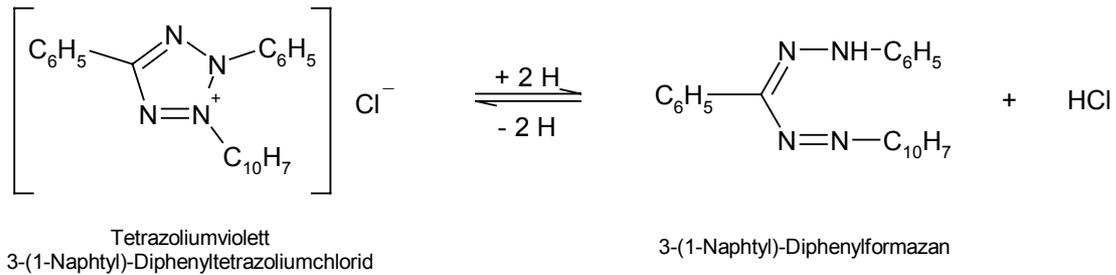


Abb. 23: Reaktionsmechanismus der Indikationsreaktion der BioLog™-Mikrotiterplatten [RÖM93]

Obwohl durch die starke Diversität der in den Biofilmen auftretenden Mikroorganismen keine eindeutige Identifizierung der einzelnen Spezies anhand ihres Nährstoffverwertungsmusters in der Biolog™-Datenbank mehr möglich ist, können durch Vergleich der Verwertungsmuster in kurzer Zeit wichtige Hinweise auf Nährstoffpräferenzen und Populationsveränderungen innerhalb der Filme gezogen werden [GAR91, CHO99], die mit nach klassischen mikrobiologischen Verfahren nur mit hohem Arbeitsaufwand über die Analyse der mikrobiellen Lipide [WHI97] ermittelt werden könnten. Die Auswertung erfolgte automatisiert über einen Flachbettscanner mit Durchlichteinheit und dem Auswertungsprogramm ScionImage™ (Scion Corp.).

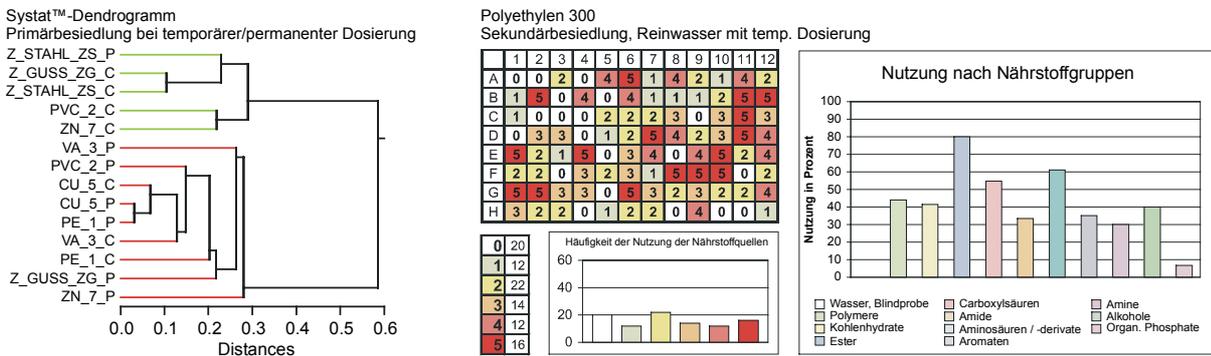


Abb. 24: Auswertung der Biolog™-Ergebnisse: Links: Statistischer Vergleich der Verwertungsmuster mit Systat™: Dendrogramm nach 15 Wochen Besiedlung verschiedener Werkstoffe, Rechts: Beispielhafte Auswertung der Nutzungshäufigkeit und Verteilung auf einzelne Nährstoffgruppen für die Sekundärbesiedlung bei PE 300

Der Vergleich der erhaltenen Daten wurde mit Hilfe des Statistikprogramms Systat (Systat Software Inc.) durchgeführt. Die hierbei erhaltenen Dendrogramme (Abb. 24 links) geben die mittlere Ähnlichkeit der Verwertungsmuster an und erlauben somit einen qualitativen Vergleich der Populationen. Zusätzlich kann durch Vergleich der Verwertungshäufigkeit und der Nutzung nach Nährstoffgruppen ermittelt werden, ob es sich um stark spezialisierte Biofilme mit Konzentration auf wenige Nährstoffe oder eine breite Populationszusammensetzung handelt, die die verschiedenen Nährstoffe statistisch nutzt.

3.4 Einfluss der Probenvorbereitung

Zur Untersuchung der Auswirkungen der in der Literatur beschriebenen Präparationsvorschriften wurde VA 1.4571 in sieben verschiedenen Oberflächenbehandlungen (Tab. 5) in Durchflusszellen für 15 Tage mit R2A (1:100) besiedelt. Nach dem Einbau der Proben wurden die Versuchsaufbauten mit 70 %igem Ethanol desinfiziert, bevor die mit einer Bakterienmischkultur geimpfte R2A im Auslauf durch die Anordnung gepumpt wurde. Nach 5, 10 und 15 Tagen wurde jeweils 1 Kanal der Durchflusszellen mit BacLight™ angefärbt und Coupon und Deckglas mit dem SCLM untersucht. Weiterhin wurde der Auslauf der Zellen beprobt und das Nährstoffverwertungsspektrum der ausgetragenen Organismen mit Biolog™ dokumentiert. Nach Abschluss der Messungen wurden die Coupons mit REM und EDX oberflächenanalytisch untersucht.

| Vorbereitung | Parameter |
|------------------------------|--|
| unbehandelt | Lieferzustand, Desinfektion der Durchflusszelle mit 70 %igem EtOH (20 min) und Spülen mit sterilem H ₂ O für 10 min. |
| mechanisch poliert | Schleifen der Oberfläche (P600, C. F. Schröder Schleifpapier AC58), Entfernen der Partikel mit H ₂ O. Desinfektion der Durchflusszelle mit 70 %igem EtOH (20 min) und Spülen mit sterilem H ₂ O für 10 min. |
| elektropoliert | Elektropolitur nach C. L. Faust: 15 % H ₂ SO ₄ , 43 % H ₃ PO ₄ , 42 % H ₂ O, 2 min bei 27 °C, 1.6 A Gleichstrom. Desinfektion der Durchflusszelle mit 70 %igem EtOH (20 min) und Spülen mit sterilem H ₂ O für 10 min. |
| entfettet mit Methanol | Reinigung im Ultraschallbad mit MeOH abs. für 3 min, Spülen mit dest. H ₂ O, Ultraschallbad mit dest. H ₂ O für 5 min. Desinfektion der Durchflusszelle mit 70 %igem EtOH (20 min) und Spülen mit sterilem H ₂ O für 10 min. |
| Reinigung mit Tensidmischung | Reinigung mit Gradoline™-Tensidmischung (Chemetall GmbH, Frankfurt) bei 60 °C für 3 min, Abspülen mit dest. H ₂ O. Desinfektion der Durchflusszelle mit 70 %igem EtOH (20 min) und Spülen mit sterilem H ₂ O für 10 min. |
| Schweißnaht, unbehandelt | Schutzgasschweißnaht, Lieferzustand mit Anlauffarben/Zunderschichten. Desinfektion der Durchflusszelle mit 70 %igem EtOH (20 min) und Spülen mit sterilem H ₂ O für 10 min. |
| Schweißnaht, gebürstet | Schutzgasschweißnaht, Lieferzustand, Entfernung der Anlauffarben/Zunderschichten durch Drahtbürste. Desinfektion der Durchflusszelle mit 70 %igem EtOH (20 min) und Spülen mit sterilem H ₂ O für 10 min. |

Tab. 5: Vorbereitungseinfluss auf VA 1.4571: Übersicht der verwendeten Oberflächenpräparationen

3.5 Desinfektion

Die Effektivität von Desinfektionsmitteln auf Biofilme wurde für Natriumhypochlorit (NaOCl) und für Wasserstoffperoxid (H₂O₂) bei jeweils fünf Konzentrationen bestimmt. Diese wurden mit Bezug auf die im DVGW Regelwerk, Technische Regel W 291 „Reinigung und Desinfektion von Wasserverteilungsanlagen“ (Stand März 2000), vorgeschlagenen bzw. vorgeschriebenen Wirkstoffgehalte für die Desinfektion von Rohrleitungen, bzw. Behältern und Anlagenteilen ausgewählt. Hierbei wurden sowohl im Labor auf drei unterschiedlichen Werkstoffen angezüchtete Biofilme als auch Coupons für sieben Werkstoffe aus der Technikumsanlage untersucht.

3.5.1 Laborbiofilme

Für die Vorversuche im Labormaßstab wurden zunächst auf den Werkstoffen Polyethylen (PE), Kupfer und Glas in Durchflusszellen Biofilme unter Durchfluss des Nährmediums R2A (1:100) für 5 (NaOCl) bzw. 9 Tage (H₂O₂) angezüchtet. Die Desinfektion erfolgte nach Trennung der Kanäle durch Zugabe von jeweils 5 ml der Desinfektionsmittellösung bei einer Wirkzeit von 30 Minuten unter Stagnation. Hierbei wurden ausgehend von konzentrierten Lösungen (NaOCl, 13 % akt. Chlor, Merck KGaA; Perhydrol, 30 %, Merck KGaA) folgende Wirkstoffkonzentrationen eingestellt:

Wasserstoffperoxid (H₂O₂): 0,15 g/l (DVGW Empfehlung für Rohrleitung), 1,5 g/l, 15 g/l (DVGW Grenzwert für Behälter und Anlagenteile), 30 g/l, 100 g/l

Natriumhypochlorit (NaOCl): 10 mg/l; 25 mg/l; 50 mg/l (DVGW Empfehlung für Rohrleitung); 100 mg/l, 200 mg/l

Hierbei erfolgte die Dosierung der einzelnen Konzentrationen in den Kanälen der Durchflusszellen entsprechend der in Abb. 25 a gezeigten Reihenfolge, um die Ergebnisse vergleichen zu können. Nach dem Spülen mit 10 ml sterilem Wasser und zehnmütiger Ruhezeit wurden die Proben mit BacLight™ angefärbt und mit dem SCLM die Oberflächenbedeckung und das Tot-Lebend-Verhältnis an 10 Punkten von Oberfläche und Deckglas der Durchflusszellen bestimmt. Zusätzlich wurden repräsentative Punkte der Oberflächen dreidimensional dokumentiert.

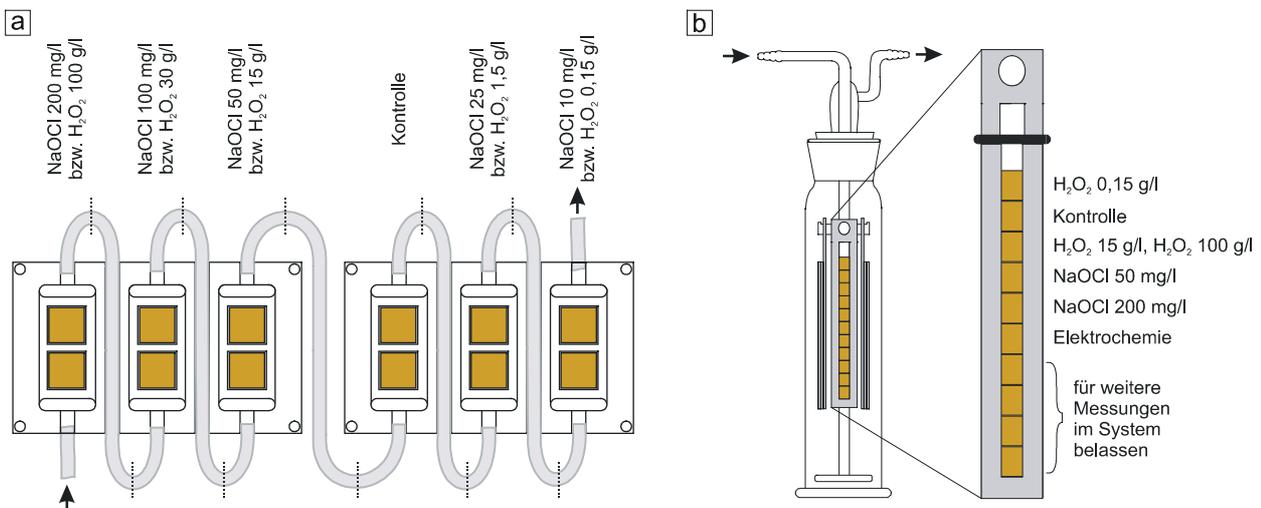


Abb. 25: Proben für Desinfektionsversuch: a) Durchflusszellen; b) Proben aus der Technikumsanlage

3.5.2 Biofilme aus der Technikumsanlage

Nach Abschluss der Vorversuche im Labor wurden für Proben, die in der Technikumsanlage in adaptierten Waschflaschen (Abb. 25 b) für 14 Monate unter laminaren Bedingungen exponiert waren, folgende Desinfektionsmittelkonzentrationen ausgewählt:

Wasserstoffperoxid (H_2O_2): 0,15 g/l (DVGW Empfehlung für Rohrleitung),
15 g/l (DVGW Grenzwert für Behälter), 100 g/l

Natriumhypochlorit (NaOCl): 50 mg/l (DVGW Empfehlung für Rohrleitung); 200 mg/l

Die Proben wurden aus der Waschflasche entnommen und mit jeweils 10 ml der Lösungen in einer Petrischale für 30 Minuten überschichtet. Im Anschluss wurden die Proben für 10 Minuten in 20 ml steriles Wasser überführt, danach mit BacLight™ angefärbt und unter dem SCLM analog zu den Vorversuchen untersucht. Zur Kontrolle wurde zusätzlich jeweils ein Coupon pro Material ohne Desinfektion untersucht.

3.5.3 Einfluss auf das elektrochemische Verhalten

Zur Untersuchung des Desinfektionsmitteleinflusses auf das elektrochemische Verhalten vor und nach Besiedlung mit Biofilmen wurden jeweils 10 Elektroden (Fläche $0,5 \text{ cm}^2$) aus Gold, VA 1.4301 und Kupfer für 14 Tage in R2A 1:100 mit einem Laborbiofilm besiedelt. Nachfolgend wurden die Auswirkungen von jeweils 10 min Desinfektion mit Wasserstoffperoxid (0.15 g/l und 15 g/l) und Natriumhypochlorid (50 mg/l und 200 mg/l) auf Besiedlungsdichte und -vitalität, die Potentialentwicklung während des Desinfektionsmitteleinsatzes, das Impedanzspektrum und das Zyklovoltamogramm der Proben in 0,1 m Na_2SO_4 -Lösung untersucht.

Zur Bestimmung der Oberflächenbedeckung wurde ein zweiter, direkt neben der elektrochemisch vermessenen Probe angebrachter Werkstoffcoupon direkt nach Ende der Desinfektion entnommen, in steriles Wasser überführt und anschließend nach den in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Verfahren mit dem SCLM analysiert.

Die elektrochemische Untersuchung umfasste die direkte Messung des Ruhepotentials in Reinwasser während der 10-minütigen Desinfektionswirkung. Hierbei wurde die Potentialaufzeichnung 1 min vor der Zugabe des Desinfektionsmittels gestartet, um verlässliche Werte für das Ausgangspotential zu erhalten. Als Bezugselektrode kam eine Quecksilbersulfatelektrode ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{SO}_4/0,1 \text{ m Na}_2\text{SO}_4$) zum Einsatz.

Nach Abschluss der Potentialmessung wurden die Proben mit dest. Wasser ab gespült und das Reinwasser gegen eine 0.1 m Na₂SO₄-Lösung ausgetauscht. Am Ruhepotential wurde das Impedanzspektrum bestimmt, bevor die Proben zykl voltametrisch (10 Zyklen, 50 mV/s) untersucht wurden.

3.6 Elektrochemische Messungen an Biofilmen

3.6.1 Bezugs Elektroden

Die Gewährleistung eines konstanten Bezugspotentials über einen Zeitraum von mehreren Wochen erwies sich für Messungen im Trinkwasser für technische Systeme als schwierig. Neben einer ungenügenden Sterilisierbarkeit der kommerziell erhältlichen Systeme zeigten Labormessungen deutliche Abweichungen durch die Besiedlung der zum elektrolytischen Kontakt genutzten Glasmembranen. Aus diesen Gründen wurde eine H₂-Generator-Bezugs elektrode (s. Abb. 26) für den Einsatz im Technikumsaufbau weiterentwickelt, die sowohl im Autoklaven sterilisierbar ist als auch durch H₂-Entwicklung am Pt-Draht eine reversible Potentialeinstellung auch nach starker mikrobiologischer Besiedlung ermöglicht. Vor jeder Messung wurde durch Anlegen einer Spannung zwischen Gold-Gegenelektrode und Pt-Draht in der Elektrodenspitze Wasserstoff erzeugt, der die Glasglocke vollständig ausfüllte und für Systeme mit konstantem pH-Wert ein verlässliches Ruhepotential einstellte. Abb. 26 b zeigt die Potentialeinstellung einer für 5 Tage in R2A mit Biofilm besiedelten Elektrode nach 10 min H₂-Entwicklung.

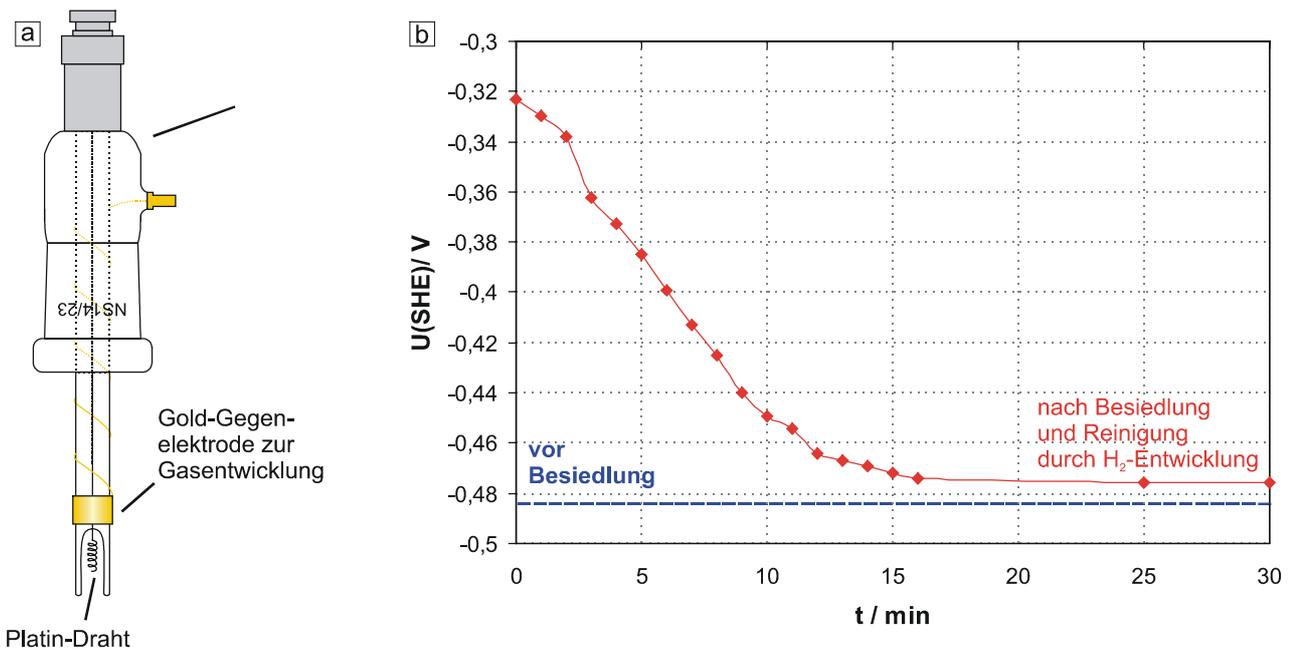


Abb. 26: Erweiterte H₂-Generator-Bezugs elektrode für Sterilmessungen:
 a) Aufbau; b) Potentialverlauf in Reinwasser nach H₂-Entwicklung für 10 min

Die Oberfläche der Elektrode wurde sowohl vor als auch nach der Gasentwicklung mit dem SCLM und dem Live-Dead-Farbstoff BacLight™ untersucht. Hierbei zeigte sich eine deutliche Abnahme der Bakterien mit intakter Zellmembran (grün angefärbt, Abb. 27) auf der Platinoberfläche nach der Wasserstoffentwicklung, die auf die reduktive Zerstörung der Zellmembranen hinweist.

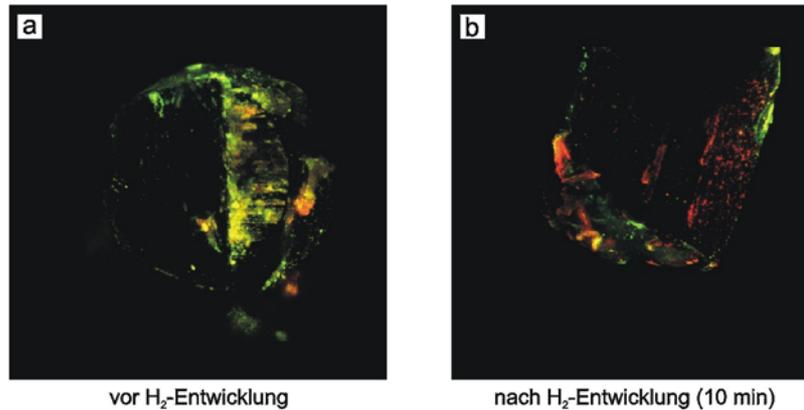


Abb. 27: SCLM-Messung mit BacLight™ Dead-Live-Stain: Platin-Draht, Schnittkante, a) vor und b) nach H₂-Entwicklung

Für Messungen im Labormaßstab kamen sowohl klassische Quecksilbersulfatelektroden (Hg/Hg₂SO₄/0,1 m Na₂SO₄) als auch Ag/AgCl-Systeme zum Einsatz.

3.6.2 Potentialmessungen im Trinkwassersystem

Vergleichende Untersuchungen zum Verhalten bei Besiedlung im Trinkwassersystem wurden für sechs verschiedene metallische Werkstoffe (Gold, Platin, VA 1.4301, VA 1.4571, Kupfer und Aluminium) in-situ durchgeführt. Nachdem Vorversuche gezeigt hatten, dass eine Analyse des mikrobiellen Einflusses auf den zeitlichen Potentialverlauf nur im Vergleich mit parallel eingebrachten Proben möglich ist, die unter sterilen, aber chemisch identischen Bedingungen betrieben werden, wurde mit Hilfe von mehreren kaskadierten Membranfiltern (Sartorius Sartopure, 1,2 und 0,2 µm Porendurchmesser) eine Sterilfiltration des zugeführten Trinkwassers realisiert (Abb. 28). Die Messaufbauten wurden durch Autoklavieren; die Einzelelektroden durch Entfetten mit Methanol und Desinfektion mit 70 %igem Ethanol sterilisiert und in der sterilen Werkbank zusammengesetzt. Als Bezugs elektrode kam sowohl im sterilen als auch im bewachsenen System eine H₂-Generatorelektrode zur Anwendung, die durch Gasentwicklung (4 x 30 min/Tag) gereinigt wurde. Nach Abschluss der Messungen erfolgte eine Vergleichsmessung mit einer klassischen Bezugs elektrode (Hg/Hg₂SO₄/0,1 m Na₂SO₄) zur Überprüfung der Absolutwerte.

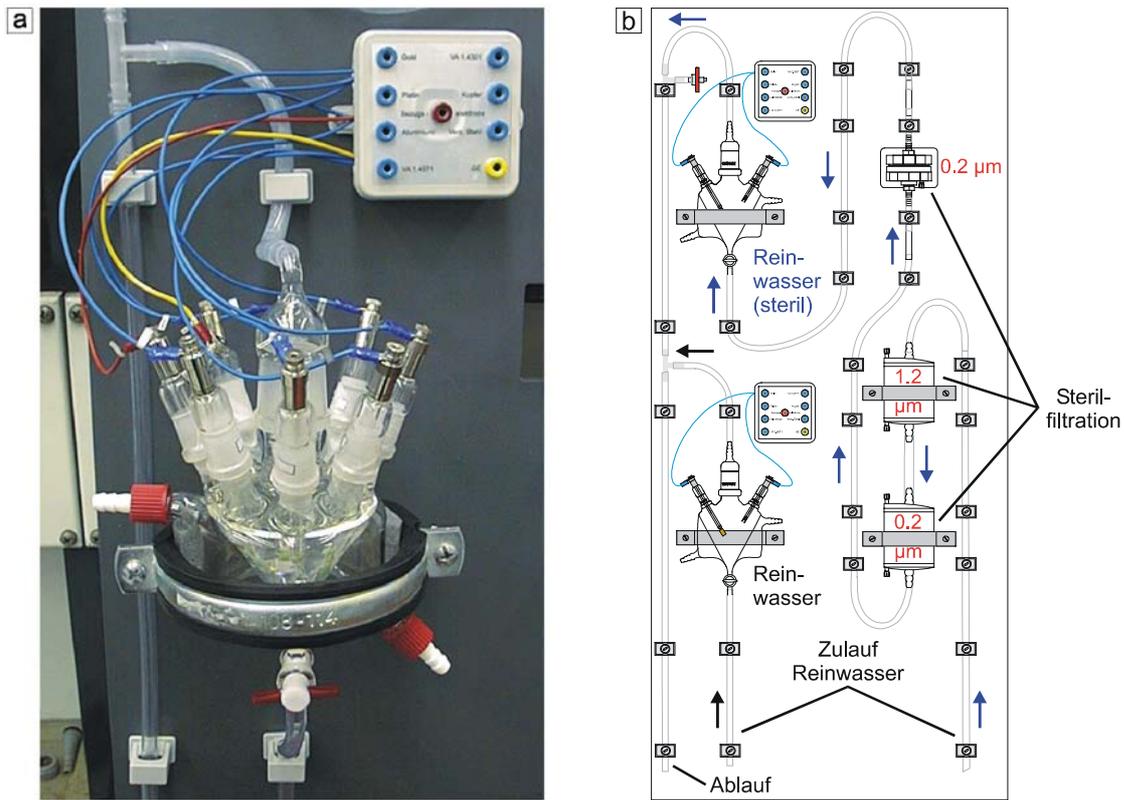


Abb. 28: Aufbau zur Potentialmessung im Trinkwasser: a) Messzelle für 8 Proben; b) Gesamtaufbau mit Sterilfiltration

Die Potentialmessungen erfolgten jeweils täglich 30 min nach Ende der Wasserstoffentwicklung, um eine ausreichende Potentialstabilisierung zu gewährleisten. Im Gegensatz zu den Vorversuchen im Labormaßstab zeigten sich bei der Bezugselektrode für einzelne Messungen Abweichungen um ca. 200 mV vom Referenzpotential, die durch Vergleich mit der ebenfalls durch Gasentwicklung gereinigten Gold-Gegenelektrode ermittelt und durch Normung auf die Gegenelektrode kompensiert werden konnten. Nach Abschluss der Messungen wurden die Elektroden mit BacLight™ angefärbt mit dem SCLM untersucht.

3.6.3 Mikroelektrochemische Messungen

Für Messungen des mikrobiellen Einflusses auf das elektrochemische Verhalten besiedelter Oberflächen wurde ein von der AG Prof. Schöning, FZ Jülich, zur Verfügung gestelltes Mikroelektrodenarray in Silizium-Planarbauweise zum Einsatz in einer Durchflusszelle (Abb. 29 a) modifiziert. Das Elektrodenarray bietet 25 planare Gold-Mikroelektroden mit einem Durchmesser von 5 μm, die quadratisch im Abstand von 50 μm angeordnet sind (Abb. 29 b) und über eine Leiterplatte einzeln adressiert werden können. Zusätzlich sind auf dem Array zwei Gegenelektroden mit 200 μm Durchmesser vorhanden, die die Aufnahme von Strom-Spannungskurven ohne Einbringung weiterer

Elektroden ermöglichen. Durch die Verkapselung der Leiterbahnen mit einer Triplex-Passivierung ($\text{SiO}_2/\text{Si}_3\text{N}_4$) wurde der Einfluss auf die Mikroorganismen minimiert. Die Bonding-Drahnte des Arrays wurden mit einem Plexiglas-Deckel und Silikonkleber (Scrintec 600/608, Scrint GmbH) abgedeckt.

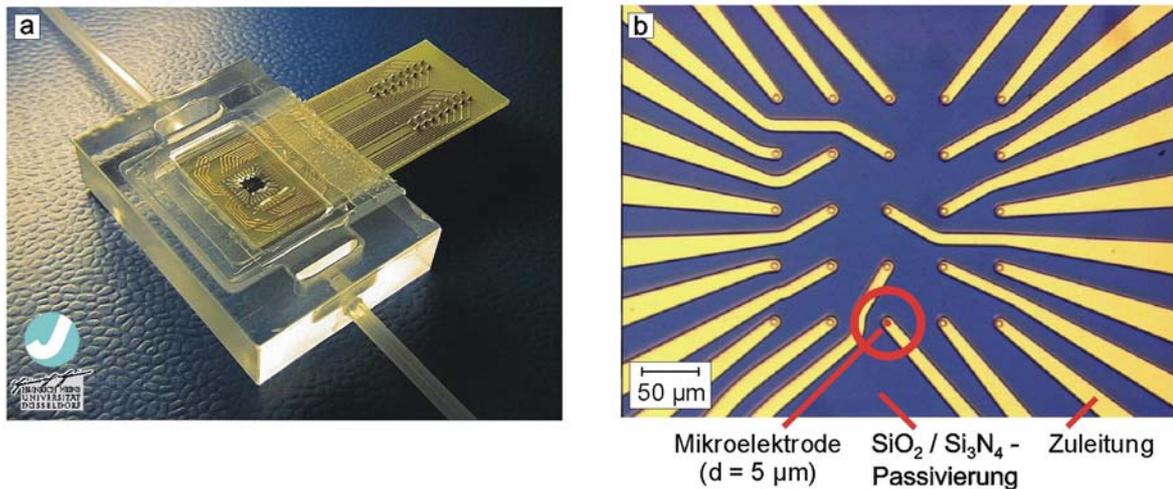


Abb. 29: Durchflusszelle mit Elektrodenarray: a) Zelle, b) Mikroskopaufnahme des Elektrodenarrays

Die elektrochemischen Messungen wurden unter Verwendung von Nährmedium (R2A) oder nach Ersatz mit 0.1 m Na_2SO_4 durchgeführt. Hierbei wurden zur Potentialmessung ein hochohmiges Messsystem mit Impedanzwandler unter Kontrolle des Signals mit einem Oszilloskop verwendet, um Störungen durch kapazitive Ströme ausschließen zu können (Abb. 30). Für spätere Messungen kam eine mobile Version des Impedanzwandlers (HIVA, Eigenentwicklung AGEF) zum Einsatz.

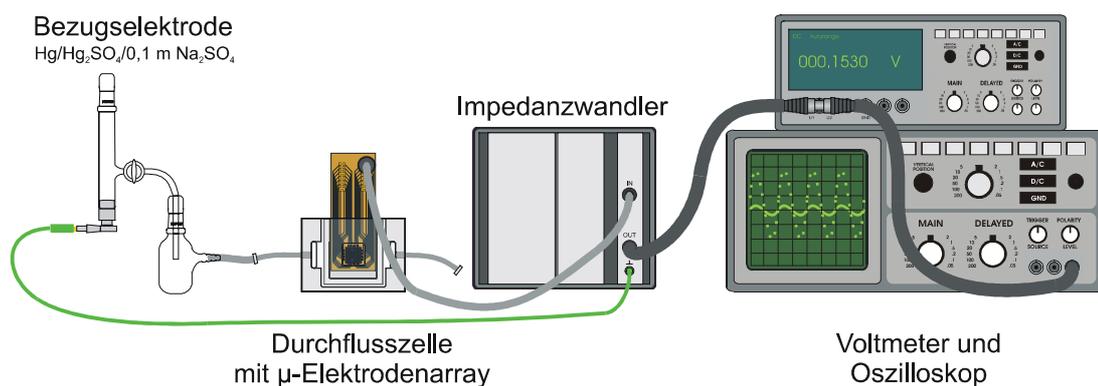


Abb. 30: Messaufbau zur Messung der Mikroelektrodenarrays

Die Desinfektion erfolgte durch Zusatz von 70 %iger Ethanol-Lösung für 10 min und einer Wartezeit von 1 Stunde in 0.1 m Na_2SO_4 . Zur oxidativen Reinigung der Arrays wurde 10%iges H_2O_2 für 30 min eingesetzt. Die optische Untersuchung der Biofilme auf der

Oberfläche des Arrays wurde nach Austausch des Elektrolyten gegen eine BacLight™-Lösung durchgeführt, um eine gleichmäßige Anfärbung der Oberfläche zu gewährleisten.

3.6.4 Messungen an bakteriellen Alginaten (EPS)

Zur Bestimmung des Einflusses eines reinen EPS-Films auf das elektrochemische Verhalten von Proben wurden lokale Messungen an Goldoberflächen durchgeführt. Diese wurden mit verschiedenen dicken Filmen eines aus mucroiden *Pseudomonas aeruginosa* SG 81 extrahierten Alginats beschichtet, das von der Arbeitsgruppe von Prof. Flemming, Universität Duisburg, zur Verfügung gestellt wurde.

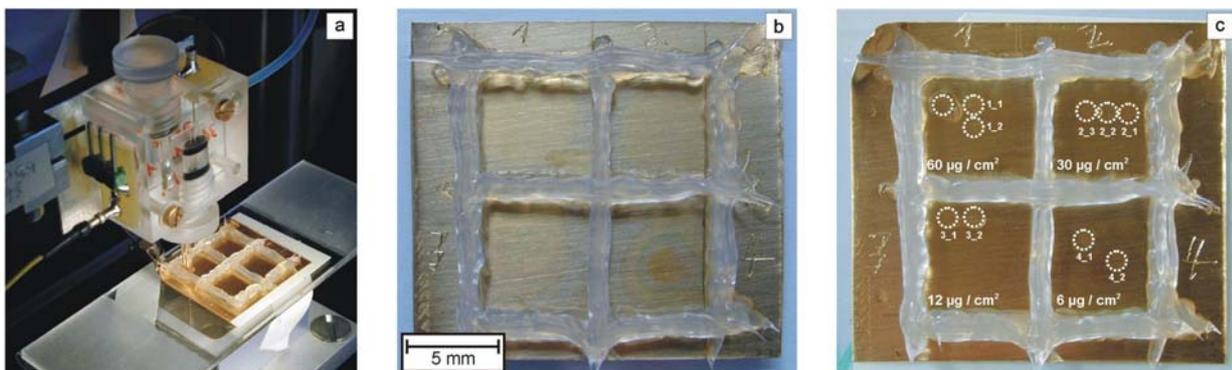


Abb. 31: Vermessung der EPS-belegten Goldoberfläche: a) Kapillar-Aufsatzzelle; b) Oberflächen vor der Messung; c) Messpunkte

Ausgehend von einer wässrigen Lösung wurden Schichten von 6, 12, 30 und 60 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ des Alginats hergestellt. Nach Eintrocknen wurden jeweils mehrere Punkte der Oberfläche mit einer Kapillar-Aufsatzzelle (Abb. 31 a) angefahren und elektrochemisch durch Zyklovoltamogramme (0,1 m Acetatpuffer; $dU/dt = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$) und Kapazitätsmessungen charakterisiert. Während die Bedeckungen für 12, 30 und 60 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ relativ homogene Schichten zeigten, wies die Probe mit 6 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ Alginat deutlich sichtbare Schichtdickenabweichungen auf, die bei der Wahl der Messpunkte berücksichtigt wurden.

3.6.5 Elektrochemische-Quarz-Mikrowaage (E-QCM)

Zur gravimetrischen Detektion der Biofilmbesiedlung wurde eine Quarz-Mikrowaagen-Durchflusszelle (Abb. 32 a) entwickelt, die neben einer kontinuierlichen Erfassung der Schwingungsfrequenz unter Durchfluss von Nährmedium eine optische Betrachtung der Quarzoberfläche mit dem SCLM erlaubte. Hierbei kamen Chrom-Gold-bedampfte Schwingquarze ($\varnothing 13 \text{ mm}$, Quarz-Technik Daun GmbH) mit einer Resonanzfrequenz von 5 MHz zum Einsatz, die mit Silikonkleber (Srintec 600, Srint GmbH) auf eine PTFE-Platte montiert wurden, um eine Schwingungskopplung mit dem Plexiglas-Gehäuse der

Durchflusszelle zu minimieren. Das Nährmedium wurde mit einer Peristaltikpumpe (Ismatec MS Reglo) in einen belüfteten Tropfbehälter mit Überlauf gepumpt, der einen konstanten hydrostatischen Druck zur Versorgung der Zelle bei Entkopplung von den Druckstößen der Pumpe gewährleistet (Abb. 32 b). Die Quarz-Schwingungsfrequenz wurde mit einem Frequenzzähler (Hewlett Packard 53131 A) detektiert und per Computer registriert. Das Ruhepotential der Gold-Elektrode des Schwingquarzes wurde mit einem Impedanzwandler gegen eine makroskopische Bezugs elektrode gemessen und auf einem Schreiber dokumentiert. Um die Effekte mikrobieller Besiedlung von Adsorptionsphänomenen oder einer Drift der Versuchsanordnung trennen zu können, wurde die Anordnung vor Zugabe der Bakteriensuspension (5 Vol%) für 24 h mit sterilem Nährmedium betrieben. Die Charakterisierung der Biofilme erfolgte nach Ende der Messungen durch Anfärben mit BacLight™ und Untersuchung mit dem SCLM.

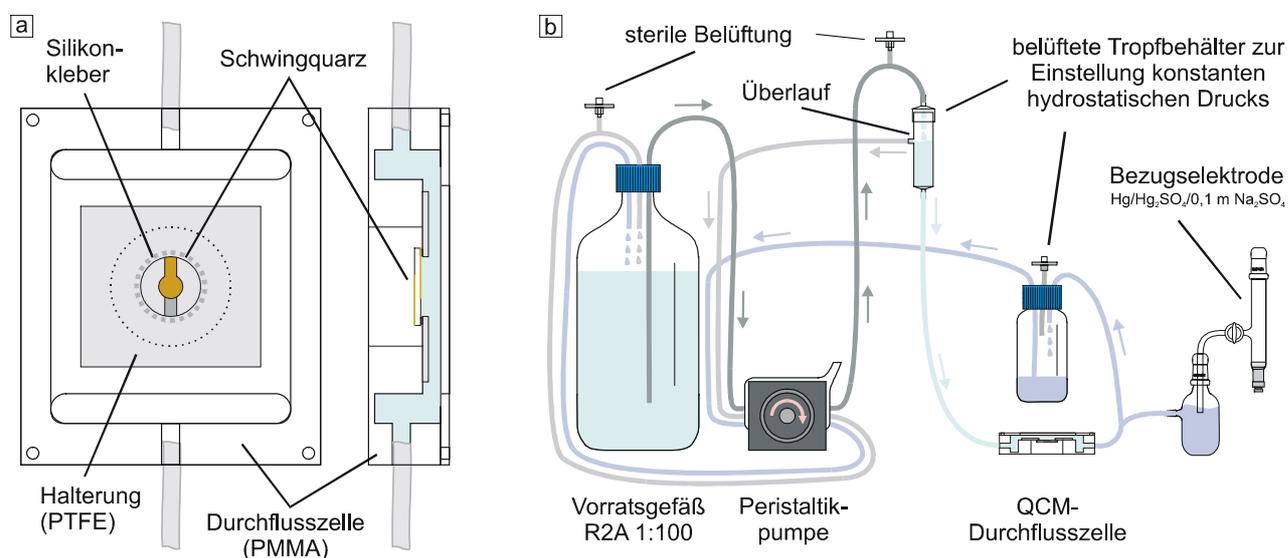


Abb. 32: Elektrochemische Quarz-Mikrowaage: a) Aufbau der Durchflusszelle;
b) Versuchsanordnung zur konstanten Zuführung des Nährmediums

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss der Probenvorbehandlung

In den letzten 15 Jahren sind mehrfach vergleichende Untersuchungen zum Materialeinfluss der Biofilmbildung in der Literatur publiziert worden. Bei Durchsicht der Versuchsbeschreibungen sind bereits bei der Auswahl der Oberflächenqualitäten und der Vorbehandlung der Proben vor Einsatz in den Messaufbauten deutliche Unterschiede zwischen den Publikationen festzustellen (Tab. 6).

| Werkstoff | Vorbehandlung | Literatur |
|-------------------------|--|-----------|
| Aluminium | Polieren (P600, 0.05 µm Al ₂ O ₃), Spülen mit dest. H ₂ O | [BUS98a] |
| Edelstahl | Autoklavieren | [JOH95] |
| Glas | Waschen mit Seife, Spülen mit dest. H ₂ O, Heißluftsterilisation | [EGI95] |
| Kupfer, Aluminium 204 | Polieren (P240) | [JAY99] |
| PVC, HDPE | 70%iges EtOH, Spülen mit dest. H ₂ O | [MURD99] |
| PVC, PE | NaOCl (4 mg Cl ₂ /l), Spülen mit dest. H ₂ O | [ZAC00] |
| PVC, Polystyrol, SS 316 | Waschen mit Seife, Spülen mit dest. H ₂ O, Lagerung in 70%igem EtOH | [EGI95] |
| SAE 1018 Steel | Polieren (P240) | [JAY97] |
| Titan, Grade 2 | Anätzen in 10%iger HNO ₃ , Polieren (P400), Entfetten (Aceton), Spülen mit dest. H ₂ O | [EAS95] |
| VA 1.4301 | Autoklavieren | [BRE99] |
| VA 1.4301 | Passivieren in 50%iger HNO ₃ , Spülen mit dest. H ₂ O, Autoklavieren | [FLI00] |
| VA 1.4301 | Polieren (3 µm Diamant), Spülen mit Seife und dest. H ₂ O | [GEO00] |
| VA 1.4301 | Passivieren in 40%iger HNO ₃ , Spülen mit dest. H ₂ O | [JAI95] |
| VA 1.4301 | Autoklavieren | [ZAC00] |
| VA 1.4301, VA 1.4571 | Entfetten (Ultraschall, Aceton), 70 %iges EtOH | [PER98] |
| VA 1.4571 | Autoklavieren | [DEB95a] |
| VA 1.4571 | Polieren (P600), Spülen mit 95%igem EtOH, Trocknen | [DIC96] |
| VA 1.4571 | Polieren (P150 - P1000, 3 µm Al ₂ O ₃) | [GON98] |
| VA 1.4571 | Ultraschall in 90%igem EtOH, Polieren (P600), Trocknen an Luft | [LEW00] |
| VA 1.4571 | Polieren (P600), Ultraschall mit dest. H ₂ O, Spülen (95 %iges EtOH), Trocknen an Luft | [LEW96a] |
| VA 1.4571, Grade 2 B | Passivieren in 50 % HNO ₃ | [GEE97] |

Tab. 6: Übersicht über die Werkstoffvorbehandlung bei Vergleichsuntersuchungen zur Biofilmbildung

Da bei den hier vorgestellten Vorbehandlungsmethoden z. T. deutliche Veränderungen der Oberflächenstruktur und -chemie der untersuchten Werkstoffe zu erwarten sind, konnte ein Präparationseinfluss auf die Besiedlungskinetik der Biofilme nicht ausgeschlossen werden. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden an gewalzten Blechen aus VA 1.4571 exemplarische Untersuchungen zu den Auswirkungen von sieben verschiedenen Oberflächenbehandlungen (Tab. 5) durchgeführt. Hierbei wurden die Proben sowohl im Lieferzustand, nach chemischer Reinigung der Oberfläche und nach Veränderung der Oberflächenrauigkeit durch mechanisches Polieren oder Elektropolieren eingesetzt. Zusätzlich wurden Proben einer Schutzgasschweißnaht sowohl unbehandelt und nach weitgehender Entfernung der Zunderschichten durch Bürsten untersucht, da diese Strukturen als bevorzugter Angriffspunkt bei der mikrobiellen

Korrosion von Edelstählen [DIA93, TIT94] beschrieben sind. Die Auswirkungen der Vorbehandlungsprozeduren auf Oberflächenmorphologie und chemische Zusammensetzung der Grenzfläche sind in Abb. 33 dargestellt.

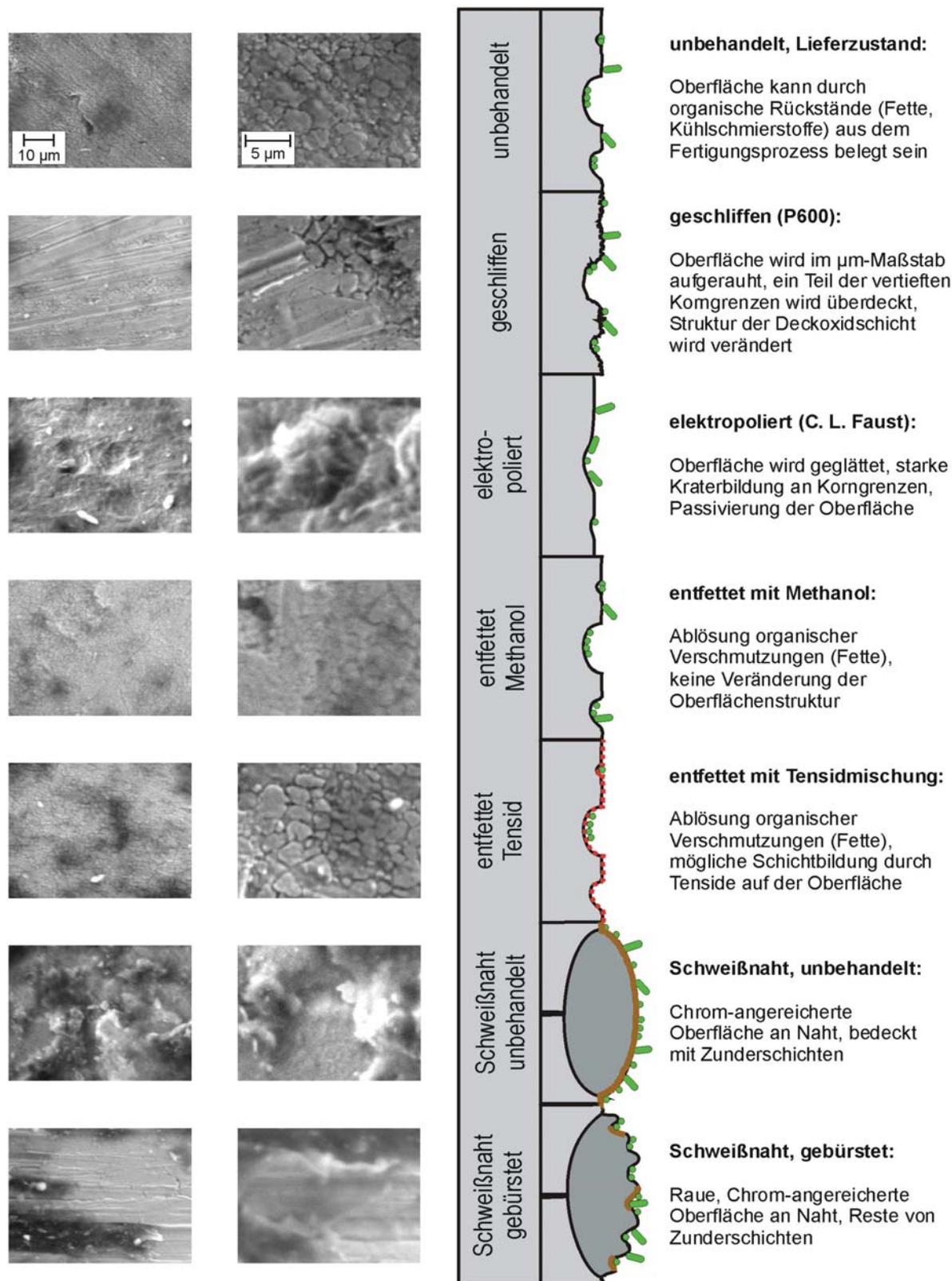


Abb. 33: Auswirkung der Oberflächenpräparation von VA 1.4571: links: REM-Aufnahmen der Oberflächen; rechts: schematischer Vergleich von Oberflächenstruktur und -zusammensetzung

Die Analyse von Bedeckungsgrad und Vitalität der mikrobiellen Filme mit dem SCLM auf den verschiedenen Probenoberflächen von VA 1.4571 wurden nach 5, 10 und 15 Tagen durchgeführt. Hierbei zeigten sich besonders für die nach 5 Tagen Expositionszeit ermittelten Werte deutliche Unterschiede, die auf einen starken Einfluss der Oberflächenbehandlung auf die Primärkolonisierung der Proben hinweisen.

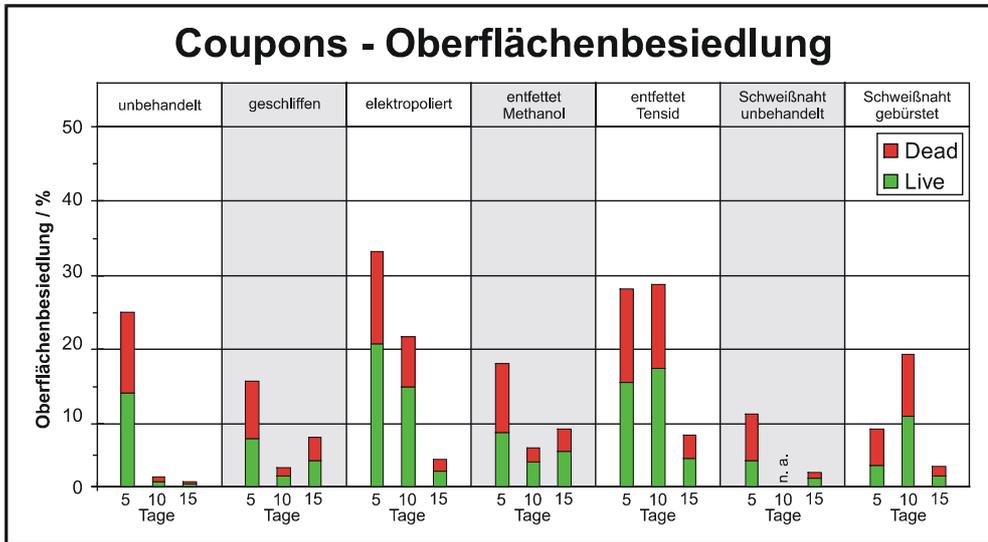


Abb. 34: Bestimmung von Vitalität und Oberflächenbedeckung auf VA 1.4571 mit BacLight™

Der starke Abfall der Oberflächenbesiedlung für die unbehandelte und die mit der Tensidmischung gereinigte Oberfläche nach 5 bzw. 10 Tagen Versuchsdauer weisen auf Rückstände auf der Werkstoffoberfläche hin, die den Organismen als Nahrungsquelle dienen bzw. die Ansiedlung durch Grenzflächenaktivität beeinflussen.

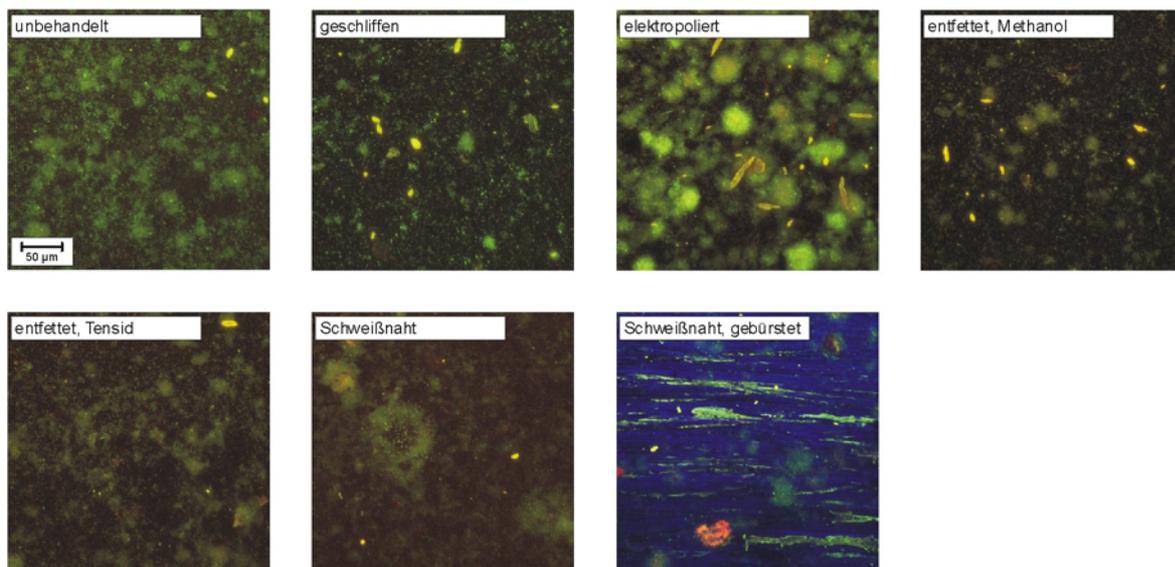


Abb. 35: Einfluss der Probenvorbereitung: SCLM-Aufnahmen der Coupons aus VA 1.4571 nach 5 Tagen Besiedlung

Die für die elektrolierte Probe beobachteten Veränderungen konnten unter dem Mikroskop auf eine stark veränderte Biofilmmorphologie zurückgeführt werden, die für die

Beprobung nach 5 und 10 Tagen dichte Kolonien innerhalb der durch die Behandlung entstandenen Krater auf der Werkstoffoberfläche widerspiegelte. Eine Übersicht über die Probenoberflächen nach 5 Tagen Besiedlung zeigt Abb. 35.

Mit zunehmender Versuchsdauer wurde der Einfluss der Oberflächenbehandlung deutlich geringer; die starken Unterschiede in der Biofilmmorphologie, die nach 5 Tagen feststellbar waren, konnten nicht mehr beobachtet werden. Eine Ausnahme bildete hierbei die Probe der gebürsteten Schweißnaht, bei der sowohl nach 5 wie nach 15 Tagen eine deutlich bevorzugte Besiedlung der Reste der Zunderschichten ermittelt werden konnte (Abb. 36).

Die auf den Abbildungen als hellgelbe, stäbchenförmige Strukturen sichtbaren Objekte konnten bei der Untersuchung der Proben mit EDX nach Ende der Versuchsreihe durch Abtrag aus dem in der Peristaltikpumpe eingesetzten Silikonschlauch identifiziert werden und wurden bei der Bestimmung der Oberflächenbedeckung nicht berücksichtigt.

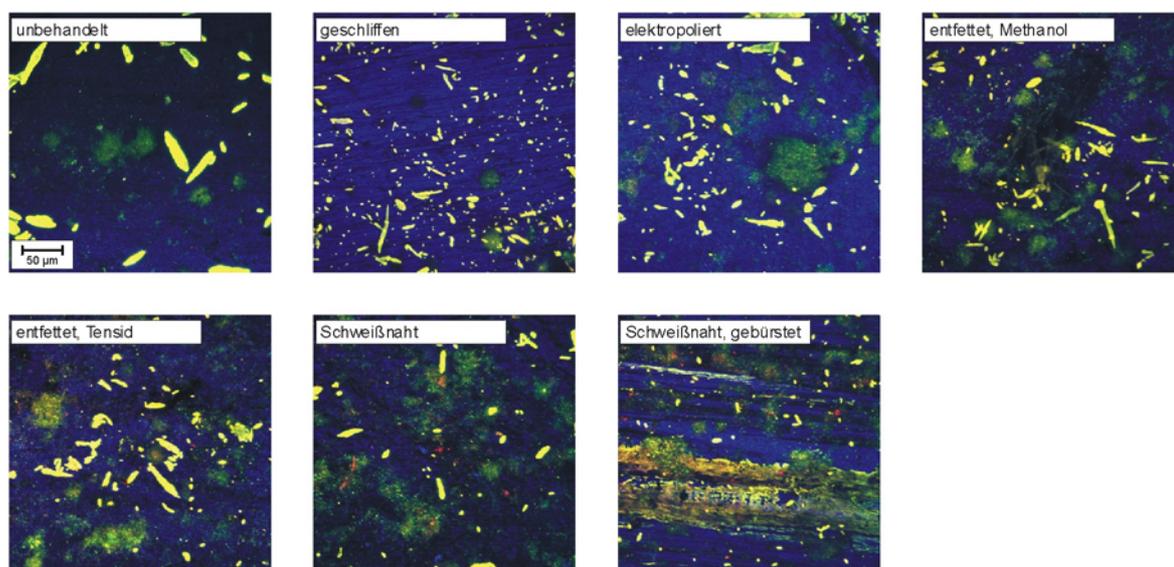


Abb. 36: Einfluss der Probenvorbehandlung: SCLM-Aufnahmen der Coupons aus VA 1.4571 nach 15 Tagen Besiedlung; Gelbe Stäbchen: Abtrag aus Silikon-Pumpschlauch (Flächenanteil nicht berücksichtigt)

Ähnlich starke Unterschiede zwischen den einzelnen Vorbehandlungsverfahren konnten für die Besiedlungsdichten auf den 1 mm von der Probenoberflächen angebrachten Deckgläsern der Durchflusszellen festgestellt werden. Hierbei wurden besonders starke Veränderungen der Besiedlungsdichte und -vitalität über die Versuchslaufzeit für die geschliffenen und elektropolierten Proben sowie für die Coupons mit gebürsteter Schweißnaht beobachtet (Abb. 37), die auf eine Veränderung der Lösungszusammensetzung durch aus der Oberfläche austretende Ionen hindeuten. Die Unterschiede der Biofilmmorphologie zwischen den einzelnen Vorbehandlungsprozeduren

waren auf den Deckgläsern nicht deutlich ausgeprägt. Nach 15 Tagen Versuchsdauer waren analog zu den Ergebnissen der Werkstoffoberfläche nur noch geringe Unterschiede in der Besiedlungsdichte der einzelnen Proben erkennbar.

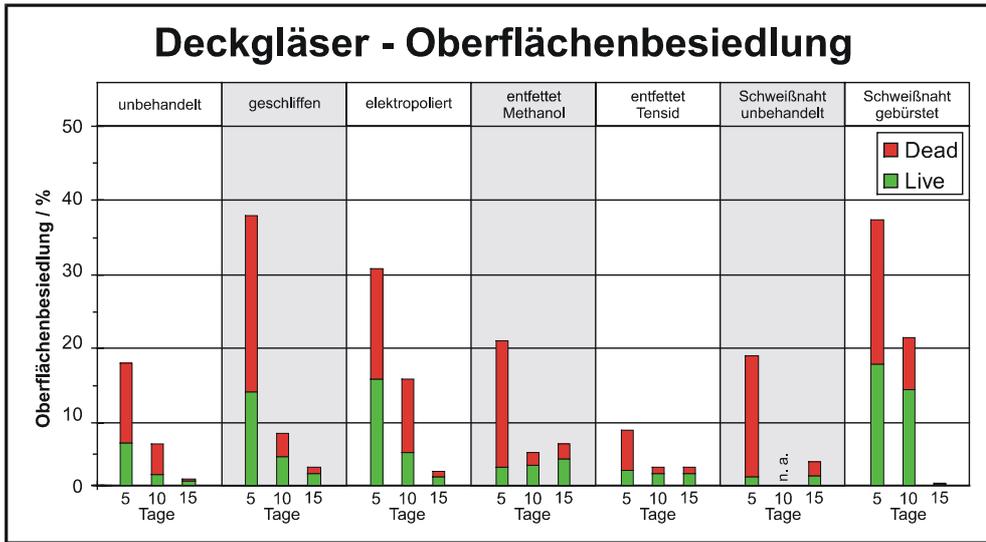


Abb. 37: Bestimmung von Vitalität und Oberflächenbedeckung auf den Deckglasoberflächen mit BacLight™

Um weitere Informationen über die Auswirkung der Oberflächenbehandlung auf die Zusammensetzung der einzelnen Biofilmpopulationen zu erhalten, wurden die Nährstoffverwertungsspektren der im Auslauf enthaltenen Mikroorganismen nach 7, 10 und 15 Tagen mit Biolog™-Mikrotiterplatten analysiert. Der statistische Vergleich der Verwertungsspektren zeigte ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Vorbehandlungsmethoden, die sich im Gegensatz zur Oberflächenbesiedlung nach 15 Tagen Versuchsdauer stärker ausprägen.

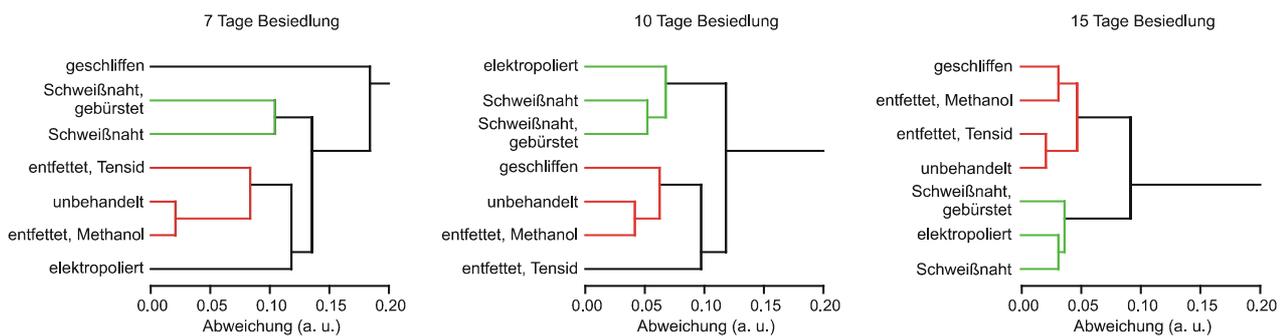


Abb. 38: Vergleich der Nährstoffverwertungsspektren der verschiedenen Oberflächenbehandlungen

Mit Ausnahme der mit Methanol entfetteten Proben wiesen alle Werkstoffvorbehandlungen deutliche Abweichungen von der unbehandelten Werkstoffprobe auf. Diese Unterschiede verringerten sich nach 10 Tagen für die geschliffene Probe deutlich, während die Coupons, bei denen im Zuge der Vorbehandlung

eine Veränderung der Legierungszusammensetzung erfolgte (Schweißnaht-Proben und elektropoliert) einen separaten Cluster bildeten, der nach 15 Tagen noch stärker ausgeprägt war. Für die chemischen und mechanischen Vorbehandlungsmethoden konnte hier eine deutliche Annäherung der Verwertungsspektren beobachtet werden, die auf eine weitgehende Angleichung der Zustände an der Werkstoffoberfläche durch Repassivierung bzw. eine Ablösung von Rückständen hindeutet.

Trägt man die Nutzungshäufigkeit der einzelnen Nährstoffe der Biolog™-Mikrotiterplatten über die Beprobungszeiträume auf (Abb. 39), zeigen sich die starken Unterschiede zwischen elektropolierten und geschweißten Proben und den restlichen untersuchten Verfahren in ausgeprägteren Verwertungsmustern, die ebenfalls auf eine starke Selektionswirkung der chemischen Bedingungen auf der Oberfläche hinweisen.

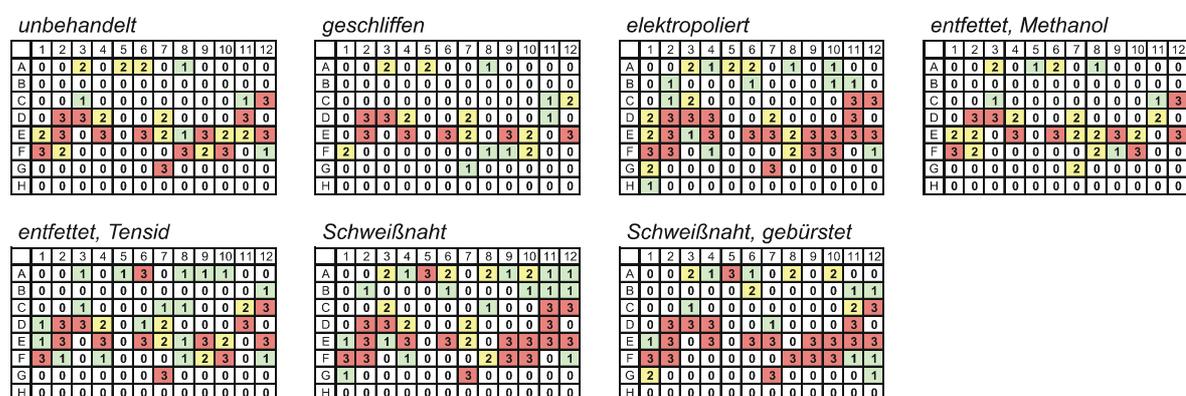


Abb. 39: Verwertungshäufigkeit der einzelnen Nährstoffe der Biolog™-Mikrotiterplatten

Zusammenfassend kann eine nicht vernachlässigbare Beeinflussung der Versuchsergebnisse für die Untersuchung mikrobieller Besiedlung von VA 1.4571 durch die Probenvorbehandlung festgestellt werden. Hierbei waren die Effekte der Reinigung mit Methanol und Tensidmischung sowie des Anschleifens auf kurze bis mittlere Laufzeiten beschränkt, während für die Elektropolitur und das Schweißen der Coupons deutliche Veränderungen in der Biofilmmorphologie und der Nährstoffverwertung festgestellt werden konnten, die eine langfristige Veränderung der Ergebnisse im Vergleich zur ursprünglichen, technisch relevanten Werkstoffprobe erwarten lassen.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde für die Vorbehandlung technischer Werkstoffe bei nachfolgenden Experimenten die Reinigung mit Methanol als Entfettungsverfahren mit den geringsten Risiken einer Veränderung von Oberflächenchemie und -morphologie ausgewählt.

4.2 Materialabhängigkeit der Biofilmbildung

4.2.1 Vergleich der mikrobiologischen und optischen Analysemethoden

Die verschiedenen zur Untersuchung der Biofilmbildung eingesetzten mikrobiologischen und mikroskopischen Verfahren weisen methodisch bedingte Unterschiede auf, die einen direkten Vergleich der Ergebnisse erschweren. Am Beispiel der Messwerte für die Primärbesiedlung der Werkstoffproben bei turbulenter Exposition im Trinkwasser werden Unterschiede und methodischen Vor- und Nachteile der einzelnen Verfahren nachfolgend erläutert.

Die Ermittlung der Gesamtzellzahl aus der im Ultraschallbad erzeugten Suspension zeigte nur geringe Unterschiede zwischen den Materialien bei geringer Varianz über die Expositionszeit (Abb. 40). Besonders bei korrodierenden Werkstoffen (Kupfer, Verzinkter Stahl) und der starken Ausfällung von Kalk (PVC) war es problematisch, sicher zwischen Mikroorganismen und durch die mechanische Belastung abgelösten abiotischen Partikeln zu unterscheiden.

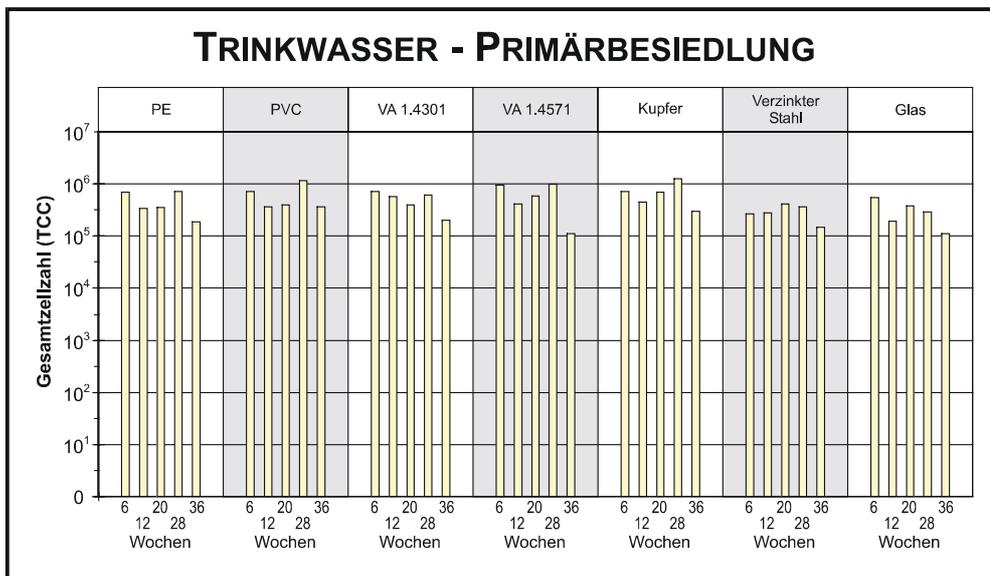


Abb. 40: Gesamtzellzahl (TCC) am Beispiel von Trinkwasser

Bei Vergleich der Werte für die Gesamtzellzahl mit Ergebnissen der Kultivierung auf R2A-Agar (CFU) konnten deutlich größere Unterschiede zwischen den Werkstoffen und den einzelnen Beprobungsterminen festgestellt werden. Generell wurden deutlich geringere Zellzahlen ermittelt, die sowohl auf die im Vergleich zum Trinkwasser deutlich veränderte Nährstoffzusammensetzung der verwendeten Agarplatten als auch auf eine relativ schlechte Kultivierbarkeit von Biofilmorganismen [FLE91] zurückgeführt werden konnten.

Eine Ausnahme bildeten hierbei die Proben von Kupfer und Verzinktem Stahl, die eine überproportionale Anzahl kultivierbarer Mikroorganismen zeigten. Dieses Ergebnis konnte aus Vergleichsuntersuchungen z. T. auf die Selektion besonders widerstandsfähiger Spezies zurückgeführt werden, die sich den stark veränderten Bedingungen einer Anzucht auf oligotrophem Nährmedium besser anpassen können.

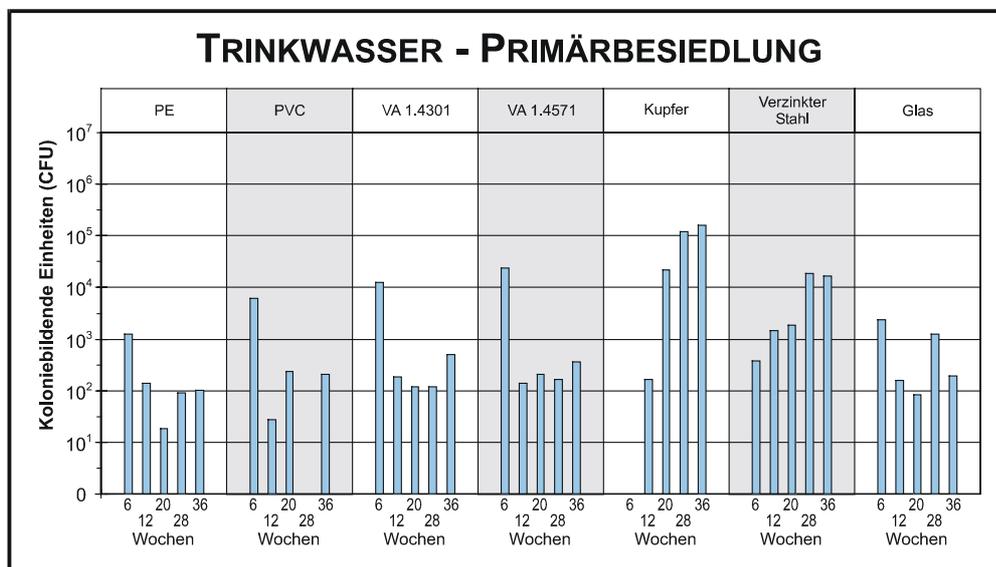


Abb. 41: Koloniebildende Einheiten (KBE) am Beispiel von Trinkwasser

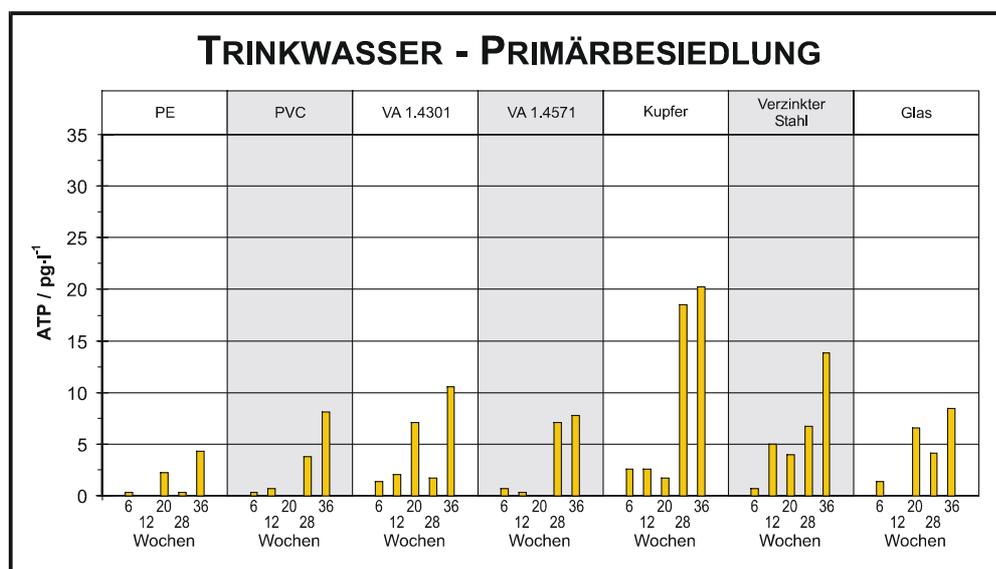


Abb. 42: ATP-Gehalte am Beispiel von Trinkwasser

Die photometrische Ermittlung des ATP-Gehaltes über die Luciferin-Luciferase-Biolumineszenz-Reaktion wird in der Literatur ebenfalls als Verfahren zur Bestimmung mikrobieller Aktivität beschrieben [KOO99]. Die ermittelten Werte (Abb. 42) zeigten eine deutlich höhere Varianz, als unter Annahme einer konstanten Stoffwechselrate bei Betrachtung der Gesamtzellzahl zu erwarten gewesen wäre. Die bei allen Werkstoffen beobachtbare Zunahme der ATP-Werte zum Ende der Versuchsreihe deutete darauf hin,

dass neben einer Erhöhung der Zellzahl der Anstieg der Stoffwechselaktivität durch bessere Adaptation an die relativ nährstoffarme Umgebung für die Veränderungen verantwortlich war.

Die mikroskopische Untersuchung der Werkstoffoberflächen wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoffgemischs BacLight™ durchgeführt, das neben einer Detektion der Biofilmdichte auch eine Klassifizierung der Membranstabilität und somit der Vitalität der Mikroorganismen ermöglicht [BOU99]. Für die meist dünnen Biofilme im Trinkwassersystem konnte durch Bestimmung des Anteils der besiedelten Oberfläche ein der Zellzahl proportionaler Messwert erhalten werden. Abweichungen durch Probenrauigkeit wurden hierbei über eine Routine in der Auswertungssoftware minimiert; Proben mit stark ausgebildeten Oxidschichten (Kupfer, Zink) zeigten z. T. aber deutliche Abschattungseffekte, so dass im Gegensatz zur Aufarbeitung mit Ultraschall nicht alle in tieferen Schichten angesiedelte Mikroorganismen erfasst werden konnten.

Die so erhaltenen Besiedlungsdichten zeigten eine deutlich höhere Dynamik über die Versuchszeit und ermöglichten durch die direkte Beobachtung der Oberfläche ohne Homogenisieren der Probe parallel die Dokumentation der Struktur der Filme und der einzelnen Schritte der Besiedlung.

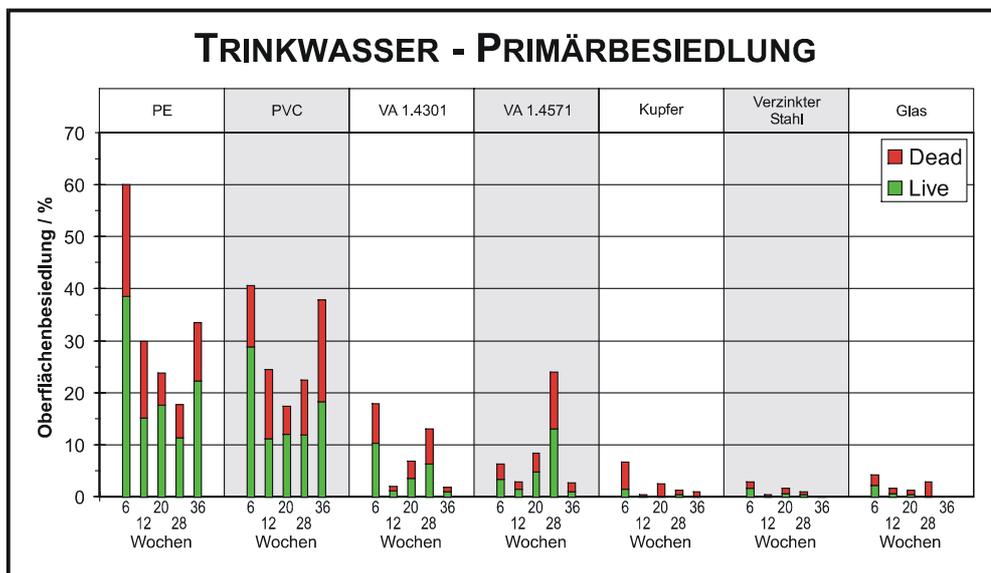


Abb. 43: Bestimmung von Vitalität und Oberflächenbedeckung mit BacLight™

Die Unterschiede zwischen den Absolutergebnissen und der Dynamik der einzelnen Messverfahren zeigten einen z. T. starken Einfluss der Messmethode auf die Aussagen zur Besiedlungskinetik der einzelnen Werkstoffe. Während die Messergebnisse von Gesamtzellzahl, Koloniebildenden Einheiten und ATP-Gehalt eine Überwachung der

mikrobiologischen Stabilität ermöglichen, kann die für die Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen der Kolonisierung wichtige Struktur der gebildeten Biofilme nur bei einer direkten mikroskopischen Untersuchung der Oberflächen dokumentiert werden. Im Folgenden wird daher für die im Reinwasser unter unterschiedlichen Bedingungen exponierten Proben hauptsächlich auf die nach Anfärben mikroskopisch ermittelten Werte für Oberflächenbedeckung und -vitalität eingegangen; signifikante Abweichungen in den anderen Messverfahren werden ggf. erwähnt.

Die im Reinwasser exponierten Werkstoffcoupons wurden sowohl auf den Einfluss einer Oberflächenbearbeitung durch Anschleifen (Körnung P600) unter turbulenten und laminaren Strömungsbedingungen als auch auf die Unterschiede bei Besiedlung in einer bereits an das Material adaptierten Umgebung (Sekundärbesiedlung) untersucht. Hierbei wurden die Proben nach 6, 12, 20, 28 und 36 Wochen entnommen und analysiert.

4.2.2 Reinwasser - Turbulente Exposition

Die Auswertung der Oberflächenbedeckung zeigte für die Primärbesiedlung im Reinwasser eine deutliche Präferenz für Polyethylen (PE), Polyvinylchlorid (PVC) und Teflon (PTFE). Metallische Werkstoffe zeigten deutlich unterschiedliche Besiedlungsmuster, die von starker Besiedlung der Korrosionsprodukte bei Aluminium bis zu relativ geringen Oberflächenbedeckungen für die Edelstähle reichte. Starke Veränderungen, die für Kupfer und Verzinkten Stahl beobachtet werden konnten, traten zeitgleich mit der Ablösung von Passivierungs- (Cu) bzw. Korrosionsschutzschichten (Zn) und dem damit einhergehenden Wechsel des Korrosionsmechanismus auf.

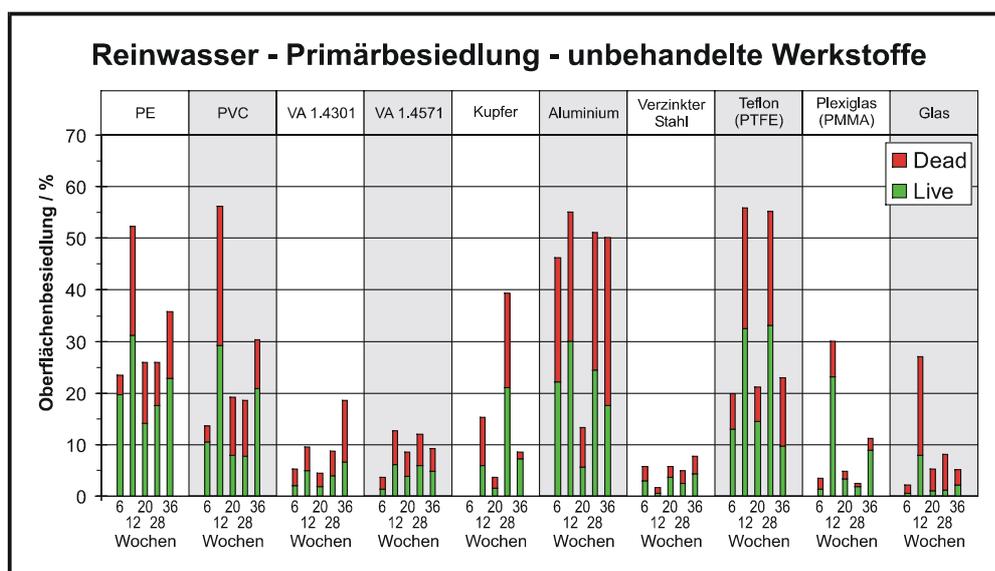


Abb. 44: Unbehandelte Werkstoffe – Primärkolonisierung in Reinwasser

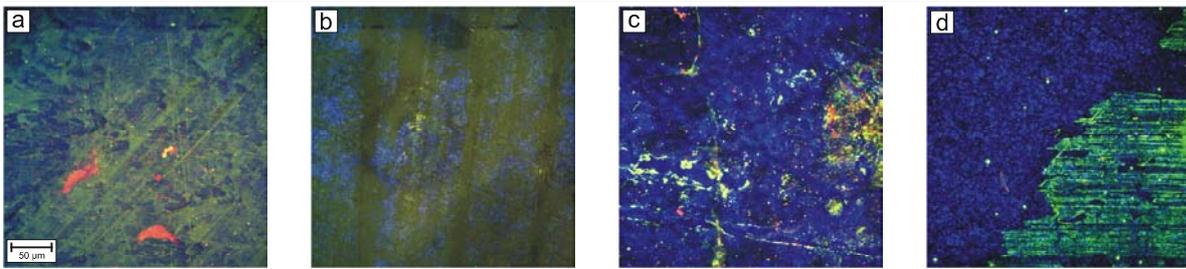


Abb. 45: Unbehandelte Werkstoffe im Reinwasser: a) Polyethylen (12 w), b) PTFE (12 w), c) Verzinkter Stahl (6 w) mit Resten der Zink-Oberfläche (rechte Bildseite), d) Kupfer (36 w): Lokalisierung von Bakterien in CuO-Deckschichten

Der Einfluss einer Oberflächenbehandlung durch Anschleifen auf die Besiedlungsdichte wies deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Werkstoffen auf. Während für PE, PVC, VA 1.4301 und Verzinkten Stahl kein eindeutiger Einfluss zu erkennen war, konnten starke Veränderungen für VA 1.4571 und Kupfer festgestellt werden, die auf die mechanische Zerstörung passivierender Deckschichten zurückgeführt werden können. Zusätzlich konnte ein starker Einfluss der Oberflächenmodifikation bei PTFE und Plexiglas festgestellt werden. Die Erhöhung der Rauigkeit führte hier zu einer deutlich stärkeren Kolonisierung.

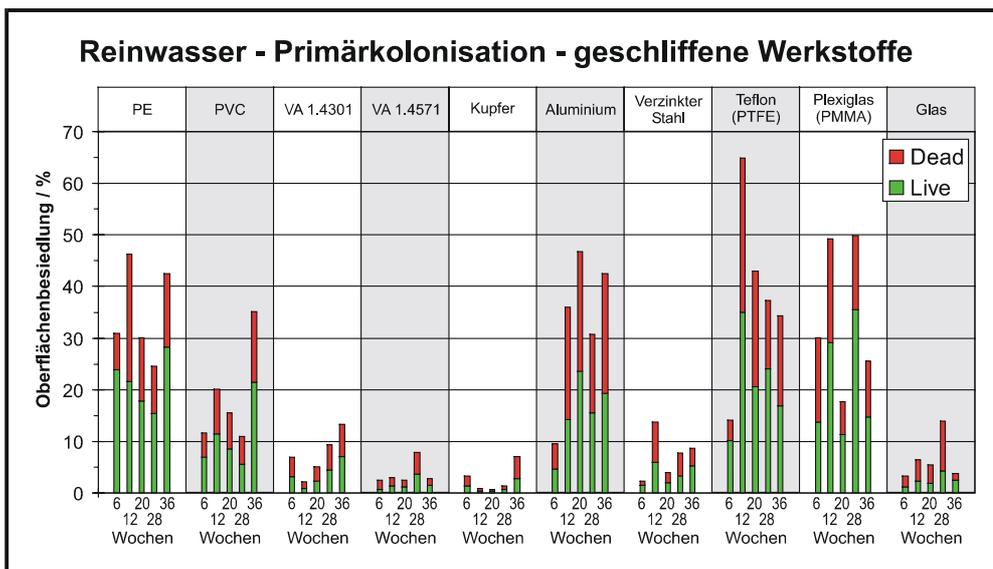


Abb. 46: Geschliffene Werkstoffe – Primärkolonisation in Reinwasser

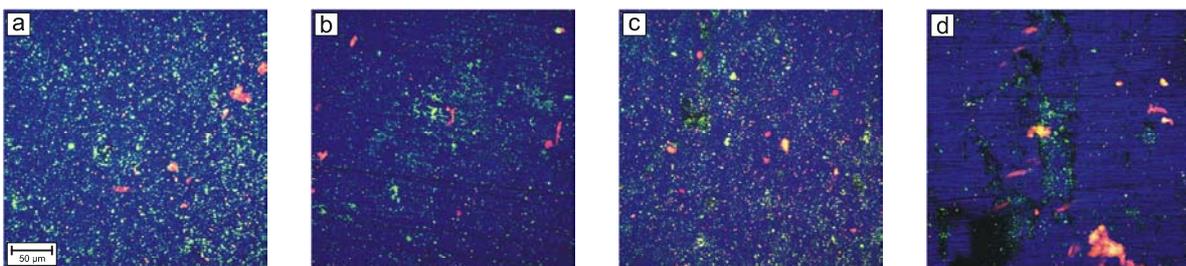


Abb. 47: Einfluss des Anschleifens auf die Besiedlung von Edelstahloberflächen (6 Wochen):
 VA 1.4301: a) unbehandelt, b) geschliffen: kein sichtbare Einfluss auf die Besiedlungsstruktur
 VA 1.4571: c) unbehandelt, d) geschliffen: Lokalisierung der MO in vertieften, nicht angeschliffenen Bereichen

Vergleicht man die so ermittelten Werte für die Oberflächenbedeckung mit Proben, die sukzessive in ein bereits an den Werkstoff adaptiertes System eingebracht werden, so zeigt sich, dass die zeitliche Varianz der Messwerte für diese Sekundärbesiedlung deutlich geringer ausfällt. Für die meisten Werkstoffe bewegte sich die mittlere Besiedlungsdichte im Bereich der für die maximale Expositionszeit der Primärbesiedlung ermittelten Werte. Deutliche Unterschiede von diesem Verhalten zeigten sich nur für Materialien mit aktiver Korrosion (Cu, Al,) (Abb. 49) und Werkstoffen, die nur eine langsame Adaptation der Mikroorganismen aufweisen, wie z. B. VA 1.4301.

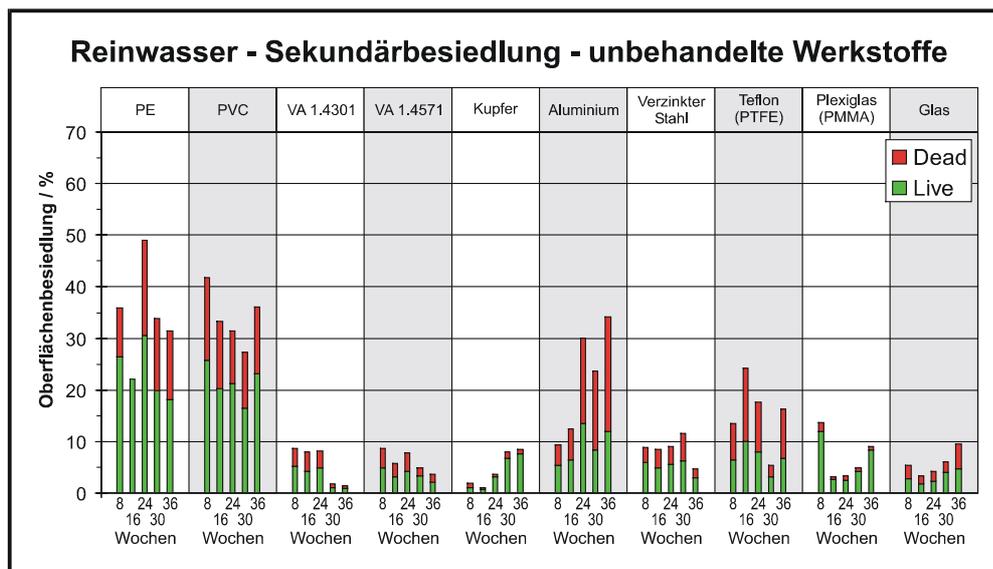


Abb. 48: Unbehandelte Werkstoffe – Sekundärkolonisation in Reinwasser

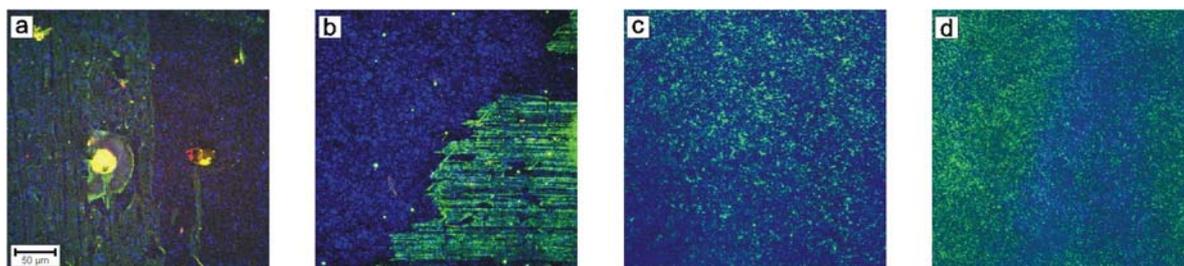


Abb. 49: Einfluss der Adaptation der Mikroorganismen auf Kupfer in Reinwasser: Primärbesiedlung: Lokalisierung in Oxiddeckschichten (a: 20 w; b: 36 w); Sekundärbesiedlung: hoher Flächenanteil (c: 20 w, d: 36 w)

Der Einfluss der Oberflächenbehandlung auf die Sekundärbesiedlung in einer adaptierten Umgebung erwies sich als deutlich material-spezifischer als bei der Primärbesiedlung. Während der Anstieg der Oberflächenbesiedlung durch Erhöhung der Rauigkeit für Plexiglas und PTFE in der selben Größenordnung beobachtet werden konnte, waren die Unterschiede zu den unbehandelten Proben von Kupfer und VA 1.4571 deutlich geringer, was auf eine gesteigerte Fähigkeit der Mikroorganismen zur Anpassung an Veränderungen der chemischen Eigenschaften während der Korrosionsprozesse hinweist.

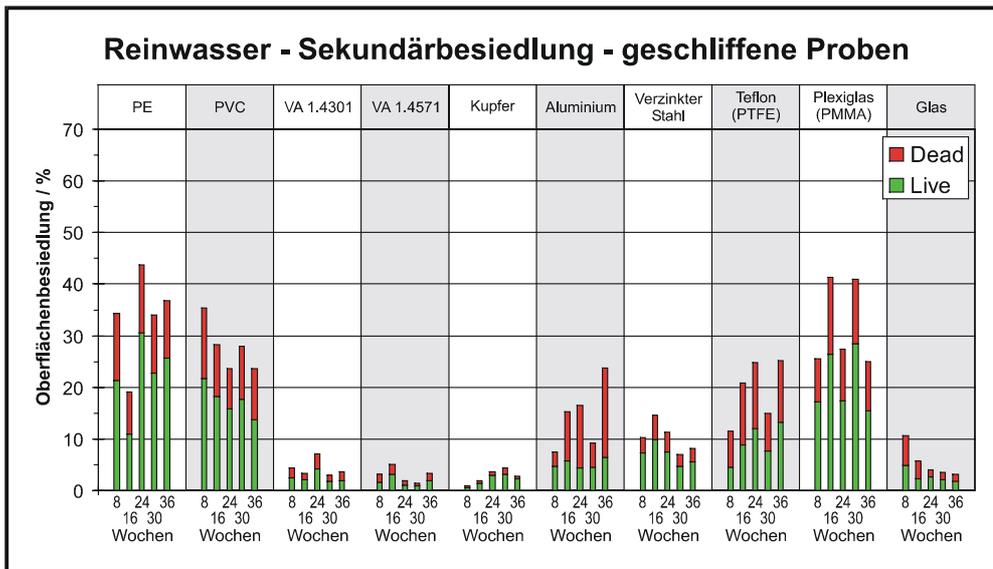


Abb. 50: Geschliffene Werkstoffe – Sekundärkolonisation in Reinwasser

Die Analyse der Nährstoffverwertungsspektren der Sekundärbesiedlung mit Biolog™-Mikrotiterplatten zeigte sowohl für VA 1.4571 als auch Kupfer eine deutlich stärkere Konzentration auf wenige Nährstoffe, die ebenfalls auf eine stärker spezialisierte Population hinweist (Abb. 51).

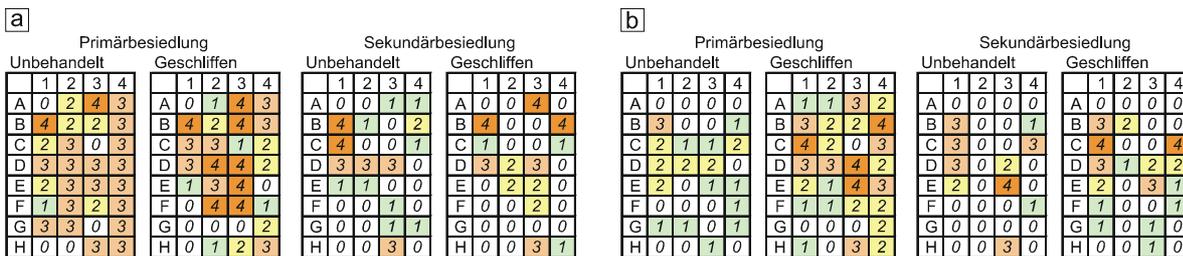


Abb. 51: Auswirkung der Adaptation auf die Nährstoffverwertungsspektren mit EcoLog™: a) VA 1.4571, b) Kupfer

4.2.3 Reinwasser – laminare Exposition

Besiedlung der Werkstoffoberflächen

Unter laminaren Strömungsbedingungen zeigten sich im Vergleich zur turbulenten Exposition deutlich geringere Unterschiede der Besiedlungsdichten der Werkstoffe. Während PE, PVC und Aluminium leicht geringeren Biofilmbewuchs zeigten, waren die für die Edelstähle ermittelten Werte höher als bei turbulenter Exposition. Durch die geringeren Durchflussgeschwindigkeiten zeigten Veränderungen der Korrosionsprozesse (z. B. der Abtrag der Passivierungsschicht bei Kupfer oder die Auflösung der Zink-Schicht bei Verzinktem Stahl) stärker ausgeprägte Effekte auf die mikrobielle Population.

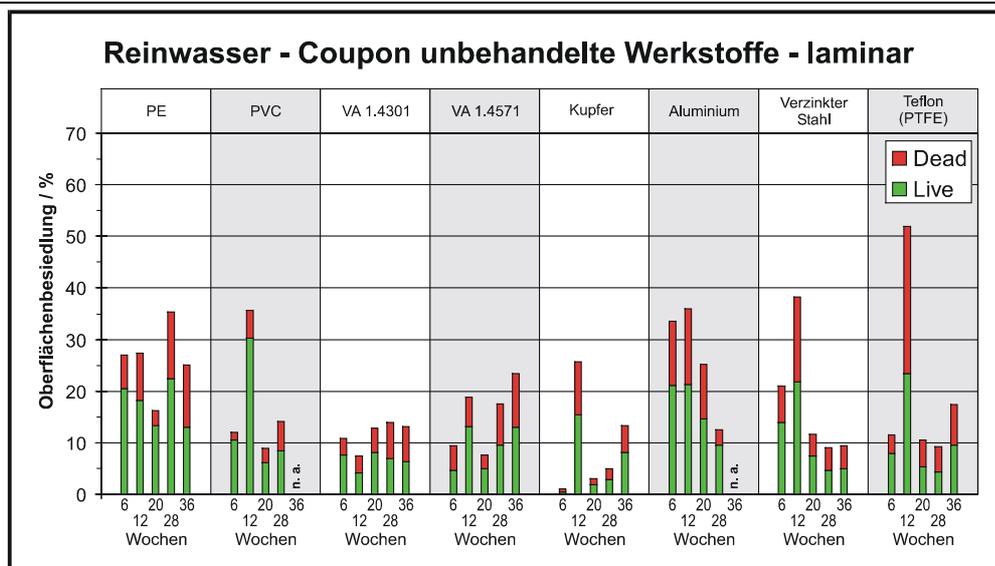


Abb. 52: Unbehandelte Werkstoffe – Couponoberflächen - laminare Exposition

Eine erhöhte Oberflächenrauigkeit durch Anschleifen wirkte sich unter laminaren Bedingungen nur wenig auf die Besiedlungsdichten der eingesetzten Kunststoffe aus. Starke Unterschiede zur turbulenten Exposition konnten hingegen für beide Edelstähle und Aluminium festgestellt werden.

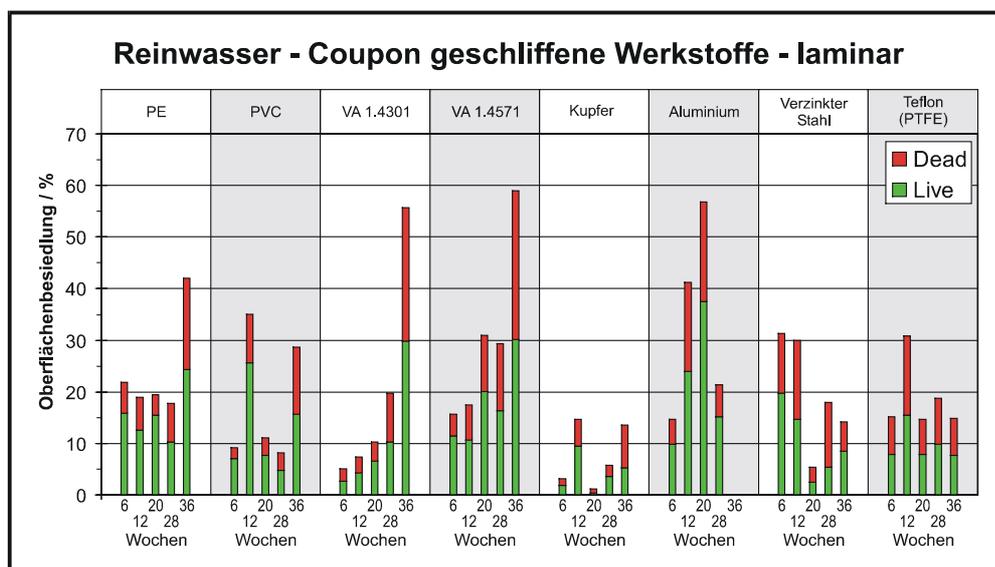


Abb. 53: Geschliffene Werkstoffe – Couponoberflächen - laminare Exposition

Die Erhöhung der Besiedlungsdichte bei Aluminium konnte bei mikroskopischen Untersuchungen auf starke Besiedlung hemisphärischer Oxidstrukturen zurückgeführt werden, die bei turbulenter Exposition nach einigen Wochen durch die Strömung abgeschert wurden (Abb. 54). Der starke Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit auf die Besiedlungsdichten der geschliffenen Edelstähle konnte nicht aufgeklärt werden.

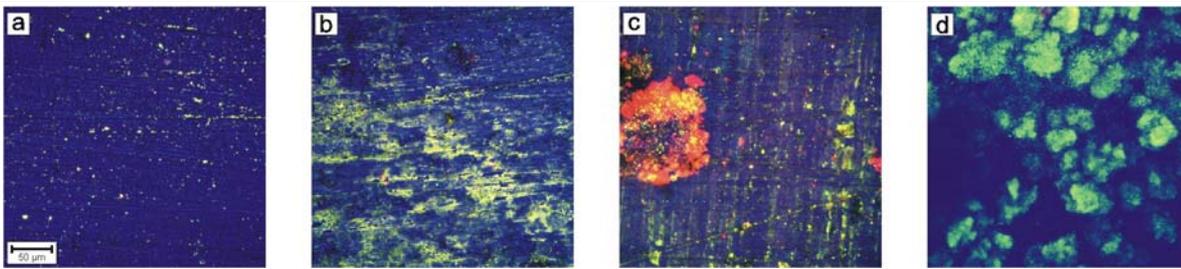


Abb. 54: Einfluss der Strömungsgeschwindigkeit auf die Besiedlung: VA 1.4301 (geschliffen) nach 28 w: a) turbulente, b) laminare Exposition; Aluminium (geschliffen) nach 28 w: c) turbulente, d) laminare Exposition

Besiedlung der Deckgläser

Die Analyse der Oberflächenbedeckung unter laminaren Bedingungen in den Durchflusszellen erlaubte auch die Bestimmung der Biofilmbildung auf dem im geringen Abstand zur Oberfläche angebrachten Deckglas.

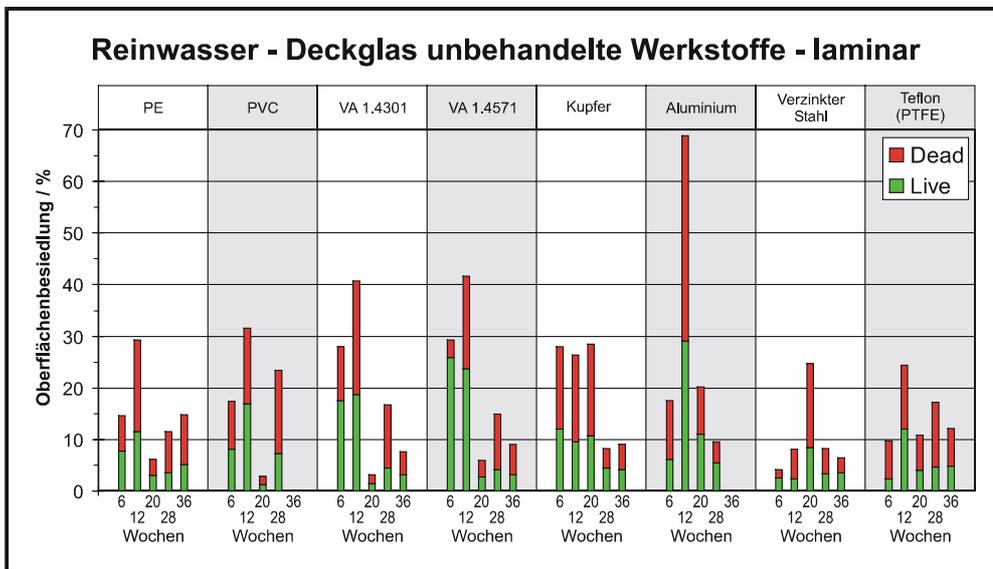


Abb. 55: Unbehandelte Werkstoffe - Deckglasoberflächen - laminare Exposition

So konnten sowohl Veränderungen auf der Werkstoffoberfläche beobachtet werden, als auch deren Auswirkung auf die Wasserphase, z. B. durch Auslaugungsprozesse. Bei den Kunststoffen wurde die Werkstoffoberfläche im Vergleich zur Deckglasoberfläche bevorzugt besiedelt, bei den Werkstoffen mit aktiver Korrosion wurde ein umgekehrtes Verhalten ermittelt. Dabei zogen drastische Veränderungen in der Chemie der Werkstoffoberfläche (z. B. Cu-Korrosion, Zn-Auflösung, (Abb. 56)) ebenso starke Veränderungen der Besiedlungsdichte und Vitalität der Organismen auf dem Deckglas nach sich.

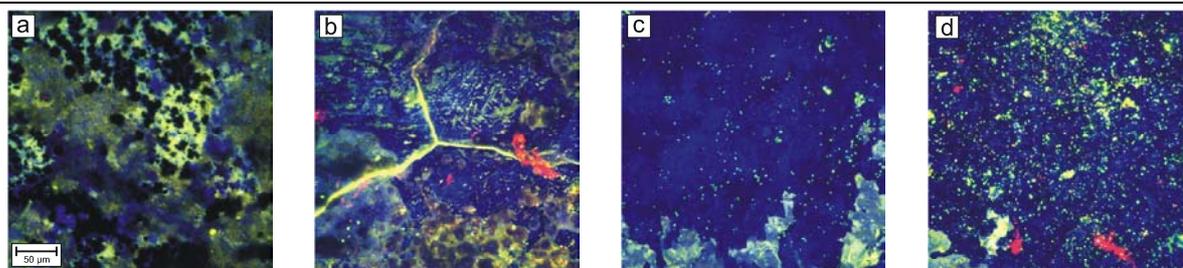


Abb. 56: Ablösung der Zink-Schicht bei laminarer Exposition von Verzinktem Stahl:

Aufsicht auf die unbehandelte Werkstoffoberfläche: a) 6 Wochen, b) 12 Wochen, c) 28 Wochen, d) 36 Wochen

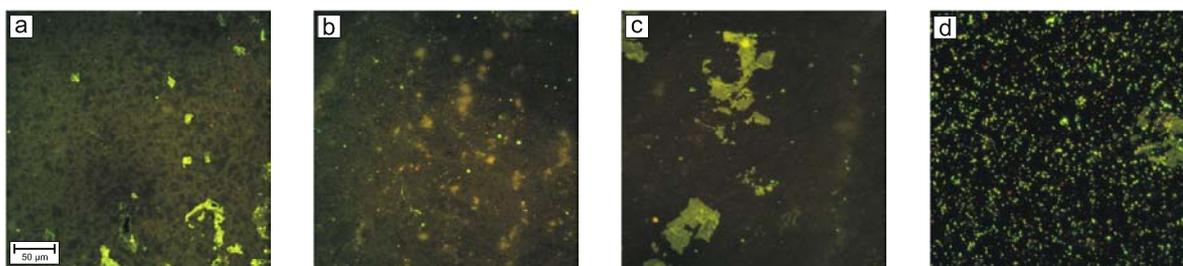


Abb. 57: Auswirkung der Prozesse auf die Deckglasoberfläche bei laminarer Exposition von Verzinktem Stahl: Aufsicht auf das Deckglas: a) 6 Wochen, b) 12 Wochen, c) 28 Wochen, d) 36 Wochen

Der Einfluss des Anschleifens der Werkstoffoberfläche war ebenfalls in den Besiedlungsdichten der Deckgläser erkennbar. Geringere Besiedlungsdichten für die Glasoberflächen für PE und PVC zeigten eine noch stärkere Präferenz für die rauheren Oberflächen, während die Werte für die geschliffenen Edelstähle sich trotz der Veränderung der Oberflächenstruktur nicht deutlich unterschieden. Stärkere Unterschiede konnten für Kupfer und Aluminium beobachtet werden, die auf eine direkte Verbindung zwischen Veränderungen des Korrosionsprozesses und des Auftretens für Mikroorganismen problematischer Metallionen (Cu^{2+} , Al^{3+}) in der Wasserphase hinweisen.

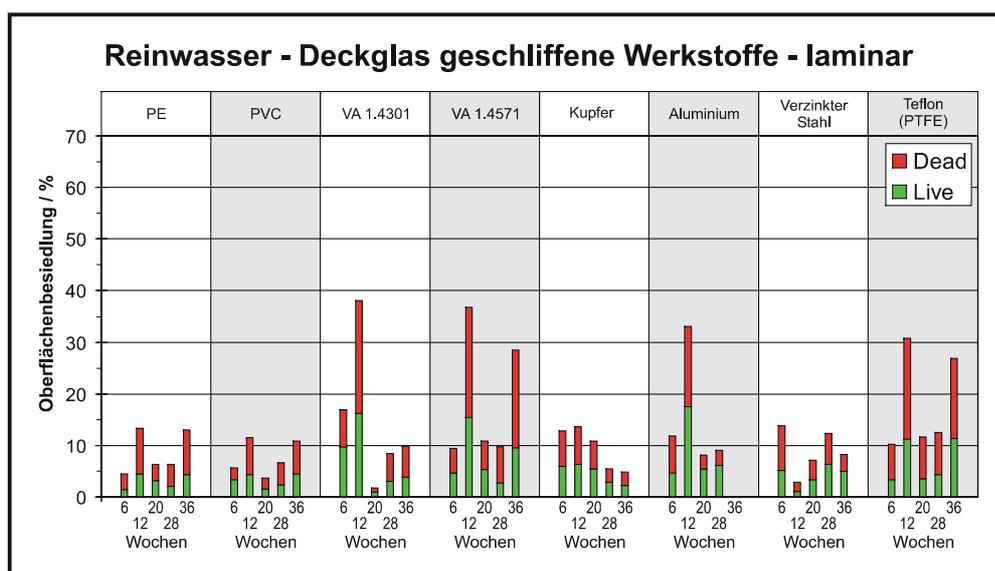


Abb. 58: Geschliffene Werkstoffe – Deckglasoberflächen – laminare Exposition

Deutliche Unterschiede zwischen laminarer und turbulenter Exposition konnten auch für den Mechanismus der Korrosion bei den Kupferproben festgestellt werden.

Für die unter turbulenten Bedingungen exponierten Coupons wurde die Besiedlung der auch im REM erkennbaren Deckoxidschichten aus CuO durch die Mikroorganismen beobachtet. Diese Schichten wurden ausgehend von Fehlstellen unterwandert, durch Korrosion destabilisiert und mit der Strömung in kleinen Teilen abgetragen. Auf den so freigelegten Oberflächen konnte nur noch Flächenkorrosion beobachtet werden, die eine Neuansiedlung der Mikroorganismen zunächst unterband.

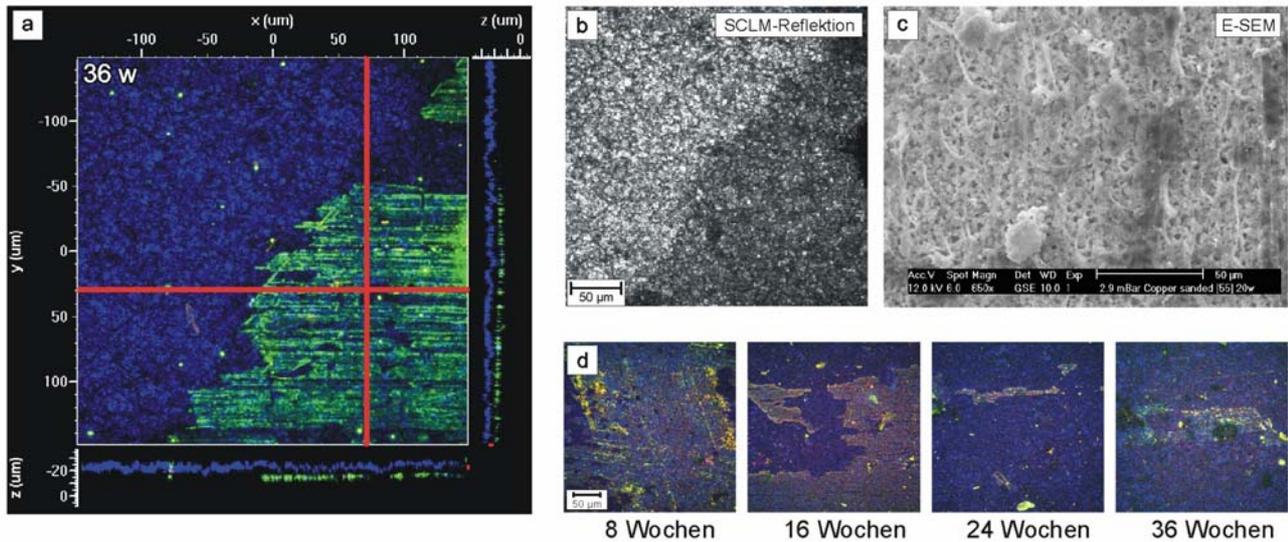


Abb. 59: Korrosion von Kupfer in Reinwasser unter turbulenten Bedingungen: a) Lokalisierung der Mikroorganismen in der CuO-Deckoxidschicht; b) Reflektionsaufnahme der Deckoxidschicht; c) REM-Aufnahme der Probe; d) Ablösung der besiedelten Oxidschicht durch die Strömung, Wiederbesiedlung der Oberfläche mit der Zeit

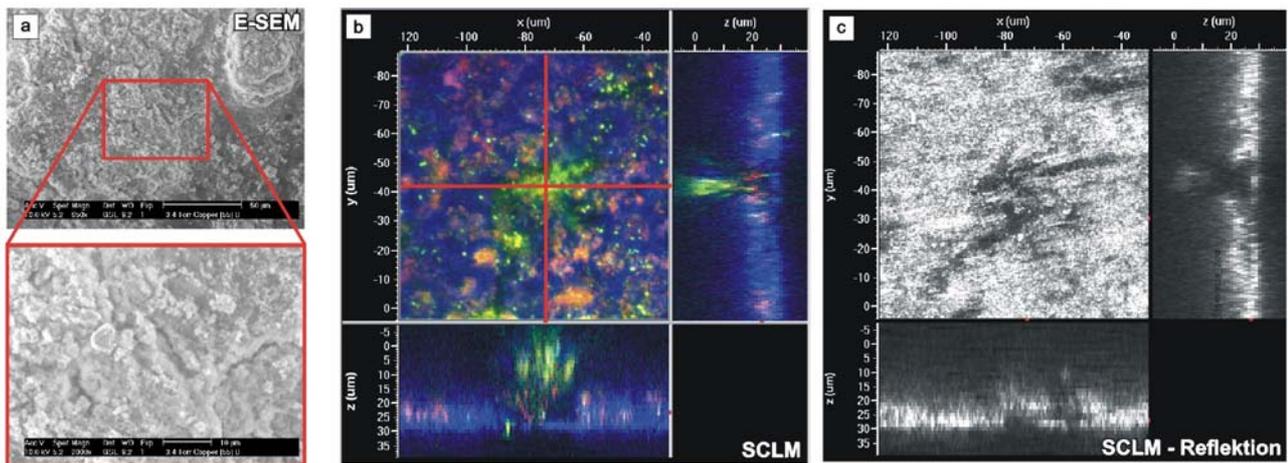


Abb. 60: Korrosion von Kupfer in Reinwasser unter laminaren Bedingungen: a) REM-Aufnahme der Probe: Risse in der Deckoxidschicht; b) Lokalisierung der Mikroorganismen innerhalb der Korrosionskaverne; c) Reflektionsaufnahme

Unter laminaren Bedingungen wurde ein anderes Korrosionsbild der Kupferoberflächen festgestellt (Abb. 59). Auch hier erfolgte zunächst die Besiedlung der Deckoxidschichten,

allerdings wuchsen die Organismen nicht nur innerhalb dieser dünnen Schicht auf, sondern bildeten daneben auch kleine Kolonien. Die elektronenmikroskopische Untersuchung zeigte eine raue Oxidschicht auf der Oberfläche, die von Rissen durchzogen war und bereits deutliche Korrosionsspuren aufwies. Innerhalb dieser Risse konnten mit dem SCLM Bakterien beobachtet werden, die den Boden der für die Lochkorrosion klassischen Kavernen besiedelten. Hierbei konnten Kavernen bis zu 30 μm Tiefe und 20 μm Ausdehnung unterhalb von Rissen in der Oxidschichten dokumentiert werden. Abb. 61 zeigt schematisch die beobachteten Mechanismen der Korrosion unter den verschiedenen Strömungsbedingungen.

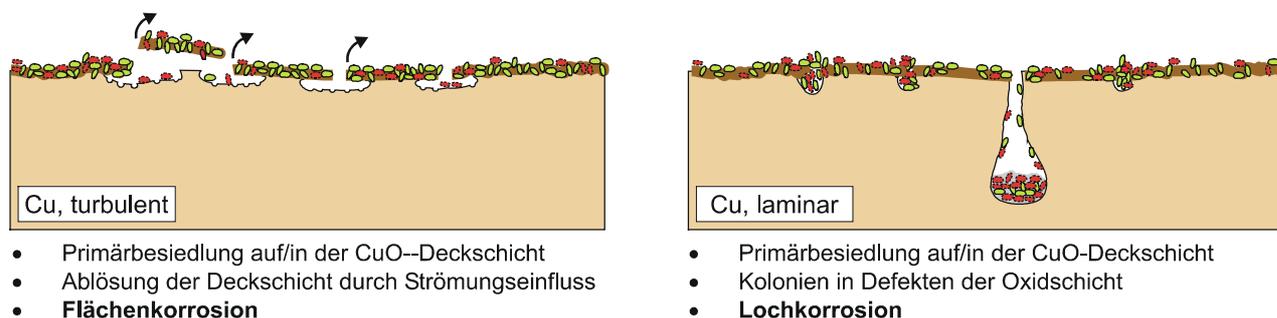


Abb. 61: Einfluss der Strömungsbedingungen auf die Korrosionsmechanismen im Reinwasser

4.3 Elektrochemische Eigenschaften besiedelter Oberflächen

4.3.1 Potentialmessungen im Reinwassersystem

Nachdem für alle untersuchten Werkstoffe signifikante Besiedlung durch Mikroorganismen bei Exposition im Reinwasser dokumentiert und z. T. deutliche Veränderungen der Korrosionsmechanismen festgestellt werden konnten, wurde der Einfluss der Biofilme auf das elektrochemische Verhalten genauer untersucht.

Hierzu wurden an der Technikumsanlage für sechs verschiedene metallische Werkstoffe (Gold, Platin, VA 1.4301, VA 1.4571, Kupfer und Aluminium) in-situ Potentialmessungen im Reinwasser durchgeführt. Die Messungen erfolgten parallel an 2 Sätzen von Proben, die a) mit technischem oder b) mit steril filtriertem Reinwasser für 30 Tage betrieben wurden, um eine eindeutige Trennung der mikrobiologischen Einflüsse von Effekten durch abiotische Korrosionserscheinungen zu gewährleisten.

Der Vergleich der Messkurven erlaubte die Einteilung der untersuchten Metalle in drei Gruppen, für die jeweils ein Messkurvenpaar in Abb. 62 gezeigt wird.

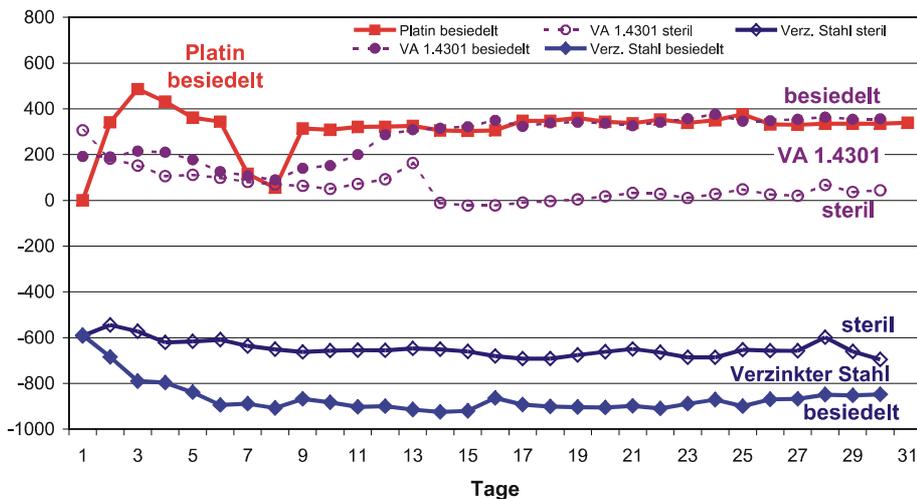


Abb. 62: in-situ Potentialmessung im Reinwasser: Potentialverlauf für Platin, VA 1.4301 (steril/besiedelt), Verz. Stahl (steril/besiedelt)

Platin und Gold als klassische Redoxelektroden zeigten bei beiden Expositionsarten Schwankungen um einen gemeinsamen Mittelwert, ohne einen deutlichen Trend über die Versuchsdauer aufzuweisen. Hierbei war die Schwankungsbreite für die besiedelten Proben nach ca. 10 Tagen sehr gering, was auf die dominierende Rolle der Biofilme auf die Potentialeinstellung hinweist. Für Kupfer, Aluminium und Verzinkten Stahl als aktiv korrodierende Werkstoffe wurde innerhalb der ersten Woche der Exposition eine deutliche kathodische Verschiebung des Korrosionspotentials um 250 mV im Vergleich zu den steril

exponierten Proben beobachtet, bevor sich ein stabiler Wert für die restliche Messdauer einstellte (Abb. 62). Im Gegensatz dazu war ab diesem Zeitpunkt für die Edelstähle VA 1.4301 und VA 1.4571 ein stetiger Potentialanstieg erkennbar, der nach ca. 2 Wochen die Potentialwerte der Edelmetalle erreichte und dieses Niveau beibehielt. Dieses Phänomen entspricht dem in der Literatur [DIC96] beschriebenen "Ennoblement" der Edelstähle, dessen Auftreten mit mikrobiell beeinflusster Korrosion korreliert wird.

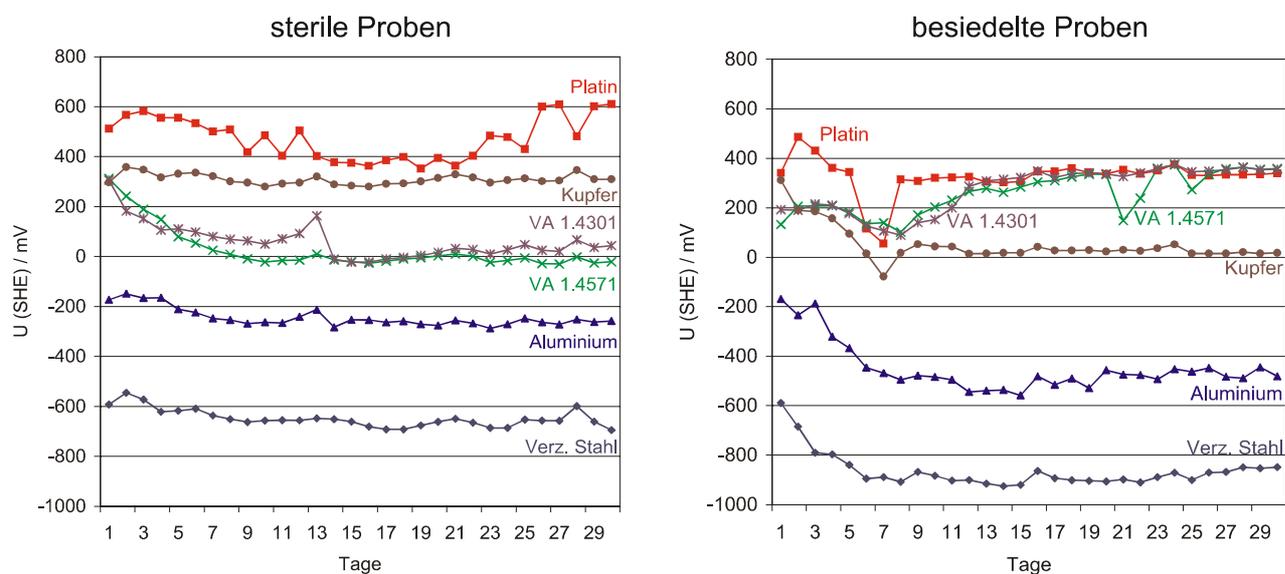


Abb. 63: in-situ Potentialmessung im Trinkwasser: links: steril exponierte Proben, rechts: besiedelte Proben

Die besondere Bedeutung der Potentialverschiebung durch Mikroorganismen zeigt sich bei Eintrag der Messdaten mit den Pourbaix-Diagrammen der untersuchten Werkstoffe (Abb. 64). Sowohl für Chrom, das bei den Edelstählen als Cr_2O_3 -Deckschicht an der Oberfläche angereichert ist, als auch für Zn und Cu bewegen sich die beobachtbaren Verschiebungen des Ruhepotentials für die im Trinkwasser zulässigen pH-Werte im Bereich der Auflösung stabiler Passivschichten.

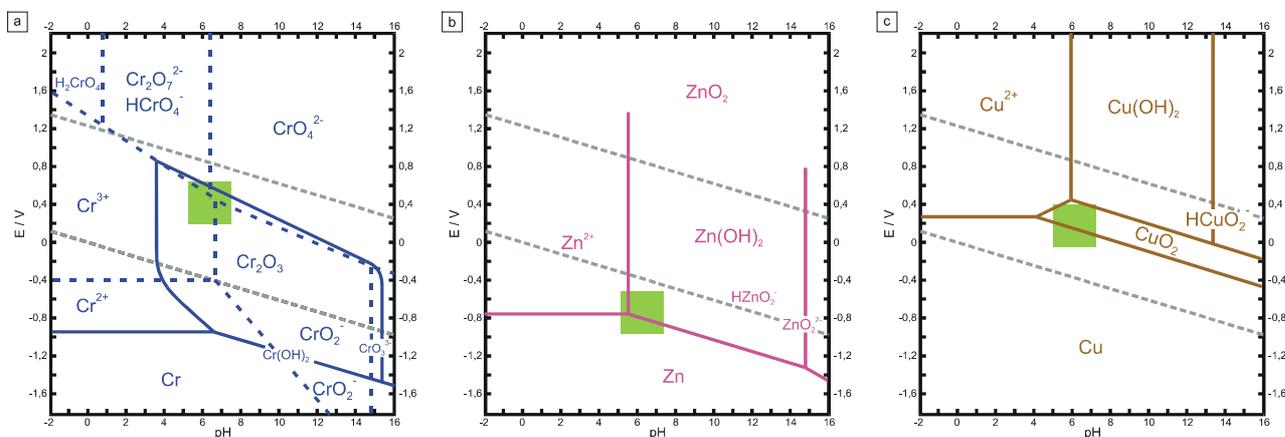


Abb. 64: Pourbaix-Diagramme [POU66] für a) Chrom, b) Zink und c) Kupfer;
grün: Bereich der Potential- und pH-Verschiebung durch Mikroorganismen im Reinwasser

Die Untersuchung der Elektrodenoberflächen mit dem CSLM (Abb. 65) zeigte eine stark unterschiedliche Morphologie der Biofilme auf den unterschiedlichen Oberflächen. Während bei Gold und Platin die statistische Ausbildung kleiner Kolonien beobachtet wurden, konnte für die beiden Edelmstähe eine deutliche Ausrichtung der Besiedlung an der Oberflächenstruktur beobachtet werden [GEE97]. Für Kupfer, Aluminium und Verzinkten Stahl war eine klare Lokalisierung der Mikroorganismen in oder an Oxidschichten zu erkennen [WAG96]. Bei Kupfer und Verzinktem Stahl zeigte sich überdies eine Ablösung der dünnen Deckoxidschichten und der Übergang zu poröseren Oxidoberflächen.

Bemerkenswert war die Besiedlung der Gold-Gegenelektrode der H₂-Generator-Bezugselektrode, die trotz täglicher intensiver Sauerstoffentwicklung mit starker pH-Verschiebung nur geringe Unterschiede der Biofilmstruktur im Vergleich zur unbeeinflussten Gold-Elektrode zeigte.

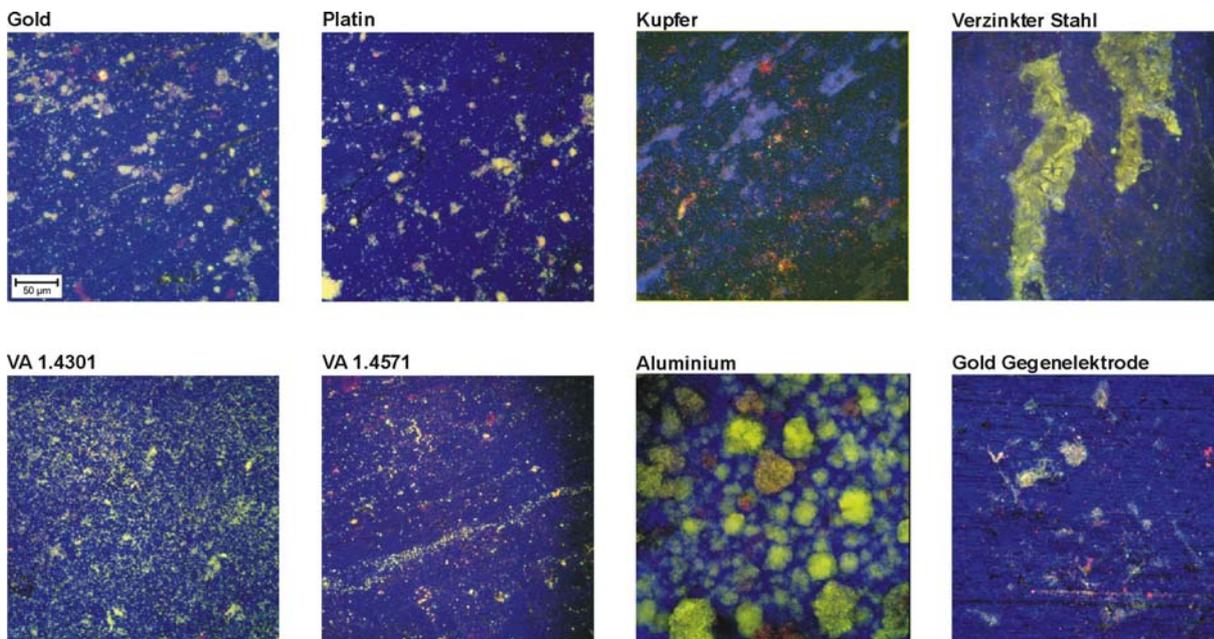


Abb. 65: CSLM-Aufsicht der Elektrodenoberflächen nach 6-wöchiger Exposition im Trinkwasser

4.3.2 Gravimetrische Detektion mit der Quarz-Mikrowaage

In der Literatur sind für die Potentialverschiebung durch Biofilmbelegung verschiedene mechanistische Modelle beschrieben. Diese reichen je nach Expositionsort von der Bildung von Belüftungselementen durch unterschiedliche Filmdicken [MAT97, DEB98], dem aktiven Einflusses durch Stoffwechselforgänge [LEW96b] bis zur Ablagerung anorganischer Oxide durch die Mikroorganismen [LEW00].

Da der Zeitpunkt des Einsetzens der Potentialverschiebung während des Besiedlungsprozesses in der Literatur bisher nicht ausreichend dokumentiert war, wurden

zur Klärung dieser Fragestellung Messungen durchgeführt, die eine kontinuierliche Detektion der Organismen von den ersten Stadien der mikrobiellen Ansiedlung an erlaubten. Hierzu wurde eine Quarz-Mikrowaagen-Durchflusszelle (Abb. 32) zunächst im Labormaßstab mit Zuchtbiofilmen im Medium R2A 1:30 zur Erfassung dünner Biofilme getestet.

Nach einem Vorlauf mit sterilem Medium für ca. 10 h zur Gewährleistung der Messwertstabilität ($f_0 = 5 \text{ MHz} \pm 5 \text{ Hz}$) wurde die Lösung mit Mikroorganismen beimpft und die Veränderung der Schwingungsfrequenz (Abb. 66) aufgezeichnet. Hier zeigte sich nach einer konstanten Phase von ca. 20 h ein Absinken des Frequenzsignals um ca. 450 Hz bei einer Messdauer von 115 h, die rechnerisch einer durchschnittlichen Biofilmschichtdicke von ca. $1,5 \mu\text{m}$ entspricht, die auch bei nachfolgender mikroskopischer Betrachtung detektiert werden konnte.

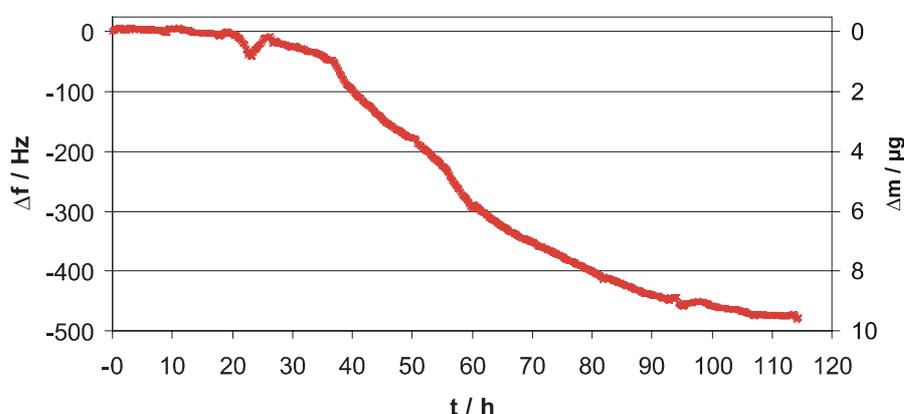


Abb. 66: Quarz-Mikrowaage: Massenänderung nach Besiedlung im Nährmedium R2A 1:30

Bei nachfolgenden Messungen wurde das System im Modus der Elektrochemischen Quarz-Mikrowaage (E-QCM) betrieben, die zusätzlich zur klassischen Massendetektion die Erfassung bzw. Steuerung des Potentials auf der Elektrodenoberfläche des schwingenden Quarz-Wafers erlaubt. Hierbei wurde die Veränderung der Schwingungsfrequenz und die Entwicklung des Ruhepotentials der besiedelten Elektrodenoberfläche simultan aufgezeichnet (Abb. 67 links) und die Elektrodenoberfläche nach Abschluss der Messung mit dem CSLM dokumentiert (Abb. 67 rechts).

Der zeitliche Verlauf der Signale von Schwingungsfrequenz und Ruhepotential zeigt für beide Kurven einen den Erwartungen aus Vorversuchen entsprechenden Verlauf. Die Resonanzfrequenz des Schwingquarzes zeigte ein relativ konstantes Signal für die ersten 27 h. Anschließend wurde ein Abfall des Messwertes mit ca. 30 Hz/h beobachtet, bevor sich Δf nach 35 h leicht verringerte und nach 65 h einen nahezu konstanten Wert von

$\Delta f \approx -780$ Hz erreichte, der einer theoretischen durchschnittlichen Biofilmschichtdicke von $d = 2 \mu\text{m}$ entspricht.

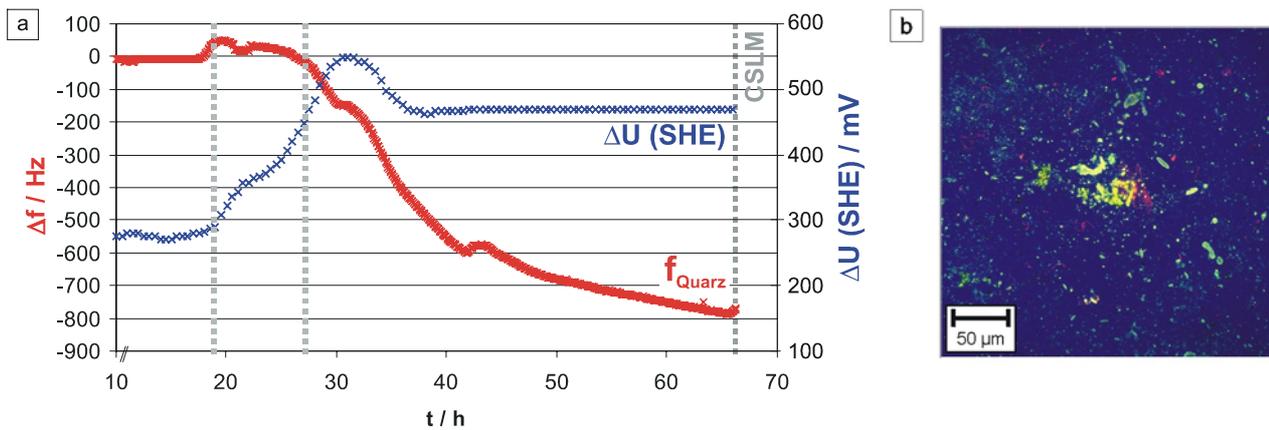


Abb. 67: Elektrochemische Quarz-Mikrowaage: a) Korrelation zwischen Frequenzänderung und Potentialverschiebung bei Besiedlung im Nährmedium R2A 1:100, b): Besiedelte Quarz-Oberfläche nach Abschluss der Messung (67 h)

Deutliche Veränderungen des Ruhepotentials U_R konnten bereits nach 18 h beobachtet werden. Nach 40 h wurde ein stabiler Wert von $U_{SHE} = 465$ mV, der einer Verschiebung von $\Delta U_R = 175$ mV zur unbesiedelten Oberflächen entspricht, erreicht. Während das Frequenzsignal auch zu diesem Zeitpunkt eine weitere Besiedlung der Oberfläche durch die Massezunahme anzeigt, scheinen diese Vorgänge in weiterer Entfernung zur Elektrodenoberfläche nur noch untergeordnete Bedeutung für die Potentialeinstellung zu haben. Die mikroskopische Untersuchung der Quarzoberfläche nach Ende der Messung (Abb. 67 b) zeigte eine Monolage von Bakterien mit einzelnen Kolonien, die bis zu $5 \mu\text{m}$ Höhe erreichten.

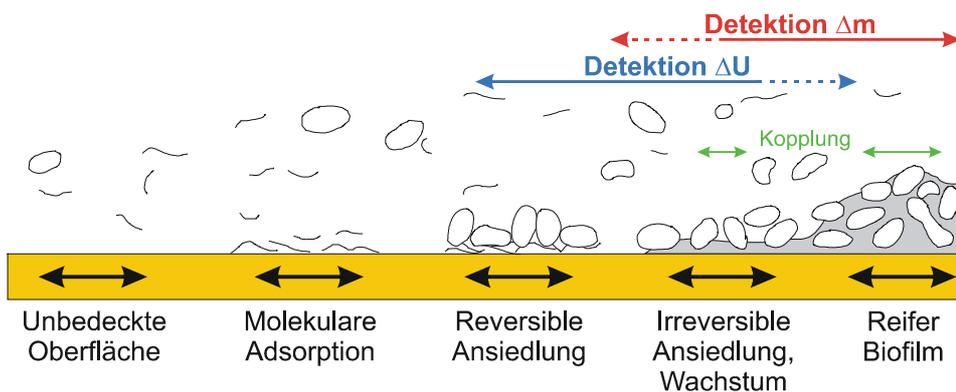


Abb. 68: Stadien der Biofilmbildung: Detektionsbereiche für Massenänderung Δm und Potentialverschiebung ΔU

Vergleicht man die Ergebnisse mit der klassischen Theorie zur mikrobiellen Besiedlung von Oberflächen (Abb. 68), so kann die Potentialverschiebung bereits bei der reversiblen Ansiedlung der Organismen beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt sind die Bakterien

nur durch eine elastische Verbindung über extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) mit der Oberfläche verbunden, die nur eine sehr geringe Kopplung mit der Schwingquarzelektrode (grüne Pfeile in Abb. 68) und somit eine ungenügende Detektion der Massezunahme zur Folge hat. Die eindeutige Erfassung der Biofilmmasse durch den Quarz erfolgt erst mit irreversibler Ansiedlung der Organismen, bei der durch Exkretion von EPS eine festere Verbindung hergestellt wird.

4.3.3 Einfluss der Besiedlungsdichte auf das Ruhepotential

Während der Zeitpunkt des Einsetzens der Potentialbeeinflussung im Besiedlungsvorgang durch die elektrochemische Quarz-Mikrowaage ermittelt werden konnte, war der Zusammenhang zwischen Biofilmmorphologie und Intensität der maximalen Potentialverschiebung weiterhin unklar. Da der Quarz-Mikrowaagenaufbau während der Messung nicht permanent mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt und mit dem SCLM untersucht werden konnte, wurden Laborbiofilme auf Platin-Elektroden gezüchtet und über einen Versuchszeitraum von 165 h bei sukzessiver Entnahme der Proben auf Potentialverlauf und Struktur der Biofilme untersucht. Hierbei wurden für fünf Proben neben der mikroskopischen Besiedlungsdichte bei elektrochemischen Messungen in 0.1 m Na₂SO₄ das Impedanzspektrum am Ruhepotential und das CV ($dU/dt = 50 \text{ mV/s}$) dokumentiert. Neben der externen Messung wurde das Ruhepotential auch kontinuierlich in-situ gegen eine H₂-Generatorelektrode (vgl. 3.6.1) ermittelt.

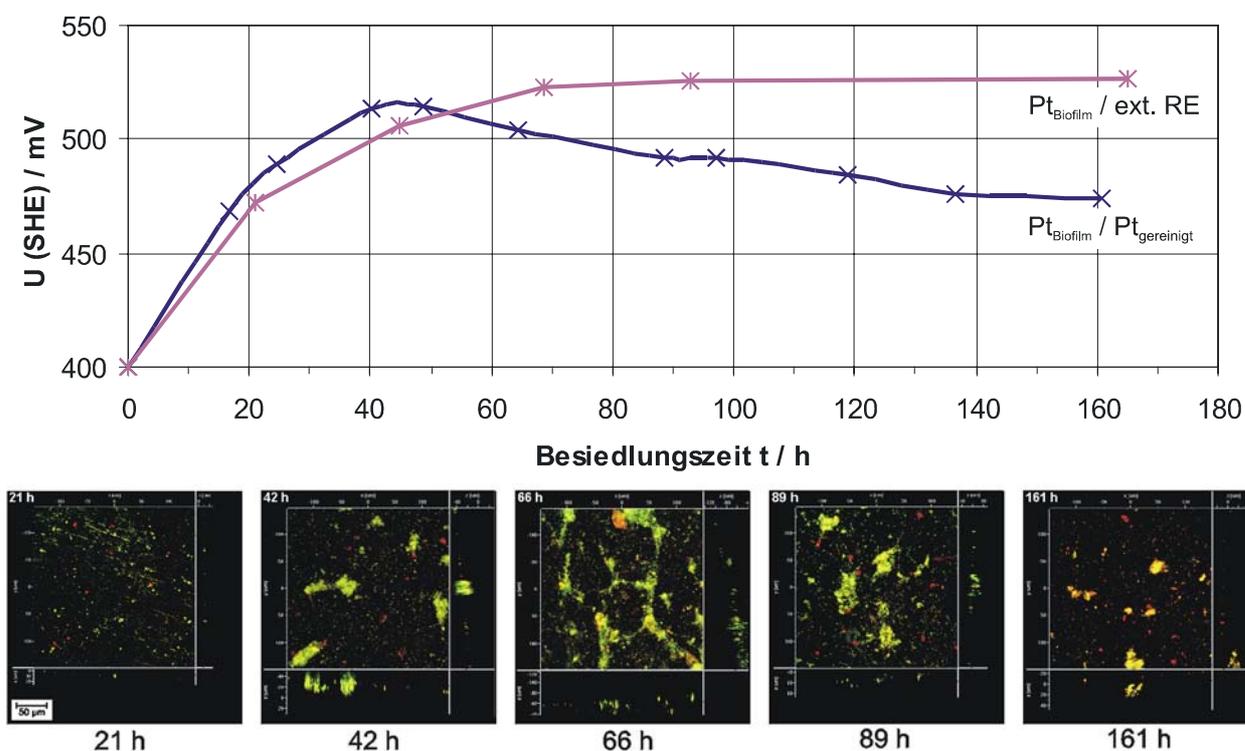


Abb. 69: oben: Vergleich der Potentialentwicklung bei interner und externer Messung, unten: 3D-SCLM-Projektionen der Elektrodenoberflächen (Mikroorganismen hell markiert)

Beim Vergleich bei der Messung zwischen der durch Wasserstoffentwicklung gereinigten und der besiedelten Elektrode zu messenden maximalen Potentialdifferenzen mit dem Verlauf des Elektrodenpotentials bei Messung der parallel entnommenen Coupons gegen die externe Bezugs elektrode (Abb. 69 oben), verliefen beide Kurven für die ersten 50 h der Messung parallel. Das Absinken der Potentialdifferenz Pt_{Biofilm} / Pt im weiteren Verlauf der Messung ist hauptsächlich auf eine Veränderung des Redoxpotentials des über die Zeit an Nährstoffen verarmenden Mediums zurückzuführen.

Korreliert man die ermittelten Potentiale mit den optisch durch das CSLM zu detektierenden Biofilmen (Abb. 69 unten, helle Areale), war eine Übereinstimmung zwischen Anstieg der Besiedlungsdichte und Potentialerhöhung für den Zeitraum von 21 h bis zu 66 h offensichtlich. In diesem Zeitraum wurde der Aufwuchs des Films von einer Monolage (21 h) über einzelne Kolonien (42 h) bis zu einer vernetzten Koloniestruktur (66 h) beobachtet. Die aufgrund der Verarmung der Nährlösung auftretende Rückbildung der Kolonien bei 89 h und 161 h war hingegen nicht mit elektrochemischen Messmethoden detektierbar.

Bei der elektrochemischen Untersuchung der entnommenen Proben zeigten die Impedanzspektren am Ruhepotential zwar eine leichte Erhöhung der Impedanz für mittlere und hohe Frequenzen im Vergleich zur unbesiedelten Oberfläche, die Spektren der einzelnen Besiedlungsdichten des Biofilms wiesen aber nur minimale Unterschiede (Abb. 70 a) auf. Beim Vergleich der Zyklovoltamogramme konnten hingegen ein deutlicher Einfluss der Biofilmbildung auf das elektrochemische Verhalten der besiedelten Platin-Elektroden festgestellt werden.

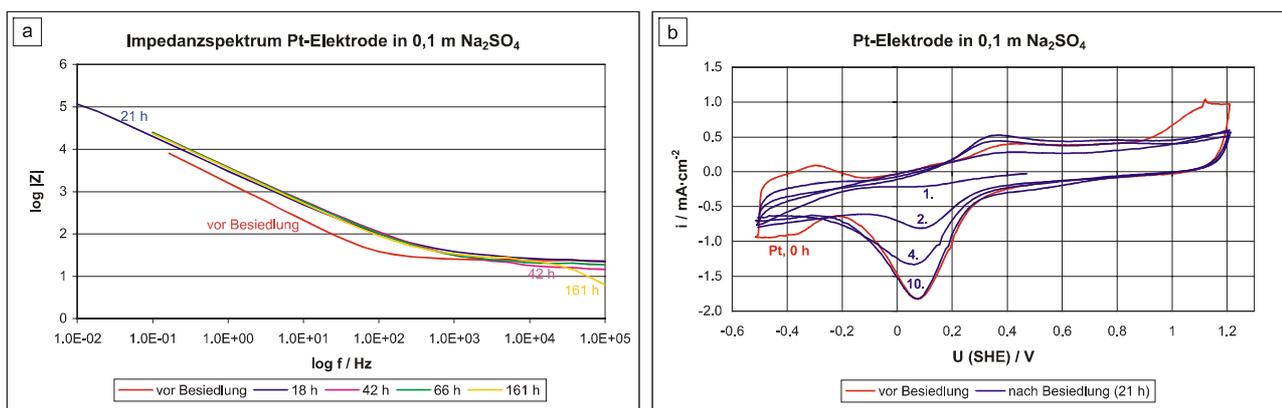


Abb. 70: Einfluss der Biofilmbesiedlung auf Pt-Elektroden: a) Impedanzspektren der verschiedenen Besiedlungszeiten; b) CVs von unbesiedelter (rot) und besiedelter Pt-Elektrode (21 h, blau) in belüfteter 0.1 m Na₂SO₄, dU/dt = 50 mV/s

Abb. 70 b zeigt den ersten sowie nachfolgende Zyklen der für 21 h besiedelten Platinelektrode in belüfteter 0.1 m Na₂SO₄ (pH ≈ 7) mit einem Vorschub von

$dU/dt = 50 \text{ mV/s}$. Das CV vor Besiedlung mit Bakterien (rot) zeigt die typischen Signale der Wasserstoffadsorption ($U \approx -0.35 \text{ V}$), der Platinoxidbildung ($U = 0.3 \text{ bis } 1.2 \text{ V}$) und -reduktion ($U = 0.25 \text{ bis } -0.15 \text{ V}$). In der belüfteten Lösung überlappen die Signale von Wasserstoffadsorption und Sauerstoffreduktion für Potentiale $U_{\text{SHE}} < 0.5 \text{ V}$.

Das erste Zyklovoltamogramm der für 21 h besiedelten Platinoberfläche, das bei $U = U_R = 475 \text{ mV}$ in kathodischer Richtung gestartet wurde, zeigte vollständige Inhibition der Wasserstoffadsorption und deutliche Inhibition der Platinoxidbildung und -reduktion, während die Sauerstoffreduktion stattfand. Für die später entnommenen Proben war im ersten Zyklus keine Platinoxid-Reduktion mehr erkennbar; die Reduktionsströme nehmen hier ab $U = -0.2 \text{ V}$ aber deutlich zu (Abb. 71 a).

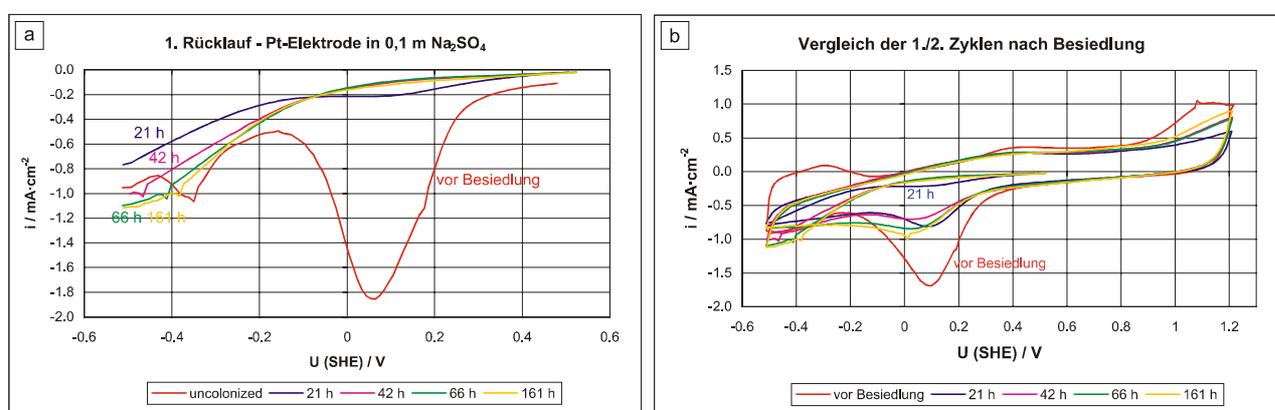


Abb. 71: Vergleich der Zyklovoltamogramme nach unterschiedlichen Besiedlungszeiten:

a) Ausschnitt des 1. Zyklus (0.5 - -0.5 V); b) Vergleich der 1. und 2. Zyklen

Im Vergleich zur unbesiedelten Oberfläche konnte für alle besiedelten Proben ein signifikanter Anstieg der Sauerstoff-Reduktionsladung beobachtet werden, der auf einen katalytischen Einfluss der mikrobiellen Besiedlung auf diese Teilreaktion hinweist. Abb. 72 a zeigt die Sauerstoffreduktionsladung (berechnet für den Bereich von -0.5 V - -0.1 V im anodischen Durchlauf) für die verschiedenen Beprobungszeiten und Zyklen.

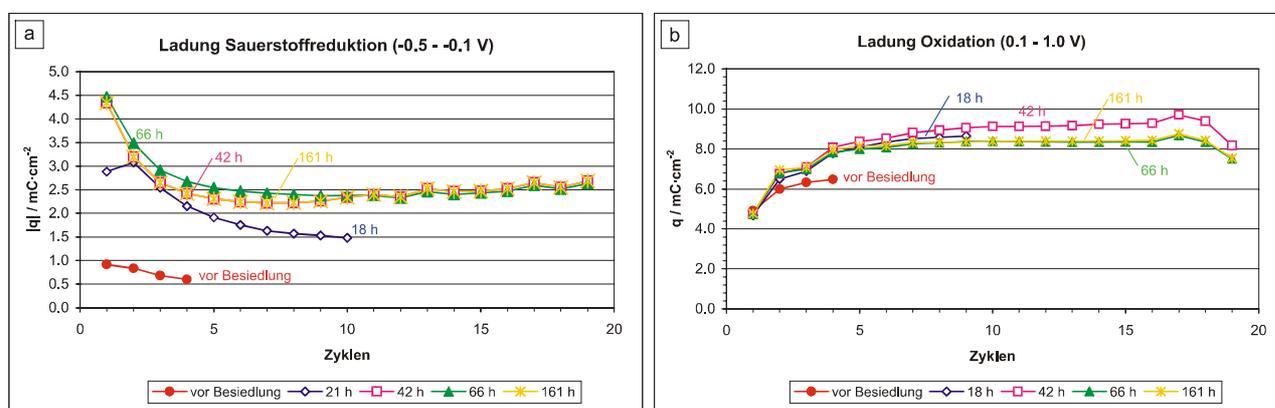


Abb. 72: Vergleich der umgesetzten Ladungen nach unterschiedlichen Besiedlungszeiten:

a) Sauerstoffreduktionsladung (-0.5 - 0.1 V anod.); b) Oxidationsladung (0.1 - 1.0 V anod.)

Durch kontinuierliches Zyklen stiegen Ströme für Oxidbildung und -reduktion wieder auf die für unbesiedelte Proben beobachteten Werte an, während die Wasserstoffadsorption nicht beobachtet werden konnte. Geringe Ladungszunahmen im Bereich der anodischen ($U > 0.3 \text{ V}$) und kathodischen ($U < 0.2 \text{ V}$) Durchläufe wiesen auf zusätzliche Redoxprozesse an Mikroorganismen und EPS hin (Abb. 72 b), auf die Veränderungen in Biofilmdicke und -struktur mit der Zeit nur schwachen Einfluss ausübten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass nur eine dünne Biofilmschicht auf der Elektrodenoberfläche elektrochemisch aktiv ist. Ein auf diesen Messungen basierendes Modellbild für die elektrochemischen Wechselwirkungen zwischen Biofilm und Elektrodenoberfläche wird in Abb. 79 vorgestellt.

4.3.4 Messungen mit Mikroelektrodenarrays

Obwohl die Messungen an makroskopischen Pt-Elektroden einen geringeren Einfluss der mikrobiellen Kolonien auf die Einstellung des Ruhepotentials der Elektroden erwarten liessen, konnten durch den geringen Oberflächenanteil dieser Strukturen im Vergleich zur Gesamtoberfläche keine Informationen zum lokalen Einfluss der dichten Biofilmkolonien auf die darunterliegende Elektrodenoberfläche erhalten werden.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden Messungen mit Mikroelektroden durchgeführt, bei der ein von der AG Prof. Schöning, FZ Jülich, zur Verfügung gestelltes Mikroelektrodenarray in Silizium-Planarbauweise zum Einsatz in einer Durchflusszelle modifiziert wurde. In ersten Versuchen wurden mit Hilfe unterschiedlicher Nährstoffkonzentrationen und Anzuchtzeiten verschiedene Filmschichtdicken auf der Arrayoberfläche erzeugt und die resultierenden Potentialverschiebungen ermittelt. Abb. 73 zeigt die Potentialverteilung auf der Arrayoberfläche und die SCLM-Abbildung der entsprechenden Biofilme. Die Ruhepotentialwerte U_R der einzelnen Elektroden wurden hierbei elektronisch über die $50 \mu\text{m}$ -Zwischenräume extrapoliert, um eine bessere Visualisierung zu erreichen. Relativ dick aufgewachsene Biofilme ($d \geq 100 \mu\text{m}$) wurden bei Anzucht mit höheren Nährstoffgehalten (R2A 1:30) erhalten, während sich bei Verwendung von geringer dosierten Nährmedien (R2A 1:100) hauptsächlich bakterielle Monolagen auf den Arrayoberflächen bildeten. Erstaunlicherweise bewegten sich die auf der Oberfläche messbaren Potentialwerte für beide Film-Morphologien im selben Potentialbereich (Abb. 73).

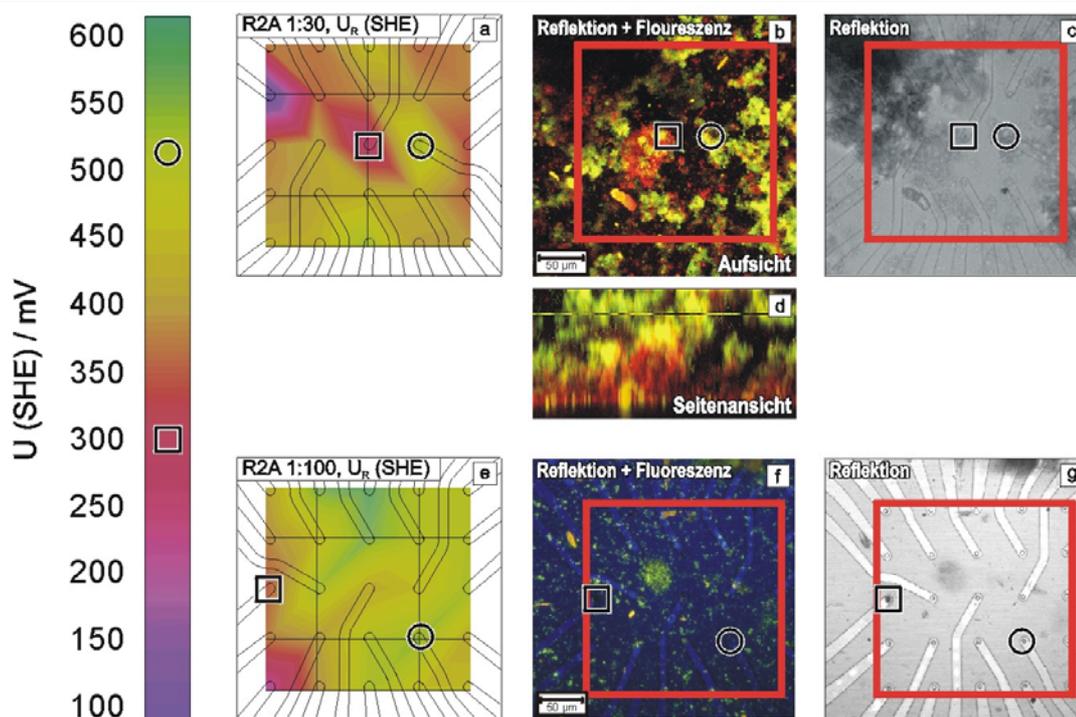


Abb. 73: Einfluss der lokalen Biofilmschichtdicke auf das lokale Ruhepotential U_R auf Gold-Mikroelektroden: oben: Biofilm nach Anzucht mit R2A (1:30), maximale Schichtdicke $d_{\max} \approx 200 \mu\text{m}$; unten: Biofilm nach Anzucht mit R2A (1:100), maximale Schichtdicke $d_{\max} \approx 10 \mu\text{m}$, a, e: U_R (Skala links); b, d, f: SCLM-Bilder der besiedelten Array-Oberflächen; d, g: Reflektionssignal der Array-Oberfläche. Zwei exemplarische Bereiche mit unterschiedlicher Morphologie aber identischem Ruhepotential U_R sind markiert (O: $U_R = 510 \text{ mV SHE}$, □: $U_R = 300 \text{ mV SHE}$)

Im Kontrast zu klassischen Mikroelektrodensystemen erlaubte das hier verwendete Durchflusszellensystem nicht nur zerstörungsfreie und wiederholbare elektrochemische Messungen während des Aufwachsens mikrobieller Filme, sondern war auch in der Lage, kontinuierliche Messungen der selben Probe bei späterer Behandlung mit Desinfektions- und Reinigungsmitteln zu liefern.

Abb. 74 zeigt die Potentialverteilung auf der Arrayoberfläche vor (a) und nach (b) der Besiedlung mit einer Biofilm-Mischkultur im Medium R2A (1:100) über 5 Tage. Während die gereinigte Oberfläche einen konstanten Potentialwert anzeigt, wurde für einige Elektroden nach dem Aufwachsen des Biofilms eine anodische Verschiebung von U_R von bis zu 300 mV beobachtet. Die Untersuchung des Arrays mit dem SCLM zeigte mehrere Kolonien auf der Oberfläche (c). Eine direkte Korrelation zwischen der Position dieser Biofilmkolonien bzw. den Punkten reduzierter Reflektivität auf der Oberfläche (d) und den Maxima des Potentials konnte jedoch nicht abgeleitet werden.

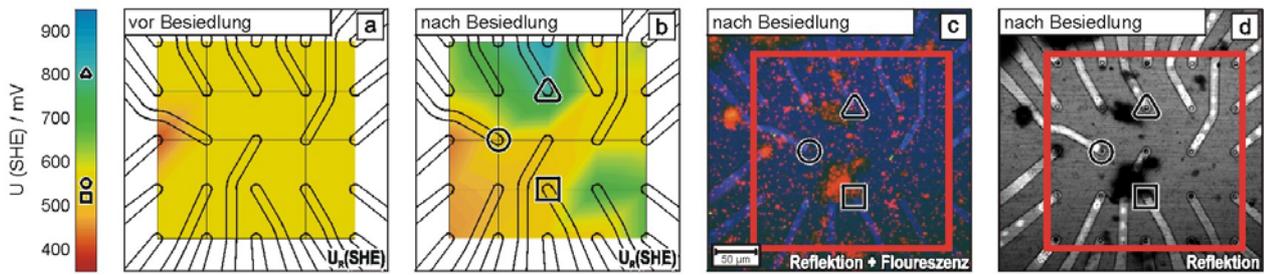


Abb. 74: Potentialverteilung auf dem Mikroelektrodenarray vor (a) und nach (b) Besiedlung mit Biofilm und korrespondierende SCLM-Aufnahme des Biofilms (c) und der Oberflächenreflektion (d). Exemplarische Elektroden mit Besiedlung (□), ohne Besiedlung (○) und im Bereich der maximalen Potentialverschiebung (Δ)

Da ein Einfluss der Atmung und des aktiven Stoffwechsels der Zellen auf das Potential der Elektroden nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde das Array mit 70 %igem EtOH für 10 min desinfiziert und nach 1-stündiger Ruhezeit erneut auf Potentialverteilung und Biofilmbedeckung untersucht (Abb. 75 a-c). Obwohl die mikroskopische Untersuchung mit BacLight™ eine vollständige Abtötung der Bakterien auf der Oberfläche und eine teilweise Ablösung des Films zeigte, waren die Werte des Ruhepotentials U_R auch nach der Desinfektion mit EtOH nahezu unverändert. Dies zeigte, dass die Inhibition der Mikroorganismen nur geringen Einfluss auf die Potentialverschiebung hat, solange die Messungen kurz nach der Desinfektion durchgeführt werden. Der Einfluss der Ablagerung von bakterieller EPS und anderer Stoffe, z. B. Enzyme, auf der Arrayoberfläche wurde nach oxidativer Reinigung der Zelle mit 10 %igem H_2O_2 für 30 min untersucht. Hier konnte nach einer Ruhezeit von 4 h die Wiedereinstellung der vor der Besiedlung ermittelten Ruhepotentiale beobachtet werden (Abb. 75 d).

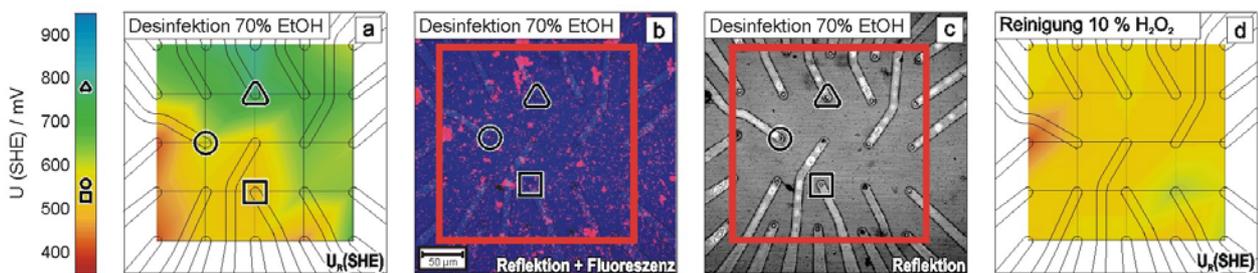


Abb. 75: Potentialverteilung auf dem besiedelten Mikroelektrodenarray nach Desinfektion mit 70%igem EtOH (a) (b+c: korrespondierende SCLM-Bilder) und nach Reinigung mit 10 %igem H_2O_2 (d)

Dieses Verhalten deutete darauf hin, dass die beobachteten Veränderungen der Elektrodenpotentiale nicht durch Stoffwechselaktivität der über der Elektrode befindlichen Bakterienkolonien, sondern durch Vorgänge direkt an der Oberfläche der Elektroden hervorgerufen werden. Da eine Reinigung der Elektrode mit H_2O_2 zur Wiedereinstellung der ursprünglichen Potentiale führte, erschien eine Beteiligung der EPS bei der

Entwicklung der Potentialverschiebungen über die Ausbildung von Belüftungselementen durch Abdeckung der Oberflächen möglich.

4.3.5 Elektrochemische Charakterisierung der EPS

Zur Klärung dieser Fragestellung wurden lokale Messungen an Goldoberflächen durchgeführt, die mit verschiedenen Schichtdicken eines aus mucroiden *Pseudomonas aeruginosa* SG 81 extrahierten Alginats beschichtet wurden (s. 3.6.4).

Beim Vergleich der Messwerte zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Kurven für die unbehandelte Goldoberfläche und den mit Alginat beschichteten Oberflächen (Abb. 76). Die EPS-Beschichtung führte zur Ausbildung eines deutlichen Oxidationspeaks bei 300 mV, der sich im 2. und 3. Durchlauf deutlich verkleinerte. Dies wies auf einen oxidativen Abbau der EPS während der Messung hin. Darüber hinaus wurden deutlich höhere Ströme im Bereich der Gold-Oxidation bei 1.2 V und eine im Vergleich zur Gold-Oberfläche ca. 150 mV früher einsetzende Sauerstoffentwicklung an den beschichteten Elektroden festgestellt. Im Rücklauf war eine Erhöhung der Reduktionsladung für die Gold-Reduktion und der Anstieg des Reduktionsstroms zwischen 0,5 und -0,1 V zu erkennen, die durch reversible Redox-aktive Zentren des Alginats hervorgerufen werden.

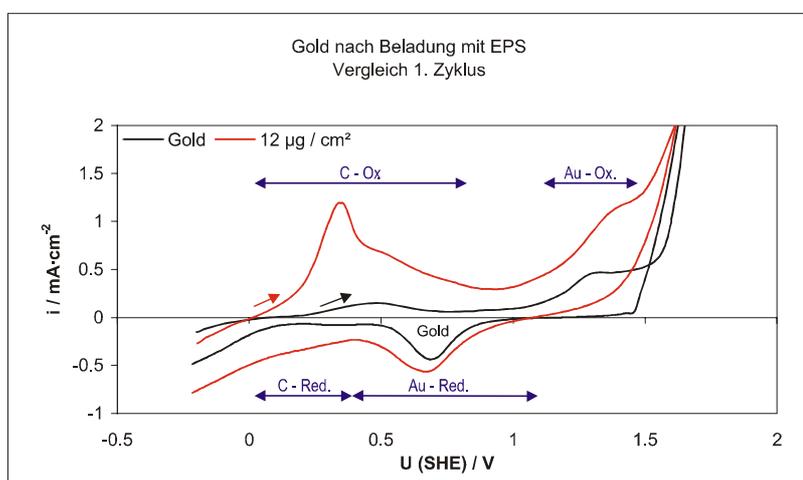


Abb. 76: Übersicht über Zyklovoltamogramme unbehandelter und EPS-beschichteter Goldoberflächen

Die starke Erhöhung der im Bereich der Gold-Oxidation und -Reduktion messbaren Ladungen bei Anwesenheit des Alginats deutete auf eine starke Wechselwirkung zwischen Gold und aktiven Zentren des Polymers hin. Da die gemessene Ladungsmenge bei allen Versuchen im Bereich von 5-10 $\text{mC}\cdot\text{cm}^{-2}$ lag, erfolgte die Reaktion hauptsächlich

an der Grenzfläche von Elektrode und EPS. Eine Mitwirkung von Redoxzentren, die tiefer in der EPS-Schicht lokalisiert sind, ist nicht erkennbar.

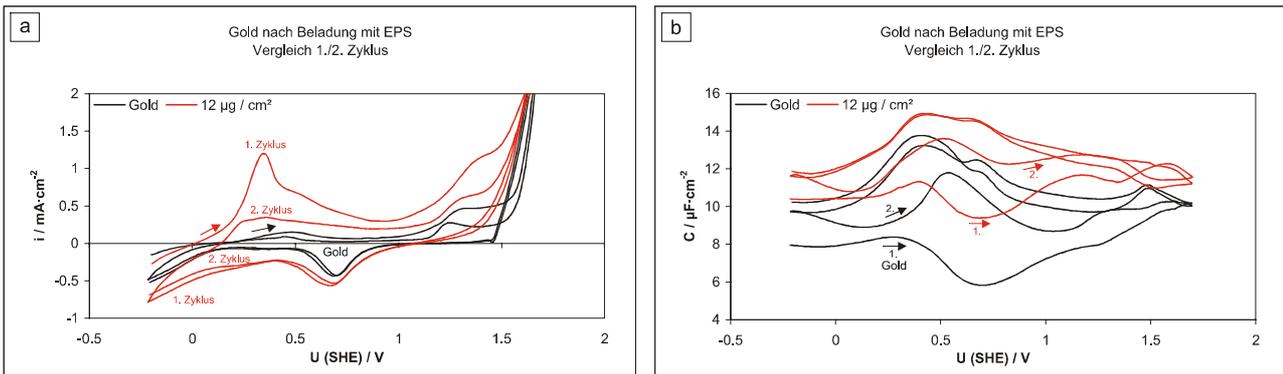


Abb. 77: Vergleich von Zyklovoltamogrammen (a) und Kapazitätsmessungen (a) für 1. und 2. Zyklus

Der Vergleich der Kapazitätsmessungen ergab eine deutlich erhöhte Kapazität der beschichteten Elektroden im Vergleich zur Goldoberfläche (Abb. 77 b), die sich bei oxidativer Belastung im 1. Zyklus noch erhöhte. Im Anschluss konnten für weitere Zyklen nur minimale Veränderungen der Zyklovoltamogramme und Kapazitätskurven festgestellt werden, die eine reversible Redoxaktivität der EPS-Matrix anzeigten.

Für die Zyklovoltamogramme der verschiedenen Schichtdicken des Alginats (Abb. 78) konnten nur leicht unterschiedliche Kurvenverläufe beobachtet werden, die keinen der Schichtdicke zuzuordnenden Trend aufwiesen. Auch der Vergleich der aus den Messkurven ermittelten Ruhepotentiale führte nicht zu den hohen, bei den natürlichen Biofilmen gemessenen Verschiebungen, die Abweichungen lagen deutlich unter 100 mV.

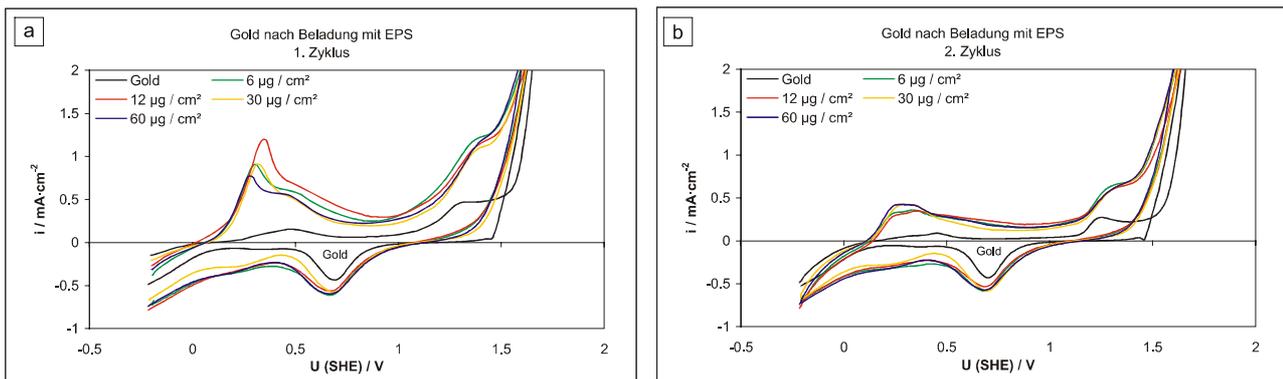


Abb. 78: Zyklovoltamogramme der EPS-beschichteten Elektroden: a) 1. Zyklus; b) 2. Zyklus

4.3.6 Modell für die elektrochemischen Prozesse an der Grenzfläche Edelmetall / Biofilm

Die Ergebnisse der verschiedenen Messungen an unter oligotrophen Bedingungen besiedelten Edelmetallelektroden können nun zu einem Modellbild zusammengefasst werden. Abb. 79 a zeigt ein unter diesen Aufwuchsparametern typisches Biofilmprofil: während der überwiegende Teil der Oberfläche von dünnen Filmen mit weniger als $5\ \mu\text{m}$ Schichtdicke besiedelt ist, können einzelne, hoch aufwachsende Kolonien von bis zu $100\ \mu\text{m}$ Höhe beobachtet werden.

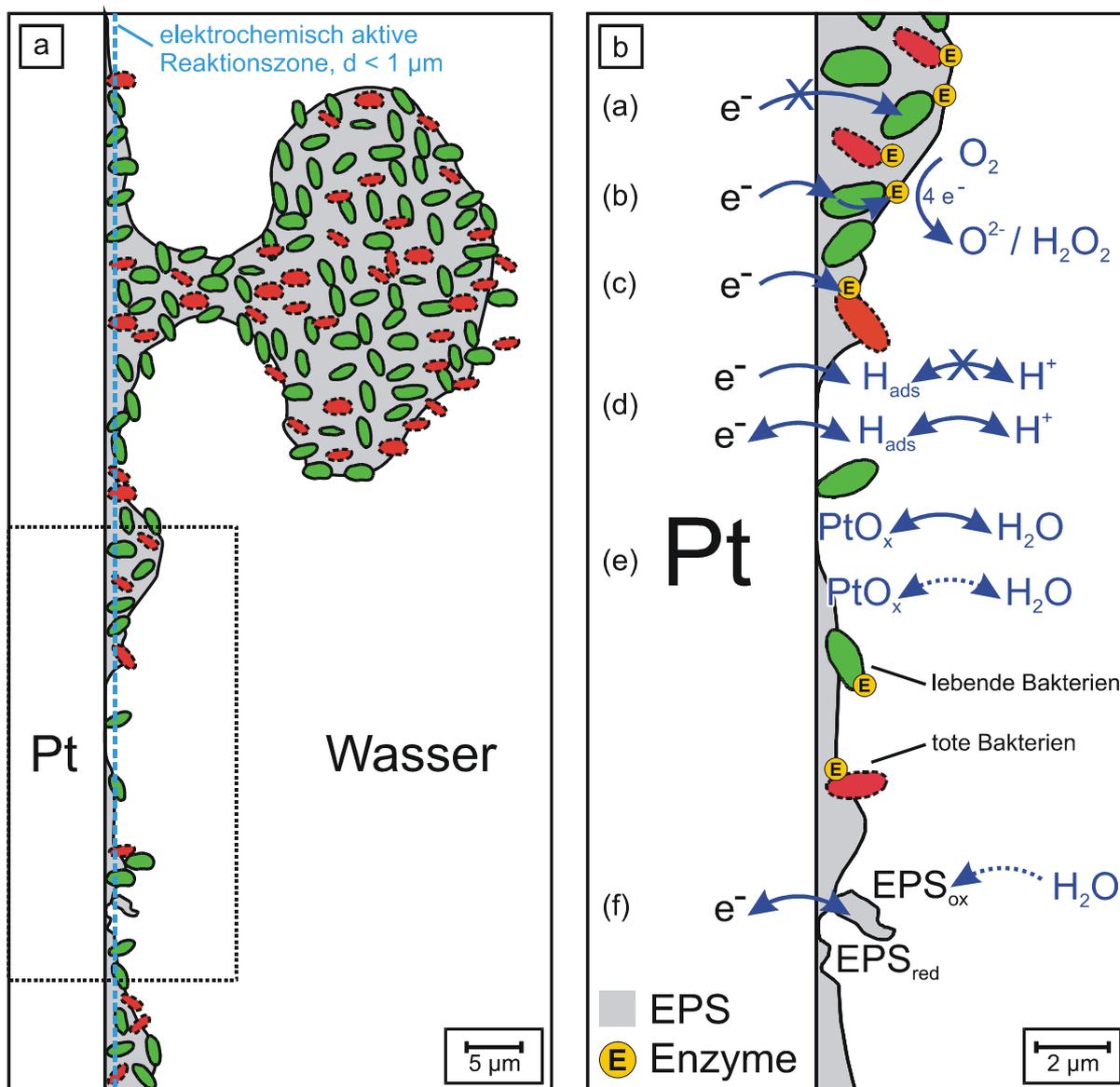


Abb. 79: Modellbild der Biofilm-Besiedlung in oligotrophen Systemen:
a) typische Morphologie; b) Redoxprozesse an der Oberfläche von Pt

Elektrochemische Messverfahren detektierten deutliche Veränderungen des Verhaltens der besiedelten Elektrodenoberflächen (Abb. 79 b). Hierbei wird die Beeinflussung des

Ruhepotentials U_R bei Messungen mit der Elektrochemischen Quarz-Mikrowaage bereits für bakterielle Monolagen während die ersten Schritte der reversiblen Besiedlung erfasst. Der Maximalwert von U_R wird deutlich vor dem Ende des gravimetrisch ermittelbaren Bewuchses erreicht und nicht vom Abbau größerer Kolonien beeinflusst. Die umgesetzten Ladungsmengen im Bereich weniger mC und direkte mikroelektrochemische Messungen an unterschiedlichen Schichtdicken der Filme zeigen, dass ein direkter Elektronentransfer in tiefere Schichten der Biofilm-Matrix (a) nicht beobachtet werden kann. Die Messergebnisse deuten auf eine dünne elektrochemisch aktive Zone auf der Elektrodenoberfläche mit einer Dicke von $d < 1 \mu\text{m}$. Durch Biofilmbildung wird die Sauerstoffreduktion auf der Oberfläche signifikant erhöht, was wahrscheinlich auf die enzymatische Katalyse durch die Mikroorganismen zurückzuführen ist. Der exakte Mechanismus konnte mit den vorliegenden Messungen nicht ermittelt werden. Ein möglicher Reaktionsweg könnte über den Transfer der Elektronen in die Organismen (b), den nachfolgenden Ladungstransport innerhalb der Bakterien und die abschließende enzymatische Reduktion von Sauerstoff an der Biofilmoberfläche verlaufen. Die Ergebnisse nach Desinfektion mit Ethanol bzw. Reinigung von H_2O_2 weisen auf einen Mechanismus, der auf dem direkten Elektronentransfer zu den bakteriellen Enzymen (c) oder andere reduktive Stoffe innerhalb der EPS-Matrix ohne aktiven Stoffwechseleinfluss der Organismen beruht, als weiteren möglichen Reaktionsweg hin. Während die Wasserstoffadsorption (d) vollständig durch die Besiedlung der Oberfläche inhibiert wurde, war der Oxidbildungsstrom im Vergleich zur freien Pt-Elektrode nur reduziert, was auf unterschiedliche Anforderungen dieser Prozesse an die Größe freigelegter metallischer Flächen des Platins hinweist. Durch Zyklen der besiedelten Elektrode konnten innerhalb weniger Durchläufe die Platinoxidations- und -reduktionsladungen der unbesiedelten Elektrode wieder eingestellt werden, während die Reinigungswirkung zur Beobachtung der Wasserstoffadsorption nicht ausreichend war. Die Untersuchung bakterieller EPS zeigte Redox-aktive Zentren innerhalb der Polymere und die Zerstörung der Polysaccharide durch reduktive und oxidative Prozesse (f). Ein direkter Einfluss gereinigter EPS auf die Potentialentwicklung im Rahmen von Diffusionselementen konnte trotz signifikanter Erhöhung der Redoxaktivität der belegten Goldelektroden nicht beobachtet werden.

4.4 Einfluss von Desinfektionsmitteln

Die Effektivität von Desinfektionsmitteln auf Biofilme wurde für Natriumhypochlorit (NaOCl) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bei jeweils fünf Konzentrationen untersucht, die mit Bezug auf das DVGW Regelwerk, Technische Regel W 291 „Reinigung und Desinfektion von Wasserverteilungsanlagen“ (Stand März 2000), ausgewählt wurden. Neben Versuchen mit Biofilmen, die auf drei Werkstoffproben im Labor angezüchtet wurden, kamen auch Vergleichscoupons aus der Technikumsanlage zum Einsatz, auf denen sich die Biofilme unter technischen Bedingungen über 14 Monate gebildet hatten.

Da die Untersuchungen an Edelmetallelektroden eine starke Veränderung der elektrochemischen Charakteristik durch die Besiedlung mit Biofilmen gezeigt hatten, wurde abschließend der Einfluss der Biofilmbildung auf das elektrochemische Verhalten während und nach der Desinfektion für Proben aus VA 1.4301, Kupfer und Gold untersucht.

4.4.1 Versuche mit Zuchtbiofilmen im Labor

Die Untersuchung der Desinfektionsmittelwirkung auf Biofilme, die in Durchflusszellen im Labormaßstab auf den Werkstoffen Polyethylen, Kupfer und Glas angezüchtet wurden, zeigte starke Schwankungen der Ergebnisse in Abhängigkeit vom untersuchten Werkstoff und dem eingesetzten Desinfektionsmittel.

Bei Verwendung von Natriumhypochlorit (Abb. 81) wurden auf den Coupons aus Polyethylen und Glas sowie auf allen Deckgläsern die Bakterien bereits mit der niedrigsten Konzentration von 10 mg/l NaOCl vollständig abgetötet. Einige Kolonien der Biofilme auf Kupferproben wurden trotz ähnlicher Morphologie der Filme scheinbar nicht vom Desinfektionsmittel beeinflusst; andere zeigten nur die Abtötung der äußeren Schichten (Abb. 80 c).

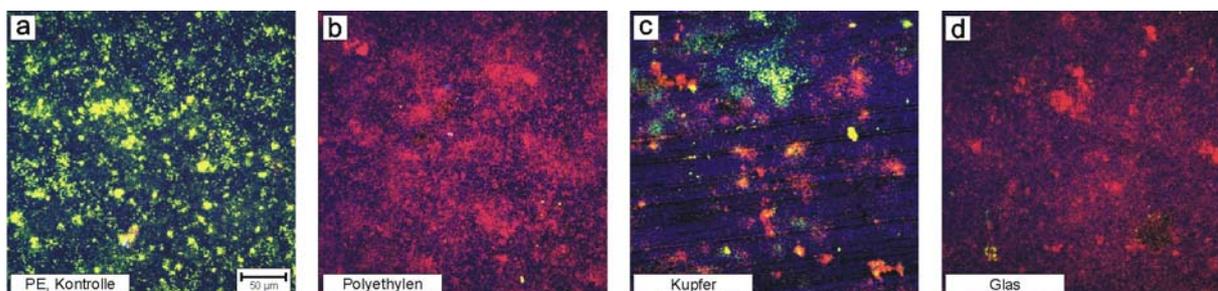


Abb. 80: Desinfektionswirkung von 10 mg/l NaOCl bei Laborbiofilmen;
a) Polyethylen - Kontrolle, b) Polyethylen, c) Kupfer, d) Glas

Desinfektionswirkung auf Laborbiofilme: Natriumhypochlorit (NaOCl)

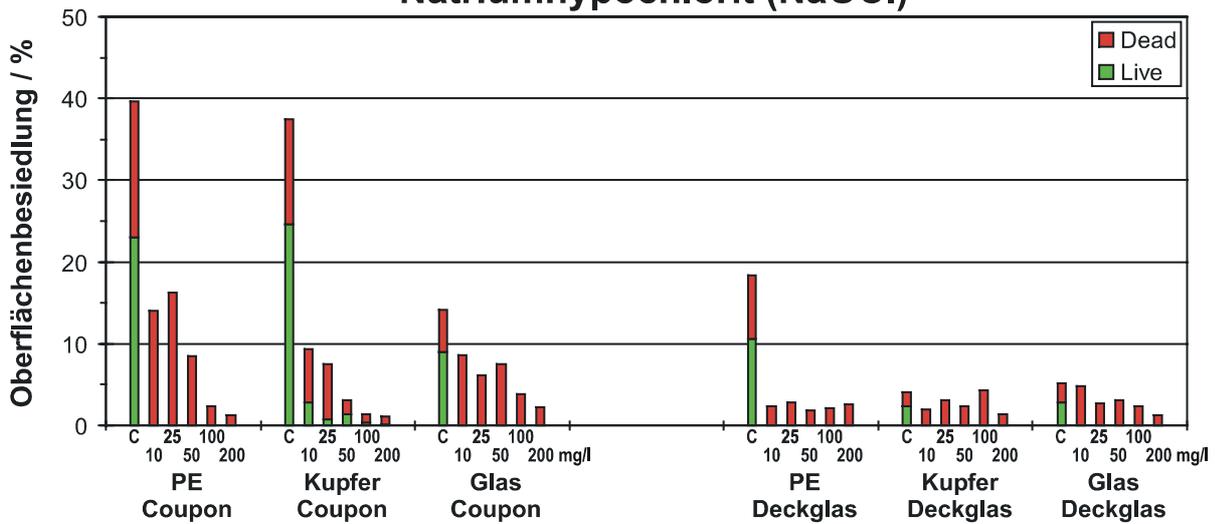


Abb. 81: Desinfektionswirkung von NaOCl bei Laborbiofilmen; 30 min Exposition;
links: Couponoberflächen; rechts: Deckgläser C: Kontrolle; 10 / 25 / 50 / 100 / 200 mg/l NaOCl

Ansteigende Konzentrationen des Hypochlorits reduzierten auf allen Oberflächen die Besiedlungsdichte signifikant (Abtragsraten 50 - 95 %), bei Kupfer konnten auch für 200 mg/l NaOCl noch Bakterien mit intakter Membran nachgewiesen werden, die in Spalten der Deckoxidschicht detektiert wurden (Abb. 82 d). Auch auf den in 1 mm Abstand zur Kupfer-Probe angebrachten Deckgläsern konnte eine geringere Empfindlichkeit der Organismen gegenüber niedriger Konzentrationen von NaOCl beobachtet werden; der Einsatz technisch angewendeter Konzentrationen (c > 50 mg/l NaOCl) führte aber im Gegensatz zur Kupferoberfläche zur vollständigen Abtötung.

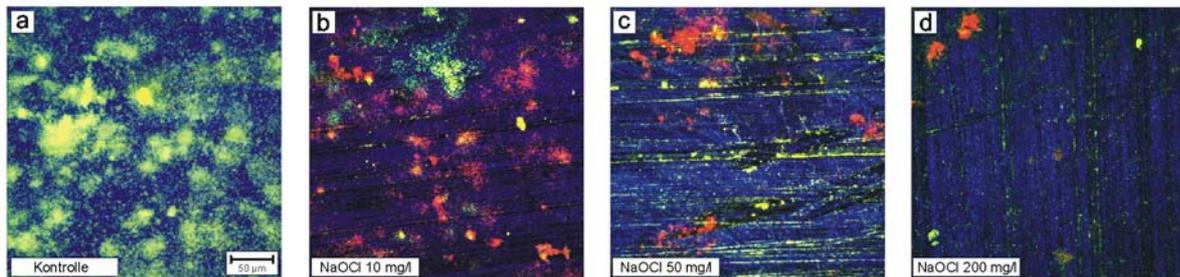


Abb. 82: Desinfektionswirkung von NaOCl: Laborbiofilme auf den Kupfercoupons:
a) Kontrolle, b) 10 mg/l, c) 50 mg/l, d) 200 mg/l NaOCl

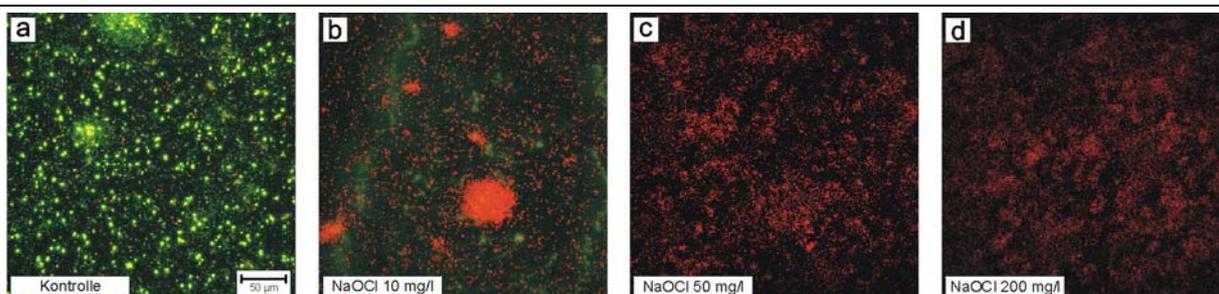


Abb. 83: Desinfektionswirkung von NaOCl: Laborbiofilme auf den Deckgläsern der Kupferproben:

a) Kontrolle, b) 10 mg/l, c) 50 mg/l, d) 200 mg/l NaOCl

Die Desinfektion mit Wasserstoffperoxid zeigte bei Vergleich mit den Messwerten für Hypochlorit trotz höherer Konzentrationen der aktiven Spezies eine deutlich geringere Wirkung auf die Mikroorganismen. Neben einer unzureichenden Abtötung wurde bei mikroskopischer Untersuchung ein starkes Aufquellen der Biofilmkolonien festgestellt, das besonders bei niedrigeren Konzentrationen eine scheinbare Zunahme der Oberflächenbesiedlung auf den Proben von PE und Glas sowie auf den Deckgläsern zur Folge hatte (Abb. 84).

Desinfektionswirkung auf Laborbiofilme: Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

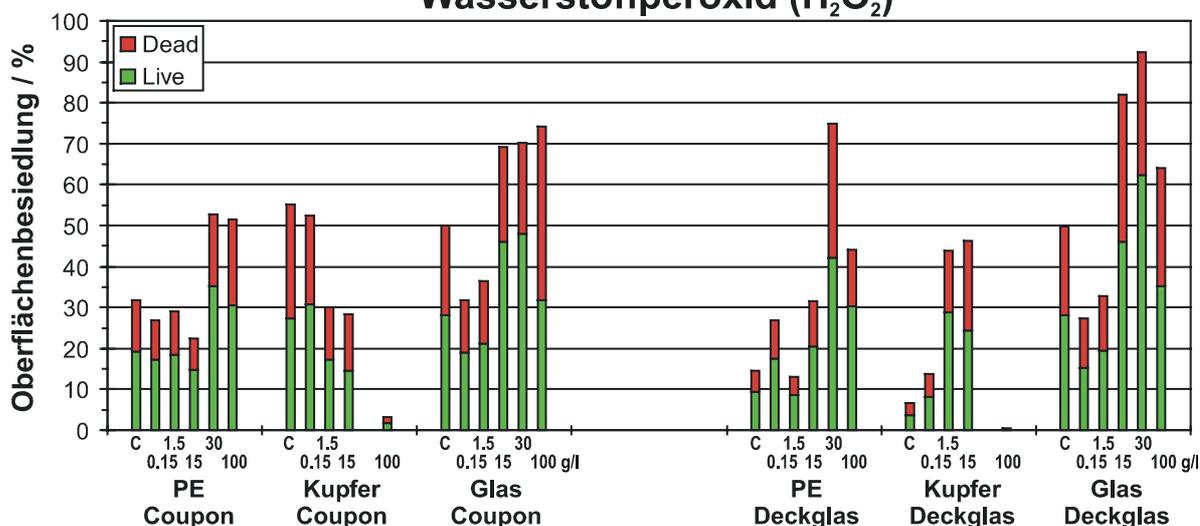


Abb. 84: Desinfektionswirkung von H_2O_2 bei Laborbiofilmen; 30 min Exposition;

links: Couponoberflächen; rechts: Deckgläser C: Kontrolle; 0.15 / 1.5 / 15 / 30 / 100 g/l H_2O_2

Auch für hohe Wirkstoffkonzentrationen, die mit 15 g/l Wasserstoffperoxid an der oberen Grenze des durch das DVGW-Regelwerk für den Trinkwasserbereich festgelegten Konzentrationsbereichs lagen, konnte für alle untersuchten Proben keine ausreichende Desinfektionswirkung ermittelt werden (Abb. 85).

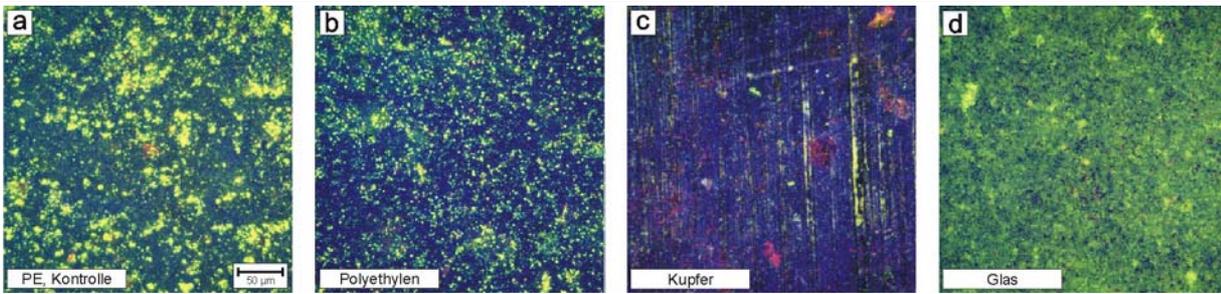


Abb. 85: Desinfektionswirkung von 15 g/l H₂O₂ bei Laborbiofilmen: a) Kontrolle, b) Polyethylen, c) Kupfer, d) Glas

Die höchsten Desinfektionsraten von Wasserstoffperoxid wurden für die Biofilme auf Kupferproben beobachtet. Die starke Entfernung der Besiedlung bei einer Dosierung von 100 g/l H₂O₂ scheint aber nicht auf einen direkten Angriff auf den Biofilm oder eine Verstärkung der Radikalkonzentration [PED97] über die Fenton-Reaktion oder den Haber-Weiss-Zyklus zurückzuführen zu sein, sondern primär auf die intensive Reaktion mit den Korrosionsprodukten des Kupfers, da die von den Mikroorganismen bevorzugt besiedelte Deckoxidschicht durch H₂O₂-Zersetzung unter Gasentwicklung abgetragen wird.

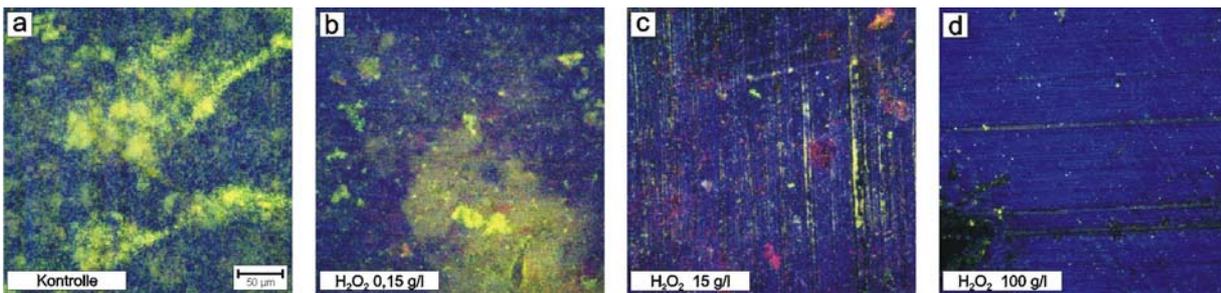


Abb. 86: Desinfektionswirkung von H₂O₂: Laborbiofilme auf den Kupfercoupons:
a) Kontrolle, b) 150 mg/l, c) 15 g/l, d) 100 g/l H₂O₂

4.4.2 Versuche mit Biofilmen aus der Technikumsanlage

Die Proben von insgesamt acht verschiedenen Werkstoffen aus der Technikumsanlage wurden analog zu den an den Laborproben durchgeführten Experimenten auf die Auswirkungen des Desinfektionsmitteleinsatzes untersucht. Hierbei standen neben Proben im Lieferzustand auch angeschliffene Coupons zur Verfügung, die den Einfluss der Oberflächenbehandlung auf das Desinfektionsergebnis klären sollten. Die Untersuchungen wurden aufgrund der hohen Anzahl der Proben mit den technisch üblichen Konzentrationen von Wasserstoffperoxid (150 mg/l, 15 g/l, 100 g/l) und Natriumhypochlorit (50 mg/l, 200 mg/l) durchgeführt.

Im Gegensatz zu den Laborbiofilmen war für alle eingesetzten Konzentrationen eine Desinfektionswirkung auf die deutlich dünner aufgewachsenen Filme aus dem Reinwassersystem zu beobachten, allerdings wurde mit Ausnahme von Kupfer und

Verzinktem Stahl auf keiner sonst untersuchten Probe die vollständige Abtötung der Organismen innerhalb der 30-minütigen Desinfektion erreicht. Besonders die bei Laborbiofilmen ermittelte intensive Wirkung des Hypochlorits fiel auf den langsam aufgewachsenen Filmen deutlich geringer aus. Hierbei ist jedoch durch die geringe Schichtdicke der untersuchten Filme nicht von einer in der Literatur für Biofilme mit 1 mm Ausdehnung beschriebenen Diffusionshemmung für Aktiv-Chlor [CLO98, STE01] auszugehen. Eine von [ARM98] beobachtete signifikant geringere Desinfektionswirkung von Hypochlorit auf Mikroorganismen auf PVC-Coupons im Vergleich zu Edelstahl und Glas konnte nicht bestätigt werden. Während bei Polyethylen, Verzinktem Stahl und Teflon eine stärkere Wirkung des NaOCl gegenüber dem Wasserstoffperoxid beobachtet wurde, war bei PVC und den beiden Edelstählen eine effektivere Desinfektion ab 150 mg/l H_2O_2 zu erkennen.

Desinfektionswirkung auf Reinwasserbiofilme: unbehandelte Proben

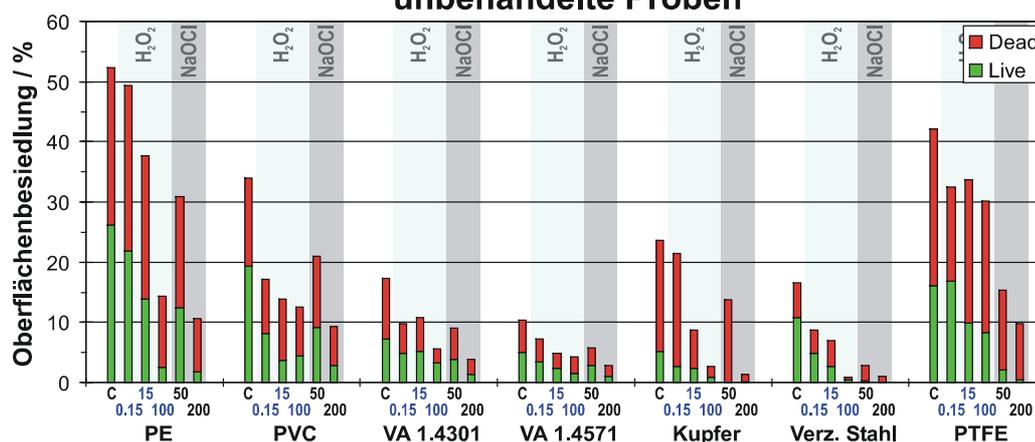


Abb. 87: Desinfektionswirkung bei unbehandelten Proben aus der Technikumsanlage;

C: Kontrolle; 0.15 / 15 / 100 g/l H_2O_2 ; 50 / 200 mg/l NaOCl

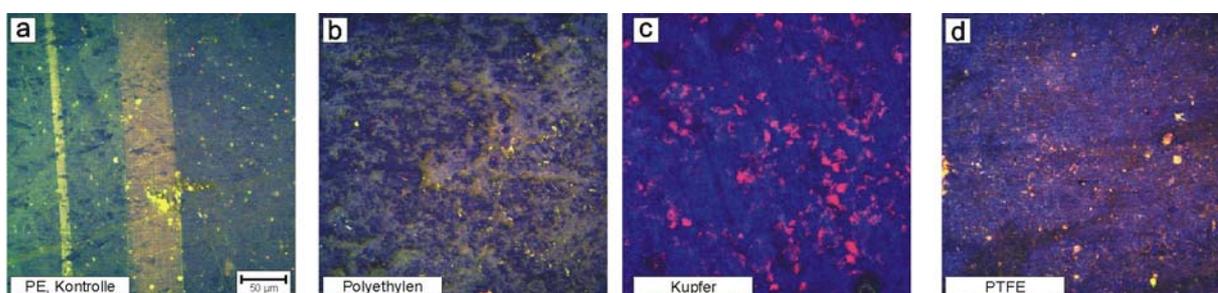


Abb. 88: Desinfektionswirkung von 50 mg/l NaOCl auf Proben aus der Technikumsanlage (Exposition 14 Monate):

a) Kontrolle, b) Polyethylen, c) Kupfer, d) Glas

Beim Vergleich der Ergebnisse von unbehandelten (Lieferzustand, Abb. 87) und angeschliffenen (Abb. 89) Coupons zeigten sich im Hinblick auf die Abtötung und Entfernung des Biofilms für die meisten Werkstoffe nur geringe Unterschiede durch das

Anschleifen. Eine Ausnahme bildeten hierbei die Proben aus Verzinktem Stahl und Kupfer, bei denen für geschliffene Oberflächen eine deutlich stärkere Entfernung der Filme beobachtet wurde.

**Desinfektionswirkung auf Reinwasserbiofilme:
geschliffene Proben**

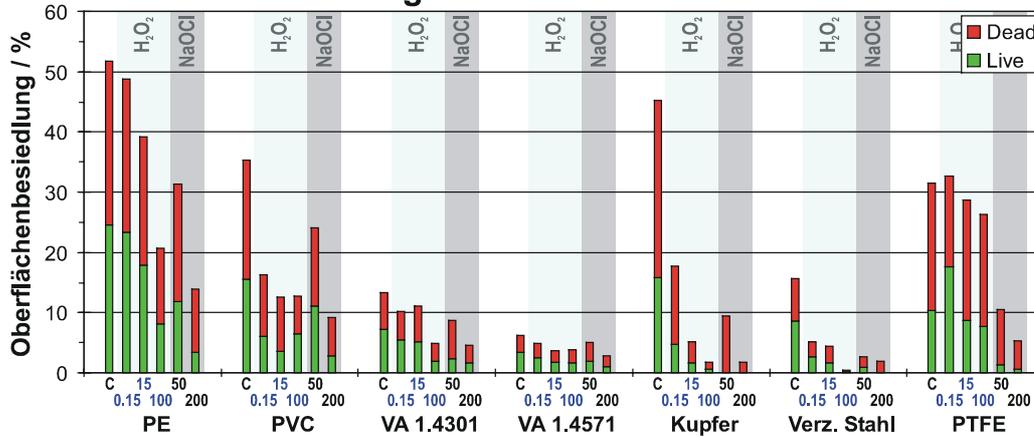


Abb. 89: Desinfektionswirkung bei geschliffenen Proben aus der Technikumsanlage;
C: Kontrolle; 0.15 / 15 / 100 g/l H₂O₂; 50 / 200 mg/l NaOCl

Diese Desinfektionswirkung ist analog zu den Laborversuchen auf die direkte Reaktion der Oxidationsmittel mit der Oxidschicht zurückzuführen, bei der sich die besiedelte Deckoxidschicht durch Gasentwicklung ablöste (Abb. 90).

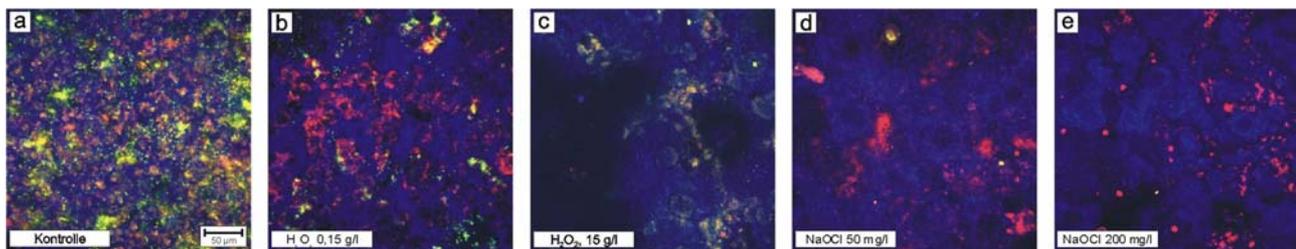


Abb. 90: Desinfektionswirkung auf Kupferproben aus dem Technikum (Exposition 14 Monate):
a) Kontrolle, b) H₂O₂ 150 mg/l, c) H₂O₂ 15 g/l, d) NaOCl 50 mg/l, e) NaOCl 200 mg/l

Die durchschnittlichen Abtötungs- und Entfernungsraten der einzelnen Konzentrationen für die untersuchten Reinwasserproben sind in Tab. 7 zusammengefasst.

| | Unbehandelte Oberfläche | | Geschliffene Oberfläche | |
|--|-------------------------|----------------|-------------------------|----------------|
| | Abtötung / % | Entfernung / % | Abtötung / % | Entfernung / % |
| Kontrolle | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| H ₂ O ₂ 0,15 g/l | 34,0 | 29,8 | 26,7 | 32,4 |
| H ₂ O ₂ 15 g/l | 54,3 | 45,5 | 52,4 | 45,1 |
| H ₂ O ₂ 100 g/l | 74,1 | 67,6 | 67,3 | 62,3 |
| NaOCl 50 mg/l | 68,8 | 51,4 | 66,6 | 50,5 |
| NaOCl 200 mg/l | 90,5 | 81,1 | 87,0 | 76,4 |

Tab. 7: Abtötungs- und Entfernungsraten der eingesetzten Desinfektionsmittel

4.4.3 Desinfektion und elektrochemisches Verhalten

Da die Untersuchungen an Edelmetallelektroden eine starke Veränderung der elektrochemischen Charakteristik durch die Besiedlung mit Biofilmen gezeigt hatten, wurden durch Messungen während und nach Einsatz von Desinfektionsmitteln die Auswirkungen des oxidativen Angriffs durch NaOCl und H_2O_2 auf die Biofilme und die darunterliegende Werkstoffoberfläche dokumentiert. Um die bei den vorherigen Untersuchungen aufgetretenen Unterschiede zwischen Laborbiofilmen und Technikumsproben aus dem Reinwasserbereich zu minimieren, wurden Proben aus VA 1.4301, Kupfer und Gold in einem nährstoffärmeren Nährmedium (R2A 1:100) über einen Zeitraum von 14 Tagen mit Biofilm besiedelt. Die hierbei entstandenen Filme zeigten deutlich dünnere Schichtdicken und entsprachen in der Morphologie eher den im technischen System beobachteten Strukturen.

Die Desinfektionsmittel wurden analog zu den Versuchen mit Proben aus dem Reinwassersystem mit Bezug auf technische Konzentrationen eingesetzt. Abb. 91 zeigt die mit dem SCLM ermittelten Besiedlungsdichten vor und nach der Desinfektion in Reinwasser für 10 min.

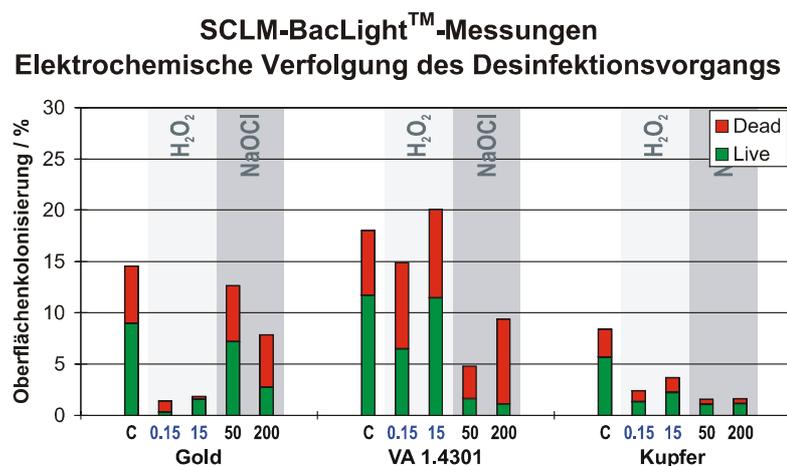


Abb. 91: Desinfektionswirkung an Gold, VA 1.4301 und Kupfer: C: Kontrolle; 0.15 / 15 g/l H_2O_2 ; 50 / 200 mg/l NaOCl

Für die Gold-Proben konnte mit dem SCLM eine relativ dünne Oberflächenbesiedlung mit kleineren Kolonien beobachtet werden, die bei Einsatz von Wasserstoffperoxid stark abgelöst wurde. Die geringe H_2O_2 -Konzentration zeigte deutlich intensivere Abtötung und Ablösung der Bakterien; hohe Gehalte von 15 g/l H_2O_2 führten erneut zu Quellphänomenen (Abb. 92 c). Bei Anwendung von NaOCl wurde für 50 mg/l nur eine geringe Wirkung auf den Biofilm detektiert; bei 200 mg/l war sowohl die Abtötung als auch die Entfernung der Filme noch wesentlich geringer als bei Desinfektion mit H_2O_2 .

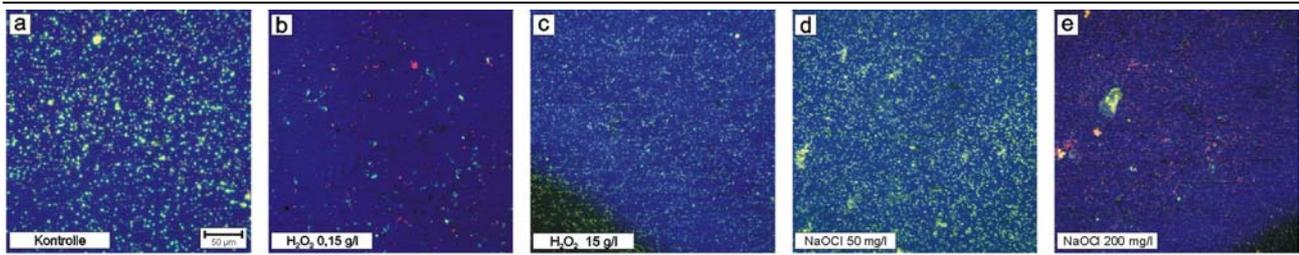


Abb. 92: Desinfektionswirkung auf Gold-Proben: a) Kontrolle; b, c) H₂O₂; d, e) NaOCl

Die Untersuchung der Werkstoffproben aus VA 1.4301 zeigte dagegen für den Einsatz von Wasserstoffperoxid nur eine sehr geringe Desinfektionswirkung auf die Biofilme. Während bei 150 mg/l H₂O₂ sowohl ein geringer Rückgang der Besiedlungsdichte als auch eine Abnahme der lebenden Organismen beobachtet werden konnte, wies die mit 15 g/l H₂O₂ behandelte Oberfläche keine eindeutigen Veränderungen im Vergleich zur Kontrollprobe auf. Starke Desinfektionswirkung konnte hingegen bei Einsatz von Hypochlorit festgestellt werden. Mit beiden Konzentrationen wurde eine deutliche Reduktion von Besiedlung und Vitalität der Filme erreicht (Abb. 93 d, e).

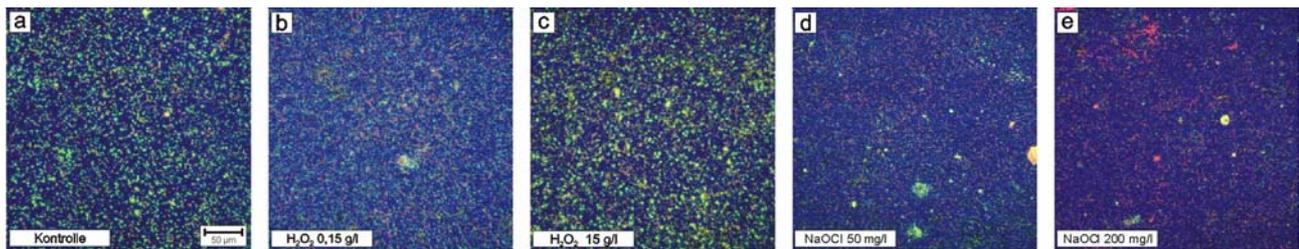


Abb. 93: Desinfektionswirkung auf Proben aus VA 1.4301: a) Kontrolle; b, c) H₂O₂; d, e) NaOCl

Die Besiedlungsdichte auf Kupfer-Coupons nahm sowohl bei Einsatz von Wasserstoffperoxid als auch bei Verwendung von Hypochlorit deutlich ab; aber auch hier wurde eine Ansiedlung überlebender Organismen innerhalb von Spalten der Oxidschicht detektiert. Durch die vergleichsweise kurze Anzuchtzeit war der Einfluss von Korrosionsprozessen auf die Ablösung der Organismen mit der Oxidschicht noch nicht in der Größenordnung der Reinwasserproben feststellbar.

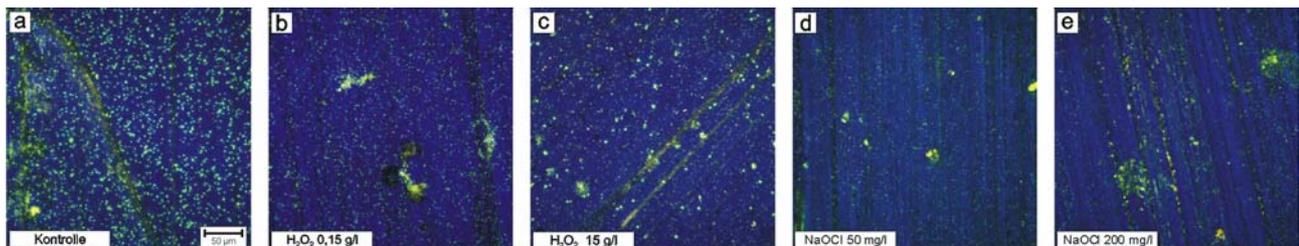


Abb. 94: Desinfektionswirkung auf Kupfer-Proben: a) Kontrolle; b, c) H₂O₂; d, e) NaOCl

Biofilme auf Gold

Für die mit Mikroorganismen besiedelten Goldoberflächen konnte bei Zugabe von NaOCl und H_2O_2 ein starker Anstieg des Ruhepotentials U_R innerhalb weniger Sekunden beobachtet werden. Im Vergleich zu den unbesiedelten Elektroden wiesen die mit Biofilm belegten Proben deutlich geringere U_R vor der Desinfektion auf und zeigten auch nach Zugabe noch um 50 - 150 mV niedrigere Ruhepotentiale als die freien Goldoberflächen. Die Zugabe von 15 g/l H_2O_2 führte zu einer drastischen Erhöhung von U_R für die besiedelte Elektrode. Der Endwert von U_R lag hierbei ca. 50 mV über dem Wert der unbehandelten Probe.

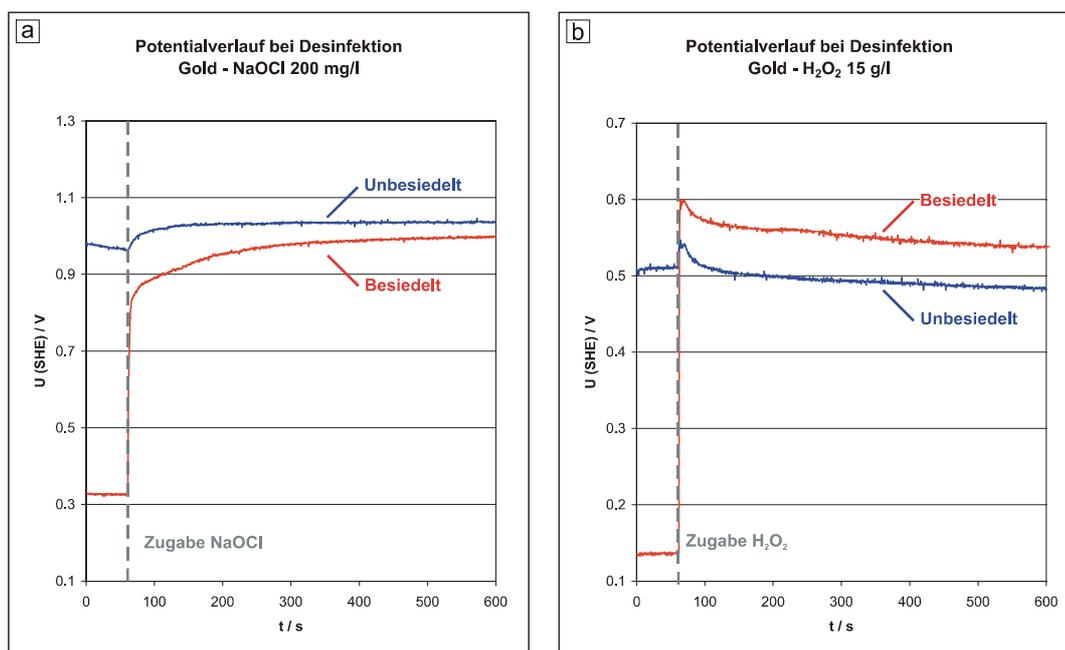


Abb. 95: Ruhepotentialverlauf während der Desinfektion von Goldoberflächen: a) NaOCl 200 mg/l, b) H_2O_2 15 g/l

Die Zyklovoltamogramme nach Besiedlung mit Biofilmen im Bereich von 0.3 - 0.8 V zeigten zusätzliche Oxidationsströme im Vergleich zur freien Goldoberfläche (vgl. Abb. 77 a), die nach Zugabe von Hypochlorit deutlich reduziert wurden und sich nach mehreren Zyklen verkleinerten (Abb. 96 a). Aus der Lage dieser Peaks und der korrespondierenden Erhöhung der reduktiven Ströme im Bereich 0 - -0.5 V kann hier auf die oxidative Zerstörung der EPS durch NaOCl geschlossen werden.

Vergleicht man die Stromspannungskurven der mit Wasserstoffperoxid desinfizierten besiedelten Proben (Abb. 96 b), so zeigt sich ein geringerer Einfluss der niedrigeren Wirkstoffkonzentration auf die Probe, während die mit 15 g/l desinfizierte Probe deutliche Zeichen einer Zerstörung organischer Bestandteile des Biofilms mit hohen oxidativen und reduktiven Strömen aufweist.

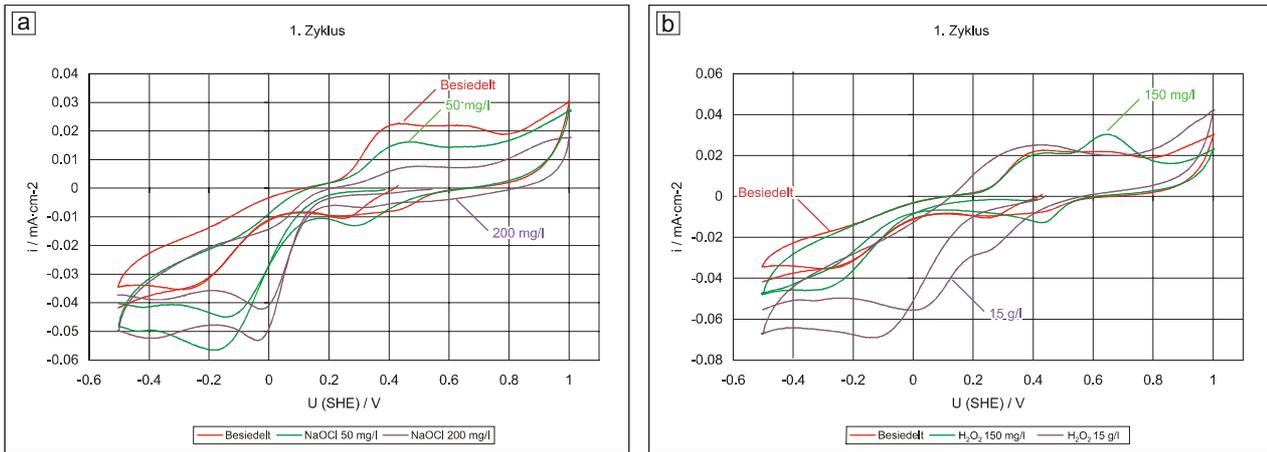


Abb. 96: Zyklovoltammogramme besiedelter Gold-Elektroden in 0.1 m Na₂SO₄ (dU/dt = 50 mV/s) nach 10 min Desinfektion: a) NaOCl, b) H₂O₂

Vergleicht man die umgesetzten Ladungsmengen ($|q| = |q_+| + |q_-|$) der einzelnen Zyklovoltammogramme über die untersuchten Zyklen (Abb. 97), so ist eine deutliche Reduzierung der Ladungsmengen durch Biofilmbesiedlung festzustellen, die eine Inhibition der Reaktionen an der Elektrodenoberfläche anzeigt, wie sie auch für die untersuchten Platinelektroden (Abs. 4.3.3) festgestellt werden konnte.

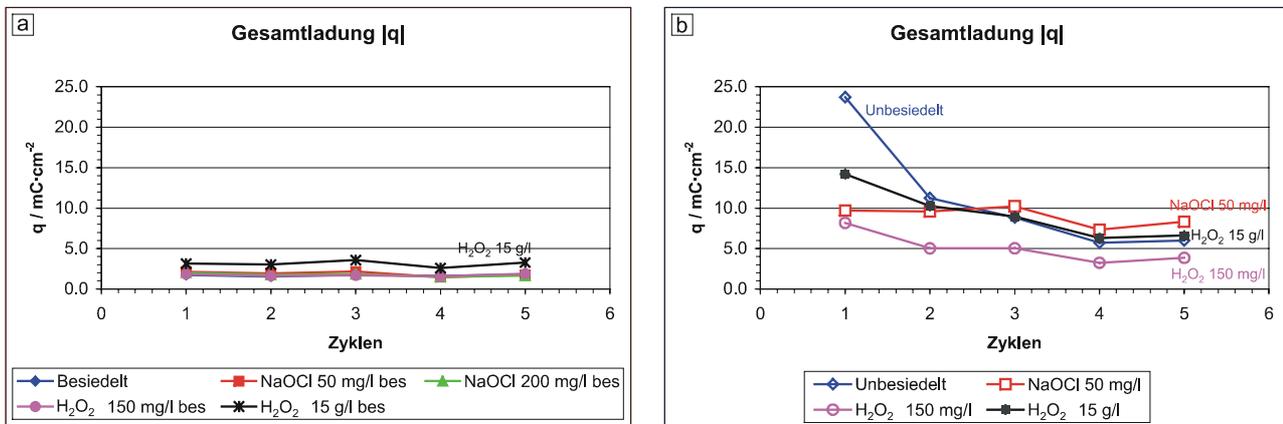


Abb. 97: Übersicht über die Gesamtladung ($|q| = |q_+| + |q_-|$) aus Zyklovoltammogrammen von Gold in 0.1 m Na₂SO₄ (dU/dt = 50 mV/s) nach 10 min Desinfektion mit H₂O₂: a) Besiedelte Proben, b) unbesiedelte Proben

Biofilme auf Kupfer

Die Besiedlung der Kupferoberflächen durch Biofilme führte durch die auch bei mikroskopischer Betrachtung erkennbare Integration der Bakterien in die Deckoxidschichten zu Änderungen des elektrochemischen Verhaltens der Coupons. Während der Zudosierung der Desinfektionsmittel konnte für unbesiedelte und besiedelte Elektroden eine intensive Erhöhung des Ruhepotentials U_R ermittelt werden, die einen Overshoot auf Werte zwischen 450 - 600 mV für ca. 50 s nach Zugabe zeigte und dann

deutlich um 80 - 150 mV abfiel (Abb. 98). Dieser Effekt war für alle untersuchten Konzentrationen bei den besiedelten Oberflächen deutlich stärker ausgeprägt. Im weiteren Verlauf der Messung näherte sich U_R der besiedelten Oberflächen langsam den Werten der unbesiedelten Elektroden an.

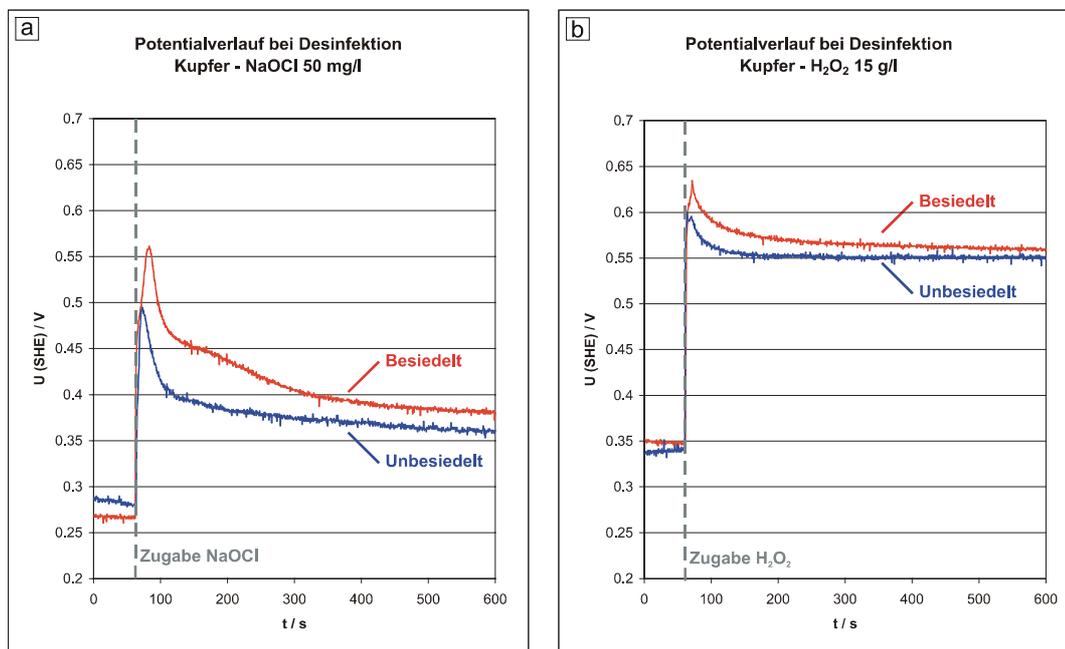


Abb. 98: Ruhepotentialverlauf während der Desinfektion von Kupferproben a) NaOCl 50 mg/l, b) H_2O_2 15 g/l

Der Einfluss der Biofilmbelugung auf Kupferoberflächen konnte ebenfalls nach Abschluss der Desinfektion bei der Analyse der Impedanzspektren in 0.1 m Na_2SO_4 am Ruhepotential der Proben dokumentiert werden. Die Werte von U_R waren nach der Desinfektion für die unbesiedelten Elektroden deutlich erhöht (Tab. 8), während für die besiedelten Elektroden nur minimale Veränderungen beobachtet werden konnten. Eine Ausnahme bildeten die Proben, die mit 15 g/l H_2O_2 behandelt worden waren. Die großen Unterschiede der ermittelten Potentialwerte deuten hier auf starke Veränderungen der Oberflächenzusammensetzung durch das hohe Redoxpotential, u. U. durch Bildung von Cu(II)-Oxiden.

Die Spektren der nicht desinfizierten Elektroden zeigten besonders im Bereich der niedrigen Frequenzen ($f < 100$ Hz), die Durchtrittsprozessen durch die Phasengrenze zugeordnet werden, eine deutliche Verringerung der Impedanz Z für die besiedelten Proben. Diese Verringerung wird durch den Einsatz von Desinfektionsmitteln aufgehoben, im Vergleich zu den unbesiedelten Oberflächen konnte eine Erhöhung der Impedanzen Z bei deutlich geringeren Varianzen zwischen den einzelnen Wirkstoffkonzentrationen ermittelt werden.

Ergebnisse

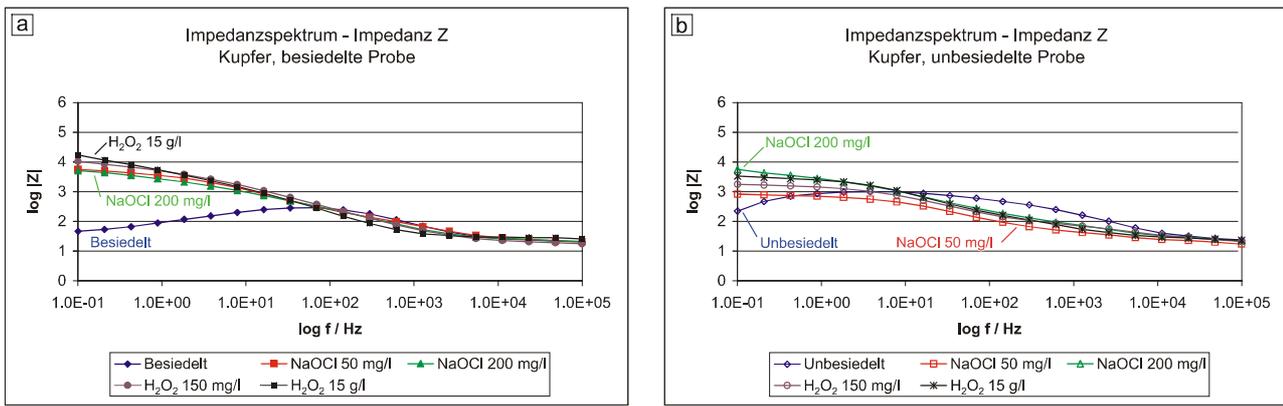


Abb. 99: Impedanz Z der Kupfer Coupons nach Desinfektion in 0.1 m Na₂SO₄ am Ruhepotential U_R:
a) besiedelte Probe, b) unbesiedelte Probe

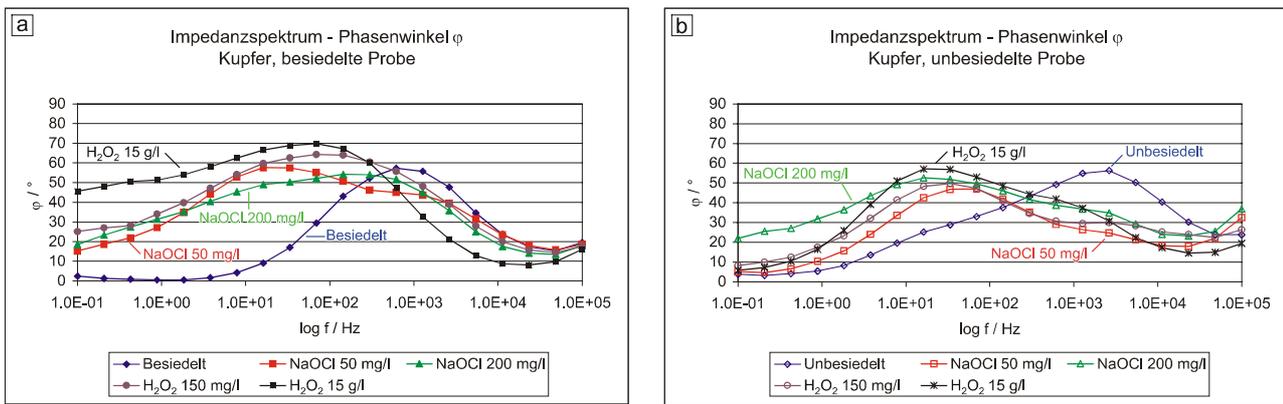


Abb. 100: Phasenwinkel phi der Kupfer Coupons nach Desinfektion in 0.1 m Na₂SO₄ am Ruhepotential U_R:
a) besiedelte Probe, b) unbesiedelte Probe

| | Unbesiedelt | | | Besiedelt | | |
|--|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | U _R | C _D | C _F | U _R | C _D | C _F |
| Referenz | 294 mV | 1,19 µF | 22,3 µF | 280 mV | 4,5 µF | - |
| 50 mg/l NaOCl | 375 mV | 3,42 µF | 33,1 µF | 280 mV | 5,3 µF | 23,2 µF |
| 200 mg/l NaOCl | 375 mV | 2,23 µF | 28,9 µF | 280 mV | 6,3 µF | 10,5 µF |
| 150 mg/l H ₂ O ₂ | 400 mV | 2,15 µF | 28,9 µF | 280 mV | 6,8 µF | 12,2 µF |
| 15 g/l H ₂ O ₂ | 78 mV | 2,88 µF | 30,0 µF | 400 mV | 9,8 µF | 16,4 µF |

Tab. 8: Übersicht über die Ruhepotentiale U_R, Doppelschichtkapazitäten C_D und Farradayschen Kapazitäten C_F für Kupfer-Elektroden in 0.1 m Na₂SO₄ nach Desinfektion

Die Analyse der kapazitiven Anteile ergab für die unbesiedelte Probe vor Desinfektion eine Doppelschichtkapazität von C_D = 1,19 µF, die einer dünnen Oxidschicht auf der Probenoberfläche zugeordnet werden kann. Der Vergleich mit der besiedelten Oberfläche zeigte eine deutliche Erhöhung dieses Wertes um Faktor 2 - 3 (Tab. 8) durch die aufliegenden Biofilme. Auch die Analyse der Farradayschen Anteile der Kapazität im Bereich von f = 10 - 100 Hz, die Reaktionen zwischen Probe und Ionen des Elektrolyten zugeordnet werden, wies deutliche Veränderungen durch die Besiedlung auf. Während für

die unbesiedelte Probe mit $C_F = 22,3 \mu\text{F}$ ein für Metallelektroden typischer Wert ermittelt werden konnte, zeigte die besiedelte Oberfläche eine Hemmung dieser Reaktionen durch den Biofilm. Nach Einsatz von Desinfektionsmitteln konnte für alle Proben eine deutliche Erhöhung von C_D und C_F festgestellt werden, die auf eine punktuelle Zerstörung der Passivschichten durch Oxidation schließen lassen. Besonders starke Veränderungen wurden für C_F der besiedelten Proben festgestellt, die einen stärkeren metallischen Anteil an der Impedanz durch Freilegung der Kupferoberfläche anzeigten.

Beim Vergleich der Zyklovoltamogramme in $0,1 \text{ m Na}_2\text{SO}_4$ nach Aufnahme der Impedanzspektren konnten ebenfalls Differenzen des elektrochemischen Verhaltens zwischen Biofilm-belegten und den unbesiedelten Oberflächen ermittelt werden. Während die unbesiedelte Elektrode vor Desinfektionsmitteleinsatz nur sehr geringe Kupferoxidations- und -reduktionsströme zeigte, wurden auf der besiedelten Oberfläche deutliche Signale einer Kupferoxidation und -reduktion ermittelt, die Störungen innerhalb der Passivschicht anzeigten. Nach Einwirkung von Hypochlorit konnten auf den Biofilm-belegten Proben nur geringe Veränderungen der Strom-Spannungskurven detektiert werden; die Desinfektion mit 200 mg/l NaOCl führte hier im 1. Zyklus zunächst zu einer Verringerung der Oxidationsladung. Für die unbesiedelten Proben zeigten sich starke Oxidations- und Reduktionspeaks, die in den ersten Zyklen der Reduktion von Kupferoxiden und -chloriden zugeordnet werden konnten.

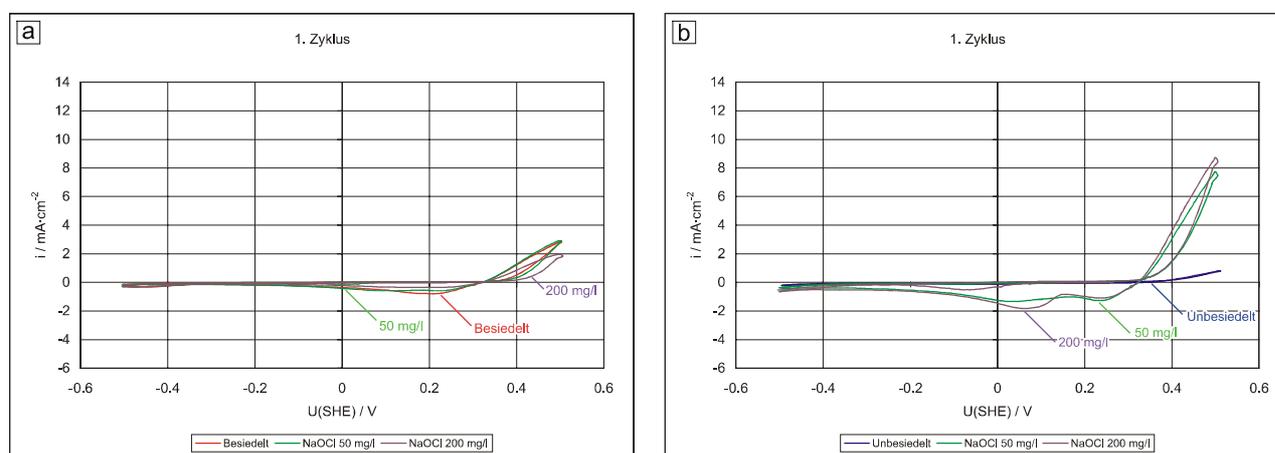


Abb. 101: Zyklovoltamogramme von Kupfer in $0,1 \text{ m Na}_2\text{SO}_4$ ($dU/dt = 50 \text{ mV/s}$) nach 10 min Desinfektion mit NaOCl :
a) Besiedelte Proben, b) unbesiedelte Proben

Bei Verwendung von Wasserstoffperoxid als Desinfektionsmittel zeigten sich deutlich geringere Unterschiede zwischen den Stromspannungskurven besiedelter und unbesiedelter Elektroden. Für die Coupons mit Biofilm wurde für $150 \text{ mg/l H}_2\text{O}_2$ eine leichte, für 15 g/l Wasserstoffperoxid eine deutliche Verringerung der Oxidations- und

Reduktionsströme für Kupfer beobachtet. Bei unbesiedelten Elektroden führte die Dosierung von 150 mg/l H_2O_2 zu einer geringen Aktivierung der Probenoberfläche, während bei 15 g/l H_2O_2 eine passivierende Wirkung festgestellt werden konnte.

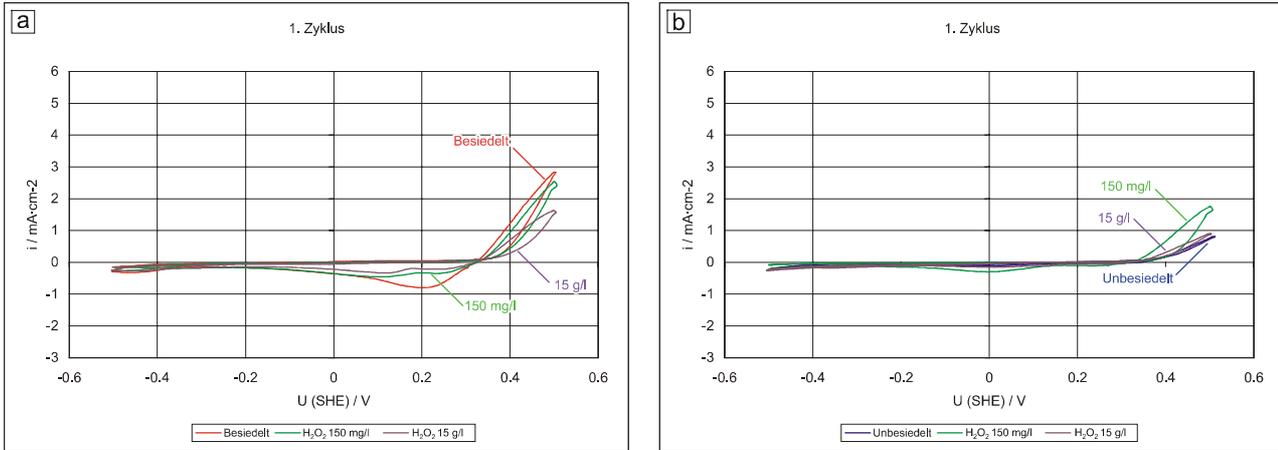


Abb. 102: Zyklovoltamogramme von Kupfer in 0.1 m Na_2SO_4 ($dU/dt = 50 \text{ mV/s}$) nach 10 min Desinfektion mit H_2O_2 : a) Besiedelte Proben, b) unbesiedelte Proben

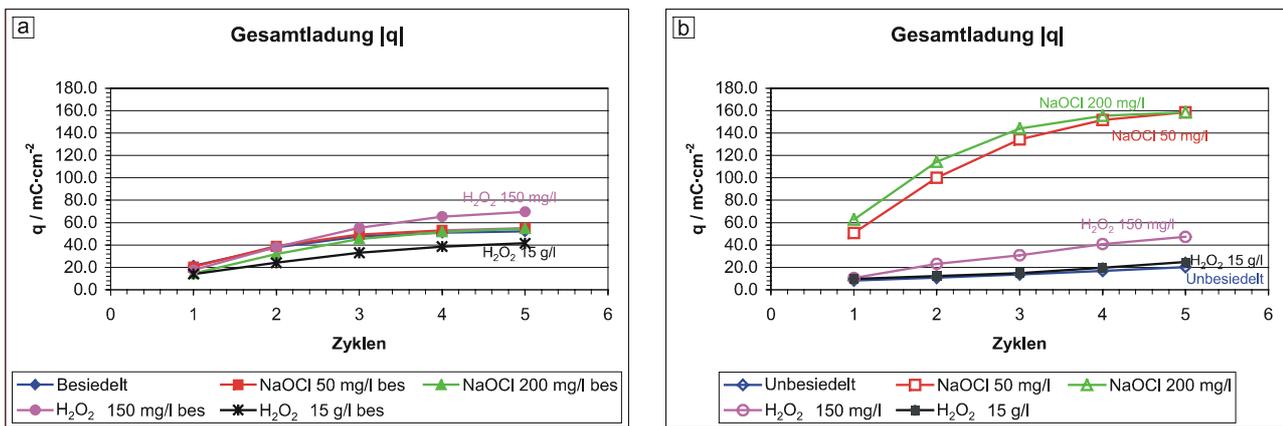


Abb. 103: Übersicht über die Gesamtladung ($|q| = |q_+| + |q_-|$) aus Zyklovoltamogrammen von Kupfer in 0.1 m Na_2SO_4 ($dU/dt = 50 \text{ mV/s}$) nach 10 min Desinfektion mit H_2O_2 : a) Besiedelte Proben, b) unbesiedelte Proben

Die umgesetzten Ladungsmengen ($|q| = |q_+| + |q_-|$) der einzelnen untersuchten Zyklen wiesen ebenfalls deutliche Differenzen durch die Besiedlung auf (Abb. 103). Für besiedelte Proben zeigte sich die Änderungen der Gesamtladung bei Zugabe von Hypochlorit nur in den ersten zwei Zyklen, bevor die Ladungen der nicht desinfizierten Oberfläche entsprachen. Der Einsatz von Wasserstoffperoxid zeigte hier ebenfalls eine leicht aktivierende Wirkung von 150 mg/l H_2O_2 und eine passivierende Wirkung von 15 g/l Wasserstoffperoxid auf die besiedelte Probe. Für die unbesiedelten Oberflächen wurde bei Verwendung von Natriumhypochlorit mit zunehmender Zyklenzahl eine starke Aktivierung der Probe beobachtet, die auf eine Zerstörung der Deckoxidschicht unter Inhibition der Repassivierung durch Chloride hinweist. Der Einsatz von 150 mg/l

Wasserstoffperoxid resultierte ebenfalls in einer leichten Aktivierung der Probe, während durch Verwendung von 15 g/l H_2O_2 die Passivschicht erhalten blieb.

Biofilme auf VA 1.4301

Durch die Besiedlung der Proben aus VA 1.4301 mit Biofilmen konnte während und nach der Desinfektion ein stark differierendes Verhalten zur unbesiedelten Elektrode beobachtet werden. Bei Zugabe von NaOCl oder H_2O_2 waren für die unbesiedelte und die mit Biofilm belegten Elektroden ebenfalls der schnelle Anstieg des Potentials um ca. 300 mV für alle untersuchten Konzentrationen zu beobachten. Während die mit Biofilm belegten Proben diesen Potentialwert über die Messzeit von 10 min nahezu stabil beibehielten, wurden für die unbesiedelten Coupons starke Einbrüche des Ruhepotentials mit langsamem Wiederanstieg - vor allem bei NaOCl-Zugabe - beobachtet.

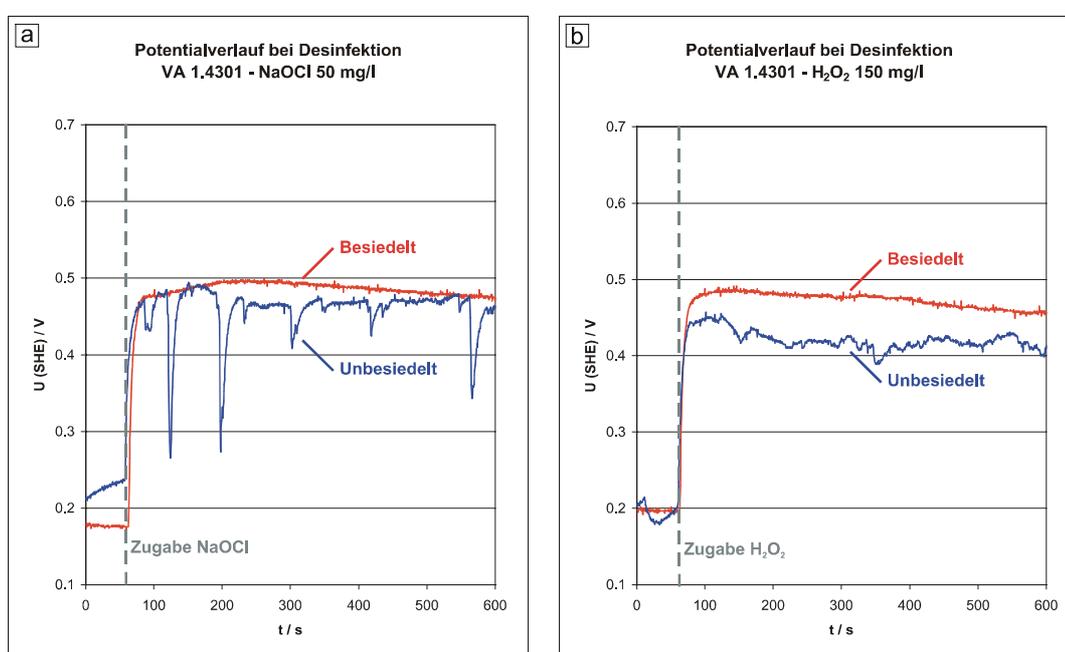


Abb. 104: Ruhepotentialverlauf während der Desinfektion von VA 1.4301: a) NaOCl 50 mg/l, b) H_2O_2 150 mg/l

Diese für die Repassivierung von Lochkorrosionsstellen typischen Potentialverläufe wurden besonders stark bei den mit 50 mg/l NaOCl desinfizierten Proben und in geringerer Intensität auch bei Verwendung von 15 g/l H_2O_2 ermittelt, während für 200 mg/l NaOCl und 150 mg/l H_2O_2 keine eindeutigen Anzeichen für diese Prozesse festgestellt werden konnten (Abb. 104).

Der Vergleich der Zyklovoltamogramme nach Ende der Desinfektion deutete ebenfalls den Einfluss des Biofilms auf die Wirkung der Desinfektionsmittel auf die Edelstahloberflächen an. Während für die besiedelten Oberflächen nur geringe Unterschiede zwischen den Zyklovoltamogrammen vor und nach Einwirkung von

Hypochlorit festgestellt werden konnte, zeigten die unbesiedelten Proben eine deutliche Erhöhung sowohl der reduktiven als auch der oxidativen Ströme, die eine partielle Zerstörung der Passivschicht durch NaOCl erkennen lassen.

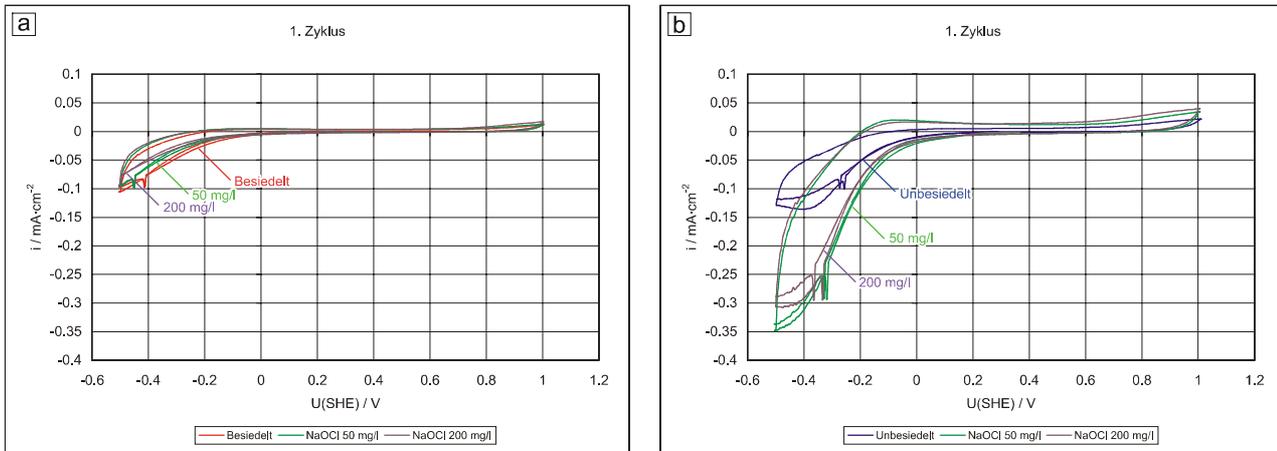


Abb. 105: Zyklovoltamogramme von VA 1.4301 in 0.1 m Na₂SO₄ (dU/dt = 50 mV/s) nach 10 min Desinfektion mit NaOCl: a) Besiedelte Proben, b) unbesiedelte Proben

Die Einwirkungen von Wasserstoffperoxid auf die Edelstahloberflächen fielen deutlich geringer aus. Während für die Biofilm-besiedelten Proben erneut nur unwesentliche Änderungen der Zyklovoltamogramme ermittelt werden konnten, zeigten die unbesiedelten Proben nur für 15 g/l H₂O₂ eine leichte Erhöhung der reduktiven und oxidativen Ströme, die auf eine leichte Schädigung der Oxidschicht durch das hohe Redoxpotential (610 mV SHE) und den geringen Chloridgehalt des Reinwasser hinweisen.

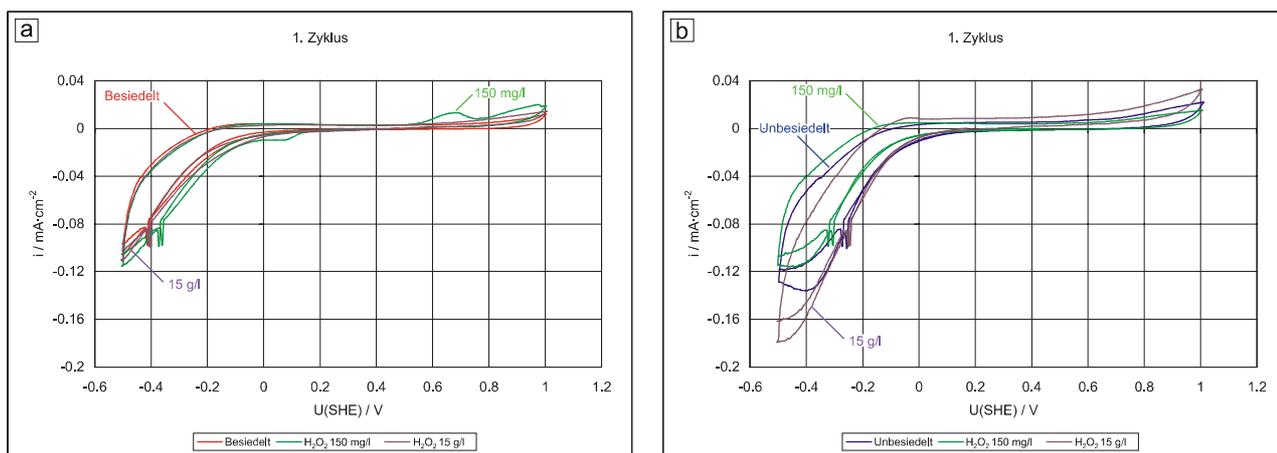


Abb. 106: Abb. 107: Zyklovoltamogramme von VA 1.4301 in 0.1 m Na₂SO₄ (dU/dt = 50 mV/s) nach 10 min Desinfektion mit H₂O₂: a) Besiedelte Proben, b) unbesiedelte Proben

Auch für VA 1.4301 zeigt der Vergleich der umgesetzten Gesamtladung über mehrere Zyklen deutlich den Einfluss der Biofilmbelagerung auf die Intensität der Reaktion an der Oberfläche. Besonders auffällig ist hierbei die starke Erhöhung der oxidativen und

reduktiven Prozesse durch Zugabe des Hypochlorits auf die unbesiedelten Proben (Abb. 108 b), während die besiedelten Proben nur minimale Abweichungen für die untersuchten Desinfektionsmittel zeigten.

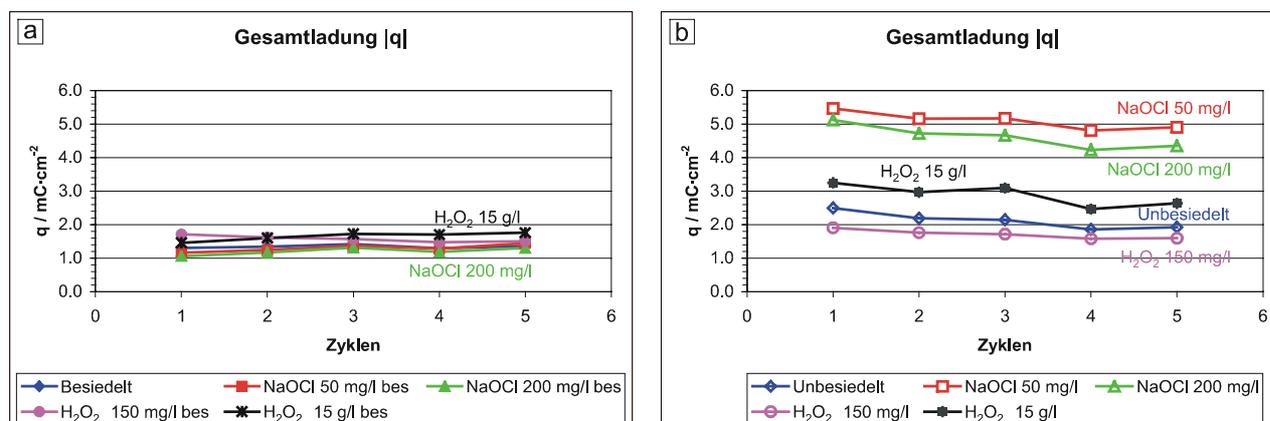


Abb. 108: Übersicht über die Gesamtladung ($|q| = |q_+| + |q_-|$) aus Zyklovoltamogrammen von VA 1.4301 in 0.1 m Na_2SO_4 ($dU/dt = 50 \text{ mV/s}$) nach 10 min Desinfektion mit H_2O_2 : a) Besiedelte Proben, b) unbesiedelte Proben

Während im maritimen Bereich die Wirkung spezieller bakterieller Populationen als Korrosionsinhibitoren beschrieben ist [MAN01/MAN02], wird im Bereich der Trinkwasserversorgung die Biofilmbildung auf Edelstählen mehrheitlich mit Korrosionsschäden durch die Erhöhung des Ruhepotentials, dem sogenannten „Ennoblement“, korreliert. Als Erklärung für den Mechanismus der beobachteten Inhibitorwirkung eines Biofilms auf die besiedelte metallische Oberfläche sind verschiedene Wirkungsweisen denkbar: neben einer Repassivierung der Oberfläche durch die Anhebung des Potentials um mehrere 100 mV im Bewuchszeitraum, das ein Ausheilen von Passivschicht-Inhomogenitäten ermöglichen kann, ist auch die besondere Morphologie der Filme auf den Edelstahloberflächen als mögliche Ursache zu sehen. Hierbei werden bevorzugt die durch ihre inhomogene Kristallstruktur als Startpunkt für Lochkorrosionsangriffe diskutierten Korngrenzen [FRA98] durch die Bakterien besiedelt [GEE97] und gegenüber der Lösung abgeschirmt. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde der Anteil der Organismen in den Korngrenzen bzw. der Anteil der durch die Bakterien abgedeckten Korngrenzen der einzelnen Proben von VA 1.4301 vor und nach der Desinfektion aus den SCLM-Aufnahmen bestimmt. Hierzu wurden das Signal der Oberflächenreflektion von Farbkanal der Reflektion getrennt, der Anteil der dunkel abgebildeten Korngrenzen bestimmt und die Schnittmenge mit den Fluoreszenzkanälen der BacLight™-Färbung ermittelt (Abb. 109). Die resultierenden Anteile der Bakterien innerhalb der Korngrenzen sind in Tab. 9 aufgeführt.

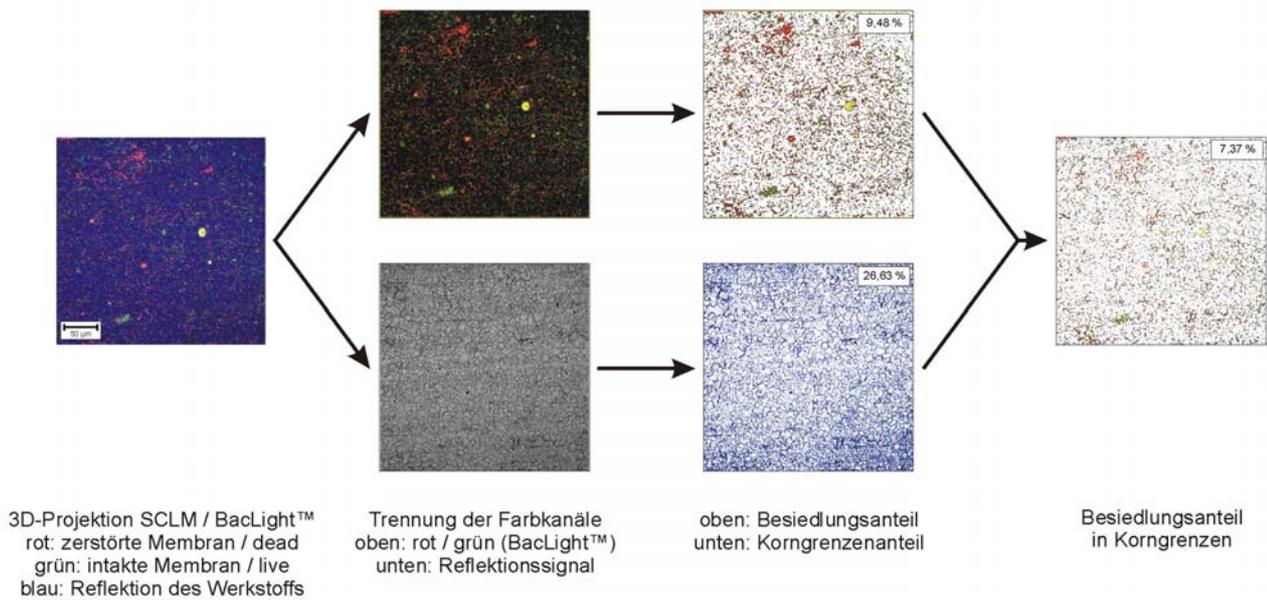


Abb. 109: Bestimmung des Korngrenzenanteils der Bakterien auf VA 1.4301 mit Hilfe des SCLM (200 mg/l NaOCl)

| | Flächenanteil Korngrenze / % | Besiedlung gesamt / % | Besiedlung Korngrenze / % | Anteil Besiedlung Korngrenze / % | Abdeckung Korngrenze / % |
|--|---------------------------------|--------------------------|------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| Kontrolle | 30.12 | 18.09 | 9.34 | 51.63 | 31.01 |
| H ₂ O ₂ 0,15 g / l | 29.62 | 16.31 | 11.55 | 70.82 | 38.99 |
| H ₂ O ₂ 15 g / l | 26.05 | 19.73 | 12.24 | 62.04 | 46.99 |
| NaOCl 50 mg / l | 29.70 | 6.00 | 3.99 | 66.50 | 13.43 |
| NaOCl 200 mg / l | 26.63 | 9.48 | 7.37 | 77.74 | 27.68 |

Tab. 9: Flächenanteil der Mikroorganismen in den Korngrenzen von VA 1.4301 vor und nach der Desinfektion

Der Vergleich zeigte, dass, obwohl die Korngrenzen nur ca. 30 % der Gesamtfläche des Edelstahl ausmachen, nach der Besiedlung über 50 % der Organismen in diesen Strukturen lokalisiert waren. Durch die bevorzugte Entfernung der Bakterien von der restlichen Oberfläche während der Desinfektion stieg dieser Anteil noch weiter bis auf ca. 77 % bei 200 mg/l NaOCl. Gleichzeitig führte die Besiedlung zu einer Abdeckung von 13 - 39 % der gesamten Korngrenzen. Hierbei konnte jedoch die angewandte Färbungsmethode nur eine grobe Näherung der tatsächlichen Verhältnisse auf der Oberfläche liefern, da die bakterielle EPS, die die Bakterien umgibt, von den eingesetzten Farbstoffen nicht markiert werden kann. Bei der Untersuchung ähnlich angezüchteter Biofilmproben unter dem E-SEM konnte für VA 1.4571 die starke Belegung der Edelstahloberfläche mit einer dünnen, stark C- und O-haltigen Schicht beobachtet werden (Abb. 110), die in ihrer Morphologie stark den beobachteten Biofilmen gleicht und

wahrscheinlich aus Resten von EPS, die nach Ablösung der Bakterien auf der Oberfläche zurückbleiben, bestand.

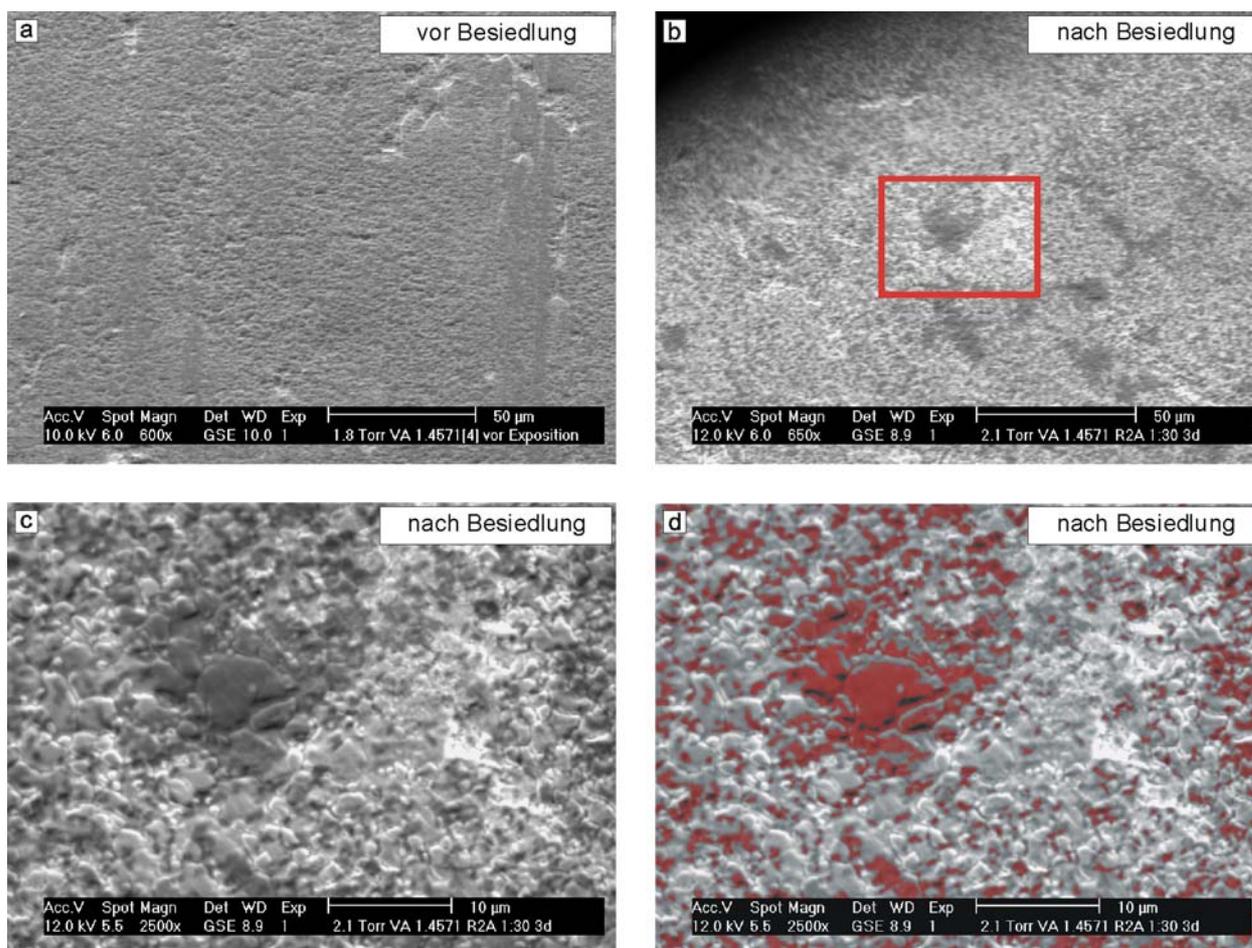


Abb. 110: Reste bakterieller EPS („Footprints“) auf der Oberfläche von VA 1.4571: a) Probe vor Besiedlung, b) nach Besiedlung mit R2A 1:30 für 3 d, c) Ausschnitt von b, d) Fehlfarbandarstellung der EPS-Reste

Diese in der Literatur auch als „Footprints“ [NEU91] diskutierten EPS-Strukturen werden in der Mikrobiologie im Rahmen der Kinetik einer Sekundärbesiedlung von Oberflächen mit anderen Mikroorganismen untersucht. Im Zusammenhang mit der beobachteten Inhibitionswirkung der Biofilme weisen diese Ergebnisse auf einen höheren durch Biofilme abgedeckten Flächenanteil der Korngrenzen hin, als bei reiner Detektion der Bakterien ermittelt werden kann. Die schnelle Einstellung des Ruhepotentials auf einen Wert, der auch für unbesiedelte Proben ermittelt werden kann, wird nicht durch die Abdeckung der Korngrenzen beeinflusst, sondern erfolgt über die restliche, weitgehend unbedeckte Oberfläche des Edeltstahls.

Zusammenfassend sind die Ergebnisse der elektrochemischen Untersuchung der Desinfektion von VA 1.4301 mit Hypochlorit in Abb. 111 dargestellt. Auf der freien Probenoberfläche beobachtet man die schnelle Reaktion des Hypochlorits, die zur Ablösung der vereinzelt Bakterien und zur Einstellung des hohen Ruhepotentials der

Probe führt (a). Bei größeren Bakterienkolonien (b) werden nur die äußeren Bereiche abgetötet; ein nennenswerter Abtrag dieser Strukturen ist nicht zu erkennen. Während für die nicht besiedelten Proben bei Zugabe von Hypochlorit chloridinduzierte Lochkorrosion ermittelt werden konnte (c), zeigten die besiedelten Proben keine Veränderung des elektrochemischen Verhaltens. Die Analyse der Oberflächenbedeckung durch Biofilme zeigt einen außerordentlich hohen Besiedlungsanteil in den Korngrenzen, die nach Besiedlung und Abdeckung mit Bakterien oder Resten der EPS nicht als Startpunkte der Lochkorrosion auftreten (d). Mit Untersuchungen mit dem E-SEM konnten die Reste der EPS, die bei Ablösung von Mikroorganismen als „Footprints“ auf der Oberfläche verbleiben, visualisiert werden (e).

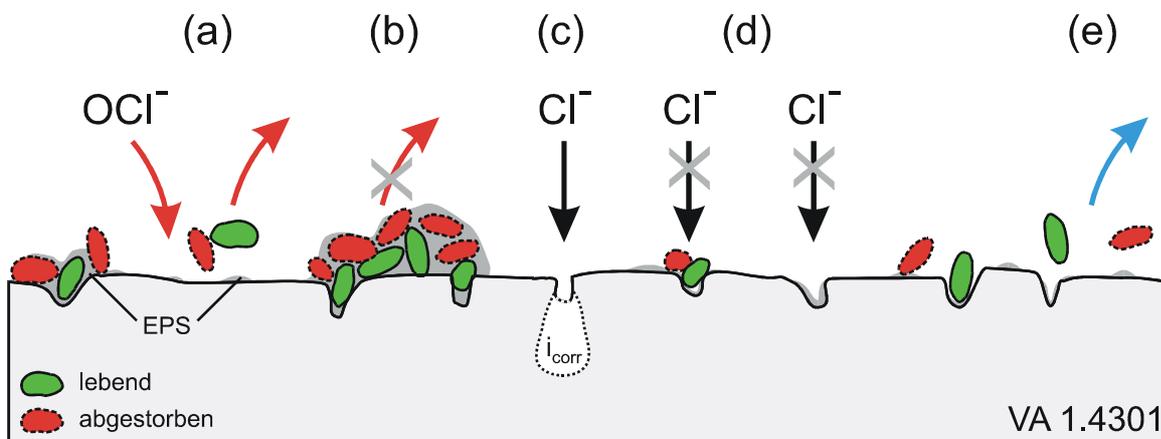


Abb. 111: Desinfektion von VA 1.4301 mit Hypochlorit: (a) Ablösung von Bakterien auf der freien Oberfläche, (b) Abtötung der Kolonien - kaum Ablösung, (c) Lochkorrosion durch Chlorid bei der unbesiedelten Oberfläche, (d) Inhibition der Lochkorrosion durch Besiedlung der Korngrenzen, (e) EPS-„Footprints“ bei der Ablösung von Bakterien

4.4.4 Modellbild für die Desinfektion

Die Ergebnisse der verschiedenen Desinfektionsmessungen an unter oligotrophen Bedingungen besiedelten Werkstoffoberflächen können in einem Modellbild zusammengefasst werden (Abb. 112).

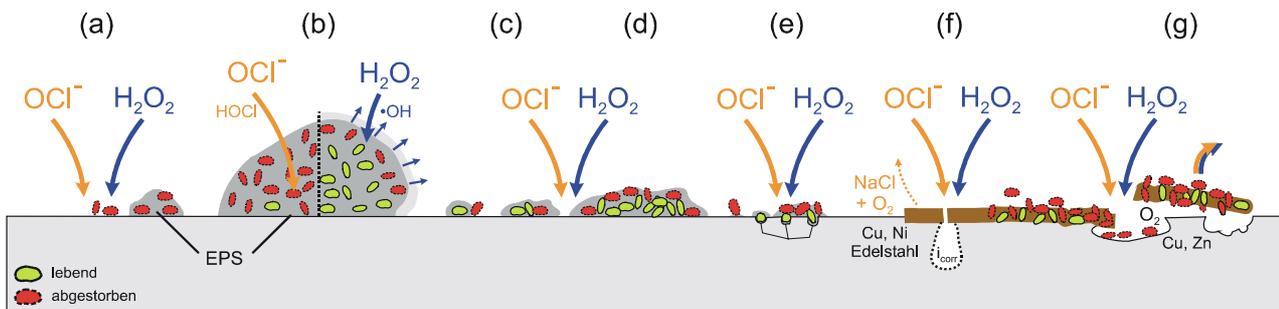


Abb. 112: Modellbild für die Desinfektion mit NaOCl und H₂O₂ unter oligotrophen Bedingungen: a, b) Laborbiofilme mit geringer Dichte; c, d) Trinkwasserbiofilme, e) Messungen an Edelstahl, Schutz der Organismen in Korngrenzen; f, g) Schutz der Organismen in Deckoxidschichten, Abtrag der besiedelten Schichten durch Gasentwicklung

Für Laborbiofilme, die bei hohem Nährstoffgehalt für kurze Laufzeiten angezüchtet werden, kann für geringe Schichtdicken (a) sowohl für NaOCl als auch H_2O_2 eine starke Desinfektionswirkung beobachtet werden. Die schnelle Potentialeinstellung im Bereich weniger Sekunden nach Zugabe der Wirkstoffe zeigt, dass die Reaktion zwischen Elektrolyt und großen Bereichen der Elektrodenoberfläche nur unwesentlich durch den Biofilm behindert wird. Vergleicht man die Desinfektionsmittelaktivität für größer ausge dehnte Biofilmkolonien (b), so ist für das Hypochlorit eine weitgehende Durchdringung der Kolonien und Abtötung der Organismen zu beobachten, während der Zusatz von Wasserstoffperoxid nur zur Abtötung der Bakterien an der Oberfläche der Kolonien und zum Aufquellen der EPS-Matrix führt. Hierbei spielen die unterschiedlichen Diffusionseigenschaften der wirksamen Spezies eine Rolle: während die antibakteriell wirksame Hypochlorige Säure (HOCl) als neutrales Molekül ein dem Wasser entsprechendes Diffusionsverhalten zeigt [JOH86] und die Membranen der Bakterien oxidativ zerstört [CLO98a], zersetzt sich das aus dem Wasserstoffperoxid entstehende Hydroxylradikal durch die hohe Aktivität bereits bei Kontakt mit Bakterien oder EPS an der Außenfläche der Kolonien und dringt so nur langsam in tiefere Bereiche ein.

Untersucht man Biofilme, die in nährstoffarmen Medien über längere Zeiträume aufwachsen (c, d), so ist eine deutlich dichtere Packung der Organismen in der EPS-Matrix festzustellen. Bei der Desinfektion sind die Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Wirkstoffen deutlich geringer; für beide wird unzureichende Abtötung in tieferen Bereichen der Filme (d) beobachtet. Durch Einlagerung in dichte EPS-Hüllen (c) können auch einzelne Bakterien und kleine Kolonien auf den Oberflächen überleben.

Die Lokalisierung von Organismen in Vertiefungen der Oberflächen (e), z. B. in den Korngrenzen des Edelstahl VA 1.4301, führt ebenfalls zu einer deutlich höheren Resistenz gegen die Desinfektion durch Abschirmung gegenüber dem Elektrolyten.

Der Einsatz von Hypochlorit und Wasserstoffperoxid zeigt für Kupfer und Edelstahl deutliche Lochkorrosionsangriffe durch punktuelle Zerstörung der Oxidschicht (f). Die Zersetzung des Hypochlorits zu Kochsalz und Sauerstoff, die für Kupfer, Nickel und Ni-Legierungen in der Literatur beschrieben ist, minderte die Desinfektionswirkung nicht.

Die in Oxidschichten (Cu, Al, Zn) eingebetteten Mikroorganismen zeigen deutlich höhere Resistenz gegenüber der Desinfektion (g); die desinfizierende Wirkung ist bei den Reinwasserproben primär auf die Ablösung der besiedelten Schichten durch intensive Gasentwicklung zurückzuführen.

Trägt man die während des Desinfektionsvorgangs gemessenen Potentiale in das in Abb. 6 entwickelte Pourbaix-Diagramm ein, so zeigen sich in Abhängigkeit des untersuchten Werkstoffs deutliche Differenzen der ermittelten Potentialwerte (Abb. 113 b).

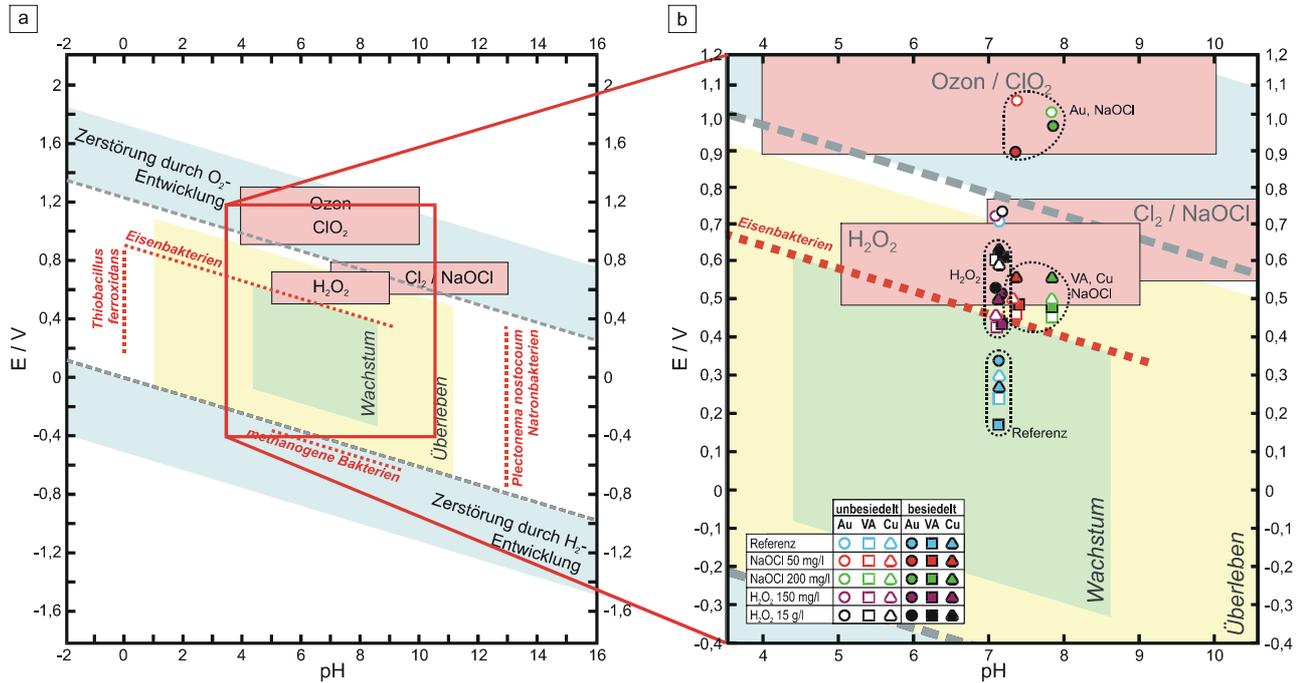


Abb. 113: Stabilitäts- und Wachstumsbereiche von Mikroorganismen in Abhängigkeit von Redoxpotential und pH (makroskopische Messung in Lösung): links: Übersicht; rechts: Ruhepotentiale während des Desinfektionsmitteleinsatzes an Gold (O), VA 1.4301 (□) und Kupfer (Δ) für verschiedene Wirkstoffkonzentrationen

Während die Potentialwerte für Kupfer und VA 1.4301 im Erwartungsbereich lagen, zeigten die Gold-Elektroden erhöhte Ruhepotentiale, insbesondere bei Desinfektion mit Hypochlorit, sowohl für besiedelte als auch unbesiedelte Elektroden an. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass neben der Wirkstoffkonzentration, dem pH-Wert und dem Werkstoff auch das Korrosionsverhalten der Coupons (i_{corr}) und die Oberflächenanteile von Metall, Biofilm und EPS das Ruhepotential beeinflussen. Die multiplen Einflussgrößen auf U_R , die nur z. T. mit den durchgeführten Messungen ermittelbar sind, lassen sich wie folgt zusammenfassen:

$$i(U_R) = 0 = i_+(\Theta_{aktiv}^M, \Theta_{passiv}^M, \Theta_{MO}, \Theta_{EPS}) + i_-(\Theta_{MO}, \Theta^M, d_{Biofilm}, c_{Desinfektion})$$

$$\text{mit: } (\Theta_{aktiv}^M + \Theta_{passiv}^M + \Theta_{MO} + \Theta_{EPS}) = 1$$

$\Theta_{aktiv}^M, \Theta_{passiv}^M$: Flächenanteil der aktiven bzw. passiven Metalloberfläche

$\Theta_{MO}, \Theta_{EPS}$: Flächenanteil der Mikroorganismen (MO) bzw. der EPS

$d_{Biofilm}, c_{Desinfektion}$: Biofilmschichtdicke bzw. Desinfektionsmittelkonzentration

5 Zusammenfassung

Die Effekte einer mikrobiellen Besiedlung von Oberflächen wurde für oligotrophe Systeme mit Bezug auf die Betriebsparameter eines Wasserversorgungsnetzes untersucht. Durch Versuche mit verschiedenen, technisch bedeutenden Werkstoffen wurde der Werkstoffeinfluss auf bakteriellen Bewuchs, Desinfizierbarkeit und Korrosionsverhalten dokumentiert.

Der Vergleich der einzelnen Betriebs- und Probenpräparationsparameter zeigte, besonders für metallische Werkstoffe, deutlichen Einfluss auf die Intensität und die Morphologie der auf den Oberflächen aufwachsenden Filme und nachfolgende Korrosionsprozesse.

Publizierte Verfahren zur Probenvorbehandlung von VA 1.4571 wiesen im Rahmen vergleichender Laborexperimente signifikante Unterschiede in der Populationsmorphologie und -zusammensetzung der aufwachsenden Biofilme auf. Für Präparationsverfahren, die eine Chromanreicherung in der Passivschicht zur Folge hatten, wurden diese auch für lange Versuchszeiträume ($t > 14$ d) beobachtet.

Durch Einsatz konfokaler Lasermikroskopie konnte die Einlagerung von Bakterien in Oxidschichten (Al, Cu), die Orientierung an Korngrenzen (Edelstahl) und die Beteiligung an Lochkorrosionsangriffen (Cu) dreidimensional und mit Bezug zur Probenoberfläche dokumentiert werden. Der Vergleich verschiedener Strömungsbedingungen zeigte deutliche Veränderungen der Biofilmmorphologie und der Korrosionsmechanismen (Verz. Stahl, Cu, Al), die sich durch Veränderung der Elektrolytzusammensetzung auch auf inerte Oberflächen in unmittelbarer Umgebung der Proben auswirkten (Zn, Cu). Der Vergleich zwischen einer Primärbesiedlung durch statistisch in der Wasserphase enthaltene Bakterien mit einer Sekundärbesiedlung durch bereits an den Werkstoff spezialisierte Organismen wies besonders für aktiv korrodierende Werkstoffe Veränderungen von Besiedlungsmechanismus und Nährstoffverwertung (Cu, Edelstahl) auf.

Die im Reinwassersystem bei Biofilmbildung beobachtete Verschiebung der Ruhepotentiale U_R konnte durch simultane Messung von Biofilmmasse und Elektrodenpotential mit einer elektrochemischen Quarz-Mikrowaage im Labormaßstab bereits für die reversible Ansiedlung der Organismen auf der Goldoberfläche detektiert werden. Nachfolgende makro- und mikroelektrochemische Messungen zum Einfluss der Biofilmmorphologie auf U_R zeigten durch Ladungsumsätze von wenigen mC und lokale Vergleichsmessungen auf Mikroelektrodenarrays, dass unter den vorgegebenen

Betriebsparametern elektrochemisch nur eine aktive Zone der Filme mit einer Schichtdicke von $d < 1 \mu\text{m}$ erfasst werden kann. Die Zyklovoltamogramme besiedelter Platinelektroden wiesen bereits für dünne, meist monolagige Biofilme eine vollständige Inhibition der Wasserstoffadsorption sowie eine Verminderung von Platinoxidation und -reduktion auf. Während die Redoxaktivität der Platinoberfläche durch Zyklen der Probe langsam wieder auf die Werte unbesiedelter Elektroden erhöht werden konnte, war die Wasserstoffadsorption nicht erneut zu beobachten. Durch Biofilmbildung wurde die Sauerstoffreduktion auf Platin signifikant erhöht, was wahrscheinlich auf eine mechanistisch nicht geklärte enzymatische Katalyse durch die Mikroorganismen zurückzuführen ist. Hierbei ist sowohl ein Elektronentransfer in die Bakterien und nachfolgende enzymatische Katalyse der Sauerstoffreduktion als auch ein direkter Transfer zu den in der EPS-Matrix gebundenen Enzymen ohne Beteiligung des mikrobiellen Stoffwechsels aufgrund der Messergebnisse als Reaktionsweg möglich. Bei Vergleichsmessungen mit gereinigten bakteriellen Alginaten (EPS) konnte zwar eine Erhöhung der Redoxaktivität durch die aufliegenden Schichten, jedoch keine deutliche Auswirkung auf U_R , die Sauerstoffreduktion oder die Korrosionseigenschaften durch Konzentrationselemente festgestellt werden.

Der Vergleich der Desinfektionsmittelaktivität an Proben von Labor- und Reinwasserbiofilmen zeigte deutlich geringere Tötungs- und Entfernungsraten auf den unter technischen Bedingungen langsam aufgewachsenen Filmen an. Während im Labormaßstab für Hypochlorit mit Ausnahme von Kupferproben, deren Oxidschichten den Bakterien Schutz vor oxidativem Angriff boten, eine vollständige Abtötung der Bakterien ermittelt werden konnte, war auf Filmen aus dem Reinwassersystem für keine technisch übliche Konzentration von H_2O_2 oder NaOCl die vollständige Abtötung oder Entfernung der Filme im Rahmen des Versuchszeitraums feststellbar. Die elektrochemische Verfolgung des Desinfektionsvorgangs zeigte ebenfalls eine inhibierende Wirkung der Biofilme, die bei Kupfer und VA 1.4301 Lochkorrosionsangriff auf die Passivschicht durch Chloride während des Desinfektionseinsatzes verhinderten. Für Edelstahl konnte diese Inhibitionswirkung mit der starken Lokalisierung der Bakterien an den für die Initiation der Lochkorrosion bedeutenden Korngrenzen und der Bildung von EPS-Ablagerungen („Footprints“) mikroskopisch korreliert werden.

6 Literatur

- ARM98 R. Armon, T. Arbel, M. Green, *Wat. Sci. Tech.* **38** (1998) 175-179
- BAY96 Bayer, E.A.; Shoham, Y.; Tormo, J. und R. Lamed: The Cellulosome: A cell surface organelle for the adhesion to and degradation of cellulose. In: Fletcher, M (Hrsg.): *Bacterial Adhesion: Molecular and ecological diversity*. Wiley-Liss, New York (1996) 155-182
- BIS99 T. Yu, P. Bishop, *Wat. Sci. Tech.* **39** (1999) 179-185
- BOI97 F. Bois, T. Fahmy, J. Block, D. Gatel, *Wat. Res.* **31** (1997) 3146-3156
- BOU99 L. Boulos, M. Prévost, B. Barbeau, J. Coallier, *J. Microbiol. Meth.* **37** (1999) 77-86
- BOR96 R. Borlinghaus, *Zeiss Information with Jena Review*, No. 5/1995
- BRE98 A. Bressel, Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (1998)
- BRE99 S. Bredholt, J. Maukonen, K. Jujanpää, *Eur. Food. Res. Techn.* **209** (1999) 145-152
- BUS98a J. Busalmen, S. Sánchez, D. Schiffrin, *Appl. Environm. Microbiol.* **64** (1998) 3690-3697
- BUS90 H.J. Busscher, J. Sjoelma, H.C. van der Mei, in: H. J. Doyle, M. Rosenberg (eds), *Microbial cell surface hydrophobicity*, American Soc. Microbiol, Washington D.C., (1990) 335-359
- BUT92 D. Buttry, M. Ward, *Chem. Rev.* **92** (1992) 1355-1379
- CAL92 D. E. Caldwell, *Adv. Microbiol. Ecol.* **12** (1992) 1-67
- CAL98 J. Walker, K. Hanson, D. Caldwell, C. Keevil, *Biofouling* **12** (1998) 333-344
- CHO99 K.-H. Choi, F. C. Dobbs, *J. Microbiol. Meth.* **36** (1999) 203-213
- CLO98 T. Cloete, S. Venter, R. Kfir, M. Momba, *Wat. Sci. Tech.* **38** (1998) 283-289
- CLO98a T. Cloete, L. Jacobs, V. Bözel, *Biodegradation* **9** (1998) 23-37
- DIA93 A. S. M. Diab, W. Schwenk, *Mat. Corr.* **44** (1993) 367-372
- DIC96 W. Dickinson, Z. Lewandowski, *Corr. Sci.* **52** (1996) 910-920
- DEB95a P. Stewart, R. Murga, R. Srinivasan, D. de Beer, *Wat. Res.* **29** (1995) 2006-2009
- DEB98 C. Santegoeds, G. Muyzer, D. de Beer, *Wat. Sci. Tech.* **37** (1998) 125-129
- DEB98c C. Santegoeds, A. Schramm, D. de Beer, *Biodegrad.* **9** (1998) 159-167
- DEX98 S. Dexter, J. LaFontaine, *Corrosion* **54** (1998) 851-861
- DIC96 W. Dickinson, Z. Lewandowski, *Corr. Sci.* **52** (1996) 910-920
- EAS95 M. Eashwar, S. Maruthamuthu, S. Sathiyarayanan, *Corr. Sci.* **8** (1995) 1169-1176
- EGI95 P. Eginton, H. Gibson, J. Holah, P. Handley, P. Gilbert, *Coll. Surf.* **B5** (1995) 153-159
- EVA73 I. Evans, A. Linker, *J. Bacteriol.* **116** (1973) 915-924
- FLE79 M. Fletcher, in: D. C. Ellwood, J. Melling, P. Rutter (eds.): *Adhesion of microorganisms to surfaces*, Academic Press, London (1979)
- FLE91 H.-C. Flemming, *GWF* **132** (1991)
- FLE96 H.-C. Flemming, T. Griebe, G. Schaule, *Wat. Sci. Tech.* **33** (1996) 517-524
- FLE97 H. Flemming, A. Tamachkiarowa, J. Klahre, J. Schmitt, *Tagungsband IWW Mülheim* (1997)
- FLE00 J. Klahre, H.-C. Flemming, *Wat. Res.* **34** (2000) 3657-3665
- FLE02 H.-C. Flemming, J. Wingender, *Chemie in unserer Zeit* **36** (2002) 30-41
- FLI00 S. Flint, J. Brooks, P. Bremer, *J. Food. Eng.* **43** (2000) 235-242
- FOL96 I. Foley, P. Gilbert, *Biofouling* **10** (1996) 331-346
- FRA98 G. S. Frankel, *J. Electrochem. Soc.* **145** (1998) 2186-2198
- GAR91 J. L. Garland, A. L. Mills, *Appl. Environm. Microbiol.* **57** (1991) 2351-2359

- GEE82 G. G. Geesey, *ASM News* **48** (1982) 9-14
- GEE97 G. Geesey, R. Gillis, R. Avci, *Corr. Sci.* **38** (1996) 73-95
- GEO00 R. P. George, P. Muraleedharan, H. Khatak, T. Rao, *Mat. Corr.* **51** (2000) 213-218
- GON98 J. González, F. Santana, J. Mirza-Rosca, *Corr. Sci.* **40** (1998) 2141-2154
- GRI89 R. B. Griffin, L. R. Colwell, W. Seitz, E. Estes, *Mater. Perform.* **28** (1989) 71-74
- GRI97 T. Griebe, H.-C. Flemming, *Biospektrum* **5** (1997) 50-51
- GRO96 S. Grobe, J. Wingender, H.-G. Trümper, *J. Appl. Bacteriol.* **79** (1996) 94-102
- HAR02 J. Hartmann, L. Teichmann, H. Horn, R. Borngräber, R. Lucklum, P. Hauptmann, *Tagungsband International Specialised Conference on Biofilm Monitoring, Porto* (2002)
- HEI94 E. Heitz, *Mat. Corr.* **45** (1994) 17-20
- HEL00 H. Helle, H. Vuoriranta, J. Välimäki, V. Lekkala, V. Aaltonen, *Sensors Actuators* **B71** (2000) 27-54
- HOL95 B. Holden, M. Greetham, B. Croll, J. Scutt, *Wat. Sci. Tech.* **32** (1995) 213-220
- JAI95 D. Jain, *Wat. Res.* **29** (1995) 1869-1876
- JAY97 A. Jayaraman, T. Cheng, J. Earthman, T. Wood, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48** (1997) 11-17
- JAY99 A. Jayaraman, D. Ornek, D. A. Duarte, C. Lee, F. Mansfeld, T. Wood, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52** (1999) 787-790
- JOH86 J. D. Johnson, J. N. Jensen, *J. AWWA* **78** (1986) 156-162
- JOH95 M. Johnston, M. Jones, *J. Microbiol. Meth.* **21** (1995) 15-26
- JON02 D. A. Jones, P. S. Amy, *Corrosion* **58** (2002) 638-645
- KOO95 D. v. d. Kooij, H. Vrouwenvelder, *Tagungsband Noordwijkerhout* (1995) Kiwa. N. V. Research and Consultancy, PO Box 1072 3430 BB, Nieuwegein, NL
- KOO99 D. van der Kooij, J. van Lieverloo, J. Schellart, P. Hiermstra, *Aqua* **48** (1999) 31-37
- LAW91 J. R. Lawrence, *J. Bacteriology* **173** (1991) 6558-6567
- LEC88 M.W. LeChevallier, D.C. Cawton, R.G. Lee, *Appl. Environ. Microbiol.* **54** (1988) 2492-2499
- LEW96a W. Dickinson, F. Caccavo, Z. Lewandowski, *Corr. Sci.* **28** (1996) 1407-1422
- LEW96b F. Roe, Z. Lewandowski, T. Funk, *Corrosion* **52** (1996) 744-752
- LEW00 B. Olesen, R. Avci, Z. Lewandowski, *Corr. Sci.* **42** (2000) 211-227
- LIC94 J. W. Lichtman, *Spektrum der Wissenschaft* **10** (1994) 78-97
- LIN94 P. Linhard, *Mat. Corr.* **45** (1994) 79-83
- LIT96 B. Little, P. Wagner, *Int. Biodet. Biodegrad.* (1996) 151-157
- LIT97 B. Little, P. Wagner, in: *Corrosion Testing Made Easy*, Vol. 5, NACE, Houston, TX (1997)
- LOO90 M. Van Loosdrecht, W. Norde, A. Zehnder, *J. Biomaterial Appl.* **5** (1990) 91-106
- MAD97 M. T. Madigan, J. M. Martinko, J. Parker, *Biology of microorganisms*, Prantice Hall Int., Upper Saddle River NJ (1997)
- MAN01 A. Nagiub, F. Mansfeld, *Mat. Corrosion* **52** (2001) 817-826
- MAN02 F. Mansfeld, C.H. Hsu, Z. Sun, D. Örnek, T. K. Wood, *Corrosion* **58** (2002) 187-191
- MAR71 K. C. Marshall, R. Stout, R. Mitchell, *J. Gen. Microbiol.* **68** (1971) 227-348
- MAR01 M. Martienssen, *Habilitationsschrift*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2001)
- MAT97 K. Mattila, L. Carpen, T. Hakkarainen, *Int. Biodet. Biodegrad.* **40** (1997) 1-10
- MIT90 M. Mittelman, in: K. Mittal (ed.): *Particles in Gases and Liquids 2*, Plenum Press, New York (1990) 33-50
- MUR99 F. Murdoch, P. G. Smith, *Wat. Res.* **33** (1999) 2893-2895

- NEU91 T. R. Neu, K. C. Marshall, *Biofouling* **3** (1991) 101-112
- NIE99 P. H. Nielsen, A. Jahn, in: J. Wingender, T. Neu, H.-C. Flemming (eds.): *Microbial extracellular polymeric substances*, Springer, Heidelberg (1999) 49-72
- NIV93 E. Nivens, *Anal. Chem.* **65** (1993) 65-69
- NIV95 D. Nivens, R. Palmer, D. White, *J. Indust. Microbiol.* **15** (1995) 263-276
- OLS91 B. Olsen, R. McCleary, J. Meeker, in: C. J. Hurst (ed.): *Modelling the environmental fate of microorganisms*, ASM Press, Washington DC (1991)
- PED97 R. Pedahzur, H. Shuval, S. Ulitzur, *Wat. Sci. Tech.* **35** (1997) 87-92
- PER98 S. Percival, J. Knapp, D. Wales, *Wat. Res.* **32** (1998) 243-253
- PER99 S. Percival, J. Knapp, D. Wales, R. Edyvean, *J. Indust. Microbiol. Biotech.* **22** (1999) 152-159
- POU66 Pourbaix, Marcel, *Atlas of electrochemical equilibria in aqueous solutions*, Pergamon Press, Oxford (1966)
- RAM01 R. Ramalho, J. Cunha, P. Teixeira, P. Gibbs, *J. Microbiol. Meth.* **44** (2001) 97-103
- REA85 D. J. Reasoner, *Appl. Environm. Microbiol.* **49** (1985) 1-7
- RÖM93 *Römpf Chemie-Lexikon*, Thieme-Verlag, Stuttgart (1993)
- RUD02 M. Rudh, H. Green, E. Lie, L. Slöström, *Tagungsband International Specialised Conference on Biofilm Monitoring, Porto* (2002)
- SAF97 S. Saffic, *Biofilmuntersuchungen im Düsseldorfer Trinkwassersystem, Tagungsband Berlin* (1997)
- SAN00 W. Sand, in: M. Schütze (ed.), *Corrosion and Environmental Degradation, Vol. 1*, VCH-Wiley, Weinheim (2000) 171-207
- SCO98 V. Scotto, M. Lai, *Corr. Sci.* **40** (1998) 1007-1018
- STE01 P. Stewart, J. Rayner, F. Roe, W. M. Rees, *J. Appl. Microbiol.* **91** (2001) 525-535
- STL91 E. Stelzer, A. Merdes, J. de Mey, *Biologie in unserer Zeit* **1** (1991) 21
- SUT90 I. W. Sutherland, *Biotechnology of exopolysaccharides*, Cambridge University Press, Cambridge, UK (1990)
- SUT94 I. W. Sutherland, *Biotech. Adv.* **12** (1994) 393-448
- TEI89 P. Teixeira, J. Azeredo, A. Oliveira, E. Chibowski, *Colloids Surfaces* **B 12** (1989) 69-75
- TIL98 D. Tillmann, *Dissertation, Gerhard-Mercator-Universität Duisburg* (1998)
- TIT94 J. Korkhaus, J. Titz, G. Wagner, *Mat. Corr.* **45** (1994) 87-95
- TRI99 B. Tribollet, E. L'Hostis, C. Compère, D. Festy, C. Deslouis, *Corr. Sci.* **53** (1997) 4-10
- TUI95 E. Tuite, B. Nordén, *Bioorg. Med. Chem.* **3** (1995) 701-711
- WAG96 D. Wagner, W. Fischer, H. Paradies, in: E. Heitz, H. C. Flemming: *Microbial Influenced Corrosion of Materials*, Springer Vlg., 1996
- WHI96 D. White, A. Arrage, D. Nivens, R. Plamer, J. Rice, G. Saylor, *Biofouling* **10** (1996) 3-16
- WHI97 D. C. White, H. C. Pinkart, D. B. Ringelberg: *Biomass measurements: Biochemical approaches*. In: C. J. Hurst (ed.): *Manual of Environmental microbiology*, ASM Press (1997) 91-101
- VIE99 I. Pinho, M. Montenegro, M. Vieira, *Tagungsband IAWQ Conference, New York* (1999)
- YAL88 M. Yalpani, *Polysaccharides: synthesis, modifications and structure/property relations*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, NL (1988)
- ZAC00 O. Zacheus, E. Iivanainen, T. Nissinen, M. Lehtola, P. Martikainen, *Wat. Res.* **34** (2000) 63-70