

# Schlussbericht

---

zu IGF-Vorhaben Nr. 18352 N

## Thema

Cyclodextrine - Biobasierter Korrosionsschutz für Metallwerkstoffe durch EPS-Analoga

## Berichtszeitraum

01.11.2014 - 30.09.2017

## Forschungsvereinigung

DECHEMA e.V.

## Forschungseinrichtung(en)

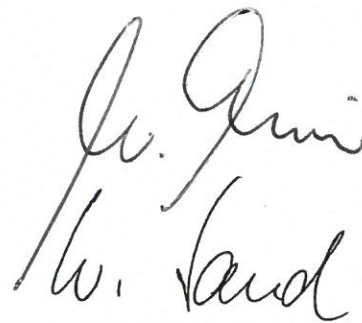
1. DECHEMA-Forschungsinstitut, Frankfurt am Main
2. Universität Duisburg-Essen, Biofilm-Centre, Essen

Frankfurt am Main, 31.12.2017  
Essen, 31.12.2017

Ort, Datum

PD Dr. W. Fürbeth  
Prof. Dr. W. Sand

Name und Unterschrift aller Projektleiterinnen und Projektleiter der  
Forschungseinrichtung(en)



## 1 Zusammenfassung

Im hier referierten Forschungsvorhaben zur Entwicklung eines biobasierten Korrosionsschutzes für Metallwerkstoffe durch EPS-Analoga gegen mikrobiell beeinflusste Korrosion von Eisenwerkstoffen in wässrigen Milieus wurde auf den Ergebnissen des verwandten Vorläuferprojekts 16953 N aufgebaut. Als relevante Werkstoffe wurden unlegierter Stahl (St 37) und hochlegierter Stahl (1.4301) untersucht. Das Hauptaugenmerk lag auf der Entwicklung einer praxisnahen Applikationsmethode für modifizierte Cyclodextrine (CD's) als auch dem Aufbau eines realitätsnahen Simulationssystems und der Auslagerung von Proben in industriellen Anlagen. Durch die wasserunlöslichen und sich bei Kontakt mit wässrigem Milieu selbstverkettenden CD's konnte ein Tauchverfahren zur Beschichtung etabliert werden, welches keiner weiteren Behandlung vor dem Auslagern der Proben bedarf. Mittels oberflächenspektroskopischer Methoden konnten diese Adsorbate auf der Oberfläche als homogene Belegungen identifiziert werden. Eine Bestimmung der Schichtdicke war nicht möglich, jedoch zeigte sich, dass beschichtete Proben eine verringerte Metalloxidation auf der Oberfläche aufwiesen und unter anaeroben Bedingungen teilweise eine hohe Stabilität zeigten sowie ihren hydrophoben Charakter beibehielten. Die Auslagerung von mit CD's beschichteten Coupons in mit *D. vulgaris* beimpfter Nährlösung in statischen und geschüttelten Batch-Reaktoren zeigte eine Reduktion der Korrosion um bis zu 70 % und eine Reduktion der Biofilmbildung um bis zu 75 %. Das Hochskalieren von Batch-Reaktoren zu einem turbulenten Strömungsreaktor (Mini-Plant, mit *D. vulgaris* beimpfter Nährlösung) zeigte eine bis zu 80-fach höhere Korrosion einer nicht beschichteten Referenz, dennoch wiesen die CD's bei diesen Langzeitversuchen (bis zu 8 Wochen) eine korrosionsinhibierende Wirkung von bis zu 45 % auf. Desweiteren wurde der synergistische Angriff von Sulfat-reduzierenden und Schwefel-oxidierenden Bakterien getestet. Es zeigte sich jedoch, dass die Adsorbate hier keine korrosionsinhibierende Schutzwirkung aufwiesen. Elektrochemische Untersuchungen zum Korrosionsverhalten unter abiotischen und aeroben Bedingungen zeigten für die mit wasserunlöslichen CD's beschichteten Oberflächen der Werkstoffe St37 und 1.4301 weder unter pH-neutralen noch unter pH-sauren Bedingungen eine Verbesserung der Korrosionseigenschaften. Unter MIC Bedingungen (mit *D. vulgaris* inokuliert) zeigte sich für ACBCD beschichtete Proben aus unlegiertem Stahl St37 im Vergleich zu Kontrollen jedoch eine Verschiebung des Durchbruchpotentials in anodische Richtung und damit eine Verbesserung der Korrosionseigenschaften. Dies konnte für REBCD und ROBCD nicht gezeigt werden. In Korrosionstests zeigten jedoch alle CD's eine Reduzierung des Gewichtsverlusts. Für den Werkstoff 1.4301 in mit *D. indonesiensis* beimpfter Nährlösung (+ 2 % NaCl), zeigten die Beschichtungen aus REBCD und ROBCD während der Versuchsreihen keine positive (anodische) Verschiebung der Lochbildungspotentiale, jedoch inhibierten sie sowohl die elektrochemischen Prozesse als auch die Lochbildung. Dies wurde durch eine Verringerung der Korrosionsstromdichte (bzw. Erhöhung des Polarisationswiderstandes) gezeigt. Im Falle der ACBCD-Beschichtung wurde kein Einfluss auf das Lochbildungspotential und die Korrosionsstromdichte beobachtet. Untersuchungen zur korrosionsinhibierenden Wirkung von CMBCD und CEBCD an (un)legiertem Stahl zeigten, dass die CD's die kathodische Teilreaktion der elektrochemischen Korrosionsprozesse reduzieren können und durch Bildung einer Barrierschicht den Ladungs- bzw. Elektronentransfer inhibieren. In der praxisorientierten Testphase wurden mit CEBCD beschichtete Proben in einem Wärmetauscher ausgelagert. Jedoch zeigte sich nach Beendigung der Testphase keine Verbesserung der Korrosionseigenschaften. Die Ziele des Vorhabens wurden teilweise erreicht.

## Inhalt

1	Zusammenfassung.....	2
2	Einführung.....	6
2.1	Vorbemerkung.....	6
2.2	Ausgangssituation und Aufgabenteilung.....	6
3	Zusammengefasste Gegenüberstellung von Zielsetzungen und Ergebnissen.....	6
3.1	Arbeitspaket 1: Mikrobiologische Arbeiten zum Züchten von Mikroorganismen, Erstellen eines Sulfuretums .....	6
3.2	Arbeitspaket 2: Labororientierte Untersuchungen zu Korrosionsinhibierung und Stabilität der Adsorbate.....	7
3.3	Arbeitspaket 3: Praxisorientierte Untersuchungen zu Korrosionsinhibierung und Stabilität der Adsorbate.....	11
3.4	Arbeitspaket 4: Untersuchungen zum Einfluss der Substanzen auf Korrosion durch Organismen des Schwefelkreislaufs .....	12
3.5	Arbeitspaket 5: Untersuchungen zur Übertragbarkeit auf CuNi-Legierungen.....	13
3.6	Arbeitspaket 6: Untersuchungen zur Anwendbarkeit der Adsorbate als Ersatz klassischer Korrosionsinhibitoren in polymerbasierten Schutzsystemen .....	13
4	Stand der Forschung und Entwicklung.....	13
4.1	Mikrobiell beeinflusste Korrosion.....	13
4.2	Konventionelle Abhilfemaßnahmen und Problemstellung.....	15
4.3	Korrosionsinhibitoren auf biogener Basis .....	16
4.4	Korrosionsschutz durch Mikrobiell beeinflusste Korrosionsinhibierung.....	18
4.4.1	MICI durch lebende Biofilme .....	18
4.4.2	MICI durch zellfreie extrazelluläre polymere Substanzen .....	20
4.5	Korrosionsinhibition durch einzelne Stoffgruppen (EPS- Analoga) .....	21
4.5.1	Cyclodextrine .....	22
5	Angestrebte Forschungsergebnisse.....	24
6	Material und Methoden.....	24
6.1	Mikroorganismen.....	24
6.2	Zellkultivierung .....	25
6.2.1	Kultivierung von <i>Leptothrix discophora</i> .....	25
6.2.2	Kultivierung von SRB .....	25
6.2.3	Kultivierung von <i>Thiomonas intermedia</i> .....	25
6.3	Werkstoffauswahl und Probenvorbereitung .....	25
6.3.1	Verwendete Werkstoffe .....	25
6.3.2	Probenanfertigung.....	26
6.3.3	Probenvorbereitung.....	26
6.3.4	Proben-Aufarbeitung nach Entnahme .....	27

6.3.5	Statistische Auswertung der Biofimbildung.....	27
6.4	Absorbatbildung .....	28
6.4.1	Cyclodextrine .....	28
6.4.2	Erzeugung von Cyclodextrinschichten durch Polymerisierung.....	28
6.4.3	Optimierung der Beschichtung auf St37 und 1.4301 .....	28
6.4.4	Beschichtung zylinderförmiger Proben .....	29
6.4.5	Untersuchung der selbstverkettenden Cyclodextrinschichten auf Wasserlöslichkeit.....	29
6.5	Labororientierte Untersuchungen zum Einfluss der Cyclodextrin Adsorbate auf MIC und MICl .....	30
6.5.1	Statische Korrosionsversuche im 20 mL Maßstab mit SRB.....	30
6.5.2	Korrosionsversuche im 1000 mL Maßstab mit SRB.....	31
6.6	Praxisorientierte Untersuchungen zum Einfluss der Cyclodextrin Adsorbate auf MIC und MICl .....	31
6.6.1	Aufbau eines realitätsnahen Simulationssystems (Mini-Plant) zur Simulation von MIC 31	
6.6.2	Auslagerung in einem Wärmetauschersystem.....	33
6.7	Mikroskopische Untersuchungsmethoden .....	33
6.7.1	Lichtmikroskopie .....	33
6.7.2	Fluoreszenzmikroskopie.....	34
6.7.3	AFM .....	34
6.8	Charakterisierung der Adsorbatbildung sowie der Schichten verschiedener Cyclodextrin Varianten auf Stahl.....	35
6.9	Elektrochemische Untersuchung zum Adsorbat-Einfluss auf abiotische Korrosion und MIC durch SRB.....	35
7	Ergebnisse und Diskussion .....	36
7.1	Kultivierung von Mikroorganismen.....	36
7.2	Entwicklung einer praxisnahen Applikationsmethode .....	36
7.3	Oberflächeneigenschaften hergestellter Adsorbate .....	37
7.4	Oberflächeneigenschaften und Stabilität der Adsorbate nach kurzer Auslagerung.	40
7.5	Elektrochemische Evaluierung der Schutzwirkung wasserunlöslicher Cyclodextrin Adsorbate gegen Korrosion .....	44
7.5.1	Abiotische Korrosion .....	44
7.5.2	MIC durch SRB .....	46
7.5.3	Untersuchungen zur korrosionsinhibierenden Wirkung von CMBCD und CEBCD an (un)legiertem St-37 und 1.4301.....	48
7.6	Labororientierte Untersuchungen zum Einfluss der Cyclodextrin Adsorbate auf MIC und MICl .....	51
7.6.1	Bestimmung der Oberflächenrauigkeit .....	51

7.6.2	Untersuchungen im statischen Batchverfahren .....	52
7.6.3	Untersuchungen im geschüttelten Batchverfahren .....	54
7.6.4	Untersuchungen und Aufbau eines realitätsnahen Simulationssystems .....	56
7.7	Praxisnahe Auslagerung von Cyclodextrin beschichteten Proben .....	60
7.7.1	Werkstoffkundliche Untersuchung .....	60
7.7.2	Mikrobiologische Untersuchung .....	61
8	Praktischer Nutzen der Ergebnisse .....	62
8.1	Wissenschaftlich-technischer Nutzen der erzielten Ergebnisse und Transfermaßnahmen zur industriellen Anwendung speziell durch KMU .....	62
8.2	Verwendung der Zuwendung .....	64
8.3	Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit .....	64
8.4	Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft .....	64
8.4.1	Bereits durchgeführte spezifische Transfermaßnahmen während der Laufzeit des Vorhabens .....	64
8.4.2	Geplante spezifische Transfermaßnahmen nach der Projektlaufzeit .....	65
8.4.3	Einschätzung zur Realisierbarkeit des vorgeschlagenen und aktualisierten Transferkonzeptes.....	65
9	Darstellung des Projekts in der Öffentlichkeit .....	65
10	Literaturverzeichnis.....	67
11	Anhang .....	75
11.1	Lösungen .....	75
11.1.1	Vitaminlösung.....	75
11.1.2	Spurenelementlösung SL-10.....	75
11.1.3	Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) .....	75
11.2	Medien SRB.....	76
11.3	Medium Leptothrix discophora .....	78
11.4	Selektiv Medien.....	80
11.4.1	Chemoorganotrophe Bakterien .....	80
11.4.2	Pilze .....	80
11.4.3	Moderat acidophile Bakterien .....	81
11.4.4	Manganoxidierende Bakterien.....	83

## **2 Einführung**

### **2.1 Vorbemerkung**

Der vorliegende Schlussbericht wurde vom DECHEMA Forschungsinstitut (Forschungsstelle 1) und der Abteilung Aquatische Biotechnologie des Biofilm Centre Universität Duisburg-Essen (Forschungsstelle 2) gemeinsam erstellt.

### **2.2 Ausgangssituation und Aufgabenteilung**

Im Fokus dieses Vorhabens stehen Untersuchungen zur Wirkung natürlicher Stoffklassen bzw. funktioneller industrieller Analoga gegen abiotische und Biokorrosion an unlegierten und hochlegierten Stählen in wässrigen Medien. Dabei soll sowohl die korrosionsinhibierende Wirkung als auch die Stabilität der Schutzschichten optimiert werden.

Als Modellsysteme für Biokorrosion sollten der Angriff von Sulfat-reduzierenden Bakterien in Reinkulturen oder von Mischkulturen mit Schwefel-oxidierenden Bakterien (Simulation eines natürlichen Schwefelkreislaufs) auf unlegierten Stahl St-37 und hochlegierten Stahl 1.4301 eingesetzt werden. Für die Untersuchungen zum Einfluss von Mangan-oxidierenden Mikroorganismen und auch zur Lochkorrosion soll hochlegierter Stahl 1.4301 eingesetzt werden.

Die am Projekt beteiligten Forschungsstellen waren bereits aus dem Vorläuferprojekt miteinander vertraut und aufeinander abgestimmt, so dass eine reibungslose Zusammenarbeit möglich war. Die einerseits werkstofftechnische (Forschungsstelle 1) und andererseits mikrobiologische (Forschungsstelle 2) Orientierung der Forschungsstellen ermöglichte es, dass die jeweiligen Spezialkenntnisse und das Know-How gewinnbringend in die gemeinsame Bearbeitung des Projekts eingebracht werden konnten. Schwerpunkte der Forschungsstelle 1 waren werkstoffkundliche Untersuchungen und elektrochemische Versuche sowie Korrosionsexperimente an den Cyclodextrinen. Schwerpunkte der Forschungsstelle 2 waren die Fortführung der Kultivierung als geeignet erscheinender Mikroorganismen und die Durchführung von Untersuchungen unter Berücksichtigung mikrobiologischer Aspekte.

Ein intensiver Erfahrungsaustausch zwischen den Forschungsstellen war unerlässlich und führte in Form von mehreren gegenseitigen Besuchen und Gastaufenthalten zu einem guten Fortschreiten der Arbeiten.

## **3 Zusammengefasste Gegenüberstellung von Zielsetzungen und Ergebnissen**

### **3.1 Arbeitspaket 1: Mikrobiologische Arbeiten zum Züchten von Mikroorganismen, Erstellen eines Sulfuretums**

Es wurden permanent Reinkulturen der Sulfat-reduzierenden Bakterien (SRB) *Desulfovibrio vulgaris*, *D. alaskensis* und *D. indonesiensis* sowie des Mangan-oxidierenden Mikroorganismus (MOMO) *L. discophora* als auch SRB-Anreicherungskulturen aus MIC-Schadensfällen der Industrie kultiviert. Es lagen bis zum Abschluss des Projektes sechs verschiedene SRB-Anreicherungskulturen vor.

In der Mini-Plant wurde erfolgreich ein realitätsnahes Sulfuretum etabliert, in dem simultan SRB und SOB (Schwefel-oxidierende Bakterien) wachsen konnten. Dies wurde durch qualitative Bestimmung der Organismengruppen auf selektiven Nährmedien überprüft und bestätigt. Es wurden erfolgreich die Parameter pH und Redox-Potential, sowohl in der Bulklösung als auch mittels Minielektroden direkt an der Phasengrenze Werkstoff/Flüssigkeit bzw. Werkstoff/Biofilm gemessen. Da der synergistische Angriff von SRB und SOB bereits zu teils starker Korrosion führte, wurde auf den weiteren Einsatz von MOMO verzichtet.

### **3.2 Arbeitspaket 2: Labororientierte Untersuchungen zu Korrosionsinhibierung und Stabilität der Adsorbate**

#### *Entwicklung einer praxisnahen Applikationsmethode (mikrobiologisch und werkstoffkundlich):*

Die Entwicklung einer praxisnahen Applikationsmethode wurde erfolgreich abgeschlossen. Die Applikation in einem 2K-System erwies sich als nicht praktikabel. So wurde auf Cyclodextrine (CD's) ausgewichen, welche sich in einem einzigen Schritt durch Tauchen (bis zu 5 Tauchschritte) auf die Metalloberfläche aufbringen lassen und bei Kontakt mit einem wässrigem Milieu sich selbst verketteten und so einen nachgeschalteten Polymerisationsschritt überflüssig machen. Es wurden die CD's REBCD und ROBCD auf unseren Wunsch von der Fa. Cyclolab synthetisiert. Die oben genannten CD's zeichnen sich durch verschieden lange Seitenketten, Ethyl (C<sub>2</sub>) und Octyl (C<sub>10</sub>) aus, sowie durch ihre selbstverkettenden Eigenschaften. Im Detail: Durch die hydrophoben Seitenketten sind sie nicht wasserlöslich und wurden für das Projekt in Essigsäureethylester gelöst. Ebenfalls wurden die Lösemittel Dichlormethan, Aceton und Chloroform getestet aber aufgrund ihrer aggressiven und gesundheitsgefährdenden Eigenschaften letztendlich ausgeschlossen. In gelöstem Zustand liegen die Seitenketten frei vor. Kommt ein beliebiger Werkstoff nach dem Tauschbeschichten mit einer wässrigen Lösung in Kontakt, lagern sich die hydrophoben Seitenketten in die hydrophoben Kavitäten der benachbarten CD's ein. Die CD's verketteten sich in wässrigem Milieu selbst, so ist eine zeitintensive nachgeschaltete Polymerisation unnötig. Es konnte so eine praxisnahe Applikationsmethode mit nur einem Schritt realisiert werden. Ebenfalls wurde das Cyclodextrin ACBCD untersucht, welches keine selbstverkettenden Eigenschaften besitzt aber ebenso durch die Acethyl-Seitenkette wasserunlöslich ist. Es wurde in Acetonitril gelöst und besitzt eine potentiell höhere Resistenz gegenüber Ablösung in Wasser als wasserlösliche Cyclodextrine, welche im Vorläuferprojekt eingesetzt wurden. In Anlehnung an die Ergebnisse des Vorläuferprojektes wurden Lösungen der jeweiligen CD's in der Konzentration 10 mg\*mL<sup>-1</sup> hergestellt. Die Proben (Coupons und Zylinder) wurden durch eintauchen beschichtet.

#### *Mikrobiologische Untersuchungen zum Einfluss der Adsorbatschichten auf Biofilmbildung und Biokorrosion (statisch und geschüttelt):*

Es wurden erfolgreich Versuche in 20 mL statischen sowie in 1000 mL geschüttelten Batch-Reaktoren durchgeführt. Hierzu wurden die CD's CMBCD, CEBCD, REBCD, ROBCD und ACBCD getestet. Über alle Versuche hinweg zeigte ACBCD die höchste inhibierende Wirkung, sowohl auf die Flächenbelegung mit Bakterien als auch auf die Korrosion. So zeigte ACBCD eine Reduktion der Korrosion um bis zu 70 % und eine Reduktion der Flächenbelegung um bis zu 75 % (im Vergleich mit einer nicht beschichteten Referenz). Die CD's CMBCD, CEBCD, REBCD und ROBCD verringerten die Korrosion um bis zu 45 % in statischen bzw. bis zu 35 % in geschüttelten Batch-Reaktoren. Ebenfalls konnte ein Einfluss

auf die Biofilmbildung gezeigt werden. Detaillierte Ergebnisse dazu finden sich in Abschnitt 7.6.2. Im Zuge der sukzessiven Hochskalierung des Versuchsaufbaus wurde ebenfalls gezeigt, dass die Abtragsrate pro Jahr um bis zu Faktor 10 ansteigt (eine nicht beschichtete Referenz steigt von 23  $\mu\text{m} / \text{a}$  auf 276  $\mu\text{m} / \text{a}$  an).

*Mikrobiologische Überprüfung einer eventuellen Abbaubarkeit der Adsorbate durch SRB-Anreicherungskulturen, Manganoxidanten und Anreicherungskulturen aus Böden und Ausschluss eines möglichen Nährstoffeintrags in der Mini-Plant:*

Im Vorläuferprojekt 16953N wurde gezeigt dass die CD's durch SRB und Anreicherungskulturen aus Böden in statischen Batch-Verfahren nicht abgebaut werden. Ebenfalls zeigt die Literatur für stark durch Seitenketten modifizierte CD's eine geringe Abbaubarkeit, 40 % des Ausgangsgehaltes waren nach 2 Jahren noch nachweisbar (Fenyvesi, et al., 2005). Die in diesem Projekt verwendeten nicht wasserlöslichen Cyclodextrine haben durch ihre schlechte Verfügbarkeit eine potentiell geringe Abbaubarkeit. Eine abschließende Bewertung des Nährstoffeintrags sowie der Abbaubarkeit in der Mini-Plant kann aber nicht gegeben werden da die Messung von Reaktionsprodukten (z.B. Messung des Kohlenhydratabbaus mittels chromatographischer Methoden) in der Bulk-Lösung nicht möglich war. Die Abbaubarkeit und der Nährstoffeintrag wird insgesamt als gering eingeschätzt.

*Werkstoffkundliche Untersuchungen zur Adsorption ausgewählter Substanzen und der Oberflächeneigenschaften:*

Untersuchungen zu ausgewählten Cyclodextrinen und ihrer Adsorption dienen der Aufklärung von sterischer Ausrichtung, Morphologie, räumlicher Verteilung und Stabilität der Adsorbate. Oberflächeneigenschaften wie Hydrophobizität sollten mittels Kontaktwinkelmessungen ermittelt werden. Desweiteren sollten Analysen zur Bestimmung der Morphologie, räumlichen Verteilung und zur Quantifizierung der gebildeten Adsorbate mit Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) als auch Infrarot-Spektroskopie (IR) durchgeführt werden.

Eine Identifizierung der Adsorbate auf der Oberfläche durch Einsatz fluoreszenzmikroskopischer Methoden war nicht möglich da die Cyclodextrine nicht fluoreszenzmarkiert werden konnten. Jedoch konnten mittels FTIR-Spektroskopie alle drei Cyclodextrine eindeutig auf der Oberfläche der jeweiligen St37 und 1.4301 Coupons wiedergefunden werden. Ein Vergleich der Banden im Fingerprintbereich (1500 bis 400  $\text{cm}^{-1}$ ) beschichteter Proben der Werkstoffe St37 bzw. 1.4301 mit den Banden der Rein-Substanzen führte zur Identifizierung der genannten Cyclodextrine. Mittels REM konnte eine homogene Bedeckung der Oberfläche gezeigt werden. Weiter zeigten die REM Untersuchungen, dass als Folge des Abdampfens von Lösemittel Randzonen entstehen an denen die Oberflächenbedeckung dicker aufliegt als im Inneren der behandelten Fläche. Die mittels EDX analysierten Randzonen zeigen mit ca. 75 Atom % auf hochlegiertem Stahl 1.4301 bzw. 65 Atom % auf unlegiertem Stahl St37 den höchsten Anteil des Elements Kohlenstoff. Im Inneren werden auf 1.4301 noch ca. 40 Atom % bzw. auf St37 30 Atom % Kohlenstoff detektiert. Des Weiteren fiel während der Probenuntersuchung mittels REM auf, dass die Oberflächen nicht beschichteter Proben dunkler erschienen als Oberflächen, welche mit nicht wasserlöslichen CD Varianten modifiziert wurden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass auf den Oberflächen nicht beschichteter Proben verstärkt Metalloxide ausgebildet wurden. Eine Bestimmung der Schichtdicken war nicht möglich. In Hinblick auf die Benetzbarkeit der mit



ACBCD, REBCD und ROBCD modifizierten Werkstoffproben zeigten REBCD und ROBCD hydrophobe Eigenschaften während für ACBCD Beschichtungen im Vergleich zur Kontrolle hydrophile Eigenschaften gemessen wurden.

*Mikrobiologische Untersuchungen der Adsorbat-Stabilität gegen abiotische Faktoren: Variation von pH, Temperatur, Salz- und Sauerstoffgehalt:*

Es wurden Rauigkeitsmessungen mittels AFM durchgeführt und der Einfluss von Sauerstoff auf die Adsorbate getestet. Eine Auslagerung unter Ausschluss von Sauerstoff zeigte keinen Einfluss auf die Rauigkeit, eine Auslagerung unter Sauerstoff zeigte jedoch einen Anstieg der Rauigkeit von 217 nm auf 475 nm. Die Adsorbate zeigen keine Stabilität gegenüber Sauerstoff.

*Werkstoffkundliche Untersuchungen der Adsorbat-Stabilität gegen abiotische Faktoren: Variation von pH, Temperatur, Salz- und Sauerstoffgehalt:*

Die Stabilität der wasserunlöslichen CD Adsorbate gegen Ablösung von den Werkstoffoberflächen wurde mittels FT-IRRAS und Kontaktwinkeluntersuchung nach einer Auslagerung von bis zu drei Tagen unter anaeroben und pH neutralen Bedingungen untersucht.

Mit Ausnahme von REBCD auf St-37 konnten die nicht wasserlöslichen CD Varianten mittels FT-IR(RAS) nach kurzer Auslagerung von bis zu drei Tagen unter anaeroben Bedingungen in steriler Postgate C Nährlösung auf den Oberflächen der Werkstoffe St-37 und 1.4301 detektiert werden. Ein Vergleich der Banden ( $4000$  bis  $400\text{ cm}^{-1}$ ) mit den Banden der Reinsubstanzen und der von beschichteten Oberflächen vor einer Auslagerung, zeigten keine Änderung der Bandenlage oder Form und zeigen damit eine Stabilität der genannten Cyclodextrine auf der Oberfläche. Der repulsive Charakter der mit ROBCD modifizierten Oberflächen bleibt auch nach der kurzen Auslagerungszeit in steriler, anaerober Postgate C Nährlösung erhalten, während die Eigenschaften von mit REBCD beschichteten Proben mit fortschreitender Auslagerungszeit von hydrophob zu hydrophil wechselt. Der hydrophile Charakter von mit ACBCD beschichteten Proben bleibt nur für den Werkstoff 1.4301 erhalten, während die Kontaktwinkel für mit ACBCD modifizierten St-37 vergleichbar mit den Werten der nicht beschichteten Kontrolle waren.

*Mikrobiologische Korrosionsversuche mit Rein- und Anreicherungskulturen von SRB sowie Manganoxidanten:*

Für die mikrobiologische Untersuchung des Einflusses der Cyclodextrine in der Mini-Plant wurde *Desulfovibrio (D.) vulgaris* ausgewählt. Auf die Verwendung von Anreicherungskulturen wurde aufgrund des zeitlichen Aufwands der Mini-Plant Messungen und des (mechanistisch) vergleichbaren Angriffs verzichtet. Ebenfalls wird kein weiterer Erkenntnisgewinn erwartet. Manganoxidanten wurden nicht eingesetzt, Details siehe "Erstellen eines Sulfuretums". Die Mini-Plant (Strömungsreaktor) wurde erfolgreich eingesetzt. Es konnten die Parameter pH und Redox-Potential in der Bulklösung gemessen werden. Zusätzlich wurde auch mittels Minielektroden direkt an der Phasengrenze Werkstoff/Flüssigkeit das Redox-Potential gemessen. Hierzu wurden vom Kurt-Schwabe-Institut miniaturisierte Redox-Potential Elektroden nach unseren Vorgaben hergestellt. Selbige können mittels einer Bohrung in den Ringsegmenten (Werkstoff St37 oder 1.4301) der Mini-Plant eingesetzt werden. Im späteren Projektverlauf wurden die Minielektroden von Biofilmen überwachsen und lieferten Messwerte aus der relevanten Phasengrenze

Werkstoff/Biofilm. Das sukzessive Hochskalieren der Laborversuche hin zu einem praxisnahen Simulationssystem war erfolgreich, dies zeigt sich in einem weiteren Anstieg der Abtragsrate im Vergleich mit statischen und geschüttelten Batch-Reaktoren. Die Abtragsrate steigt um bis zu Faktor 80, das entspricht einem Abtrag von bis zu 1757  $\mu\text{m}$  pro Jahr. Versuche mit CEBCD und ROBCD zeigten eine korrosionsinhibierende Wirkung von 20 % bzw. 50 % gegen mikrobiell beeinflusste Korrosion. Weitere Untersuchungen zu der Schutzwirkung von REBCD und ACBCD in der Mini-Plant zeigten z. T. widersprüchliche Ergebnisse, Details dazu siehe Abschnitt 7.6.4.

*Elektrochemische Untersuchungen zum Einfluss der Substanzen auf Korrosionsinhibierung:*

Die Evaluierung der Schutzwirkung und Praxistauglichkeit der Adsorbate gegen abiotische und biotische Korrosion (durch Sulfat-reduzierende, Schwefel-oxidierende und Mangan-oxidierende Bakterien) unter statischen Bedingungen soll durch elektrochemische Messungen (Stromdichte-Potential-Kurven, Polarisationswiderstandsmessungen, Impedanzspektroskopie u.a.) in-situ erfolgen. Dabei kann die zeitliche Entwicklung des Ruhepotentials als Indikator für den Beginn von korrosiven Vorgängen wichtige Informationen über die Stabilität der Adsorbate geben. Der elektrochemische Zustand der Elektrode soll durch in regelmäßigen Zeitabständen aufgenommene Daten aus EIS und elektrochemischer Polarisation beurteilt werden.

Der Einfluss auf abiotische Korrosion der nach erweitertem Standardverfahren mit ACBCD, REBCD und ROBCD beschichteten Proben aus legiertem Stahl (1.4301) und unlegiertem Stahl (St-37) wurde in 1 molarer bzw. 0,2 molarer NaCl Lösung bei Raumtemperatur und unter aeroben Bedingungen untersucht. In einer Versuchsreihe zum Lochbildungspotential am Werkstoff 1.4301 konnte für ACBCD und ROBCD beschichtete Proben im Vergleich zu nicht beschichteten Proben kein Einfluss auf das Lochbildungspotential festgestellt werden. Während das Lochbildungspotential für mit ACBCD und ROBCD beschichtete Proben in vergleichbare Potentialbereiche fiel (450 bis 550 mV gegen NHE angegeben), wurde für mit REBCD beschichtete Proben sogar eine Verschiebung des Lochbildungspotentials um ca. 100 mV in kathodische Richtung beobachtet (ca. 360 mV gegen NHE), was einer Verschlechterung der Korrosionseigenschaften entspricht. Die Untersuchungen zum Einfluss der wasserunlöslichen Cyclodextrin-Adsorbate ACBCD, REBCD und ROBCD auf das Korrosionsverhalten von St-37 in 0,2 molarer NaCl Lösung zeigten ebenfalls, dass die nach erweitertem Standardverfahren entwickelten Schichten keinen Schutz bieten und im Fall der REBCD und ROBCD Beschichtungen Korrosionsprozesse sogar beschleunigt werden.

Die nach erweitertem Standardverfahren mit ACBCD, REBCD und ROBCD modifizierten Proben der Werkstoffe 1.4301 und St-37 wurden auch in 0,5 molarer HCl Lösung bei Raumtemperatur und sowie aeroben Bedingungen auf ihre Korrosionseigenschaften hin untersucht. Die Ergebnisse zur Lochbildung an nach erweitertem Standardverfahren mit REBCD und ROBCD beschichtetem Werkstoff 1.4301 zeigten im Vergleich zu nicht beschichteten Proben, weder eine positive (anodische) Verschiebung des Lochbildungspotentials noch eine Verringerung der Korrosionsstromdichte und somit keine Verbesserung der Korrosionseigenschaften. Auch die Untersuchung zum Einfluss von REBCD bzw. ROBCD auf das Durchbruchpotential des Werkstoffs St-37 in 0,5 molarer HCl zeigen, dass die Potentiale mit Durchbruchpotentialen nicht beschichteter Kontrollen vergleichbar sind. Desweiteren zeigte die Auswertung der Stromdichte-Potential Messungen für REBCD und ROBCD Beschichtungen im Vergleich zur nicht beschichteten St37 Kontrolle ähnliche Korrosionsstromdichten (262  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  für REBCD, 230  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  für ROBCD und 270

$\mu\text{A}/\text{cm}^2$  für die Kontrollen) und Polarisationswiderstände (43 Ohm für REBCD; 54 Ohm für ROBCD und 44 Ohm für die nicht beschichteten Kontrollen).

Die Ergebnisse zum Einfluss der nach erweitertem Standardverfahren hergestellten Cyclodextrin-Beschichtungen auf MIC von unlegiertem Stahl (St-37) während kurzer, anaerober und statischer Auslagerung (für 3 Tage) in *D. vulgaris* beimpfter Postgate C Nährlösung zeigten für ACBCD beschichtete Proben im Vergleich zu nicht beschichteten Kontrollen eine Verschiebung des Durchbruchpotentials in anodische Richtung. Eine Verringerung der Korrosionsstromdichte bzw. Erhöhung des Polarisationswiderstandes konnte nicht gezeigt werden. Die Untersuchung von mit ACBCD beschichtetem St-37 zeigte zudem, dass im Gegensatz zur SRB-beimpften Versuchsführung unter sterilen Bedingungen keine positive (anodische) Verschiebung beobachtet wurde. Die Beschichtungen aus REBCD und ROBCD zeigen während MIC Versuchsreihen weder eine Verschiebung der Durchbruchpotentiale noch eine Verringerung der Korrosionsstromdichte (bzw. Erhöhung des Polarisationswiderstandes) und damit keine Verbesserung der Korrosionseigenschaften.

In *D. indonesiensis* beimpfter Postgate C (modi) + 2% NaCl Nährlösung zeigten die Beschichtungen aus REBCD und ROBCD auf dem Werkstoff 1.4301 während der Versuchsreihen keine positive (anodische) Verschiebung der Lochbildungspotentiale, respektiv zur nicht beschichteten Kontrolle. Die Beschichtungen scheinen jedoch die elektrochemischen Prozesse und die Lochbildung zu inhibieren, was durch eine Verringerung der Korrosionsstromdichte (bzw. Erhöhung des Polarisationswiderstandes) gezeigt wurde. Im Falle der ACBCD Beschichtung wird kein Einfluss auf das Lochbildungspotential und die Korrosionsstromdichte beobachtet.

Mit Hilfe der EIS Methode wurde die Wirkung von CMBCD und CEBCD an unlegiertem Stahl (St-37) in Cyclodextrin-haltiger (Konz.: 5 mg/ml) 0,2 molarer Natriumchlorid Lösung und an mit CMBCD und CEBCD beschichteten Proben aus legiertem Stahl (1.4301) während einer 12-tägigen Auslagerung in mit *D. indonesiensis* beimpfter Postgate C (modi.) + 2% NaCl Nährlösung untersucht.

Die EIS Ergebnisse von St-37 in CMBCD- und CEBCD-haltiger (Konz.: 5 mg/ml) 0,2 molarer NaCl-Lösung zeigen unter aeroben Bedingungen und Raumtemperatur eine geringe Verbesserung der Impedanzwerte (Polarisationswiderstand). Zu Beginn der Auslagerung waren die Werte der Kontroll-Proben in CD-freier 0,2 molarer NaCl-Lösung im Vergleich zu den Werten für St37 in CD-haltiger Lösung besser. Im weiteren Verlauf der Auslagerung sanken die Impedanz-Werte der Kontrollen jedoch schneller als im gleichen Zeitraum für St37 in CD-haltiger Lösung. Die größeren Halbkreis-Durchmesser für St-37 in CD-haltiger Lösung die im Verlauf der Auslagerung gemessen wurden sind indikativ für einen reduzierten Elektronentransfer an der Werkstoffoberfläche. Durch weitere Untersuchungen mittels Zyklischer Voltammetrie konnte für St-37 in CMBCD- und CEBCD-haltiger 0,2 molarer NaCl-Lösung gezeigt werden, dass die getesteten Cyclodextrine die kathodische Teilreaktion der elektrochemischen Korrosionsprozesse beeinflussen können und durch Bildung einer Barriere-Schicht den Ladungs- bzw. Elektronentransfer inhibieren.

### **3.3 Arbeitspaket 3: Praxisorientierte Untersuchungen zu Korrosionsinhibierung und Stabilität der Adsorbate**

*Mikrobiologische und werkstoffkundliche Untersuchungen von Proben während der Auslagerung in technischen Systemen:*

Ausgewählte Adsorbate (und Applikationsverfahren), die in den labororientierten Versuchen vielversprechende Eigenschaften zeigten, wurden in einem Wärmetauscher eingesetzt. Zu diesem Zweck wurde eine Kooperation mit dem TÜV Süd am Standort Industriepark Höchst geschlossen.

*Werkstoffkundliche Untersuchungen:*

Die Proben wiesen unter den turbulenten Bedingungen während der Praxis-orientierten Auslagerung in einem Wärmetauscher im Vergleich zu nicht beschichteten Kontrollen keine verbesserten Schutzeigenschaften auf. Die Proben neigen unter den gewählten Bedingungen zur Korrosion in Form von Lochbildung. Wie REM-Aufnahmen zeigten, konnte keine Cyclodextrin-Beschichtung bzw. keine Rückstände nach dieser Versuchsreihe gefunden werden. Die EDX-Untersuchungen deuteten an, dass der Kohlenstoff-Gehalt verglichen mit den CEBCD Proben vor Auslagerung insgesamt höher ist. Ein Vergleich der mit CEBCD beschichteten Proben mit nicht beschichteten Kontrollen zeigte keine mess- bzw. erkennbaren Unterschiede. Anhand dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die Beschichtungen unter den gewählten Bedingungen (variierende Temperatur und Flussgeschwindigkeit zwischen 0,1 bis 0,2 m/sek.) keine Haft-Stabilität aufweisen und aufgrund der Schichtauflösung keine Verbesserung der Korrosionseigenschaften zeigen.

*Mikrobiologische Untersuchungen:*

Nach der Auslagerung wurden die Proben mikrobiologisch charakterisiert und die Zellzahlen von 4 Organismengruppen bestimmt. Im Mittel zeigte der Werkstoff 1.4571 eine leicht niedrigere Besiedlung im Vergleich zum Werkstoff 1.4301. Dies äußert sich aber vor allem durch die starke Besiedlung der Probe 1.4301 (1), welche bis zu einer Log-Stufe höhere Zellzahlen aufweist. Auf der Oberfläche hat sich ein heterogener Bewuchs aus verschiedenen Organismengruppen gebildet. Die Anwesenheit von moderat acidophilen und Mangan oxidierenden Bakterien ist ein Indikator für die Möglichkeit von MIC und kann die Lochbildung der in Abbildung 29 gezeigten Probe erklären.

Der Einbau der Mini-Plant als Bypass in industriellen Betriebskreisläufen erwies sich in Absprache mit unserem Kooperationspartner, dem TÜV Süd am Standort Industriepark Höchst als nicht praktikabel. Ebenfalls wurde aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse auf Erdeingrabe- und Salzsprühtests in Kooperation mit der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung verzichtet.

### **3.4 Arbeitspaket 4: Untersuchungen zum Einfluss der Substanzen auf Korrosion durch Organismen des Schwefelkreislaufs**

*Mikrobiologische Untersuchungen zum synergistischen Angriff von SOB und SRB im Sulfuretum (analog zu abwasserführenden Rohrsystemen):*

In der Mini-Plant wurde ein Sulfuretum erfolgreich durch Begasung abwechselnd mit Stickstoff und Sauerstoff (6 Stunden Intervall) sowie Anpassung des Nährmediums für SRB und SOB erstellt. Zuerst wurde der synergistische Angriff von SRB und SOB auf den Werkstoff St37 getestet. Die CD's zeigen für den Werkstoff St37 keine Schutzwirkung, die

Korrosionsrate der beschichteten Coupons liegt sogar höher als die einer nicht beschichteten Referenz. Aufgrund dieser und der in den vorherigen Arbeitspaketen gesammelten Information ist nicht davon auszugehen, dass die ausgewählten CD's eine Schutzwirkung gegen Sauerstoffkorrosion und den synergistischen Angriff von SRB und SOB aufweisen. Analog dazu wird erwartet, dass die CD's ebenfalls keine Schutzwirkung für Gusseisen im Sulfuretum aufweisen, daher wurde auf eine Auslagerung im Institut Fraunhofer UMSICHT verzichtet.

### **3.5 Arbeitspaket 5: Untersuchungen zur Übertragbarkeit auf CuNi-Legierungen**

*Orientierende Untersuchungen zur Schutzwirkung der Adsorbate gegen abiotische Korrosion und MIC von CuNi-Legierungen (Kraftwerkswärmetauscher):*

In einem Wärmetauscher wurde die Stabilität der Adsorbate auf den Werkstoffen 1.4301 und 1.4571 getestet und es zeigte sich keine Schutzwirkung. Analog dazu können diese Ergebnisse auf CuNi-Legierungen übertragen werden. Um die Wirkung auf CuNi-Legierungen abschließend zu klären muss daher zunächst die Polymeradhäsion verbessert werden.

### **3.6 Arbeitspaket 6: Untersuchungen zur Anwendbarkeit der Adsorbate als Ersatz klassischer Korrosionsinhibitoren in polymerbasierten Schutzsystemen**

*Untersuchungen zur Verwendung modifizierter Cyclodextrine als Ersatz klassischer Korrosionsinhibitoren wie Zinkphosphat in polymerbasierten Schutzschichten:*

In ersten Gesprächen im Rahmen des projektbegleitenden Ausschusses wurde die Möglichkeit diskutiert, klassische Korrosionsinhibitoren wie Zinkphosphate durch Cyclodextrine zu ersetzen. Da Zinkphosphate bereits erfolgreich durch andere EPS-Analoga in kommerziellen Lackformulierungen ersetzt wurden, wurde der Vorschlag positiv aufgenommen. Eine simple Substitution der eines klassischen Korrosionsinhibitors schien aber nicht praktikabel, so dass hier erst eine Verbesserung der korrosionsinhibierenden Wirkung der Cyclodextrine erzielt werden muss.

## **4 Stand der Forschung und Entwicklung**

### **4.1 Mikrobiell beeinflusste Korrosion**

Mikrobiell beeinflusste Korrosion (MIC) oder auch Biokorrosion stellt eine besonders schwierig erkennbare und kaum vorhersagbare Form der Korrosion dar (Beech, 1999) (Beech, 2005) (Flemming, 2002) (Little, 2007) (Sand, 2003) (Titz, 1999) (Videla, 2005). Bei dieser speziellen Form der Korrosion werden starke Schäden durch lebende

Mikroorganismen, die meist innerhalb sogenannter Biofilme leben, verursacht. Diese Thematik hat in den letzten beiden Jahrzehnten stark an Interesse gewonnen. Nachdem die Korrosion durch Mikroorganismen zunächst als "nebensächlich" betrachtet worden war, gelangte man anhand fundierter Untersuchungen zu der Überzeugung, dass MIC nicht nur eine Begleiterscheinung von Korrosionsschäden ist. Mittlerweile ist akzeptiert, dass Mikroorganismen sogar maßgeblich für das Einsetzen von Korrosion sein können und die chemischen Reaktionen, die Korrosionsschäden ausmachen, erheblich beschleunigen können (Flemming, 1995).

Für das Auftreten von Biokorrosion sind in der Regel komplexe Biofilme verantwortlich, in denen Mikroorganismen in Kontakt mit dem Werkstoff stehen (Flemming, et al., 2001). Einzelne Zellen sind hinsichtlich der Werkstoffzerstörung kaum von Bedeutung. Allgemein können Biofilme durch Stabilisierung von anodischen und kathodischen Bereichen auf der Werkstoffoberfläche an sich bereits zum Entstehen von Lokalelementen führen. Außerdem können Biofilme als Konzentrationszellen wirken und dadurch z. B. auch Lochkorrosion an hochlegierten Stählen verursachen (Congmin Xu, 2008).

Bei MIC sind insbesondere drei verschiedene Gruppen von Mikroorganismen von Bedeutung: Sulfat-reduzierende, Schwefel-oxidierende Bakterien (SRB bzw. SOB) und Mangan-oxidierende Bakterien bzw Mikroorganismen (MOMO). Mikroorganismen aus der Gruppe der SRB sind eine der Hauptursachen für MIC unter anaeroben Bedingungen. Es wird angenommen, dass sie für bis zu 50 % aller Schadensfälle durch MIC verantwortlich sind (Hamilton, 1985). SRB wachsen und leben generell strikt anaerob, obwohl einige Arten Sauerstoff tolerieren können. Typische Vertreter der SRB sind z.B. *Desulfovibrio vulgaris* sowie die marinen Arten *D. alaskensis* und *D. indonesiensis*. SRB oxidieren verschiedene organische Substanzen. Dabei wird Schwefel in höheren Oxidationsstufen, z.B. in Sulfat, Thiosulfat oder auch Elementarschwefel als Elektronenakzeptor genutzt und zu Schwefelwasserstoff ( $H_2S$ ) reduziert. In Gegenwart von Eisenwerkstoffen reagiert Schwefelwasserstoff mit Eisen(II)-Ionen zu schwerlöslichem Eisensulfid. Insbesondere bei der Korrosion hochlegierter Stähle spielen die Mangan-oxidierenden Bakterien, wie *Leptothrix discophora*, eine wichtige Rolle. Es wurde nachgewiesen, dass sie das Ruhepotential rostfreier Stähle und anderer passiver Metalle und Legierungen erhöhen können (Ennoblement; (Dickinson, et al., 1997); (Gümpel, et al., 2005)). Sie oxidieren Mangan(II)-Ionen zu Mangan(IV)-oxid, welches an der Oberfläche ausfällt. Diese Ablagerungen beeinflussen das Korrosionsverhalten des Materials erheblich ( (Kreikenbohm, et al., 2003). Linhardt beschreibt u.a. einen Korrosionsfall in einem Wasserkraftwerk, bei dem große Mengen an Mangandioxid gefunden wurden (Lindhardt, 1997) und (Lindhardt, 2004). Durch diese Verbindung wurde dort Lochkorrosion durch Chlorid-Ionen an rostfreiem Stahl verursacht. Auffällig dabei war, dass die Chlorid-Konzentration deutlich unter dem Bereich lag, der allgemein für den dort vorhandenen Stahltyp als kritisch für die Initiierung von Lochkorrosion angesehen wird.

Der korrosive Angriff von SRB auf metallische Werkstoffe wird noch deutlich verstärkt, wenn sie in Biofilmen synergistisch mit aerob lebenden Schwefel-oxidierenden Bakterien (SOB) wachsen. Diese Interaktion ist typisch für Bedingungen mit wechselndem Sauerstoffangebot, wie z.B. an Hafenspundwänden mit wechselnden Wasserständen. Typische Vertreter der SOB sind z.B. *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Eisen- und Schwefeloxidierer), *At. thiooxidans*, *Thiobacillus denitrificans* und *Thiomonas intermedia*. Die Interaktion dieser beiden Bakteriengruppen führt zu einem biologisch getriebenen Schwefelkreislauf, der Sulfuretum genannt wird. Bei Niedrigwasser wird das durch die SRB gebildete Eisensulfid durch die SOB über Thiosulfat, Schwefel und Polythionate zu Schwefelsäure (Sulfat) umgesetzt. Die

Umgebung wird dabei stark angesäuert und der Metallwerkstoff durch die Schwefelsäure direkt angegriffen (Säurekorrosion). Bei Hochwasser wiederum wird das durch die SOB zur Verfügung gestellte Sulfat durch SRB wieder zu Schwefelwasserstoff umgesetzt. Dieser Schwefelkreislauf wird einerseits direkt durch die Korrosion des Eisenwerkstoffes und andererseits durch in der Umgebung verfügbare organische Substanzen innerhalb des Biofilms getrieben und führt in sehr kurzer Zeit zu starken Korrosionsschäden (Sand, 2003).

Bislang konnte eine Reihe unterschiedlicher Mechanismen beschrieben werden: Zum einen werden bei MIC die (elektro-) chemischen Korrosionsprozesse durch Biofilme unterschiedlicher Bakterien oder deren Stoffwechselprodukte wie oben beschrieben katalytisch beschleunigt. Korrosive Metabolite, wie z. B. organische Säuren, beeinflussen vor allem die anodische Teilreaktion der Korrosion. Sulfide können auf Grund ihres Oxidationspotentials die kathodische Teilreaktion begünstigen und die Kathodenfläche vergrößern. Diese Art von MIC, d.h. die Stimulation der kathodischen und /oder anodischen Reaktion durch bakterielle Stoffwechselprodukte, wird als chemische MIC (CMIC) bezeichnet und steht für einen indirekten Einfluss von SRB auf die Korrosionsprozesse (Enning, et al., 2014).

Zum anderen werden eine direkte Beeinflussung und die damit verbundene Beschleunigung der Korrosionsprozesse im Zusammenhang mit einer biologischen Verwertung kathodischer Elektronen diskutiert und in der Literatur als kathodische Depolarisation bezeichnet (von Wolzogen Kühr, 1961) (von Wolzogen Kühr, et al., 1934). Über Jahrzehnte wurde angenommen, dass unter anaeroben Bedingungen die SRB über eine enzymatische Verwertung von abiotisch auf der Metalloberfläche gebildetem Wasserstoff in der Lage sind, die Kathode zu depolarisieren und auf diese Weise die Metallauflösung zu beschleunigen (Cord-Ruwisch, et al., 1986) (Daniels, et al., 1987). Allerdings zeigten jüngste Studien mit spezifischen, korrosiven SRB Stämmen eine direkte Extraktion von Elektronen aus elementarem Eisen als ursächlich für die beschleunigte Eisenkorrosion, wie sie häufig bei Schadensfällen in Form von Lochkorrosion beobachtet wird (Enning, et al., 2014) (Venzlaff, et al., 2013). Dieser Prozess der direkten Verwertung von kathodischen Elektronen als Energiequelle für ihren Stoffwechsel wird als elektrische MIC (EMIC) bezeichnet (Enning, et al., 2014).

## **4.2 Konventionelle Abhilfemaßnahmen und Problemstellung**

Abhilfemaßnahmen speziell gegen Biokorrosion konzentrieren sich bislang auf das Abtöten der Mikroorganismen durch starke Biozid-Zugabe. Mit der neuen EU-Biozidrichtlinie (EU-Biozidrichtlinie, vom 22. Mai 2012) werden viele Wirkstoffe bald nicht mehr verfügbar sein, da für sie aufgrund der für KMU zu hohen Kosten für eine Wirkstoff-Zulassung und kleiner werdender Absatzmärkte keine Zulassung beantragt wurde. Aufgrund des resultierenden geringeren Angebots an Wirkstoffen muss davon ausgegangen werden, dass in Zukunft Lücken im Materialschutz auftreten werden, da nicht mehr für jeden Anwendungsfall der notwendige Wirkstoff erhältlich sein wird. Aber auch die Verwendung weiterhin zugelassener Biozide und Wirkstoffe ist kritisch zu betrachten. Mikroorganismen in Biofilmen können aufgrund der Schutzwirkung der Biofilm-Matrix hohen Konzentrationen an Bioziden widerstehen. Es wurde sogar beobachtet, dass einige Mikroorganismen in Biofilmen verschiedene Biozide als Nährstoffquelle verwenden konnten und Biozidapplikation in der Konsequenz zu erhöhtem Aufkommen von Biomasse geführt hat (Zuo, 2007). Die Applikation der Biozide erfordert technisches und wissenschaftliches Hintergrundwissen sowie Erfahrung, damit ein Biofilm gar nicht erst entstehen kann. Kritisch zu bewerten sind auch einige hoch-effiziente Biozide wie Natriumhypochlorit, die selbst stark korrosiv wirken

können. Auch unter ökologischen Gesichtspunkten sind Biozide kritisch zu betrachten. Aktuelle Ansätze versuchen die Bildung eines Biofilms unter anderem dadurch zu umgehen, dass Biozide in Beschichtungen eingebettet werden (Roehl, 2010). Allerdings werden die Biozide auch so mit der Zeit verbraucht und in die Umgebung eingebracht.

Vor diesem Hintergrund besteht ein großer technischer und wirtschaftlicher Bedarf an neuen Korrosionsschutzmethoden. Hierdurch würde ein Markt bedient, welcher stark von kleinen und mittelständischen Unternehmen geprägt ist, die sich eigene Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet nicht leisten können. Insbesondere sind innovative Lösungen gefordert, die idealerweise umwelttechnisch unbedenklich und preiswert sind. Diese Bedingungen werden von mikrobiologisch basierten Antifouling-Strategien vollständig erfüllt, was im Rahmen dieses Vorhabens umgesetzt werden sollte.

### **4.3 Korrosionsinhibitoren auf biogener Basis**

Korrosionsinhibitoren auf biogener Basis erfreuen sich gegenwärtig eines hohen Interesses, was auch Ausdruck in einigen Veröffentlichungen findet, die weiter unten vorgestellt werden. Neben reinen Substanzen wurden auch komplexe biologische Systeme wie nicht weiter aufgearbeitete Pflanzenextrakte untersucht, bislang allerdings auf rein empirischer Basis.

Beispielsweise zeigen Oguzie und Koautoren, dass die essentielle und schwefelhaltige Aminosäure Methionin in Salzsäurelösung eine korrosionsinhibierende Wirkung auf unlegiertem Stahl hat, welche durch Zugabe von Kaliumiodid erhöht werden kann (Oguzie, 2007). Methionin liegt unter diesen Bedingungen in protonierter Form als Kation vor, dessen Adsorption durch das Halogenid stabilisiert wird. Ein N-Acyl-Derivat des Methionins wurde 2008 als Hauptbestandteil einer Korrosionsschutz-Formulierung patentiert (Leinweber, et al., 2008).

Der Farbstoff Methylenblau kann sowohl die Korrosion von Aluminium (Oguzie, et al., 2004) als auch von unlegiertem Stahl (Oguzie, 2005) (Oguzie, et al., 2005) in saurer Lösung vermindern. Der Farbstoff liegt als schwach gebundenes Physisorbat vor, was erklärt, dass die Wirkung mit Temperaturerhöhung abnimmt. Neben Methylenblau kann Stahl auch durch den Farbstoff Kongo Rot und einer weiteren Anzahl organischer Farbstoffe geschützt werden (Oguzie, et al., 2005) (Oguzie, 2004). Auch der Naturfarbstoff Indigo hat eine korrosionsinhibierende Wirkung auf unlegierten Stahl in saurer Lösung, welche durch Halogenide verstärkt werden kann (Oguzie, 2004).

Auch Saccharide und deren Derivate werden von Müller und Kurfeß als Korrosionsinhibitoren für Aluminium diskutiert (Müller, et al., 2004). Dabei werden von den Autoren zwei Gruppen unterschieden: Reduzierende Mono- und Disaccharide, welche die Enol-Struktur stabilisieren, und Hydroxycarbonsäuren, welche chelatisierend wirken. Als besonders stark inhibierend erwies sich Ascorbinsäure, welche eine Enol-Struktur aufweist. Saccharide bzw. Polysaccharide können großtechnisch auch durch Mikroorganismen produziert werden. In dieser Hinsicht sind Biofilme, deren Matrix zum großen Teil aus Polysacchariden besteht, auch für den Korrosionsschutz von Interesse.

Poly-Maleinsäure und Poly-Aspartat werden in ihrer Wirkung als Korrosionsinhibitoren von Wilson und Koautoren beschrieben (Wilson et al., 2010). Die Autoren gleichen die Eigenschaften ihrer Substanzen mit den '12 Forderungen' ab, die von der bekanntermaßen strengen US-Amerikanischen Umweltbehörde EPA für 'green chemistry' aufgestellt wurden.



Als weitere Einsatzmöglichkeit von sogenannten „green polymers“ wird die Verhinderung von Kalkablagerungen (Sulfat-, Carbonat-„scale“) in der Öl- und Gasindustrie angesehen, da gegenwärtig verwendete Phosphonate in vielen Fällen in Bälde verboten sein werden (Jordan et al., 2010).

Neben Reinsubstanzen wurden auch Pflanzenextrakte untersucht. Beispielsweise zeigen Extrakte der immergrünen Pflanze *Sansevieria trifasciata* schützende Eigenschaften für Aluminium sowohl in saurer als auch in alkalischer Lösung (Oguzie, et al., 2007). Auch hier konnte eine Verstärkung des Effekts durch Zugabe von Halogeniden erreicht werden. Auch für Extrakte der folgenden Pflanzen konnte ein korrosionsinhibierender Einfluss beobachtet werden: *Azadirachta indica*, *Garcinia kola*, *Hibiscus sabdariffa*, *Mimosa pudica* und *Moringa oleifera*, (Corrosion 2010, 2010). Diese Pflanzen sind zum Teil als Heilpflanzen mit antimikrobiellen Eigenschaften oder als vitamin- und proteinreiche Pflanzen bekannt.

Als Beispiel einer industriellen Verwertung wurden von Kharshan und Cracauer (Kharshan, et al., 2010) die Inhaltsstoffe von Sojabohnen und Raps als Korrosionsinhibitoren auf biogener Basis, sog. „biobased materials“, vorgestellt. Wie die Autoren zeigen konnten, wird im Fall von unlegiertem Stahl tatsächlich eine Verminderung der Korrosionsrate erzielt. Interessant ist, dass die Autoren Vertreter eines Unternehmens sind, was zeigt, dass ‚biobased materials‘ durchaus industrierelevant sind und als vermarktungsfähig angesehen werden. Die Autoren weisen auch auf Studien hin, die sich mit Rapsinhaltsstoffen beschäftigen.

Diesen Rohstoffen ist gemeinsam, dass sie in großen Mengen und z. T. als Abfallprodukte in Form von Pressrückständen vorliegen. Eine Nutzung der Abfälle wäre ökologisch und ökonomisch sinnvoll. Vor diesem Hintergrund sollte auch an andere „Abfälle“ gedacht werden, z.B. Pressrückstände von Oliven oder Nüssen.

Gunasekaran et al. berichten von der schützenden Wirkung der Inhaltsstoffe von *Zenthoxylum alatum* auf unlegierten Stahl in Phosphorsäure (Gunasekaran, et al., 2004).

Auch antimikrobielle Eigenschaften werden bei einigen Pflanzen beobachtet und sollten für ein Konzept gegen MIC in Betracht gezogen werden (Iwu, et al., 1999). Beispielsweise wird auch der von Oguzie bereits erwähnte Baum *Garcinia kola* aufgeführt, dessen Inhaltsstoffe – u. a. Biflavonoide, Xanthone und Benzophenone – auch eine antimikrobielle und antivirale Wirkung entfalten.

Hinsichtlich des Schutzes gegen Lochfraß konnte gezeigt werden, dass einige organische Substanzen in der Lage sind, den Beginn des Lochfraßes zu höheren Potentialwerten zu verschieben (Zucchi, et al., 1987) (DeBerry, et al., 1988). Je nach chemischer Zusammensetzung der Substanzen konnten geeignete pH-Bereiche identifiziert werden. Eine Repassivierung bzw. ein Ausheilen bereits gebildeter Löcher konnte nicht erreicht werden. Von den Substanzen erwies sich insbesondere N-Acylsarkosin als wirksam, wobei die Anwesenheit einer Säuregruppe im Molekül sowohl für eine stabile Bindung sorgen als auch den niedrigen pH-Wert in bereits vorhandenen Löchern anheben soll. Das Grundmolekül Sarkosin ( $\text{CH}_3\text{NHCH}_2\text{COOH}$ ) stellt eine nicht-proteinogene Aminosäure und einen Baustein einiger Antibiotika dar. Die Ansicht, dass die Wirkungsweise im Wesentlichen auf der Blockade aktiver Stellen beruht, wird auch von Szklarska-Smialowska in einem Review zum Thema „Inhibition von Lochfraß“ geteilt (Szklarska-Smialowska, 1993).

Auch die Untersuchungen von Tadros (Tadros, 2005) und Loto (Loto, 2005) basieren auf nicht weiter analysierten Gemischen biogener Natur: Grünalgen, Röhrenwürmer und Knoblauch bzw. Cashew-Nuss-Extrakte. Nichtsdestotrotz führen diese Ansätze zu verringerter mariner Korrosion bzw. verringerter Korrosion von unlegiertem Stahl.

Ein Korrosionsschutz für unlegierten Stahl in schwefelsaurer Lösung wurde auch durch Extrakte aus Kamille oder Kidney-Bohnen erreicht (Abdel-Gaber, et al., 2006). Die Autoren leiten aus den elektrochemischen Daten ab, dass die Inhibitoren ein gemischtes Verhalten zeigen. Extrakte aus Pflaumensaft wurden erfolgreich hinsichtlich einer Korrosionsschutzwirkung an unlegiertem Stahl in Salzsäure untersucht (Ashassi-Sorkhabi et al., 2006).

Eine der wenigen systematischen Studien unter Verwendung biogener Korrosionsinhibitoren, vorgelegt von Sugama et al., beschäftigt sich mit dem Schutz von Aluminium durch acetylierte Chitosane und Stärke-modifizierte Dextrine (Sugama, 2000). Auch die biogenen Makromolekül-Gruppen der Porphyrine und Phthalocyanine weisen korrosionsinhibierende Eigenschaften auf, die durch chemische Modifizierungen noch verbessert werden konnten (Argawala, 1993). Die  $\pi$ -Ringsysteme dienen dabei als gute Anknüpfungsstellen für verschiedene Metallionen. Neben diesen Makromolekülen sind auch die biogen verfügbaren Cyclodextrine von Interesse, die weiter unten diskutiert werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Einsatz von biogenen Substanzen einen vielversprechenden Lösungsansatz für das Projekt darstellen kann. Die Tatsache aber, dass viele Studien eher empirischer Natur sind, zeigt, dass eine systematisch angelegte Herangehensweise nötig ist, die gezielt die Wechselwirkung bestimmter chemischer Strukturen mit den Werkstoffoberflächen als Fokus beinhaltet.

#### **4.4 Korrosionsschutz durch Mikrobiell beeinflusste Korrosionsinhibierung**

Der folgende Abschnitt verdeutlicht das Potential von Mikroorganismen und Biofilmen für den Einsatz sowohl gegen Korrosion im Allgemeinen als auch Biokorrosion (MIC – Mikrobiell beeinflusste Korrosion) im Speziellen. Die Korrosionsvermeidung durch Mikroorganismen wird dabei allgemein als mikrobiell beeinflusste Korrosionsinhibition (Microbially Influenced Corrosion Inhibition, MICI) bezeichnet (Naguib, et al., 2002). Die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten verdeutlicht ein veröffentlichter Bericht von Hutchens und Crovisier (Hutchens, et al., 2010). Biofilme von *Pseudomonas* sp. konnten die Korrosion von Behältern zur Lagerung eingeschmolzener und verglaste Nuklearabfälle deutlich reduzieren, die genaue Ursache für diesen Schutzeffekt ist allerdings nicht bekannt.

##### **4.4.1 MICI durch lebende Biofilme**

Verschiedene Arbeiten berichten über den positiven (korrosionshemmenden) Effekt bakterieller Biofilme bei metallischen Werkstoffen (Little, et al., 2002) (Maruthamathu, et al., 2003) (Morikawa, 2006) (Ponmariappan, et al., 2004) (Ponmariappan, et al., 2004) (Potekhina, et al., 1999) (Tanji, et al., 2002) (Zuo, 2007). Generell basiert die Schutzwirkung auf verschiedenen Wirkmechanismen, die im Folgenden kurz erläutert werden.

Im Sinne der Bildung (passivierender) Schutzschichten wird zwischen lebenden Biofilmen auf der einen Seite und zellfreiem biogenen Material (extrazellulären polymeren Substanzen, EPS) auf der anderen Seite unterschieden. Lebende Biofilme werden als Diffusionsbarriere für Korrosionsprodukte einerseits und aggressive Stoffe aus der umgebenden flüssigen Phase andererseits diskutiert. Über die Diffusionslimitierung hinaus ist die Blockade der

Elektronenübertragung durch EPS-Schichten ein weiterer Faktor. Elektronen können Distanzen bis zu 2 nm überwinden (Medvedev, et al., 2001). Wird dieser Maximalabstand überschritten (z.B. durch räumliche Trennung von Mikroorganismen und Oberfläche durch eine EPS-Schicht), stoppt der Korrosionsprozess (Bergel, 2009). Andere diskutierte Schutzmechanismen gegen MIC sind Sauerstoffzehrung durch aerobe Mikroorganismen, biogene (Re-)Phosphatierung (u.a. bei (Gunasekaran, et al., 2004)) und die Ausscheidung und Akkumulation biogener Korrosionsinhibitoren.

Im Hinblick auf die Biokorrosion sind insbesondere auch die Hemmung der Anheftung (und damit Biofilmbildung) schädlicher Mikroorganismen und/oder des Wachstums dieser Mikroorganismen von Interesse.

Durch Sauerstoffzehrung wird z.B. die schützende Wirkung verschiedener Mikroorganismen gegenüber unlegiertem Stahl erklärt, darunter *Pseudomonas* spp. (Jayaraman, et al., 1997) (Ponmariappan, et al., 2004), *Shewanella* spp. (Dubiel, et al., 2002), *Serratia marcescens* (Pedersen, et al., 1991) (Ponmariappan, et al., 2004) und verschiedene Vibrionen (Pedersen, et al., 1991). Im Zusammenhang mit der Sauerstoffzehrung durch *Pseudomonas* spp. berichten Jayaraman et al. (Jayaraman, et al., 1997) und Ismail et al. (Ismail, et al., 2002) von einer 15fach bzw. 20fach geringeren Korrosionsrate von unlegiertem Stahl. Allerdings tritt eine Sauerstoffzehrung nur bei lebenden Biofilmen auf. Die Autoren weisen darauf hin, dass eine Sauerstofflimitierung allein nicht für den starken korrosionshemmenden Effekt der Biofilme verantwortlich sein kann. Einige Autoren führen die schützende Wirkung von *Pseudomonas* spp. daher auch auf eine biogene Phosphatierung der Werkstoffoberfläche zurück. Zunächst entstehen durch die korrosive Wirkung der Mikroorganismen Eisenionen, welche bei ausreichender Phosphat- und Sauerstoffkonzentration im umgebenden Medium (darunter möglicherweise auch EPS mit Phosphat-haltigen Verbindungen) stabile Eisen-Phosphat-Schichten (Vivianit,  $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$ ) bilden (Volkland, et al., 2000).

Über eine praktische und auch kommerziell umgesetzte Anwendung von Biofilmen zur Verhinderung des Bewuchses von Schiffsrümpfen durch Muscheln und ähnlichem wurde erst kürzlich von Haeffner und Mitarbeitern berichtet (Haeffner, 2009). Diese mischen einem Bioanstrich Proteine bei, welche von Bakterien verdaut werden und zu einem Muscheln abweisenden Biofilm führen. Obwohl die Autoren den Sauerstoffabbau als Ursache vermuten, scheint dies zweifelhaft, da die Muscheln den nötigen Sauerstoff nicht aus dem Biofilm sondern aus dem Wasser filtern würden. Eine weitergehende Untersuchung erscheint lohnenswert.

Weiterhin sind Mikroorganismen, die natürliche antimikrobielle Substanzen wie Gramicidin-S produzieren, im Hinblick auf die Wachstumshemmung schädlicher Mikroorganismen von Interesse. Biofilme von *Bacillus brevis* konnten z.B. die Biokorrosion von unlegiertem Stahl in Gegenwart von Mischkulturen aus Sulfat-reduzierenden und Eisen-oxidierenden Mikroorganismen deutlich reduzieren (Morikawa, 2006). Um einen ausreichenden Schutzeffekt zu erzielen, sind aber auch hier lebende Biofilme notwendig, deren Mitglieder (Bakterien) zudem oft gentechnisch verändert werden müssen. Im Rahmen des hier vorgestellten Projektes sind diese nicht von Interesse, da die Anwenderakzeptanz gering sein dürfte. Zudem ist die Verwendung gentechnisch veränderter Organismen streng reglementiert, eine Verwendung in offenen Systemen damit nahezu unmöglich.

#### **4.4.2 MICI durch zellfreie extrazelluläre polymere Substanzen**

Nicht nur lebende Biofilme können eine schützende Wirkung aufweisen. Viele der verschiedenen potentiell schützenden Effekte werden von bestimmten Stoffen bewirkt, die 2001 von Ron in einer zusammenfassenden Veröffentlichung als „biosurfactants“ – oberflächenaktive Substanzen biogener Herkunft – bezeichnet werden (Ron, et al., 2001). In diesem Zusammenhang sind besonders die sog. extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) von Interesse. Sie werden in Biofilmen von Mikroorganismen produziert und dienen dazu, die Anheftung an eine Oberfläche zu vermitteln und die Struktur des Biofilms herzustellen und aufrecht zu erhalten. Darüber hinaus schützen sie den Biofilm vor Austrocknung, gegen Biozide und Fressfeinde wie Protozoen. EPS bestehen hauptsächlich aus Polysacchariden, Uronsäuren, Lipiden und Nucleinsäuren (Beech, et al., 1995) (Branda, et al., 2005) (Gehrke, et al., 2001) (Flemming, 2002) (Grooters, et al., 2007). Des Weiteren enthält die Polymer-Matrix verschiedenste funktionelle Gruppen, wie Carboxyl-, Phosphat- und Sulfatreste, die in der Lage sind, multivalente Kationen zu binden. Damit bilden sie zum einen stabile elektrostatische Netzwerke – sowohl innerhalb des Biofilms als auch zwischen Biofilm und Oberfläche – und zum anderen können damit verschiedene Metallionen – wie z.B. Eisen(III)-Ionen – innerhalb des Biofilms oder an der Grenzfläche zur Oberfläche akkumuliert werden (Kumar, et al., 2007) (Laspidou, et al., 2002) (Beech, et al., 2004).

Ähnlich wie bei lebenden Biofilmen kann die Schutzwirkung zellfreier EPS hauptsächlich auf zwei Mechanismen zurückgeführt werden: die Bildung schützender Schichten und die Verhinderung bakterieller Adhäsion und damit Bildung von Biofilmen aus schädlichen Mikroorganismen (z.B. SRB).

Untersuchungen haben gezeigt, dass Bestandteile der EPS dichte, wasserundurchlässige Schichten bilden können, welche die Werkstoffoberfläche bedecken/maskieren und somit von der flüssigen Phase separieren (Ponmariappan, et al., 2004). Sie bilden damit analog zu lebenden Biofilmen eine Barriere für Korrosionsprodukte und korrosive Substanzen und verhindern das Tunneln von Elektronen (Venzlaff, 2010). Auch das Ausmaß regulärer Korrosion, z.B. Chlorid-induzierter Lochkorrosion an legierten Stählen, kann durch geeignete EPS vermindert werden. Beispielsweise berichten Maruthamathu et al., dass hochlegierte Stähle durch bakterielle EPS geschützt werden können (Maruthamathu, et al., 1996). Als Ursache wird vermutet, dass die positiven Überschussladungen auf der Oberfläche von hochlegiertem Stahl durch anionische funktionelle Gruppen der EPS neutralisiert und die Oxidschichten stabilisiert werden. Dadurch wird Lochkorrosion als Folge des korrosiven Angriffs von Chloridionen verhindert.

Der anti-adhäsive Effekt von EPS wurde in neueren Studien demonstriert. So konnten die zellfreien EPS von *Lactobacillus fermentum* und *L. acidophilus* die Anhaftung von *Escherichia faecalis* an Glas um bis zu 80% reduzieren (Velraeds, et al., 1996) und die Adhäsion von *Staphylococcus* partiell unterdrücken (Walencka, et al., 2008). Meylheuc bzw. Leriche et al. verwendeten zellfreie EPS von *Ps. fluorescens* und *L. helveticus* bzw. *Staphylococcus*, um die Anheftung von *Listeria sp.* an unlegiertem Stahl zu verringern (Meylheuc, et al., 2006/91) (Leriche, et al., 2000). Die EPS formten dabei eine dichte Schicht auf der Werkstoffoberfläche und reduzierten die Anhaftung der *Listeria sp.* um über 97%. In einem anderen Versuch wurden EPS, hergestellt durch einen biotechnologisch veränderten Stamm von *Lactobacillus reuteri*, als Ersatz für Zink-Phosphat in organischem Korrosionsschutzlack verwendet. Nach 2 Jahren Exposition in einem Trockendock in den Niederlanden zeigte der EPS-haltige Lack mindestens gleichwertige Eigenschaften im Vergleich zu konventionellem, Zink-Phosphat-haltigem Lack (Exopolysaccharide ESP180 as

anti-corrosive additives for coatings, 2009) (van Leeuwen, et al., 2009). Isoliert und aufgereinigt, zeigen die EPS Schutzwirkungen, wie beispielsweise Magalhaes de Paiva vor kurzem berichtete (dePaiva, 2004) hat: Durch Applikation gereinigter EPS der Art *Desulfovibrio alaskensis* konnte die Adhäsion von Zellen der nachweislich schädlichen Art *Desulfovibrio indonesiensis* und damit die Bildung eines Biofilms verhindert werden.

Auch die EPS von Pseudomonaden zeigen einen solchen Effekt, wie verschiedene Autoren berichten (Beech, et al., 2000) (Gomez-Suarez, et al., 2002) (Gubner, et al., 2000). Hier konnte auch gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der EPS einen Einfluss auf die Schutzwirkung hat. Je nach Herkunft der EPS wurde die Adhäsion von lebenden Zellen unterschiedlich stark unterdrückt.

Im Zusammenhang mit der Biokorrosion durch SRB ist interessant, dass in eigenen Arbeiten der Antragsteller (IGF-Vorhaben 263 ZN) eine Beschichtung mit zellfreien EPS-Extrakten von *D. vulgaris* die spätere Biofilmbildung durch denselben Mikroorganismus deutlich beeinflusste (Kuklinski, 2007). Eine Erklärung hierfür bietet die Hypothese der „microbial footprints“ (Neu, 1992, 1996). Die Autoren vertreten die Annahme, dass Mikroorganismen in der Lage sind, Oberflächen aktiv zu markieren. Zur Markierung werden hierbei hauptsächlich zellfreie EPS und Exoenzyme verwendet. Bei einer Ablösung des Biofilms oder Nährstoffknappheit wird die jeweilige Oberfläche als für eine weitere Besiedlung ungeeignet markiert. Die o.g. Studien zeigten darüber hinaus, dass Herkunft und Zusammensetzung der EPS-Extrakte einen deutlichen Einfluss auf die Schutzwirkung ausüben. So führten im Falle der SRB die zellfreien EPS von *D. alaskensis* und *D. indonesiensis* sogar zu einer verstärkten Anheftung von *D. alaskensis*.

Dass die chemische Zusammensetzung der EPS einen Einfluss auf die Schutzwirkung hat, konnte auch von Ferrari und Breur gezeigt werden (Ferrari, et al., 2005): EPS, die aus Homopolysacchariden aufgebaut sind, zeigen eine bessere Schutzwirkung gegen die Korrosion von unlegiertem Stahl als solche, die aus Heteropolysacchariden aufgebaut sind.

Es ist anzunehmen, dass viele der Schutzwirkungen, die im Zusammenhang mit lebenden Biofilmen berichtet werden, im Grunde genommen durch die EPS dieser Mikroorganismen verursacht werden. Ähnliche Vermutungen in dieser Richtung werden beispielsweise auch von Werner et al. (1998) geäußert, die einen ähnlichen Mechanismus wie Maruthamuthu et al. annehmen (Maruthamuthu, et al., 1996).

#### **4.5 Korrosionsinhibition durch einzelne Stoffgruppen (EPS- Analoga)**

Die im letzten Kapitel vorgestellten Berichte belegen die potentielle Eignung von Biofilmen bzw. EPS, zeigen aber auch gleichzeitig die Problematik auf: Die als EPS zusammengefassten Stoffgruppen sind häufig nicht im Detail analysiert worden, was wohl auch auf Grund ihrer chemischen Komplexität und Variabilität nicht erfolgte.

Im Rahmen von eigenen Untersuchungen (IGF-Vorhaben 263 ZN) hat sich gezeigt, dass die technische Umsetzung zur Nutzung sowohl von lebenden Biofilmen als auch von deren sekretierter EPS schwierig ist (Grooters, et al., 2007) (Heyer, 2007) (Kuklinski, 2007) (Stadler, et al., 2010) (Stadler, et al., 2008). Bei den EPS waren die geringe Verfügbarkeit und auch die unbefriedigende Haftfähigkeit die wesentlichen Gründe. Die Ausbeuten an EPS bei Organismen wie SRB sind gering (zwischen 100 und 200 mg pro L Kulturansatz) und die nötigen Extraktionsverfahren schwierig und zeitaufwendig. Eine Möglichkeit, die Ausbeuten zu erhöhen, wäre eine gentechnische Veränderung der Mikroorganismen. Aufgrund von zu erwartenden Akzeptanzproblemen scheidet diese Variante jedoch aus. Eine Vollsynthese

natürlicher EPS ist nahezu unmöglich, da die komplexe Zusammensetzung eine chemische und strukturelle Analyse schwierig bis unmöglich macht. Darüber hinaus wären die nötigen Synthesen mit hoher Wahrscheinlichkeit aufwändig und teuer.

Aufgrund unseres vertieften Verständnisses der molekularen Prozesse beim Biokorrosionsprozess und der Rolle der EPS, ist anzunehmen, dass nur bestimmte funktionelle Gruppen und Moleküle, wie Glucuronsäurereste, eine entscheidende Bedeutung bei der Bindung von EPS und damit natürlich auch der korrosionsverursachenden Mikroorganismen an Oberflächen und somit deren Stabilität haben. Die Verwendung marktüblicher reiner Stoffgruppen, die in großen Mengen verfügbar und (leicht) chemisch modifizierbar sind, stellt daher eine Alternative zur Verwendung komplexer natürlicher EPS-Extrakte dar. Einen besonders interessanten Ansatz in diesem Zusammenhang stellen Cyclodextrine dar, auf die im folgenden Teil eingegangen wird.

#### **4.5.1 Cyclodextrine**

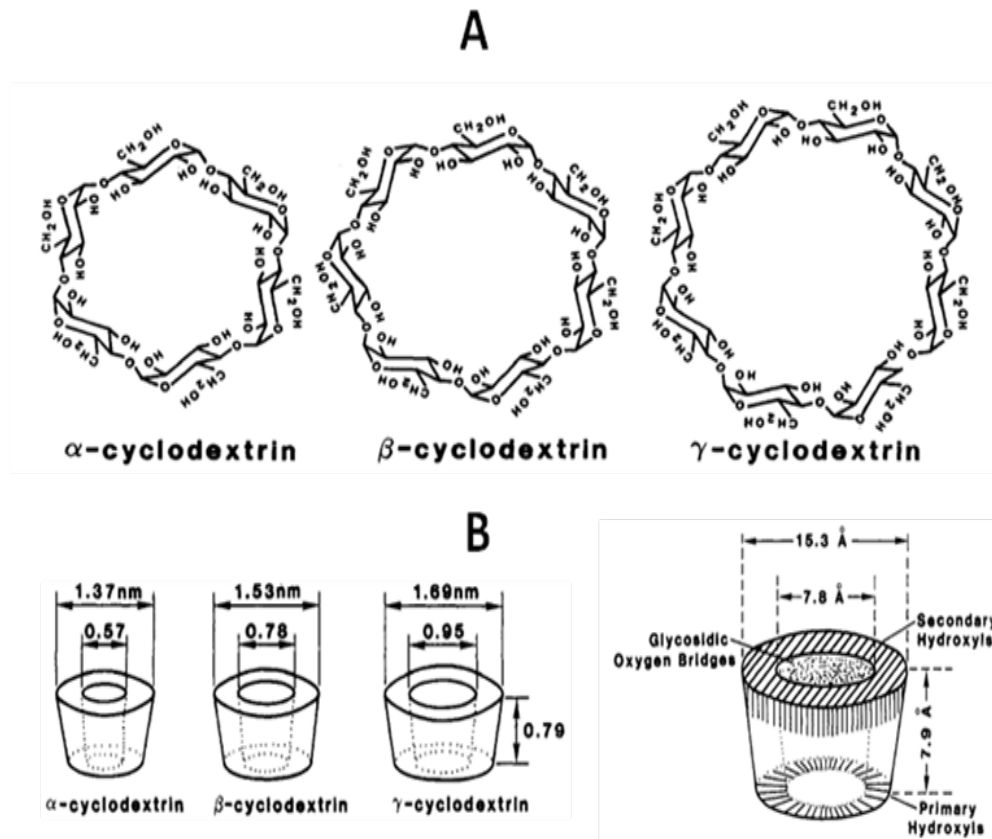
Eine mögliche Alternative, die auch im Rahmen eines IGF-Vorhabens untersucht wurde, sind Cyclodextrine (CD). CD sind zyklische, kegelförmige Oligosaccharide bestehend aus sechs ( $\alpha$ ), sieben ( $\beta$ ), acht ( $\gamma$ ) oder neun ( $\delta$ ) Glucosemonomeren, die über glycosidische  $\alpha$ -1, 4 Bindungen miteinander verbunden sind, wie die Abbildung 1A verdeutlicht.

Die Anzahl an Glucose-Einheiten bestimmt die Dimension und Größe des Hohlraums. Üblicherweise sind CD's Stärke-Derivate. Lineare Stärkekette werden gespalten und jeweils ein reduzierendes und ein nicht-reduzierendes Ende per intramolekularer Transglycosylation verbunden. Diese Reaktion wird durch das Enzym Cyclodextrin-Glycosyltransferase (CGTase) katalysiert. CGTasen bilden sowohl die CD's als auch lineare Malto-Oligosaccharide, wenn sie mit Stärke inkubiert werden (van der Veen, et al., 2000).

CD's haben primäre und sekundäre Hydroxygruppen an den Rändern und CH-Gruppen an den Kohlenstoff C-3 und C-5 sowie glycosidischen Sauerstoff auf der Innenseite des Rings (Abbildung 1B). Durch die Stellung der Hydroxylgruppe an den Rändern ist die Außenseite polar, während das Innere des Rings relativ unpolar ist (Zhang, et al., 2009) (van der Veen, et al., 2000) (Jeromin, et al., 1998). Die Ringstruktur macht CD's besonders interessant, da sie in wässrigem Milieu hydrophobe Gastmoleküle aufnehmen können. Daher werden CD oft als „Transport- Moleküle“ verwendet (Conners, 1997). Die Gastmoleküle binden dabei sowohl über hydrophobe Wechselwirkungen als auch Wasserstoffbrückenbindungen. Verschiedene CD's weisen eine Selektivität für bestimmte Stoffe auf.

Auf Grund ihrer speziellen Fähigkeit, Substrate als Gastmoleküle aufnehmen und somit vor äußeren Einflüssen schützen oder unerwünschte Stoffe aus der Umwelt entfernen (Butterfield, et al., 1996) zu können, werden CD's in vielen verschiedenen Bereichen wie der Lebensmittelindustrie, der Textilbranche, der Pharmaindustrie oder der Kosmetikindustrie verwendet (Chemie Unserer Zeit, 2005). CD's können chemisch modifiziert werden, indem z.B. Hydroxylgruppen zu Ethern oder Estern umgewandelt und dadurch die Spezifität des CD erhöht wird. Für die Lebensmittelindustrie sind sie daher von großem Nutzen, um Gerüche zu unterdrücken oder Bitterstoffe aus Nahrungsmitteln zu entfernen (Gröger, et al., 2001). In der Textilveredlung spielen CD-Derivate mit geeigneten funktionellen Gruppen eine große Rolle, denn sie können permanent auf verschiedenen Fasermaterialien fixiert werden. Wichtig dabei ist, dass sie die Eigenschaft des hydrophoben Innenraums nicht verlieren, durch dessen Einfluss sie spezielle Stoffe aufnehmen können, um somit die funktionellen Eigenschaften zu erhöhen (Dentner, et al., 1996). Auch in der Medizin bzw. Pharmaindustrie

sind Cyclodextrine von großer Bedeutung. Sie erhöhen z.B. die Wasserlöslichkeit, Stabilität und die Bioverfügbarkeit lipophiler Pharmaka (z.B. Prostavasin). Des Weiteren dienen sie zur Verkapselung von Duft- oder Aromastoffen und sind dabei toxikologisch unbedenklich und biologisch abbaubar (Bom, et al., 2002).



**Abbildung 1: Cyclodextrin Darstellung. A: Struktur von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrin, B: Molekulare Dimension von Cyclodextrinen. Quelle: (Li, et al., 1992)**

Cyclodextrine gehören wie Dendrimere (Buschmann, et al., 2004) oder auch die strukturverwandten Cucurbiturile (Lagona, et al., 2005) zu einer Substanzgruppe mit supramolekularen Strukturen. Viele Substanzen dieser Gruppe weisen ähnlich interessante Eigenschaften auf (Komplexierungsvermögen, spezifische Wechselwirkungen, strukturierbare Hohlräume), sind aber - im Gegensatz zu den aus Stärke gewonnenen Cyclodextrinen – nicht biogenen Ursprungs.

Badrudoza und Coautoren (Badrudoza, 2013) berichten, dass mit Carboxymethyl- $\beta$ -Cyclodextrin-Polymer modifizierte  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  Nanopartikel in der Lage sind, als eine Art magnetischer Adsorber selektiv  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  und  $\text{Ni}^{2+}$  aus Wasser zu entfernen. Das CD-Polymer auf den Nanopartikeln verbesserte die Adsorptions-Kapazität zu Metallionen aufgrund der Komplexierungseigenschaften der vielfachen Hydroxyl- und Carboxyl- Gruppen im Polymergerüst.

Besonders die mikrobielle Abbaubarkeit der CD's ist, im Hinblick auf ihre Verwendung für Beschichtungen gegen mikrobiell beeinflusste Korrosion (MIC), von Interesse. Vereinzelt wurde der bakterielle Abbau in Böden (Fenyvesi, et al., 2005) und bei aerober Kompostierung untersucht (Verstichel, et al., 2004). Dabei zeigte sich, dass alle natürlichen (d.h. nicht-modifizierten) CD's einem raschen biologischen Abbau unterliegen. Zufällig

methylierte CD's hingegen wurden unter aeroben Bedingungen innerhalb von 49 Tagen nicht abgebaut, im Boden waren nach 2 Jahren noch 40% des Ausgangsgehalts nachweisbar.

Bezüglich der Anwendung von CD gegen Korrosion werden nur wenige Studien vorgestellt. Dabei konzentrieren sich die Berichte auf die Einführung von CD's zur Verbesserung der Wirkeigenschaften von Polyacrylamid, Polyethylenglycol oder 2-Phosphonobutan - 1,2,4-Tricarbonsäure, welche durch die Öl- und Gasfördernde Industrie als Inhibitoren gegen die Korrosion von Stählen untersucht werden (Zou, et al., 2014) (Zou, et al., 2014) (Zou, et al., 2013).

## **5 Angestrebte Forschungsergebnisse**

Bereits im Vorläuferprojekt wurden Cyclodextrine systematisch funktionell modifiziert und als Schutzschichten gegen sowohl abiotische Korrosion als auch MIC an unlegiertem und hochlegiertem Stahl in wässrigen Medien über Zeiträume von bis zu 3 Monaten erfolgreich eingesetzt.

Schwerpunkt der Arbeiten in diesem Vorhaben sollte nun die Optimierung der o.g. Adsorbatschichten auf Cyclodextrinbasis darstellen. Im ersten Schritt sollte eine praxisnahe Applikationsmethode entwickelt werden (z.B. im 2K-System mit zwei unterschiedlich modifizierten Cyclodextrinen, die an der Oberfläche selbst polymerisieren). Durch gezielte Variation einiger wichtiger Parameter sollte das Adsorptionsverhalten optimiert werden, um daraus eine Zusammensetzung für die technische Formulierung ableiten zu können. Die Stabilität der auf den Werkstoffoberflächen erzeugten Schichten muss dann gegen biotische und abiotische Faktoren optimiert werden. Auf Basis der erzielten Ergebnisse sollten die CD's weiter gezielt chemisch modifiziert werden.

Nach Ablauf der Untersuchungen bezüglich einer Korrosionsinhibierung sollten fundierte Informationen zu den Wirkmechanismen und mögliche Beeinträchtigungen der Werkstoffe vorliegen. Außerdem sollte eine Übertragbarkeit der Resultate auf Nicht-Eisenwerkstoffe (insbesondere CuNi-Legierungen für Wärmetauscher) geprüft werden. Am Ende sollte ein Ergebnistransfer stattfinden welcher dem Anwender ermöglicht, ein praxistaugliches Korrosionsschutzsystem zu entwickeln.

## **6 Material und Methoden**

### **6.1 Mikroorganismen**

Zur Untersuchung der korrosionshemmenden Wirkung verschiedener biogener Substanzen bzw. industrieller EPS-Analoga wurden SRB, SOB und MOMO als Testorganismen für Korrosion-verursachende Mikroorganismen eingesetzt.

Tabelle 1 listet Stämme auf, die in diesem Vorhaben als Modellsysteme für Biokorrosion eingesetzt wurden.



**Tabelle 1: Liste von kultivierten Sulfat-reduzierenden und Mangan-oxidierenden Bakterien, die als Modellsysteme für Biokorrosion eingesetzt wurden.**

Mikroorganismen	Beschrieben durch	
<i>Desulfovibrio alaskensis</i>	DSM 16109	Feio et al., 2004
<i>Desulfovibrio indonesiensis</i>	DSM 15121	Feio et al., 1998
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	DSM 644	Postgate and Campbell, 1966
<i>Leptothrix discophora</i>	CCM 2812	Rogers and Anderson, 1976
<i>Thiomonas intermedia</i>	K12	Wolff, 1981

## 6.2 Zellkultivierung

### 6.2.1 Kultivierung von *Leptothrix discophora*

*Leptothrix discophora* wurden in 100 mL Erlenmeyerkolben gefüllt und mit 45 mL MSVP-2 Medium (siehe Anhang 11.3) für 2-5 Tage bei 28°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. 5 mL einer Vorkultur wurden als Inokulum genutzt.

### 6.2.2 Kultivierung von SRB

Stammkulturen von *D. vulgaris*, *D. alaskensis* und *D. indonesiensis* wurden in Postgate C nach v. Rège in 50 ml Schottflaschen mit GL-Schraubverschluss und Septen aus 4 mm dickem Paragummi bei 37° C im Dunkeln angezogen. Nach 2-5 waren die Kulturen gewachsen, was durch Trübung des ursprünglich klaren Mediums angezeigt wurde. Anschließend konnten die Kulturen maximal sechs bis acht Wochen bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden. Nach Ablauf dieser Ruhephase mussten die Kulturen als Inokulum (1% v/v) auf frisches Nährmedium überimpft werden.

Für die eigentlichen Untersuchungen zur Biokorrosion wurden Arbeitskulturen aus SRB in Postgate C (modifiziert) angezogen (siehe Anhang 11.2). Dazu wurde zunächst eine Stammkultur als Inokulum (1% v/v) auf 50 ml des modifizierten Nährmediums überimpft und nach Wachstum erneut als Inokulum (1% v/v) auf 100 ml frisches Postgate C (modifiziert) überimpft. Diese Bakterien-Lösung konnte als frei von Hefeextrakt betrachtet werden und diente schließlich als Arbeitskultur.

### 6.2.3 Kultivierung von *Thiomonas intermedia*

*Thiomonas intermedia* wurden in 100 mL Erlenmeyerkolben gefüllt und mit 45 mL Ti-Medium (Medium für moderat acidophile Thiobacillen, siehe Anhang 11.4.3) für 2-5 Tage bei 28°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. 5 mL einer Vorkultur wurden als Inokulum genutzt.

## 6.3 Werkstoffauswahl und Probenvorbereitung

### 6.3.1 Verwendete Werkstoffe

Die für die praktischen Untersuchungen vorgesehenen Proben der u.a. Werkstoffe wurden in der Forschungsstelle 1 angefertigt. In den folgenden beiden Tabellen (Tabelle 2 und Tabelle 3) sind die Werkstoffe charakterisiert. Zur Übersichtlichkeit werden diese Werkstoffe im weiteren Verlauf der Experimente mit den Kurzbuchstaben A bis C gekennzeichnet.

**Tabelle 2: Informationen zu den verwendeten Werkstoffen.**

Werkstoff	Kennzeichen	Beschreibung	Quelle / Qualität
Reineisen	A	Handelsname Armco, technisch reines Eisen mit Fe-Gehalt von 99,8 – 99,9 %.	Fa REMAG, Mannheim; Gütestufe 2, Oberfläche schwarz / dunkel
Unlegierter Stahl	B	ST 37, in der Literatur oft als „carbon steel“ bezeichnet. Werkstoffnummer 1.0037	Fa Stapf, Frankfurt am Main; R.ST. 37-2; ST. 37-2 Oberfläche dunkel / schwarz
Hochlegierter Stahl	C	X5CrNi-18-9: Werkstoff Nr. 1.4301 entspricht dem US-amerikanischen Stahl 304 SS.	Fa MVG, Frankfurt am Main; 1.4301 (V2A) 3c Oberfläche metallisch blank

**Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Werkstoffe**

Werkstoff	Bestandteile (außer Fe) [Atom %]					
	C	Si	Mn	Cr	Ni	Mo
Armco	< 0,015	Spuren	< 0,08	-	-	-
St 37	0,2	0,31	1,4	0,5	0,12	0,03
1.4301	0,07	1	2	18	9	-

### 6.3.2 Probenanfertigung

Für die Untersuchungen wurden passende Proben in unterschiedlichen Abmessungen angefertigt. Die Standard Coupons haben eine Abmessung von 20 mm x 30 mm x 1 mm. Kleine Coupons, die für spätere Untersuchungen mittels AFM und ESMA verwendet wurden, haben eine Abmessung von 20 mm x 15 mm x 1 mm. Für elektrochemische Untersuchungen wurden unter anderem auch Zylinder verwendet. Diese haben eine Abmessung von 6 mm Dicke und 10 mm Durchmesser und waren passend für spätere Untersuchungen mittels AFM.

Die Coupons aus unlegiertem und hochlegiertem Stahl wurden aus passenden Blechen geschnitten, während die Coupons aus Reineisen aus Flachstangen bzw. Rundstäben geschnitten wurden. Die Zylinder konnten bis auf Reineisen jeweils aus Rundstangen abgeschnitten werden.

### 6.3.3 Probenvorbereitung

Der Zustand einer Probenoberfläche hat nachweislich einen erheblichen Einfluss auf die bakterielle Besiedlung und muss daher reproduzierbar eingestellt werden. In Anlehnung an das Vorläufer-Projekt wurde folgendes modifiziertes Behandlungsschema angewendet.

- Nass-Schliff mit Sandpapier (SiC) unterschiedlicher Körnung
- Abspülen mit H<sub>2</sub>O VE, Ethanol p.a. und Aceton p.a.
- Aufbewahrung in Aceton p.a. bis zu den Folgeschritten
- Markierung mittels Lichtbogen-Schreiber
- Auswiegen
- Entfetten und Reinigen durch sukzessive Ultraschallbehandlung für 5 min. mit Ethanol p.a. und Aceton p.a.
- Trocknung mit anschließender Lagerung im Exsikkator bis zur weiteren Verwendung
- Sterilisieren der Proben vor dem Einsatz für 7 Std. bei 130°C (+ 2 Std. Aufheizzeit)

#### Schleifen:

Der Schliff der Proben erfolgte auf beiden Seiten und an den Rändern. Als Gerät wurde ein Lapopol 2 (Fa. Struers) eingesetzt, an dem unter Wasserkühlung gearbeitet werden konnte. Proben aus Reineisen und unlegiertem Stahl konnten mit einem Magneten festgehalten werden.

#### Kennzeichnen:

Die Kennzeichnung der Proben erfolgte nach dem Schliff mit einem sog. Lichtbogenschreiber.

#### Sterilisieren der Proben:

Die Sterilisation der Proben wurde im Trockenen durchgeführt. Dazu wurden die Proben an einem PTFE-Band befestigt und senkrecht in Rollrandgläser gestellt. Diese wurden mit Alufolie verschlossen, sodass Wasserdampf entweichen konnte. Das Gefäß wurde für sieben Stunden auf 130°C erhitzt. Nach dem Sterilisieren waren die Proben einsatzbereit.

### **6.3.4 Proben-Aufarbeitung nach Entnahme**

Für die Gewichtsverlusttests (Korrosionstests) im Batch-Verfahren oder in der Mini-Plant wurden Coupons der Sorte St37 verwendet. Zur Ermittlung des Gewichtsunterschiedes wurden die Coupons vor und nach Auslagerung gewogen. Korrosionsprodukte wurden vor der Gewichtbestimmung entfernt. Biofilme und Korrosionsprodukte wurden mittels EDTA-Lösung (37.2 g/L) für 30 min in einem Ultraschallbad entfernt. Nach der Ultraschallreinigung wurden die Coupons mit Kimtech® Präzisionstüchern abgerieben um restliche Korrosionsprodukte zu entfernen. Grafisch wird die Verringerung der Korrosion der mit Cyclodextrinen beschichteten Coupons, gemessen am Gewichtverlust, im Vergleich mit einer nicht beschichteten Kontrolle dargestellt. Zusätzlich wird die Abtragsrate in µm pro Jahr angegeben.

### **6.3.5 Statistische Auswertung der Biofilmbildung**

Für die Biofilmbildung wurden 2 biologische Replikate mit je 2 technischen Duplikaten ausgewertet (2x2 Coupons), hierzu wurden je 5 Bilder mittels EFM aufgenommen und die

Flächenbelegung mit ImageJ 1.46 (W. Rasband, National Institutes of Health, USA) ausgewertet.

## 6.4 Absorbatbildung

Die Adsorbate wurden auf Basis unterschiedlicher Konzepte hergestellt und getestet. Die Zusammensetzung der „Suspensionen“ sowie die Probenbeschichtung werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

### 6.4.1 Cyclodextrine

Tabelle 4: Verwendete Cyclodextrine mit Abkürzung.

Substanz	Abkürzung	Hersteller
Carboxymethyliertes $\alpha$ -Cyclodextrin (DS ~3.5) Na-Salz	CMACD	Cyclolab
Carboxyethyliertes $\alpha$ -Cyclodextrin (DS~3)	CEACD	Cyclolab
Carboxymethyliertes $\beta$ -Cyclodextrin (DS ~3.5) Na-Salz	CMBCD	Cyclolab
Carboxyethyliertes $\beta$ -Cyclodextrin Na-Salz (DS ~3)	CEBCD	Cyclolab
Acetyliertes- $\beta$ -Cyclodextrin polymer	ACBCD	Cyclolab
Zufällig (Random) Ethyliertes- $\beta$ -Cyclodextrin	REBCD	Cyclolab
Zufällig (Random) Octyliertes- $\beta$ -Cyclodextrin	ROBCD	Cyclolab

### 6.4.2 Erzeugung von Cyclodextrinschichten durch Polymerisierung

Für die Cyclodextrin-Polymerisation wird Glutardialdehyd im zehnfachen Überschuss benötigt (1 M Cyclodextrin zu 10 M Glutardialdehyd). Die in sterile 50 ml Falcontubes eingewogene Cyclodextrin-Menge wird zunächst unter anaeroben Bedingungen im salzsauren (pH 2) und sterilen H<sub>2</sub>O VE gelöst. Die Endkonzentration wird auf 10 mg\*ml<sup>-1</sup> eingestellt. Pro 1 ml Suspension werden dann 4,2  $\mu$ l Glutardialdehyd (25%) zugegeben (Polymerisations-Matrix).

Für eine spätere Visualisierung der Cyclodextrin-Schichten mittels Epifluoreszenz Mikroskopie (EFM) oder Konfokalmikroskopie (CLSM) werden noch 0,8% einer 10 mg\*ml<sup>-1</sup> fluoreszenzmarkierten Cyclodextrin-Lösung (CMBCD-FITC) hinzugegeben. Das Cyclodextrin / Glutardialdehyd-Gemisch muss anschließend homogenisiert werden.

Standardverfahren: Um die Coupons zu beschichten wird das Cyclodextrin/Glutardialdehyd-Gemisch unter anaeroben Bedingungen in die einzelnen Rollrandgläser gefüllt und die Coupons vollständig bzw. zur Hälfte bedeckt. Anschließend werden diese Proben unter anaeroben Bedingungen, bei 45°C, acht Stunden lang inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird das Cyclodextrin/Glutardialdehyd-Gemisch abpipettiert und die Proben für mindestens 24 Std. unter anaeroben Bedingungen (Glovebox) im Dunkeln getrocknet.

### 6.4.3 Optimierung der Beschichtung auf St37 und 1.4301

Das in dem Vorgängerprojekt (IGF-Vorhaben 16953 N) entwickelte Standardverfahren erzeugte homogene als auch korrosionsinhibierende Schichten. Jedoch ist die Beschichtung zeit- und personalaufwendig, so dass der Einsatz selbstpolymerisierender

Cyclodextrinschichten erprobt werden sollte. Hierzu wurden die Cyclodextrine REBCD und ROBCD auf unseren Wunsch von der Fa. Cyclolab synthetisiert. Die oben genannten Cyclodextrine haben verschieden lange Seitenketten, Ethyl (C<sub>2</sub>) und Octhyl (C<sub>10</sub>). Durch ihre hydrophoben Seitenketten sind sie nicht wasserlöslich und wurden für das Projekt in Essigsäureethylester gelöst. In gelöstem Zustand liegen die Seitenketten frei vor. Kommt ein beliebiger Werkstoff nach dem Tauschbeschichten mit einer wässrigen Lösung in Kontakt, lagern sich die hydrophoben Seitenketten in die hydrophoben Kavitäten der benachbarten Cyclodextrine ein. Die Cyclodextrine verketteten sich in wässrigem Milieu selbst, so ist eine zeitintensive nachgeschaltete Polymerisation unnötig.

Erweitertes Standardverfahren: Zur Adsorbatbildung wurde das Tauchverfahren ausgewählt. Die Coupons wurden durch gleichmäßiges eintauchen und sofortiges gleichmäßiges herausziehen in einer 10 mg\*mL<sup>-1</sup> Cyclodextrin/Essigsäureethylacetat-Lösung beschichtet. Um eine gleichmäßige Adsorbatbildung zu gewährleisten, wurde fünf Mal eingetaucht mit jeweiligem Ablüften des Lösemittels zwischen den Tauchschritten. Analog dazu wurde mit dem Cyclodextrin ACBCD mit acethylierten Seitenketten verfahren. ACBCD zeigt keine Selbstverkettung ist jedoch ebenso unlöslich in Wasser und hat ebenso eine potentiell hohe Stabilität gegen Ablösung in wässrigem Milieu. ACBCD wurde für das Projekt in Acetonitril gelöst. Da hier in wasserfreiem Lösemittel gearbeitet wurde, konnten alle Schritte mit den jeweiligen Werkstoffen in aerober Atmosphäre (z.B. Laborabzug) durchgeführt werden.

#### **6.4.4 Beschichtung zylinderförmiger Proben**

Die zylinderförmigen Proben müssten unter sterilen Bedingungen bereits vor der Adsorption auf die Probenhalter montiert werden, da die nachträgliche Montage ggf. die Adsorbatschicht beeinflussen könnte. Die Proben wurden nach Schleifen und Entfetten für die Trockensterilisation vorbereitet. Dazu wurden die Proben mit Schrauben versehen und an PTFE-Schlaufen in Erlenmeyerkolben befestigt. Metallstäbe und Vitonringe wurden mit Ethanol desinfiziert und anschließend in der Sterilbank in die Proben geschraubt.

Die hergestellten CD Suspensionen wurden in einer sterilen und mit N<sub>2</sub> gefluteten Anaerobenkammer in 5 ml Spritzen gefüllt, unten mit einer Kappe versehen und anschließend die bereits auf den Probenhalter montierten Proben soweit eingetaucht, dass sie nicht auf dem Boden zu liegen kamen. Die Halter ihrerseits befinden sich in speziell angepassten NS 18 zu GL 18 Übergangsstücken aus Glas, die mit dem NS-Ende fest in sterile Hülsen von 5 ml-Einwegspritzen eingepresst werden können. Nach Ablauf der Expositionszeit wurde die CD Suspension bzw. das CD/Glutardialdehyd-Gemisch abpipettiert und die Proben für mindestens 24 Std. unter anaeroben Bedingungen (Glovebox) getrocknet. Bei Verwendung fluoreszenzmarkierter Cyclodextrine geschieht die Trocknung im Dunkeln.

Bei Verwendung von wasserunlöslichen Cyclodextrinen konnte auch bei zylinderförmigen Proben, analog zum erweiterten Standardverfahren auf eine anaerobe Atmosphäre verzichtet werden.

#### **6.4.5 Untersuchung der selbstverkettenden Cyclodextrinschichten auf Wasserlöslichkeit**

Nach der Tauchbeschichtung mittels erweitertem Standardverfahren wurde die Adsorbatbildung auf den Proben (Coupons) optisch begutachtet und mit Hilfe eines EFM betrachtet. Nach der Begutachtung werden die nach erweitertem Verfahren beschichteten

Stahlcoupons in neue sterile Petrischalen überführt, diese mit jeweils 50 mL sterilem PBS-Puffer gefüllt und im Dunkeln für 7 Tage bei Raumtemperatur statisch inkubiert. Danach wird der PBS-Puffer abpipettiert und verworfen. Die Stahlcoupons verbleiben zum Trocken für 24 Stunden in den Petrischalen und werden anschließend mit dem EFM betrachtet.

## **6.5 Labororientierte Untersuchungen zum Einfluss der Cyclodextrin Adsorbate auf MIC und MICI**

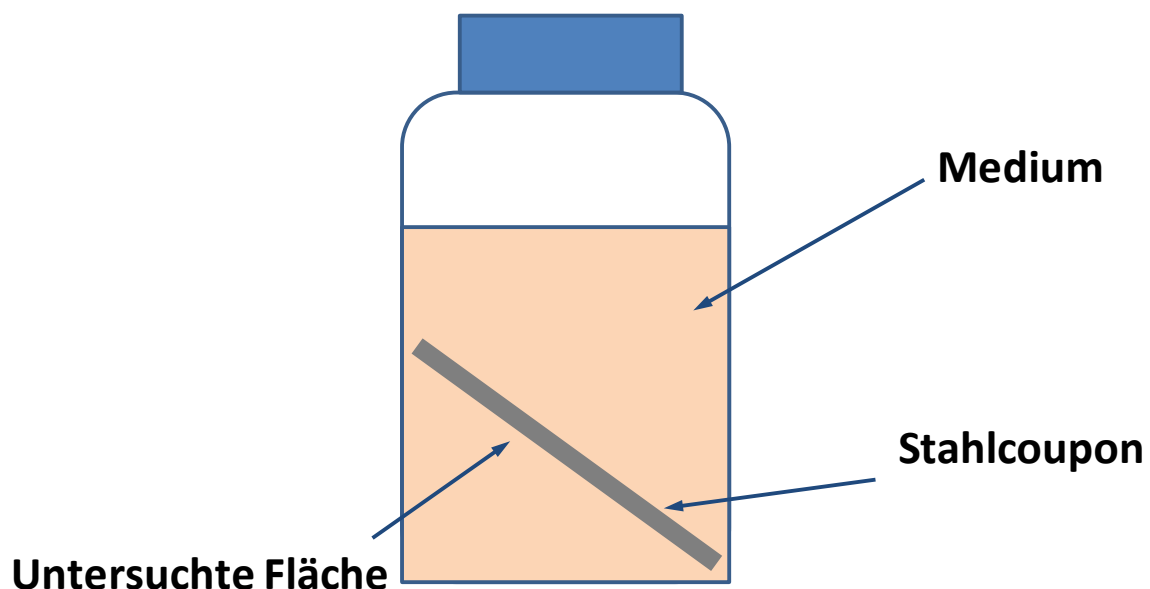
In den labororientierten Untersuchungen sollen grundsätzliche Erkenntnisse zum Verhalten der CD Adsorbatschichten gewonnen werden. Es wird deren Einfluss auf die Korrosion sowie Biofilmbildung untersucht. Sukzessive wird ein "upscaling" von statischen Versuchen hin zu realitätsnahen Untersuchungen unter Strömung in der Mini-Plant durchgeführt.

### **6.5.1 Statische Korrosionsversuche im 20 mL Maßstab mit SRB**

Um die Hemmwirkung verschiedener Cyclodextrine auf MIC in einem großen Maßstab evaluieren zu können, wurde ein einfaches Batchverfahren gewählt. In dem Batchverfahren werden sowohl wasserlösliche als auch wasserunlösliche CD's getestet. Die Stahlcoupons werden für eine bestimmte Zeit in inokulierter Postgate C (modifiziert) Nährlösung ausgelagert, zum Vergleich dient eine Sterilkontrolle.

Die St37 Coupons werden mit 20 mL beimpfter oder steriler Nährlösung überschichtet und für bis zu 42 Tage in einer Anaerobenkammer bei 28 °C inkubiert. Alle Lösungen werden sauerstofffrei gehalten.

Für die Auslagerung der Coupons in Bakteriensuspension wird zu Beginn eine Zelldichte von  $5 \cdot 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  der Sulfat-reduzierenden Schadorganismen eingestellt. Hierfür werden die einzelnen Arbeitskulturen unter einem Lichtmikroskop via Thomakammer ausgezählt. Nach Berechnung wird das benötigte Volumen an Bakteriensuspension unter sterilen Bedingungen entnommen und als Inokulum für die MIC-Simulationsversuche verwendet.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des Batchverfahrens zur Simulation von MIC durch SRB.**

Als Maß für die Korrosion wird der Gewichtsverlust bestimmt. Hierzu werden die Coupons vor und nach der Auslagerung gewogen. Soll eine mikroskopische Begutachtung der

Biofilmbildung vorgenommen werden, wird die untere Seite der Coupons mikroskopiert da diese unbeeinflusst von durch Schwerkraft herab sinkenden Präzipitaten ist.

### **6.5.2 Korrosionsversuche im 1000 mL Maßstab mit SRB**

Im nächsten Schritt werden die sich selbstverkettenden CD's REBCD und ROBCD sowie das wasserunlösliche ACBCD in einem hochskalierten geschüttelten Reaktor (80 rpm) auf ihre korrosionsinhibierende Wirkung und ihren Einfluss auf die Biofilmbildung hin untersucht. Hierzu wird eine Schraubdeckelflasche mit einem Gesamtvolumen von 1000 mL mit einem gasdichten Schraubstopfen versehen. In den Stopfen wird ein PTFE-Träger eingespannt auf dem beschichtete oder unbeschichtete St37 Coupons befestigt sind. Die Coupons werden 3 Tage (zur Untersuchung des Einflusses auf die Biofilmbildung) bzw. 21 Tage (Messung des Masseverlustes) bei 28 °C inkubiert. Alle Lösungen sind sauerstofffrei. Die Inkubation findet in normaler Atmosphäre statt, da die Flasche gasdicht verschlossen ist. Die Messung des Masseverlustes und die Beimpfung mit Schadorganismen findet analog zu Kapitel 6.5.1 statt. In Abbildung 3 wird der schematische Aufbau des Reaktors gezeigt.

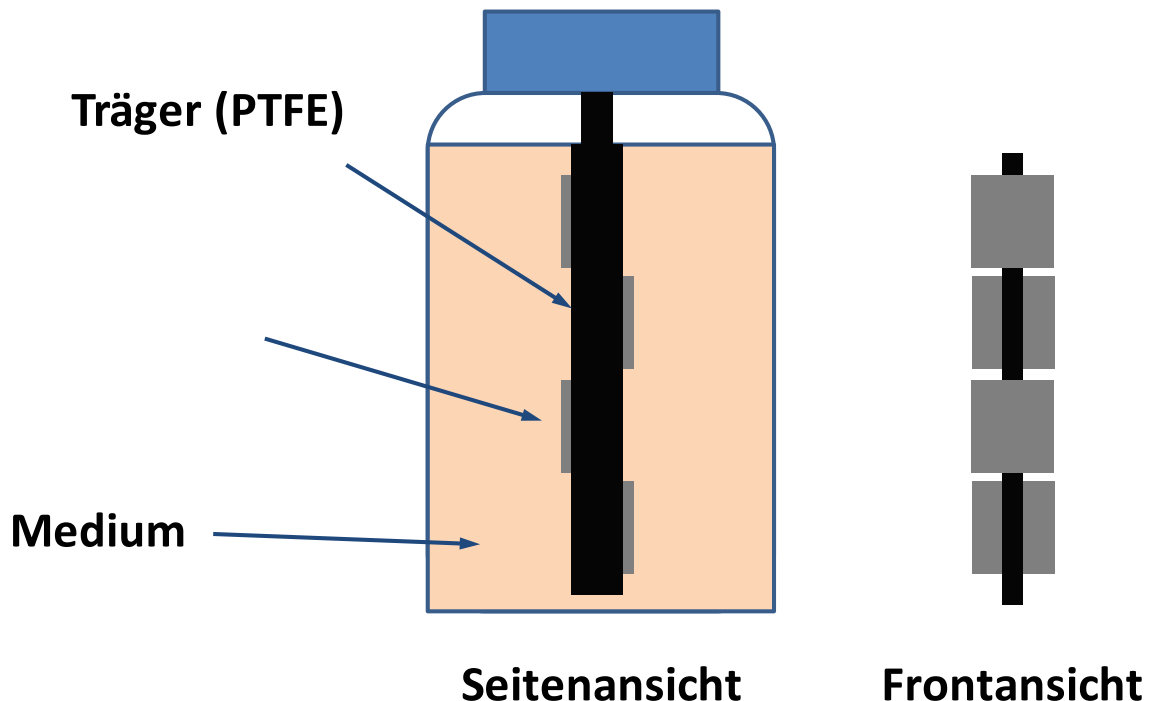


Abbildung 3: Schematische Darstellung des 1000 mL Batchverfahrens zur Simulation von MIC durch SRB. Gezeigt wird die Seitenansicht des Probenträgers im Medium sowie die Frontansicht.

## **6.6 Praxisorientierte Untersuchungen zum Einfluss der Cyclodextrin Adsorbate auf MIC und MICI**

### **6.6.1 Aufbau eines realitätsnahen Simulationssystems (Mini-Plant) zur Simulation von MIC**

Um die Schutzwirkung der mittels Standardverfahren hergestellten wasserlöslichen CD Adsorbate und der nach neuem Beschichtungskonzept (erweitertes Standardverfahren) mit sich selbst verkettenden (wasserunlöslichen) Cyclodextrinen unter Strömung zu untersuchen und somit eine erste Praxistauglichkeit dieser bestimmen zu können, wurde an beiden Forschungsstellen der Aufbau einer Mini-Plant zur Simulation von MIC-Bedingungen unter

sensorischer Erfassung kritischer Parameter wie pH-Wert und Redoxpotential durchgeführt. In der Mini-Plant (Eul, 1997) wird im Prinzip von einem Fermenter aus stetig Organismenhaltige Lösung in einem Kreislauf gepumpt und dabei eine Messstrecke durchströmt. Diese besteht aus mehreren ringförmigen Proben, die voneinander jeweils durch Kunststoffringe getrennt sind. Die Proben können mit Miniatur-Sensoren bestückt werden, die von außen durch den Ring eingeschraubt werden und im Inneren plan mit der Oberfläche abschließen. Die Spitzen der Sensoren (0,5 mm im Durchmesser) sollen von einem Biofilm überwacht werden. Dadurch ist die in-vivo Ermittlung von wichtigen Parametern möglich, z. B. Redox-Potentiale oder pH-Wert im Biofilm. Ebenfalls ist die Bestimmung selbiger Parameter im Fermenter möglich. Der modulare Aufbau erlaubt den simultanen Einsatz unterschiedlicher Materialien. Ein schematischer Aufbau der Mini-Plant wird in Abbildung 4 gezeigt. Zur Simulation von MIC mit SRB unter strömenden Bedingungen wurde die Mini-Plant durchgehend mit Stickstoff begast (50 L/h). Um ein Sulfuretum zu simulieren wurde eine wechselnde Begasung mit Stickstoff und Druckluft realisiert. Die Steuerung erfolgte über elektronisch geschaltete Ventile welche vollautomatisiert in Intervallen von je 6 h Stickstoff (50 L/h) und Druckluft (150 L/h) in den Fermenter befördert haben. In die Messstrecke können je Mini-Plant 8 Standard Coupons in Fließrichtung auf PTFE-Haltern eingebracht werden. Die Coupons als auch die Ringsegmente aus Metall wurden teilweise mit CD's beschichtet. Die Coupons wurden vor dem Einbau in die Messstrecke und nach Beendigung des Versuchs gewogen und aus der Differenz sowie der Fläche die Korrosionsrate pro Jahr bestimmt. Dies wurde teilweise auch für die Ringsegmente aus Metall durchgeführt.

## Schema des Mini-Plant-Aufbaus

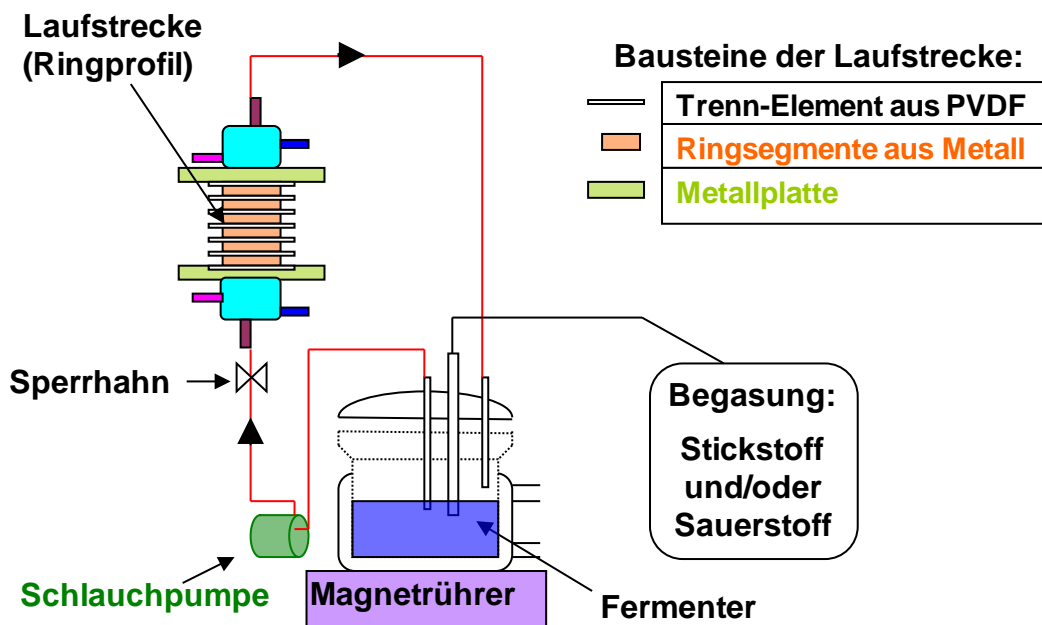


Abbildung 4: Schematischer Aufbau der Mini-Plant. Abgebildet wird der Fermenter mit der Option zur Begasung, die Laufstrecke des Mediums, Schlauchpumpe und die Messstrecke mit vorgeschaltetem Sperrhahn. Nicht gezeigt wird die Messsensoren.



## **6.6.2 Auslagerung in einem Wärmetauschersystem**

Ausgewählte Adsorbate (und Applikationsverfahren), die in den labororientierten Versuchen vielversprechende Eigenschaften zeigten, wurden in praxisorientierten Versuchsreihen ausgelagert. Zu diesem Zweck wurde eine Kooperation mit dem TÜV Süd am Standort Industriepark Höchst geschlossen.

Nachdem die Proben vorbehandelt, gereinigt und gewogen wurden, wurden die Coupons aus legiertem Stahl 1.4301 und 1.4571 nach dem entwickelten Standardverfahren (siehe 6.4.2) mit carboxyethylated- $\beta$ -Cyclodextrin (CEBCD) modifiziert.

Durch den Kooperationspartner TÜV Süd wurden die Proben auf einen Probenhalter montiert und anschließend auf einen Rechen in der Nähe des Rücklaufs in ein Wärmetauscher-System auf dem Gelände des Industrieparks Höchst eingebracht. Die Verwendung des Werkstoffs 1.4571 bei dieser Untersuchung beruht auf der Tatsache, dass dieser Werkstoff aufgrund seiner Eigenschaften viel öfter eingesetzt wird als der Werkstoff 1.4301.

Der Einbau der Proben erfolgte am 10. August 2016 für 174 Tage. Innerhalb dieser Zeitspanne wurde der Wärmetauscher für insgesamt 2391 Stunden (99,65 Tage) mit Flusswasser gespeist und betrieben. Die Flussrate lag dabei zwischen 0,1 und 0,2 Meter pro Sekunde. Das in den Wärmetauscher eingespeiste Flusswasser wurde zuvor nicht weiter behandelt und so variierte durch Jahreszeiten und Wetter bedingt die Wassertemperatur, die jedoch nicht bemessen wurde.

Der Ausbau der Proben am 31. Januar 2017 erfolgt ebenfalls durch den Kooperationspartner TÜV Süd, sie wurden anschließend zur mikrobiologischen und werkstoffkundlichen Untersuchung übergeben.

### **6.6.2.1 *Mikrobiologische Untersuchungen***

Die mikrobiologischen Methoden beziehen sich auf die Bestimmung und Quantifizierung von insgesamt vier Organismen-Gruppen. Chemoorganotrophe Bakterien sowie Pilze auf Agar Platten und moderat-acidophile Bakterien sowie Mangan oxidierende Bakterien in flüssig Medien. Hierzu wurden selektive Nährmedien (siehe Anhang) verwendet.

### **6.6.2.2 *Werkstoffkundliche Untersuchungen***

Die werkstoffkundlichen Methoden beziehen sich auf die Oberflächeneigenschaften und Topographie der Proben, sie wurden zu diesem Zwecke mit Stereolupe und REM begutachtet.

## **6.7 Mikroskopische Untersuchungsmethoden**

### **6.7.1 Lichtmikroskopie**

Die Lichtmikroskopie wurde sowohl zu mikrobiologischen als auch werkstoffkundlichen Untersuchungen eingesetzt. Mittels einfacher Lichtmikroskopie im Durchlichtverfahren (u. a. Phasenkontrast-Methode) konnten Zellen anhand ihrer Zellform identifiziert werden und z. B. unerwünschte Fremdorganismen in einer Reinkultur nachgewiesen werden. (Forschungsstelle I: Laborlux S, Leitz; Forschungsstelle II: Typ 020-518.500, Leica). Eine weitere Anwendung der Lichtmikroskopie lag in der Bestimmung der Zellzahl (Zellen ml<sup>-1</sup>) in den Medien. Diese Bestimmung gibt Aufschluss über das Wachstumsverhalten der Zellen und wurde daher in beiden Forschungsstellen regelmäßig durchgeführt. Zur Zellzahlbestimmung wurden spezielle Zählkammern Anwendung (Typ Neubauer improved,

Sondertiefe von 0,02 mm, Marienfeld) verwendet. Für werkstoffkundliche Untersuchungen wurden leistungsfähigere Lichtmikroskope bzw. Stereolupen im Auflichtverfahren - jeweils gekoppelt mit Digitalkameras - eingesetzt (Forschungsstelle I: Imager.Z.1m, Zeiss. Forschungsstelle II: Axio Imager, Zeiss).

### **6.7.2 Fluoreszenzmikroskopie**

Bei dieser Methode wird in der Regel eine Erweiterung der Lichtmikroskope im Auflichtverfahren verwendet (Forschungsstelle I: Imager.Z.1m, Zeiss. Forschungsstelle II: Axio Imager, Zeiss, Kopplung an AFM).

Mittels der Fluoreszenzmikroskopie kann die Besiedlung von Oberflächen durch Mikroorganismen (quantitativ) erfasst werden. Im Prinzip werden die Zellen vor der Untersuchung mit Fluoreszenz-aktiven Farbstoffen markiert und erscheinen bei anschließender Betrachtung der Oberfläche durch ein Epifluoreszenzmikroskop (EFM) als intensiv strahlende Stellen.

Als Beispiel für einen Marker soll hier der Farbstoff DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) Erwähnung finden. DAPI ist ein Fluoreszenzmarker, der sich unselektiv an DNA bindet und die Zellen im UV-Licht blau erscheinen lässt. Dabei werden sowohl lebende als auch tote Zellen angefärbt. Von besonderem Interesse im Rahmen des Projekts ist eine (quantitative) Analyse der Besiedlung der Proben durch die verwendeten Mikroorganismen bzw. Analyse der Besiedelbarkeit von zuvor aufgetragenen Cyclodextrinschichten.

Im Verlauf des Projekts wurden folgende Fluoreszenz-Marker verwendet:

- DAPI zur unselektiven Färbung von Zellen
- Syto 9 zur unselektiven Färbung von Zellen

Es hat sich gezeigt, dass EFM-Aufnahmen von lebenden Biofilmen nach Ablauf der Inkubationszeiten (21 bzw. 42 Tage) nicht sinnvoll ausgewertet werden können, da einzelne Zellen im dichten Biofilm nicht erkennbar sind. Diese Technik wurde daher vorwiegend bei kürzeren Inkubationszeiten von wenigen Stunden bis drei Tagen eingesetzt.

### **6.7.3 AFM**

Die Raster-Kraft Mikroskopie (AFM) eignet sich sowohl zur Analyse von Korrosionsschäden als auch zur Untersuchung der bakteriellen Besiedlung bzw. Analyse der Cyclodextrinschichten.

Das AFM der Forschungsstelle II (NanoWizard II BioAFM, JPK Instruments) ist speziell für parallele Untersuchungen mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (Axio Imager, Zeiss) entwickelt worden und wurde von der Forschungsstelle in einer Testphase verwendet. Vom AFM-Hersteller wurde eine spezielle Probenhalterung entwickelt, mit der die Proben mit hoher Ortskonstanz (max. 5 µm Verschiebung) zwischen den Mikroskopen transferiert werden können. Dadurch kann eine einmal im AFM eingestellte Position auf der Oberfläche der Probe auch im FM wieder gefunden werden. Bei einer geeigneten Anfärbung der Bakterienzellen oder Cyclodextrine mit einem Fluoreszenzmarker (DAPI, fluoreszenzmarkierte Cyclodextrine) kann die räumliche Verteilung der Zellen quantitativ erfasst werden und anschließend die Korrelation zwischen der bakteriellen Besiedlung und dem Auftreten der Schadstellen abgeleitet werden. Weiterhin kann die Rauigkeit der Proben

ermittelt werden, anhand der Rauigkeit lässt sich das Voranschreiten einer Korrosion abschätzen.

### **6.8 Charakterisierung der Adsorbatbildung sowie der Schichten verschiedener Cyclodextrin Varianten auf Stahl**

Um eine ortsaufgelöste Qualifizierung der nicht wasserlöslichen Adsorbate zu erhalten und um ihre Struktur sowie räumliche Verteilung zu ermitteln, wurden Coupons aus unlegiertem (St37) und legiertem (1.4301) Stahl mit ACBCD, REBCD bzw. ROBCD beschichtet und mittels FT-IR(RAS), ATR-IR, REM und EDX untersucht.

Um Oberflächeneigenschaften wie Benetzbarkeit und Stabilität der Adsorbate gegen Auflösung zu bestimmen, wurden die ACBCD, REBCD und ROBCD modifizierten Werkstoffe nach kurzer Auslagerung unter anaeroben Bedingungen und bei 37°C in steriler Postgate C Nährlösung mittels Kontaktwinkelmessung und FT-IRRAS untersucht.

### **6.9 Elektrochemische Untersuchung zum Adsorbat-Einfluss auf abiotische Korrosion und MIC durch SRB**

Zur Bestimmung der Wirkung der wasserunlöslichen CD Adsorbate auf abiotische Korrosion (in NaCl und HCl verdünnten Lösungen) und MIC durch SRB (*D. vulgaris*, *D. indonensis*) unter statischen Bedingungen wurden elektrochemische Messungen (Ruhepotential-Entwicklung, potentiodynamische Polarisationsmessung, Polarisationswiderstand und Impedanzmessung) durchgeführt.

Dabei kann die zeitliche Entwicklung des Ruhepotentials als Indikator für den Beginn von korrosiven Vorgängen wichtige Informationen über die Stabilität der Adsorbate geben. Der elektrochemische Zustand der Elektrode wurde durch in regelmäßigen Zeitabständen aufgenommene Daten aus EIS und elektrochemischer Polarisation beurteilt.

## **7 Ergebnisse und Diskussion**

### **7.1 Kultivierung von Mikroorganismen**

Reinkulturen der SRB *Desulfovibrio vulgaris*, *D. alaskensis*, *D. indonesiensis* und *L. discophora* sowie SRB-Anreicherungskulturen aus MIC-Schadensfällen der Industrie wurden kultiviert. Es liegen sechs verschiedene SRB-Anreicherungskulturen vor.

### **7.2 Entwicklung einer praxisnahen Applikationsmethode**

In der Zielsetzung laut Antrag sollte eine praxisnahe Applikationsmethode entwickelt werden, welche sich durch einen geringen Personal- und Zeitaufwand auszeichnet. Dies sollte durch ein zwei Komponenten-System mit unterschiedlich modifizierten Cyclodextrinen erreicht werden. Im Laufe des Projektes stellte sich heraus, dass die Applikation in einem 2K-System nicht praktikabel ist. So wurde auf Cyclodextrine ausgewichen, welche sich in einem einzigen Schritt durch Tauchen (bis zu 5 Tauchschritte) auf die Metalloberfläche aufbringen lassen und bei Kontakt mit einem wässrigem Milieu sich selbstverketteten und so einen nachgeschalteten Polymerisationsschritt überflüssig machen. Es wurden die CD's REBCD und ROBCD auf unseren Wunsch von der Fa. Cyclolab synthetisiert. Die oben genannten CD's zeichnen sich durch verschieden lange Seitenketten, Ethyl (C<sub>2</sub>) und Octyl (C<sub>10</sub>) aus, sowie durch ihre selbstverkettenden Eigenschaften. Im Detail: Durch die hydrophoben Seitenketten sind sie nicht wasserlöslich und wurden für das Projekt in Essigsäureethylester gelöst. Ebenfalls wurden die Lösemittel Dichlormethan, Aceton und Chloroform getestet aber aufgrund ihrer aggressiven und gesundheitsgefährdenden Eigenschaften ausgeschlossen. Im gelösten Zustand liegen die Seitenketten frei vor. Kommt ein beliebiger Werkstoff nach dem Tauschbeschichten mit einer wässrigen Lösung in Kontakt, lagern sich die hydrophoben Seitenketten in die hydrophoben Kavitäten der benachbarten CD's ein. Die CD's verketteten sich in wässrigem Milieu selbst, so ist eine zeitintensive nachgeschaltete Polymerisation unnötig. Es konnte so eine praxisnahe Applikationsmethode mit nur einem Schritt realisiert werden. Ebenfalls wurde das Cyclodextrin ACBCD untersucht. ACBCD besitzt keine selbstverkettenden Eigenschaften ist aber ebenso durch die Acethyl-Seitenkette wasserunlöslich. Es wurde in Acetonitril gelöst und besitzt eine potentiell höhere Resistenz gegenüber Ablösung in Wasser als wasserlösliche Cyclodextrine welche im Vorläuferprojekt eingesetzt wurden. In Anlehnung an die Ergebnisse des Vorläuferprojektes wurden Lösungen der jeweiligen CD's in der Konzentration 10 mg\*mL<sup>-1</sup> hergestellt. Die Proben (Coupons und Zylinder) wurden durch eintauchen beschichtet. Die Proben wurden optisch und mikroskopisch nach einmaligem Eintauchen untersucht und es konnten homogene deckende Schichten festgestellt werden. Mittels EFM konnte eine homogene Flächenbelegung der Cyclodextrine nachgewiesen werden. Jedoch, aufgrund ihrer besonderen Beschaffenheit im Vergleich zu den aus dem Vorläuferprojekt bekannten CD's war eine Schichtdickenmessung mittels CLSM nicht möglich. Eine spezifische Anfärbung der gesamten Schicht war mit den uns zur Verfügung stehenden Methoden nicht möglich. Daher wurde in Absprache mit der Fa. Cyclolab ein mehrmaliges Eintauchen (5 mal) und Ablüften nach jedem Tauchschritt beschlossen. Basierend auf der Erfahrung der Fa. Cyclolab lagert sich bei jedem Tauchschritt nach vorherigem Ablüften eine neue Schicht Cyclodextrine an die Probe bzw. an die vorherige Schicht an. So wird eine einheitliche und möglichst starke Schicht erzeugt.

### **7.3 Oberflächeneigenschaften hergestellter Adsorbate**

Mittels der oberflächenspektroskopischen Methoden FT-IR(RAS) und ATR-IR konnten die wasserunlöslichen CD's ACBCD, REBCD und ROBCD auf der Oberfläche der Werkstoffe St37 und 1.4301 detektiert werden. Ein Vergleich der Banden im Fingerprintbereich (1500 bis 400  $\text{cm}^{-1}$ ) beschichteter Proben der Werkstoffe St37 bzw. 1.4301 mit den Banden der Rein-Substanzen führte zur Identifizierung der genannten CD's (siehe Abbildung 5A-C).

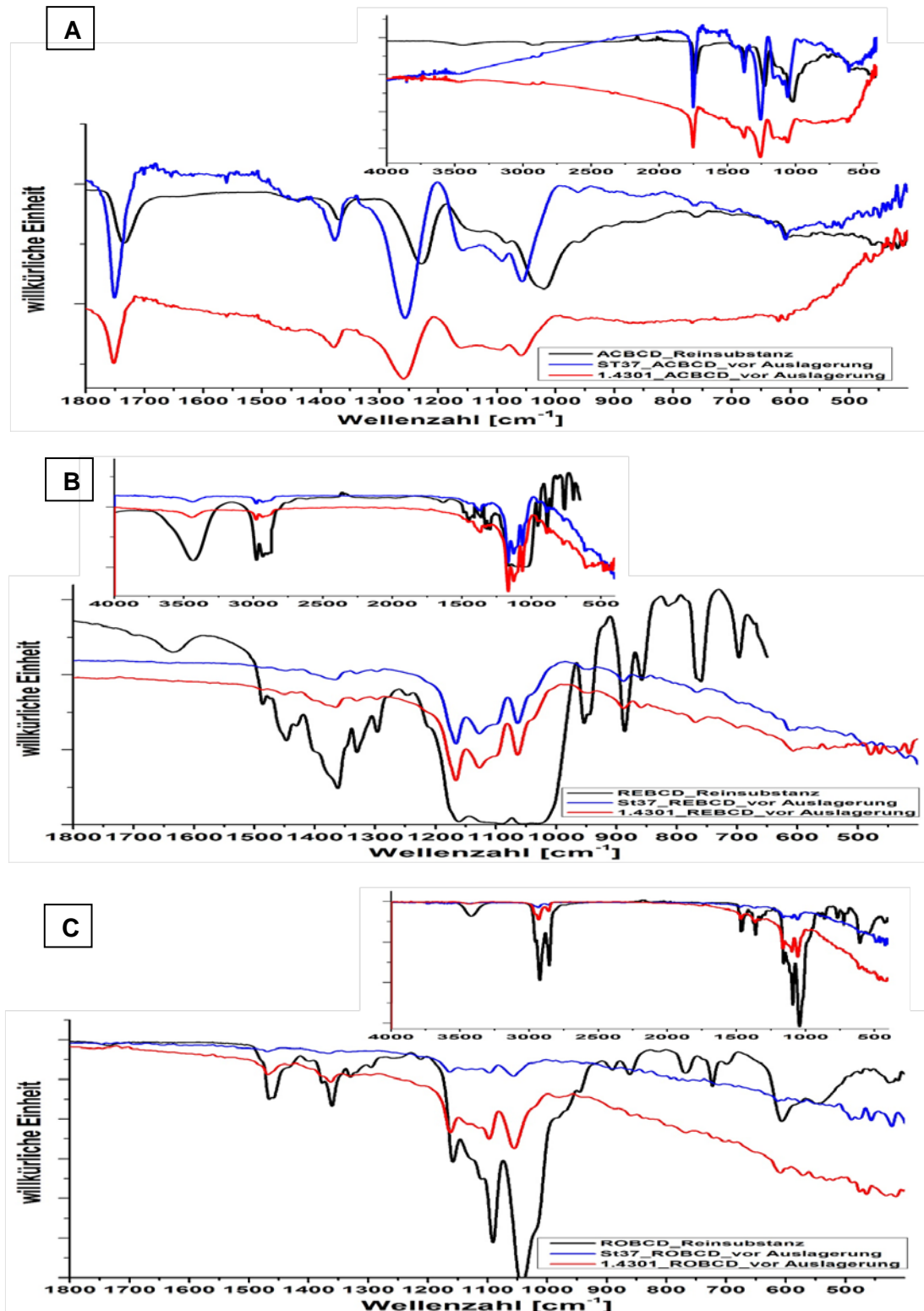
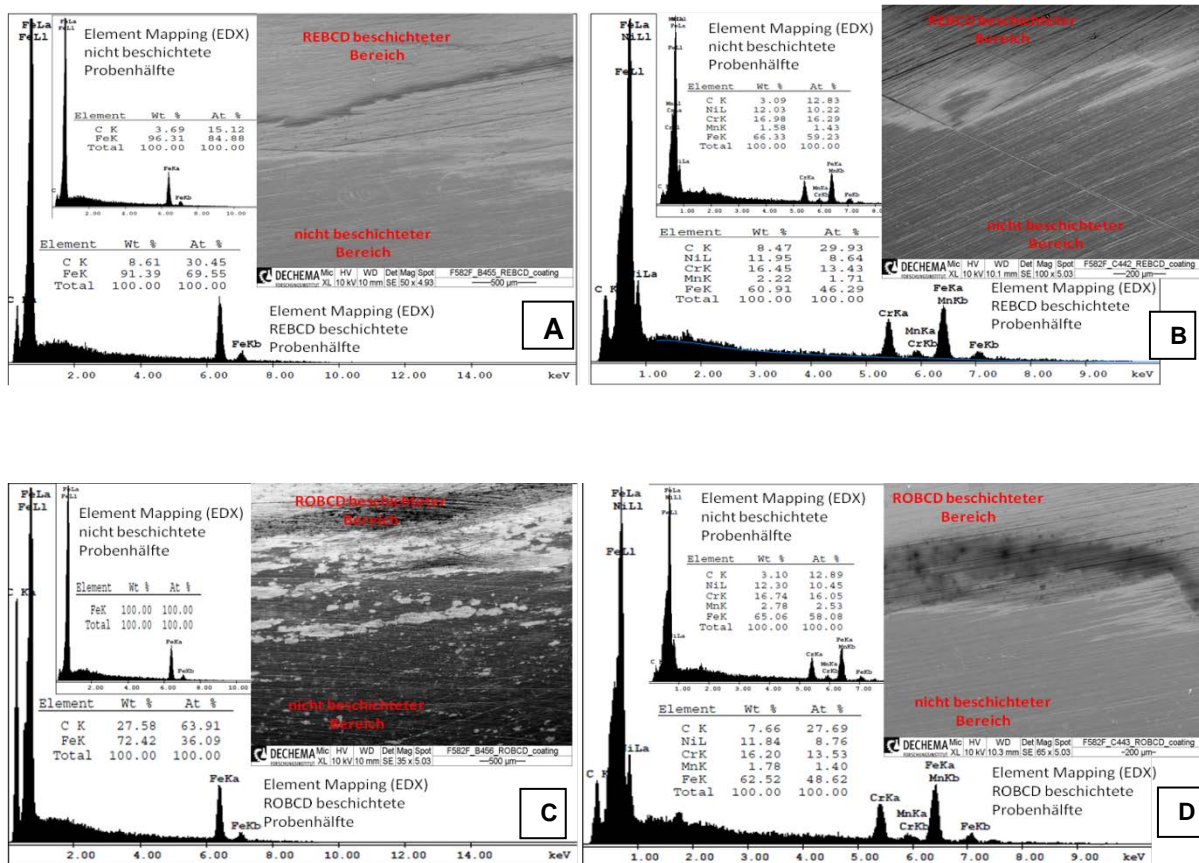


Abbildung 5: Darstellung der FT-IR Spektren wasserunlöslicher CD Varianten im Fingerprint-Bereich von 1800 bis 400  $\text{cm}^{-1}$ . Das kleine Diagramm in den jeweiligen Diagrammen zeigt die kompletten Spektren von 4000 bis 400  $\text{cm}^{-1}$ . A: Spektren von acetyliertem- $\beta$ -Cyclodextrin (ACBCD), B: Spektren von zufällig ethyliertem- $\beta$ -Cyclodextrin (REBCD), C: Spektren von zufällig octyliertem- $\beta$ -Cyclodextrin (ROBCD). Schwarze Linien zeigen Spektren der ACBCD, REBCD und ROBCD Rein-Substanzen (KBr-Prüftechnik). Blaue bzw. rote Linien zeigen Spektren von mit ACBCD, REBCD und ROBCD modifizierten Oberflächen der Werkstoffe St37 und 1.4301 (IRRAS-Methode). 100 Scans pro Messung. Auflösung 4  $\text{cm}^{-1}$ .

Wie die in Abbildung 6 dargestellten REM Aufnahmen belegen, konnten im Vergleich zu nicht beschichteten Proben auf nach erweitertem Standardverfahren mit REBCD und ROBCD modifizierten Proben Beläge identifiziert werden, welche die Oberfläche homogen bedecken. Morphologische Unterschiede zwischen REBCD bzw. ROBCD modifizierten und nicht beschichteten Proben wurden nicht beobachtet. Durch Anlegen von verhältnismäßig geringen Beschleunigungsspannungen von jeweils 10 keV wurde die Eindringtiefe des Elektronenstrahls geringgehalten, so dass vorwiegend die oberflächennahen Bereiche analysiert wurden. Gemäß der EDX Analyse ist der Anteil des für organische Materialien charakteristischen Elements Kohlenstoff für REBCD und ROBCD modifizierte Proben doppelt so hoch wie für nicht beschichtete Proben (ca. 30 Atom % zu ca. 15 Atom %). Des Weiteren fiel während der Probenuntersuchung mittels REM auf, dass die Oberflächen nicht beschichteter Proben dunkler erschienen als Oberflächen, welche mit REBCD und ROBCD modifiziert wurden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass auf den Oberflächen nicht beschichteter Proben verstärkt Metalloxide ausgebildet wurden.



**Abbildung 6: REM Aufnahmen und Element-Mapping (EDX) von nach erweitertem Standardverfahren zur Hälfte mit wasserunlöslichen CD's modifizierten Probenoberflächen der Werkstoffe St37 (A und C) und 1.4301 (B und D). A und B: mit randomly ethylated-β-Cyclodextrin (REBCD) beschichtet. C und D: mit randomly octylated-β-Cyclodextrin (ROBCD) beschichtet. Beschleunigungsspannung 10 keV.**

Wie in Abbildung 7A für den mit ACBCD modifizierten Werkstoff 1.4301 dargestellt, entstehen Randzonen, an denen die Oberflächenbelegung dicker aufliegt als im Inneren der behandelten Fläche. Dies spricht für ein langsames Eintrocknen und Aufkonzentrieren dieser CD-Variante zum Rand hin als Folge des Abdampfens des Lösemittels. Die mittels EDX analysierten Randzonen zeigen mit ca. 75 Atom % auf hochlegiertem Stahl 1.4301 (siehe Abbildung 7B) bzw. 65 Atom % auf unlegiertem Stahl St37 (Ergebnisse nicht gezeigt) den

höchsten Anteil des Elements Kohlenstoff. Im Inneren werden auf 1.4301 noch ca. 40 Atom % (siehe Abbildung 7A) bzw. auf St37 30 Atom % Kohlenstoff (Ergebnisse nicht gezeigt) detektiert. Ähnlich der REBCD und ROBCD modifizierten Proben ist der Kohlenstoffanteil für ACBCD modifizierte Proben im Vergleich zu nicht beschichteten Proben doppelt so hoch. Ebenfalls konnte für ACBCD beschichtete Proben kein morphologischer Unterschied zwischen modifizierten und nicht beschichteten Proben beobachtet werden.

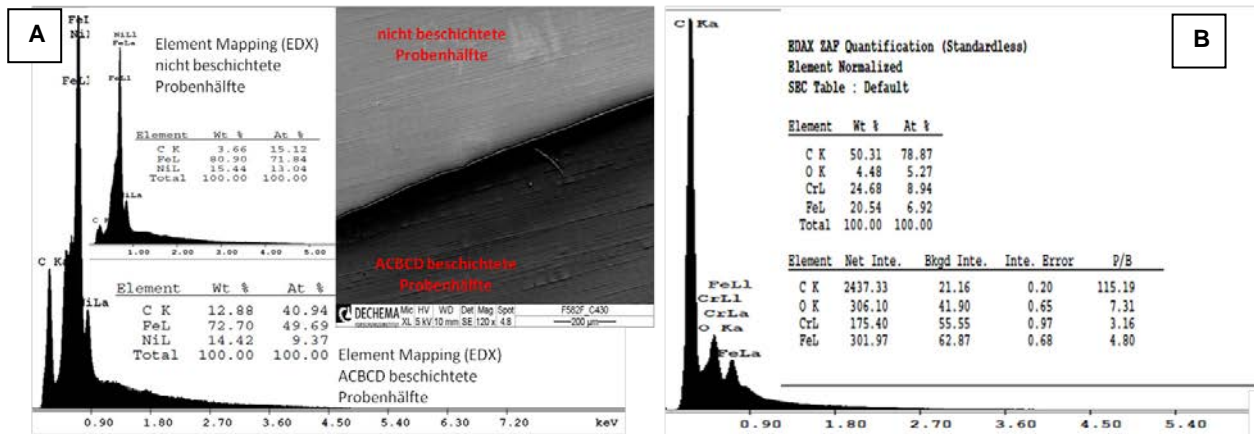
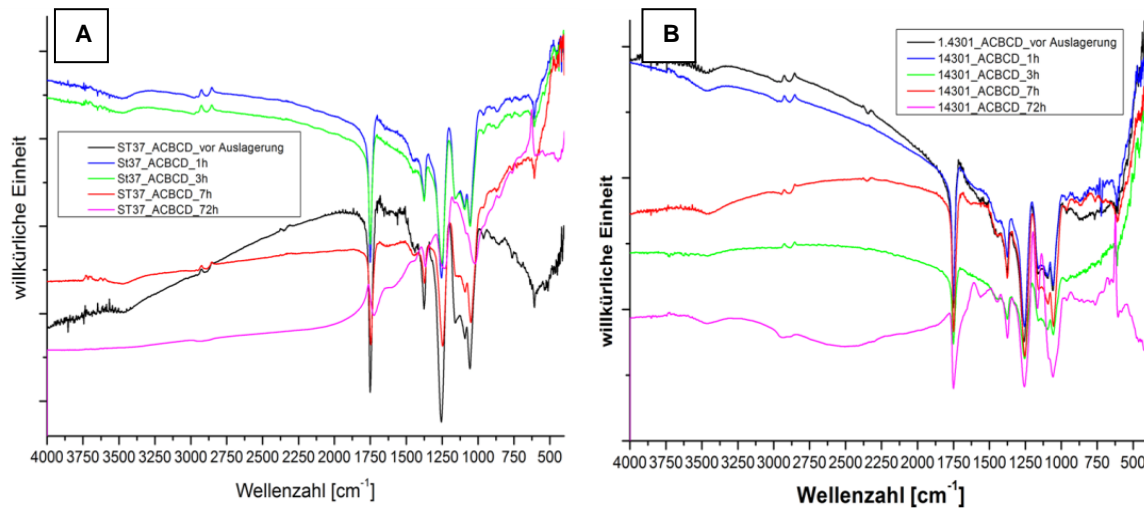


Abbildung 7: REM Aufnahme und Element-Mapping (EDX) von nach erweitertem Standardverfahren zur Hälfte mit acetyliertem-β-Cyclodextrin (ACBCD) beschichtetem Werkstoff 1.4301 (A) und Element-Mapping an der Grenzfläche/ Randzone zwischen ACBCD beschichteter und nicht-beschichteter Probenhälfte (B). Beschleunigungsspannung 10 keV.

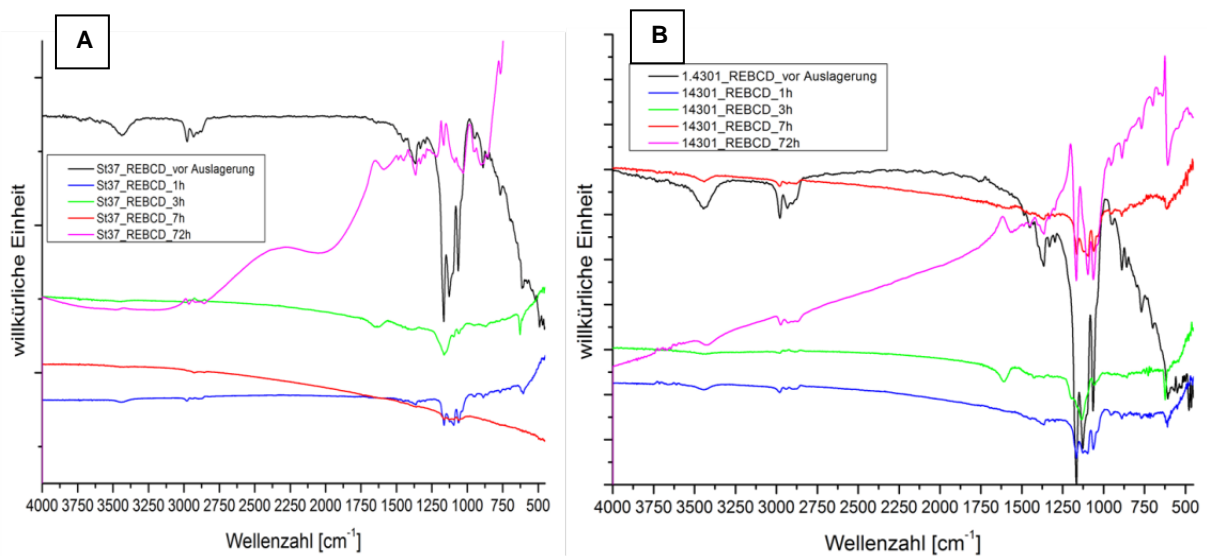
## 7.4 Oberflächeneigenschaften und Stabilität der Adsorbate nach kurzer Auslagerung

Mit Ausnahme von REBCD auf St-37 (Abbildung 8) konnten die nach erweitertem Standardverfahren aufgebracht wasserunlöslichen CD's mittels der oberflächenspektroskopischen Methode FT-IR(RAS) nach kurzer Auslagerung unter anaeroben Bedingungen in steriler Postgate C Nährlösung auf den Oberflächen der Werkstoffe St-37 und 1.4301 detektiert werden. Ein Vergleich der Banden ( $4000$  bis  $400\text{ cm}^{-1}$ ) mit den Banden der Reinsubstanzen und der von beschichteten Oberflächen vor einer Auslagerung, zeigten keine Änderung der Bandenlage oder Form und damit eine Stabilität der genannten CD's auf der Oberfläche (siehe Abbildung 9 und Abbildung 10).

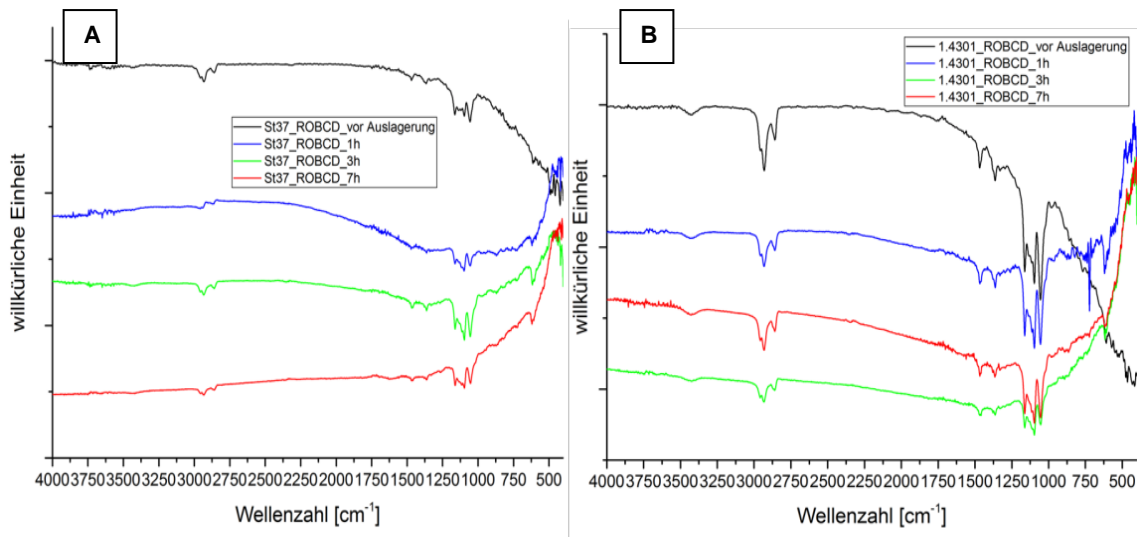




**Abbildung 8:** FT-IR Spektren von nach erweitertem Standardverfahren mit acetyliertem- $\beta$ -Cyclodextrin (ACBCD) modifizierten Werkstoffoberflächen vor bzw. nach steriler Auslagerung im Postgate C (modi.) Nährmedium bei 37 °C. A: ACBCD-Beschichtung auf St37 und B: ACBCD-Beschichtung auf 1.4301. Spektralbereich: 4000 bis 400  $\text{cm}^{-1}$ ; 100 Scans pro Messung. Auflösung 4  $\text{cm}^{-1}$ .

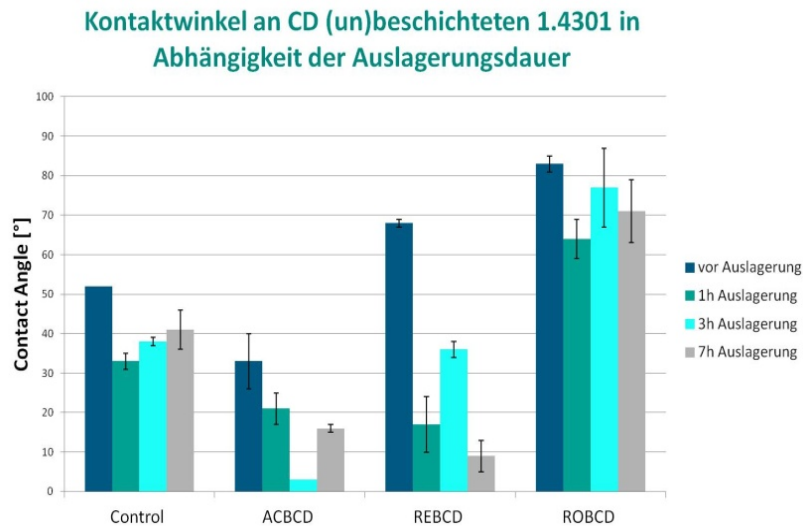


**Abbildung 9:** FT-IR Spektren von nach erweitertem Standardverfahren mit zufällig ethyliertem- $\beta$ -Cyclodextrin (REBCD) modifizierten Werkstoffoberflächen vor bzw. nach steriler Auslagerung im Postgate C (modi.) Nährmedium bei 37 °C. A: REBCD-Beschichtung auf St37 und B: REBCD-Beschichtung auf 1.4301. Spektralbereich: 4000 bis 400  $\text{cm}^{-1}$ ; 100 Scans pro Messung. Auflösung 4  $\text{cm}^{-1}$ .

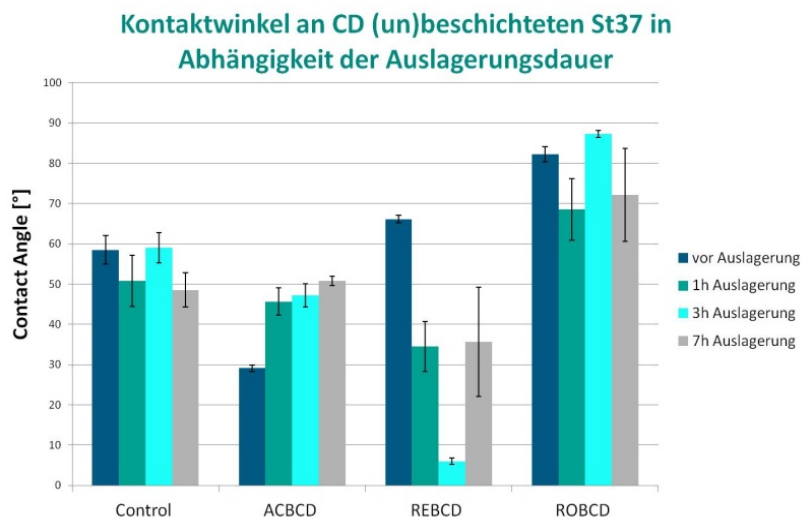


**Abbildung 10: FT-IR Spektren von nach erweitertem Standardverfahren mit zufällig octyliertem- $\beta$ -Cyclodextrin (ROBCD) modifizierten Werkstoffoberflächen vor bzw. nach steriler und anaerober Auslagerung im Postgate C (modi.) Nährmedium bei 37 °C. A: ROBCD-Beschichtung auf St37 und B: ROBCD-Beschichtung auf 1.4301. Spektralbereich: 4000 bis 400 cm<sup>-1</sup>; 100 Scans pro Messung. Auflösung 4 cm<sup>-1</sup>.**

Die Untersuchung der Benetzbarkeit der Werkstoffe St-37 und 1.4301 nach kurzer Auslagerung der nach erweitertem Standardverfahren mit ACBCD, REBCD und ROBCD modifizierten Oberflächen wurde durch Bestimmung der Kontaktwinkel ermittelt. Anhand der Kontaktwinkel zwischen einem Flüssigkeitstropfen und einer in der Regel festen Oberfläche können Aussagen zu den Wechselwirkungen getroffen werden: Kleine Kontaktwinkel charakterisieren eine starke Wechselwirkung. In diesem Fall spreitet sich das Wasser zu einem gleichmäßigen Film, der von der Oberfläche abläuft, während große Kontaktwinkel für repulsive Wechselwirkungen stehen.



**Abbildung 11: Kontaktwinkel (CA) Untersuchung an nach erweitertem Standardverfahren mit wasserunlöslichen CD's beschichtetem Werkstoff 1.4301 nach kurzer Auslagerung in steriler Postgate C (modi.) Nährlösung unter anaeroben Bedingungen und 37°C. Grafische Darstellung der ermittelten Mittelwerte und Standardabweichung für ACBCD, REBCD, ROBCD und nicht beschichtete Kontrollen. Blau: vor Auslagerung; Grün: nach einer Stunde Auslagerung; Türkis: nach drei Stunden Auslagerung; Grau: nach sieben Stunden Auslagerung. Hanging-Drop-Methode mit 5 µL bidest. Wasser.**



**Abbildung 12: Kontaktwinkel Untersuchung an nach erweitertem Standardverfahren mit nicht wasserlöslichen Cyclodextrinen beschichtetem Werkstoff St37 nach kurzer Auslagerung in steriler Postgate C (modi.) Lösung unter anaeroben Bedingungen und 37°C. Grafische Darstellung der ermittelten Mittelwerte und Standardabweichung für ACBCD, REBCD, ROBCD und nicht beschichtete Kontrollen. Blau: vor Auslagerung; Grün: nach einer Stunde Auslagerung; Türkis: nach drei Stunden Auslagerung; Grau: nach sieben Stunden Auslagerung. Hanging-Drop-Methode mit 5 µL bidest. Wasser.**

Wie die Abbildung 11 für hochlegierten (1.4301) und Abbildung 12 für unlegierten (St37) Stahl darstellt, zeigten die Untersuchungen für ROBCD-beschichtete Oberflächen überlegene hydrophobe Eigenschaften (respektive zur nicht beschichteten Kontrolle) aufgrund der langen aliphatischen octyl- Seitenketten. Auch die Beschichtungen aus REBCD weisen durch erhöhte Kontaktwinkelwerte auf hydrophobere Oberflächeneigenschaften hin.

Für ACBCD Beschichtungen wurden im Vergleich zur Kontrolle kleinere Kontaktwinkel und somit hydrophilere Eigenschaften gemessen (siehe Abbildung 11 für Kontaktwinkel an 1.4301 vor Auslagerung: Kontrolle  $52 \pm 2^\circ$ ; ACBCD  $33 \pm 7^\circ$ ; REBCD  $68 \pm 1^\circ$ ; ROBCD  $83 \pm 2^\circ$  und Abbildung 12 für Kontaktwinkel an St-37 vor Auslagerung: Kontrolle  $59 \pm 4^\circ$ ; ACBCD  $29 \pm 1^\circ$ ; REBCD  $66 \pm 1^\circ$ ; ROBCD  $82 \pm 2^\circ$ ).

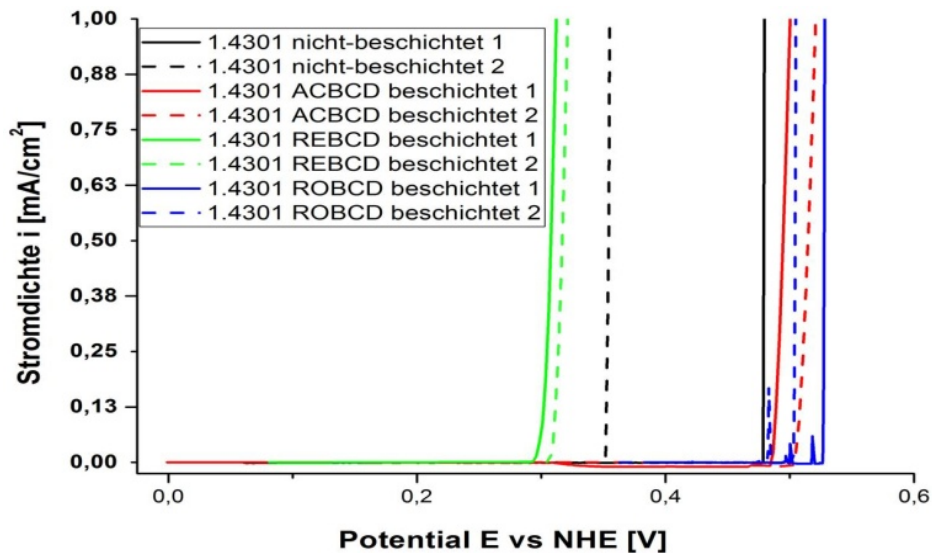
Der repulsive Charakter der mit ROBCD modifizierten Oberflächen bleibt auch nach der kurzen Auslagerungszeit in steriler, anaerober Postgate C (modifiziert) Nährlösung erhalten, während die Eigenschaften von mit REBCD beschichteter Proben mit fortschreitender Auslagerungszeit von hydrophob zu hydrophil wechselt. Der hydrophile Charakter von mit ACBCD beschichteten Proben bleibt nur für den Werkstoff 1.4301 erhalten, während die Kontaktwinkel für mit ACBCD modifizierten St-37 vergleichbar mit den Werten der nicht beschichteten Kontrolle waren (siehe Abbildung 11 für Kontaktwinkel an 1.4301 nach 7 Stunden Auslagerung: Kontrolle  $41 \pm 5^\circ$ ; ACBCD  $16 \pm 1^\circ$ ; REBCD  $9 \pm 4^\circ$ ; ROBCD  $71 \pm 8^\circ$  und Abbildung 12 für Kontaktwinkel an St-37 nach 7 Stunden Auslagerung: Kontrolle  $49 \pm 4^\circ$ ; ACBCD  $51 \pm 1^\circ$ ; REBCD  $36 \pm 14^\circ$ ; ROBCD  $72 \pm 12^\circ$ ).

## **7.5 Elektrochemische Evaluierung der Schutzwirkung wasserunlöslicher Cyclodextrin Adsorbate gegen Korrosion**

### **7.5.1 Abiotische Korrosion**

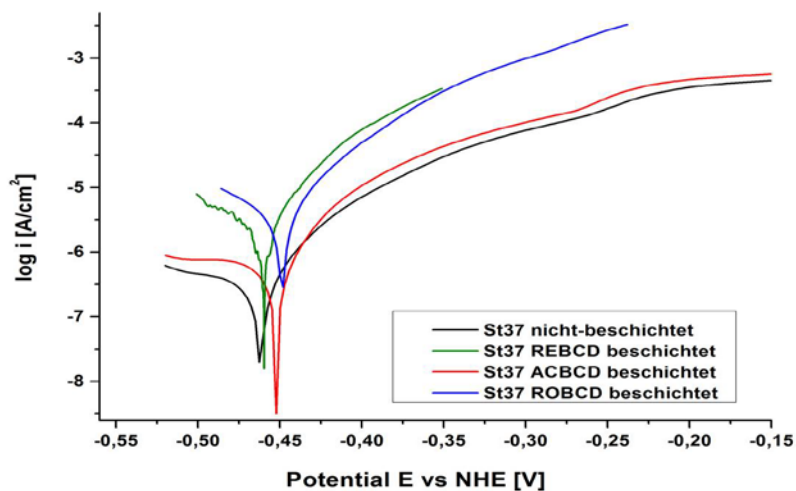
Der Einfluss der nach erweitertem Standardverfahren mit ACBCD, REBCD und ROBCD beschichteten Proben aus hochlegiertem (1.4301) und unlegiertem Stahl (St37) auf abiotische Korrosion wurde in 1 M bzw. 0,2 M NaCl Lösung bei Raumtemperatur und unter aeroben Bedingungen untersucht.

In einer Versuchsreihe zur Untersuchung des Lochbildungspotentials am Werkstoff 1.4301 konnte, wie in Abbildung 13 dargestellt, unter den gewählten Bedingungen für ACBCD und ROBCD beschichtete Proben im Vergleich zu nicht beschichteten Proben kein Einfluss auf das Lochbildungspotential festgestellt werden. Während das Lochbildungspotential für mit ACBCD und ROBCD beschichtete Proben in vergleichbare Potentialbereiche fiel (450 bis 550 mV gegen NHE angegeben), wurde für mit REBCD beschichtete Proben sogar eine Verschiebung des Lochbildungspotentials um ca. 100 mV in kathodische Richtung beobachtet (ca. 360 mV gegen NHE), was einer Verschlechterung der Korrosionseigenschaften entspricht.



**Abbildung 13:** Stromdichte-Potential Kurven von nach erweitertem Standardverfahren mit wasserunlöslichen CD's beschichtetem hochlegiertem Stahl 1.4301 nach einer Stunde Auslagerung in 1 M NaCl Lösung bei Raumtemperatur und aeroben, nicht-turbulenten Bedingungen. Start-Potential: OCP – 50 mV; Scanrate: 0,03 mV/sek.; Abbruch bei Stromdichte von 1,5 mA/cm<sup>2</sup>. Referenz-Elektrode: Silber/Silberchlorid; Gegen-Elektrode: Platindraht (Fläche A = 1 cm<sup>2</sup>).

Die Untersuchungen zum Einfluss der wasserunlöslichen CD Adsorbate ACBCD, REBCD und ROBCD auf das Korrosionsverhalten von St37 in 0,2 M NaCl Lösung zeigten ebenfalls, dass die nach erweitertem Standardverfahren entwickelten Schichten keinen Schutz bieten und im Fall der REBCD und ROBCD Beschichtungen Korrosionsprozesse sogar beschleunigt werden (siehe Abbildung 14).

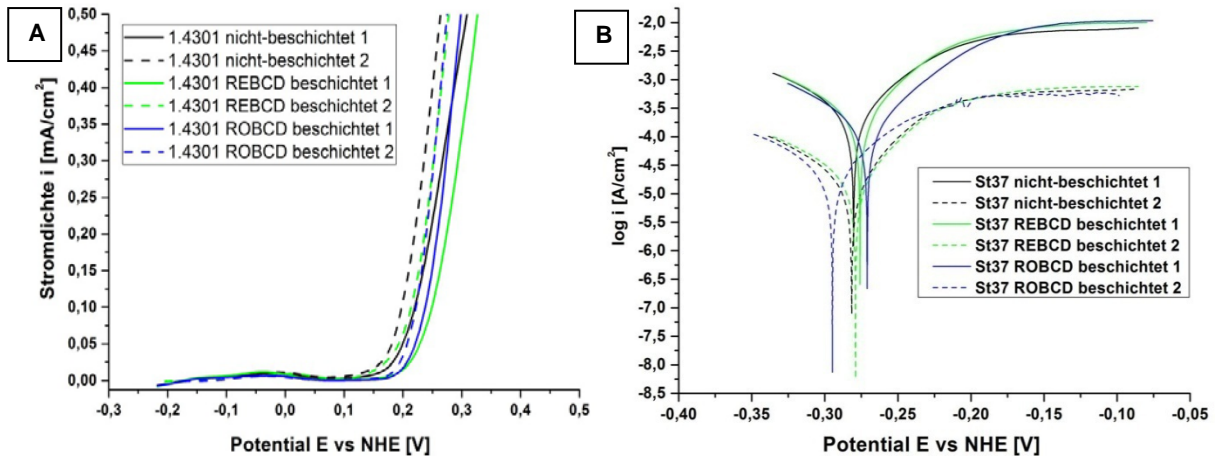


**Abbildung 14:** Stromdichte-Potential Kurve (log i Darstellung) von nach erweitertem Standardverfahren mit wasserunlöslichen CD's beschichtetem unlegiertem Stahl St37 nach einer Stunde Auslagerung in 0,2 M NaCl Lösung bei Raumtemperatur und aeroben, nicht-turbulenten Bedingungen. Start-Potential: OCP – 50 mV; Scan rate: 0,05 mV/sek.; Abbruch bei Stromdichte von 1,5 mA/cm<sup>2</sup>. Referenz-Elektrode: Silber/Silberchlorid; Gegen-Elektrode: Platindraht (Fläche A = 1 cm<sup>2</sup>).

Die nach erweitertem Standardverfahren mit ACBCD, REBCD und ROBCD modifizierten Proben der Werkstoffe 1.4301 und St37 wurden auch in 0,5 M HCl Lösung bei

Raumtemperatur und aeroben Bedingungen auf ihre Korrosionseigenschaften hin untersucht.

Wie in Abbildung 15A dargestellt, zeigen die Ergebnisse zur Lochbildung an nach erweitertem Standardverfahren mit REBCD und ROBCD beschichtetem Werkstoff 1.4301 im Vergleich zu nicht beschichteten Proben, weder eine positive (anodische) Verschiebung des Lochbildungspotentials noch eine Verringerung der Korrosionsstromdichte und somit keine Verbesserung der Korrosionseigenschaften.



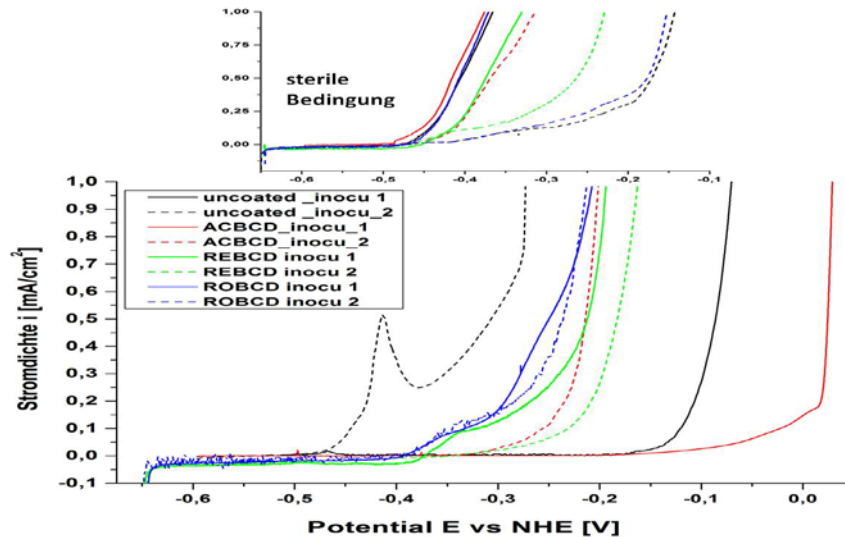
**Abbildung 15: Stromdichte-Potential Kurven von nach erweitertem Standardverfahren mit REBCD (grüne Linien) bzw. ROBCD (blaue Linien) beschichteten und nicht beschichteten (schwarze Linien) Werkstoffoberflächen nach einer Stunde Auslagerung in 0,5 M HCl Lösung unter aeroben, nicht-turbulenten Bedingungen und bei Raumtemperatur. A: Darstellung der Stromdichte  $i$  in Abhängigkeit des Potentials  $E$  für den hochlegierten Stahl 1.4301; Scan rate: 0,03 mV/sek. B: Darstellung  $\log$ -Werte der Stromdichte  $i$  in Abhängigkeit des Potentials  $E$  für unlegierten Stahl St37; 0,05 mV/sek. Start-Potential: OCP – 50 mV; Abbruch bei Stromdichte von 1,5  $\text{mA}/\text{cm}^2$ . Referenz-Elektrode: Silber/Silberchlorid; Gegen-Elektrode: Platindraht (Fläche  $A = 1 \text{ cm}^2$ ).**

Auch die Untersuchung zum Einfluss von REBCD bzw. ROBCD auf das Durchbruchpotential des Werkstoffs St37 in 0,5 M HCl zeigten, dass die Potentiale, bei denen der Werkstoff versagt und aktive Korrosionsprozesse einsetzen, mit Durchbruchpotentialen nicht beschichteter Kontrollen vergleichbar sind (siehe Abbildung 15B). Des Weiteren zeigte die Auswertung der Stromdichte-Potential Messungen für REBCD und ROBCD Beschichtungen im Vergleich zur nicht beschichteten St37 Kontrolle ähnliche Korrosionsstromdichten (262  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  für REBCD, 230  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  für ROBCD und 270  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  für die Kontrollen) und Polarisationswiderstände (43 Ohm für REBCD; 54 Ohm für ROBCD und 44 Ohm für die nicht beschichteten Kontrollen).

### 7.5.2 MIC durch SRB

Die Ergebnisse zum Einfluss der nach erweitertem Standardverfahren hergestellten Cyclodextrin-Beschichtungen auf MIC von unlegiertem Stahl (St37) während kurzer, anaerober und statischer Auslagerung (für 3 Tage) in *D. vulgaris* beimpfter Postgate C Nährlösung zeigten, wie in Abbildung 16 dargestellt, für ACBCD beschichtete Proben im Vergleich zu nicht beschichteten Kontrollen eine Verschiebung des Durchbruchpotentials in anodische Richtung. Eine Verringerung der Korrosionsstromdichte bzw. Erhöhung des Polarisationswiderstandes konnte nicht gezeigt werden. Die Untersuchung von mit ACBCD beschichtetem St-37 zeigte zudem, dass im Gegensatz zur SRB-beimpften Versuchsführung

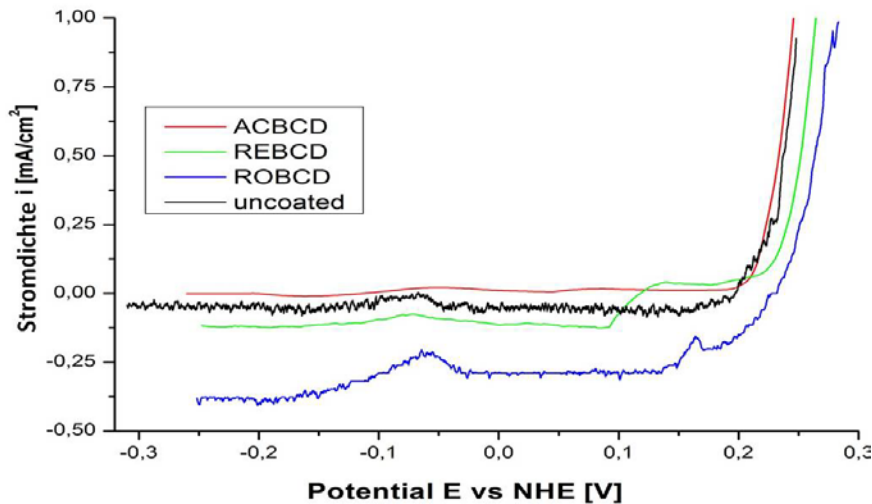
unter sterilen Bedingungen keine positive (anodische) Verschiebung beobachtet wurde (siehe Abbildung 16). Die Beschichtungen aus REBCD und ROBCD zeigten während MIC Versuchsreihen weder eine Verschiebung der Durchbruchpotentiale noch eine Verringerung der Korrosionsstromdichte (bzw. Erhöhung des Polarisationswiderstandes) und damit keine Verbesserung der Korrosionseigenschaften.



**Abbildung 16:** Stromdichte-Potential Kurve von nach erweitertem Standardverfahren mit ACBCD (rote Linien), REBCD (grüne Linien), ROBCD (blaue Linien) beschichteten Proben und nicht-beschichteten Kontrollen (schwarze Linien) des unlegierten Stahls St37 nach einer dreitägigen Auslagerung in mit SRB *D. vulgaris* beimpfem Postgate C (modi.) Nährmedium unter anaeroben, nicht-turbulenten Bedingungen und bei 37°C. Initiale Zellzahl:  $1 \cdot 10^7$  Zellen/ml. Diagramm im Diagramm zeigt den Kurvenverlauf unter sterilen Bedingungen. Start-Potential: -1300 bis 200 mV vs Referenz-Elektrode; Scan rate: 0,05 mV/sek.; Abbruch bei Stromdichte von 1,5 mA/cm<sup>2</sup>. Referenz-Elektrode: Quecksilber/Quecksilbersulfat; Gegen-Elektrode: Platinblech.

Die Auswertung der Gewichtsverluste zeigten aber nicht nur für ACBCD sondern auch für mit REBCD und ROBCD modifizierte Proben reduzierte Gewichtsverluste (im Vergleich zur Kontrolle eine Reduzierung von ca.: 30 % für ACBCD- und ROBCD- und 40% für REBCD-beschichtete Proben aus St37).

Wie in Abbildung 17 für den Werkstoff 1.4301 in *D. indonesiensis* beimpfter Postgate C (modifiziert) + 2% NaCl Nährlösung dargestellt, zeigten die Beschichtungen aus REBCD und ROBCD während der Versuchsreihen keine positive (anodische) Verschiebung der Lochbildungspotentiale, respektive zur nicht beschichteten Kontrolle. Die Beschichtungen scheinen jedoch die elektrochemischen Prozesse und die Lochbildung zu inhibieren, was durch eine Verringerung der Korrosionsstromdichte (bzw. Erhöhung des Polarisationswiderstandes) gezeigt wurde. Im Falle der ACBCD Beschichtung wird kein Einfluss auf das Lochbildungspotential und die Korrosionsstromdichte beobachtet.



**Abbildung 17: Stromdichte-Potential Kurven von nach erweitertem Standardverfahren mit ACBCD (rote Linien), REBCD (grüne Linien), ROBCD (blaue Linien) beschichteten Proben und nicht-beschichteten Kontrollen (schwarze Linien) des hochlegierten Stahls 1.4301 nach einer drei tägigen Auslagerung in mit SRB *D. indonesiensis* beimpfem Postgate C (modi.) + 2% NaCl Nährmedium unter anaeroben Bedingungen und bei 37°C. Initiale Zellzahl:  $1 \cdot 10^7$  Zellen/ml. Start-Potential: OCP – 50 mV; Scan rate: 0,03 mV/sek.; Abbruch bei Stromdichte von 1,5 mA/cm<sup>2</sup>. Referenz-Elektrode: Quecksilber/Quecksilbersulfat; Gegen-Elektrode: Platinblech (Fläche A = 2 cm<sup>2</sup>).**

### **7.5.3 Untersuchungen zur korrosionsinhibierenden Wirkung von CMBCD und CEBCD an (un)legiertem St-37 und 1.4301**

Mit Hilfe der Impedanzspektroskopie (EIS Methode) wurde die Wirkung von CMBCD und CEBCD an unlegiertem Stahl (St-37) in CD-haltiger (Konz.: 5 mg/ml) 0,2 M Natriumchlorid Lösung und an mit CMBCD und CEMCD beschichteten Proben aus hochlegiertem Stahl (1.4301) während einer 12 tägigen Auslagerung in mit *D. indonesiensis* beimpfter Postgate C (modi.) + 2% NaCl Nährlösung untersucht.

Die in Abbildung 18 als Nyquist-Diagramm dargestellten EIS Ergebnisse von St37 in CMBCD- und CEBCD-haltiger (Konz.: 5 mg/ml) 0,2 M NaCl-Lösung zeigten unter aeroben Bedingungen und Raumtemperatur eine geringe Steigerung des Polarisationswiderstands. Zu Beginn (nach zwei Stunden) der Auslagerung waren die Werte der Kontroll-Proben in CD-freier 0,2 M NaCl-Lösung (schwarze Kurve) im Vergleich zu den Werten für St37 in CD-haltiger Lösung (grüne und blaue Kurve) größer bzw. besser. Im weiteren Verlauf (nach 14 und 22 Stunden; siehe Abbildung 18) der Auslagerung sanken die Impedanz-Werte der Kontrollen jedoch schneller als im gleichen Zeitraum für St37 in CD-haltiger Lösung. Die größeren Halbkreis-Durchmesser für St37 in CD-haltiger Lösung nach 14 und 22 Stunden der Auslagerung sind ein Indiz für einen reduzierten Elektronentransfer an der Werkstoffoberfläche.

Durch weitere Untersuchungen mittels Zyklischer Voltammetrie (CV) konnte, wie in Abbildung 19 gezeigt, für St37 in CMBCD- und CEBCD-haltiger 0,2 M NaCl-Lösung gezeigt werden, dass die hier getesteten Cyclodextrine die kathodische Teilreaktion der elektrochemischen Korrosionsprozesse beeinflussen können und tatsächlich durch Bildung einer Barriere-Schicht den Ladungs- bzw. Elektronentransfer inhibieren.



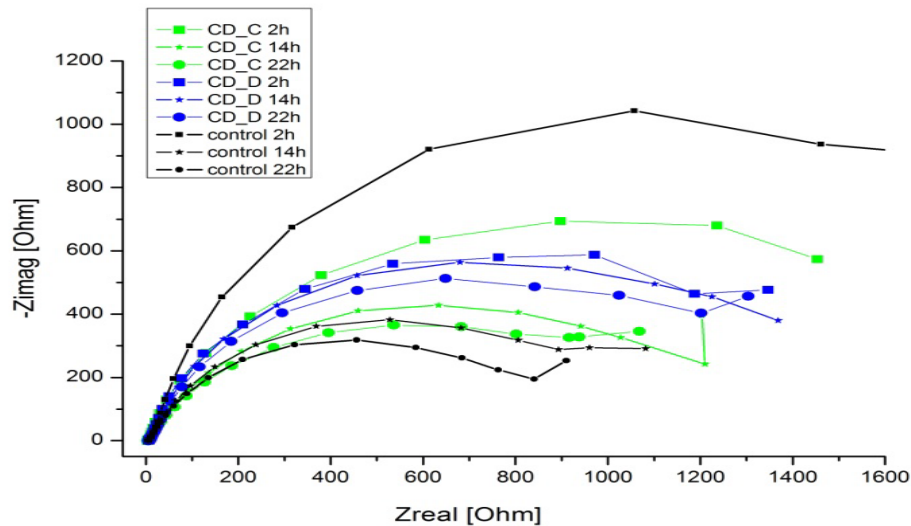


Abbildung 18: Nyquist-Darstellung der EIS-Spektren von unlegiertem Stahl St37 während einer 24 stündigen Auslagerung in CMBCD-haltiger (grüne Linien), CEBCD-haltiger (blaue Linien) 0,2 M NaCl Lösung und CD-freien (schwarze Linien) 0,2 molaren NaCl Kontroll-Lösung. - nach 2, 14 und 22 Stunden. Referenz-Elektrode: Silber/Silberchlorid; Gegen-Elektrode: Platinblech. CD-Konz.: 5 mg/ml. Messbereich: 50 kHz bis 5 mHz; Amplitude: OCP  $\pm$  5 mV. Messungen wurden unter aeroben Bedingungen und bei Raumtemperatur durchgeführt.

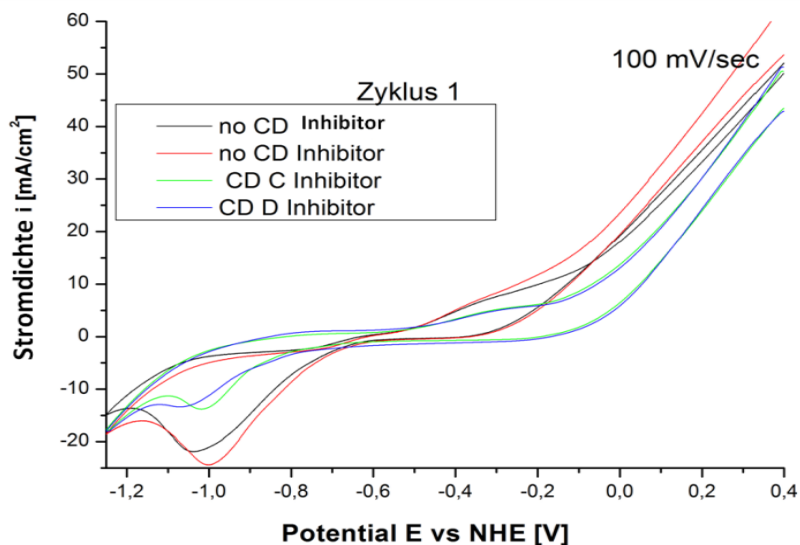
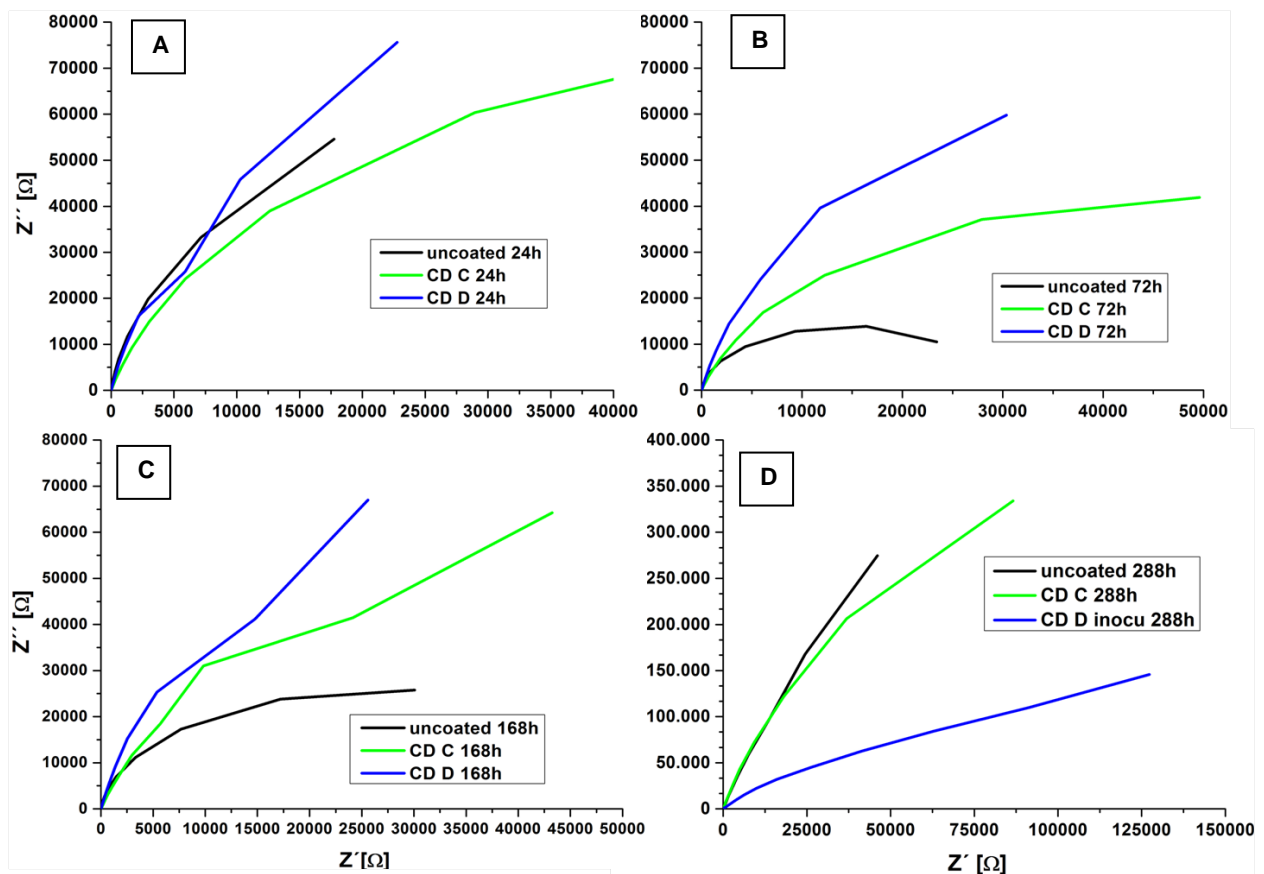


Abbildung 19: Zyklovoltammogramm (CV) von unlegiertem Stahl St37 nach einer achtstündigen Auslagerung in CMBCD-haltiger (grüne Linien), CEBCD-haltiger (blaue Linien) 0,2 M NaCl Lösung und CD-freien (schwarze Linien) 0,2 M NaCl Kontroll-Lösung. Darstellung des ersten Durchlauf-Zyklus. Start-Potential: OCP; Potentialbereich: -1450 bis 650 mV vs NHE; Vorschub-Geschwindigkeit: 100 mV/sek.. Referenz-Elektrode: Silber/Silberchlorid; Gegen-Elektrode: Platinblech (Fläche A = 2 cm<sup>2</sup>).

Für die nach Standardverfahren mit CMBCD bzw. CEBCD beschichteten Proben aus hochlegiertem Stahl 1.4301 wurde, wie in Abbildung 20 gezeigt, unter den gewählten Bedingungen (hier: 12 tägige Auslagerung in mit *D. indonesiensis* beimpfter Postgate C (modi.) + 2% NaCl Nährlösung unter anaeroben Bedingungen und bei 37°C) für einen kurzen Zeitraum während des bakteriellen Wachstums und der Oberflächenbesiedlung sogar eine deutliche Erhöhung der Impedanz-Werte beobachtet (siehe Nyquist-Diagramme in Abbildung

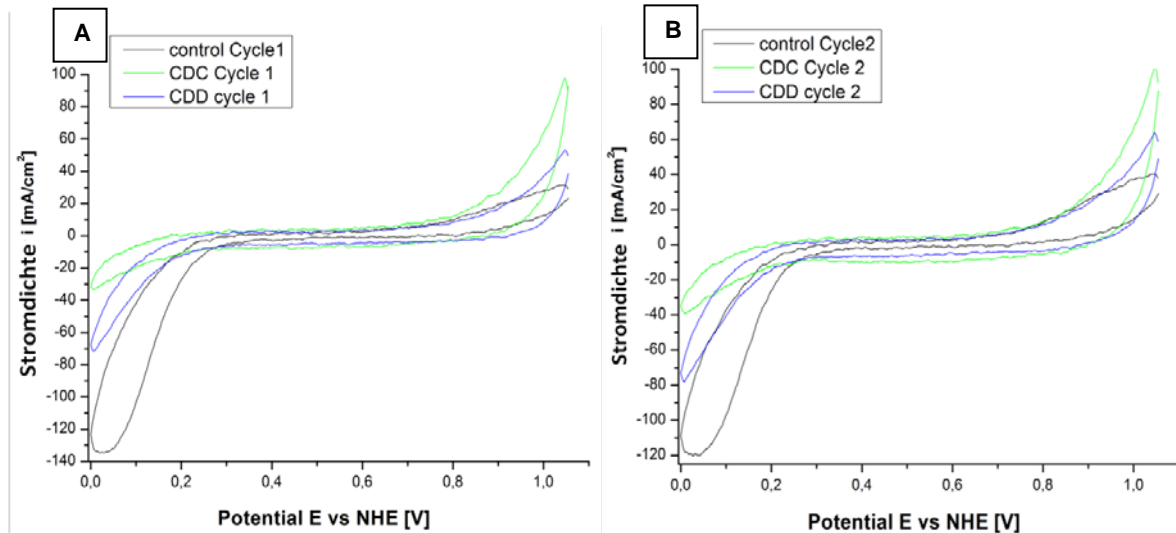
20). Im Fall der mit CD beschichteten Proben (grüne bzw. blaue Kurve) zeigte sich nach den ersten 24 Stunden der Auslagerung im Vergleich zur nicht-beschichteten Kontrolle kein Unterschied in den Impedanz-Werten, wie Diagramm A in Abbildung 20 darlegt. Ähnlich der Ergebnisse für St37 unter abiotischen Bedingungen, sanken die Werte der nicht-beschichteten Kontrollen im weiteren Verlauf der Auslagerung in bakteriell beimpfter Nährlösung schneller als die Werte für die CD beschichteten Proben. Wie die Diagramme B und C in Abbildung 20 zeigen, waren die Werte für CD beschichtete Proben (grüne und blaue Kurven) im Vergleich zur nicht beschichteten Kontrolle (schwarze Kurve) größer bzw. besser. Der erneute und deutliche Anstieg der Impedanz-Werte von sowohl CD beschichteten als auch nicht beschichteten Proben nach 12 Tagen Auslagerung (siehe Diagramm D in Abbildung 20) korreliert unter den hier gewählten MIC Bedingungen mit einer starken Abnahme der bakteriellen Zellzahl in planktonischer Phase (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Verbesserung der Korrosionseigenschaften zeigte sich aber nur unter MIC Bedingungen, während unter sterilen Versuchsbedingungen (Ergebnisse nicht gezeigt) keine deutliche Erhöhung beobachtet wurde.



**Abbildung 20:** Nyquist-Darstellung der EIS-Spektren von nach Standardverfahren mit CMBCD (grüne Linien), CEBCD (blaue Linien) beschichtetem hochlegiertem Stahl 1.4301 und nicht-beschichteten (schwarze Linien) Kontrollen während einer 12-tägigen Auslagerung in mit SRB *D. indonesiensis* beimpftem Postgate C (modi.) + 2% NaCl Nährmedium unter anaeroben Bedingungen und bei 37°C. Initiale Zellzahl:  $1 \cdot 10^7$  Zellen/ml. Referenz-Elektrode: Silber/Silberchlorid; Gegen-Elektrode: Platinblech. A: nach 1 Tag; B: nach 3 Tagen; C: nach 7 Tagen; D: nach 12 Tagen. Messbereich: 50 kHz bis 5 mHz; Amplitude: OCP  $\pm$  10 mV.

Die Ergebnisse der CV Untersuchung an CMBCD und CEBCD beschichtetem 1.4301 in 0,5 M  $K_2SO_4$  belegen, dass die Abgabe von Elektronen aus dem Werkstoff an das Hexacyanoferrat (III), welches als Oxidationsmittel der Elektrolytlösung zugefügt wurde, durch die Anwesenheit einer Barriere-Schicht aus Cyclodextrinen inhibiert wird, wodurch die Korrosion verringert werden kann.



**Abbildung 21: Zykelvoltammogramme (CV) von nach Standardverfahren mit CMBCD (grüne Linien), CEBCD (blaue Linien) beschichtetem legierten Stahl 1.4301 und nicht-beschichteten (schwarze Linien) Kontrollen nach einer 30 minütigen Auslagerung in einer 0,5 M  $K_2SO_4$  Lösung, die Kaliumhexacyanoferrat(III) als Signalmolekül für den Elektronentransfer in einer Konzentration von  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/l enthält. A: Darstellung des ersten Zyklus; B: Darstellung des zweiten Zyklus. Start-Potential: OCP; Potentialbereich: - 50 bis 1050 mV vs NHE; Vorschub-Geschwindigkeit: 100 mV/sek. Referenz-Elektrode: Silber/Silberchlorid; Gegen-Elektrode: Platinblech (Fläche  $A = 2 \text{ cm}^2$ ).**

## 7.6 Labororientierte Untersuchungen zum Einfluss der Cyclodextrin Adsorbate auf MIC und MICI

Untersucht wurde in 20 mL sowie 1000 mL Reaktoren der Einfluss der Cyclodextrine REBCD, ROBCD und ACBCD sowie zum Vergleich die in dem Vorgängerprojekt (16953 N) verwendeten Cyclodextrine CMBCD und CEBCD (letztere nur im 20 mL Maßstab) auf ihre korrosionsinhibierenden Eigenschaften sowie ihren Einfluss auf die Biofilmbildung.

### 7.6.1 Bestimmung der Oberflächenrauigkeit

In Vorversuchen wurde anhand des CD's CMBCD die inhibierende Wirkung wasserlöslicher Cyclodextrine auf chemische Korrosion in aerobem und anaerobem Milieu getestet. Hierzu wurden (un)belegte St37 Coupons 24 Stunden in Leitungswasser ausgelagert und anschließend ihre Oberflächenrauigkeit als Maß der Korrosion mittels Rasterkraftmikroskop bestimmt. Analog dazu wurden die Experimente mit den sich selbstverkettenden CD's REBCD und ROBCD sowie dem wasserunlöslichen CD ACBCD durchgeführt.

St37 Coupons zeigten vor und nach der Belegung mit Cyclodextrinen eine vergleichbare Rauigkeit ( $R_q = 228$  zu  $245 \text{ nm}$ ). Nach Auslagerung in anaerobem Leitungswasser stieg die Rauigkeit unbelegter Coupons auf  $358 \text{ nm}$ , die Rauigkeit belegter Coupons hingegen zeigte

mit 217 nm vergleichbare Werte. Nach Auslagerung im aeroben Leitungswasser zeigte sich jedoch eine deutliche Steigerung der Rauigkeit unbelegter und belegter Coupons mit jeweils 474 und 650 nm (siehe Tabelle 5).

**Tabelle 5: Bestimmung der Oberflächenrauigkeit (Rq) in nm nach 24h Auslagerung in (an)aerobem Leitungswasser von St37 Coupons (un)belegt mit CMBCD. Die Rauigkeit wurde exemplarisch an 2 Messungen mit je 5 gemessenen Arealen durchgeführt.**

	Anaerob vor Auslagerung	Anaerob nach Auslagerung	Aerob vor Auslagerung	Aerob nach Auslagerung
St37 unbelegt	228,4 ± 29,6	358,6 ± 47,9	244,5 ± 12,2	650,6 ± 189,4
St37 belegt	244,5 ± 12,2	217,3 ± 31,3	228,9 ± 29,6	474,5 ± 136,9

Cyclodextrin CMBCD zeigte wie erwartet einen Korrosionsschutz in anaerobem Milieu im Vergleich zur Kontrolle, jedoch zeigte sich kein Korrosionsschutz mehr in aerobem Milieu. Hier kam es zur Korrosion durch Sauerstoff. Die analog gemessenen CD's REBCD, ROBCD und ACBCD verhielten sich vergleichbar. Es wurde allerdings eine deutliche Sauerstoffkorrosion während aerober Auslagerung festgestellt. Da Rauigkeitsmessungen am AFM sehr zeitaufwändig sind, wurde auf die detaillierte Vermessung der weiteren CD-Varianten verzichtet, da hier kein weiterer Erkenntnisgewinn zu erwarten ist.

### **7.6.2 Untersuchungen im statischen Batchverfahren**

Untersuchungen in 20 mL Gefäßen zeigten im Vergleich zu einer nicht beschichteten Referenz eine (gemessen als Masseverlust) Verringerung der Korrosion, von bis zu 55 % (ACBCD), (siehe Abbildung 22).

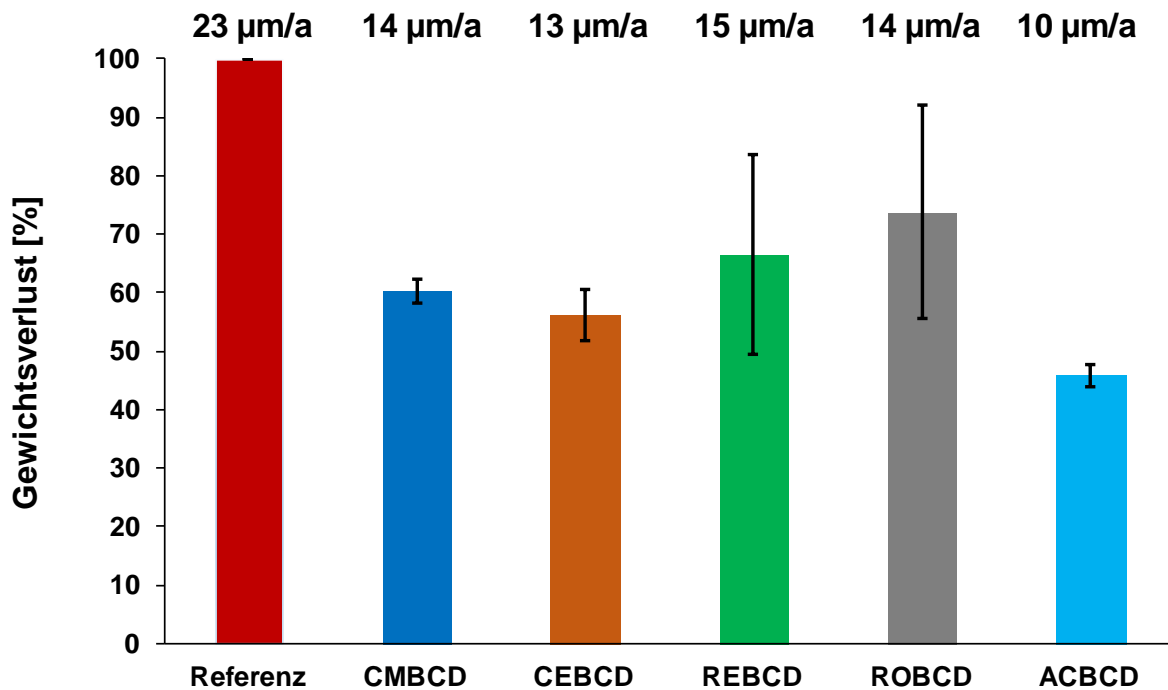
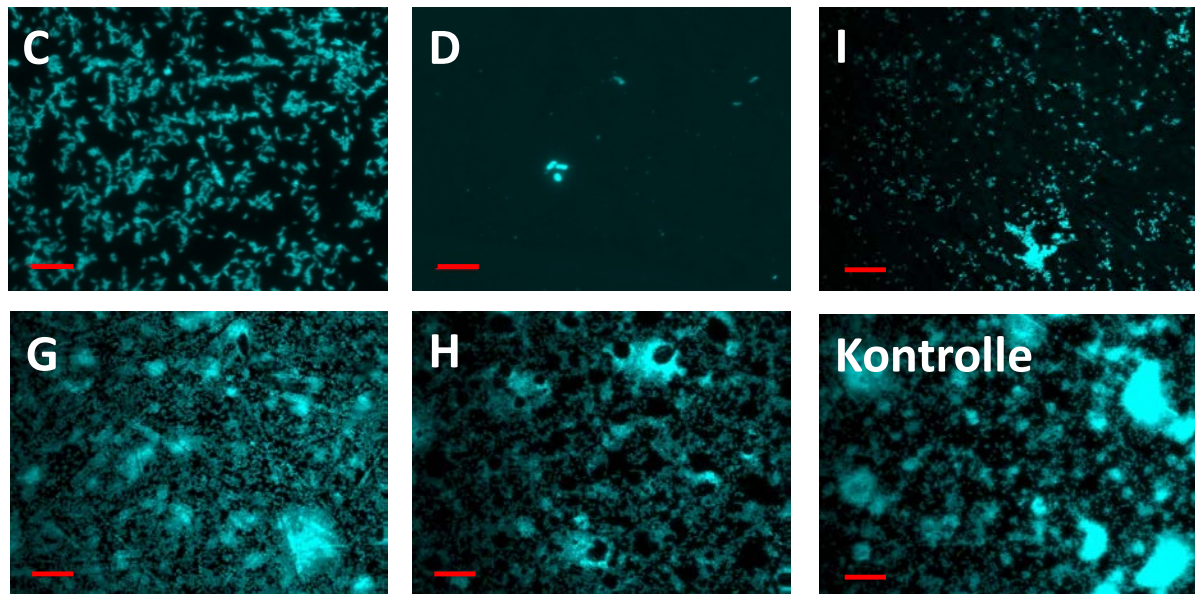


Abbildung 22: Gewichtsverlusttests mit verschiedenen Cyclodextrinen getestet an St37. Dargestellt wird die Verringerung des Gewichtverlusts durch die Beschichtung mit CD's in Prozent im Vergleich zu einer unbeschichteten Kontrolle nach 42 tägiger Auslagerung. Der Gewichtsverlust der Kontrolle wird dabei mit 100% gleichgesetzt. Zusätzlich wird der Abtrag in  $\mu\text{m/a}$  angegeben. Auslagerung mit *D. vulgaris* in Postgate C (modi) Nähmedium; 28°C; n = 3.

Unter den gegebenen Bedingungen zeigten die neuen CD's ROBCD und REBCD trotz ihrer potentiell höheren korrosionsinhibierenden Wirkung die insgesamt niedrigste korrosionsinhibierende Wirkung. Die CD's CMBCD und CEBCD zeigten vergleichbare Ergebnisse und die Variante ACBCD zeigte mit 10  $\mu\text{m}$  Abtragsrate pro Jahr im Vergleich zur Kontrolle (23  $\mu\text{m/a}$ ) die geringste Korrosion. Da nach 42 tägiger Auslagerung eine mikroskopische Auswertung der Biofilmbildung nicht möglich war, wurden Coupons des Werkstoffs 1.4301 mit den gleichen CD-Varianten beschichtet und für 7 Tage ausgelagert (siehe Abbildung 23).



**Abbildung 23:** Mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen von *D. vulgaris* auf mit verschiedenen Cyclodextrinen tauchbeschichteten Stahloberflächen. Die Kontrolle ist unbeschichtet, Die Proben C,D,I,G und H sind mit CD's beschichtet. C: CMBCD, D: CEBCD, I: ACBCD, G: REBCD und H: ROBCD. Die Skalierungsbalken für C und D entsprechen 10  $\mu\text{m}$  und für I, G und H 20  $\mu\text{m}$ . Beimpft mit *D. vulgaris*, ausgelagert für 7d bei 28°C in Postgate C (modi) Nährmedium, fluoreszenzmarkiert mit DAPI.

Eine Auswertung der Biofilmbildung nach 7 Tagen lässt nur einen bedingten Rückschluss auf die korrosionsinhibierende Wirkung der jeweiligen CD's zu. Insgesamt zeigten die Varianten CMBCD, CEBCD und ACBCD sowohl die geringste Korrosion als auch die geringste Biofilmbildung auf. Die Varianten CMBCD und CEBCD zeigen ein sehr ähnliches Korrosionsverhalten, zeigen jedoch unterschiedliche Eigenschaften zur Biofilmbildung. Hier wird deutlich dass um MIC erfolgreich zu verhindern nicht die Biofilmbildung gestoppt, sondern der Kontakt zwischen Biofilm und dem Substrat, also der Elektronenübergang verhindert werden muss.

### **7.6.3 Untersuchungen im geschüttelten Batchverfahren**

Im Zuge der sukzessiven Hochskalierung des Versuchsaufbaus wurden die neuen CD-Varianten REBCD, ROBCD und ACBCD ausgewählt und in einem 1000 mL geschüttelten Batch-Reaktor getestet. In Abbildung 24 wird der Gewichtsverlust und die Flächenbelegung der drei CD-Varianten im Vergleich zu einer nicht beschichteten Referenz gezeigt. Zusätzlich wird ebenfalls die Abtragsrate in  $\mu\text{m}$  pro Jahr angegeben. Das Hochskalieren des Reaktor-Volumens und das Erzeugen einer Strömung durch Schütteln geht einher mit einer erhöhten Abtragsrate. Der Abtrag pro Jahr steigt für die Referenz von 23 auf 276  $\mu\text{m/a}$  an. Ähnlich verhalten sich auch die beschichteten Proben. Dies zeigt dass eine Hochskalierung im Labor notwendig ist, um sich realen Bedingungen zu nähern. Die Wirkung der CD's ist vergleichbar bzw. teilweise besser als in vorangegangenen Tests. ACBCD zeigte die höchste inhibierende Wirkung (Reduktion der Korrosion um 69 %). Die sich selbstverkettenden CD's zeigten auch hier eine geringere Schutzwirkung und verringerten die Korrosion um bis zu 35 %. Die Ergebnisse korrelieren gut mit der nach 3 Tagen ermittelten initialen Biofilmbildung. Die im Mittel höchste Flächenbelegung zeigte die unbeschichtete Probe, gefolgt von ROBCD und REBCD beschichteten Proben. St37 Coupons beschichtet mit ACBCD zeigten sowohl die geringste Korrosion als auch die geringste Biofilmbildung. Zu beachten ist die insbesondere bei den Proben REBCD und ROBCD hohe Standardabweichung.

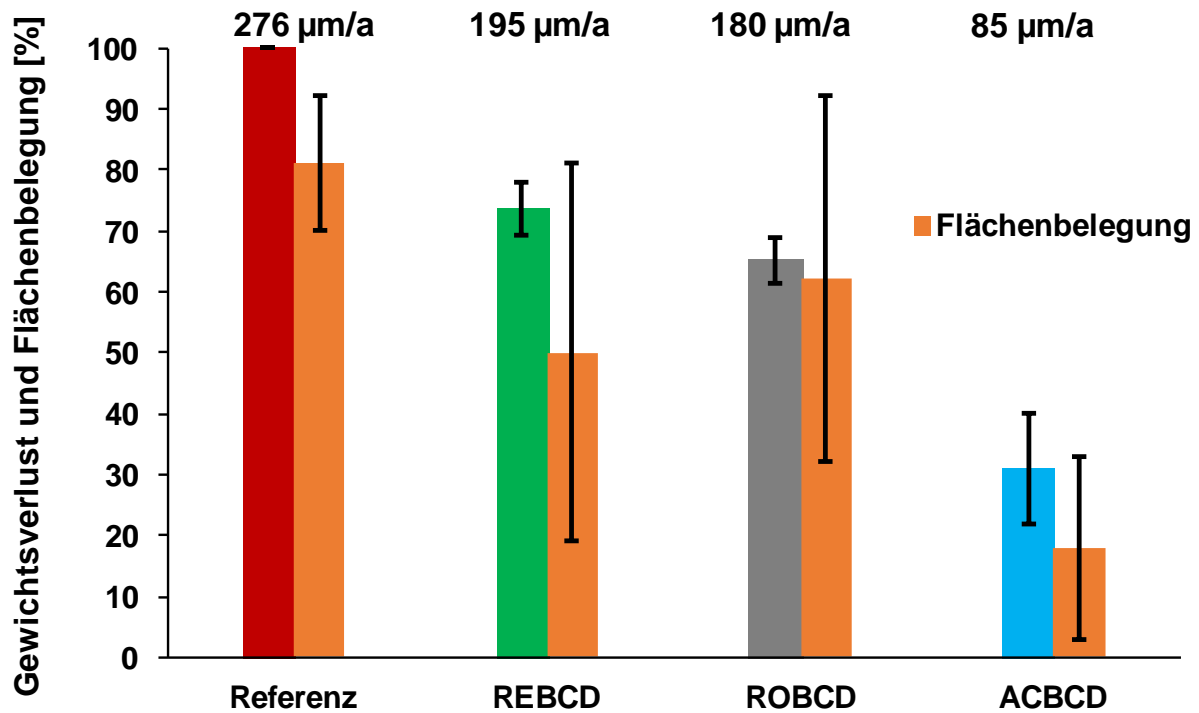
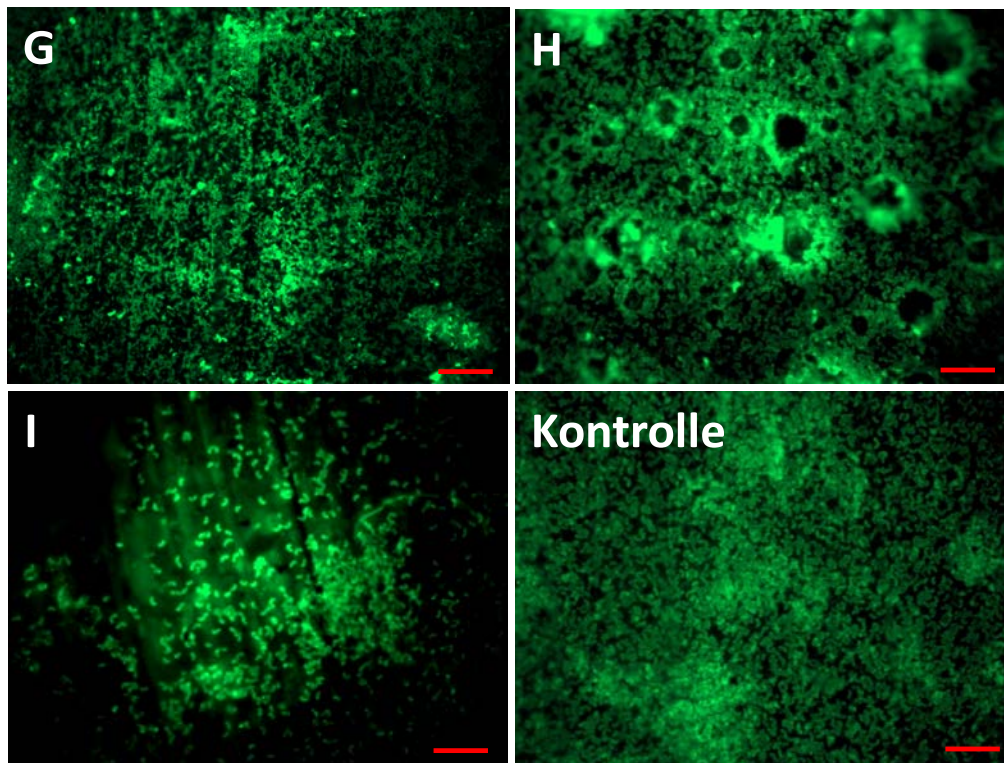


Abbildung 24: Gewichtsverlusttests und Flächenbelegung mit verschiedenen Cyclodextrinen getestet an St37. Dargestellt wird die Verringerung des Gewichtverlusts durch die Beschichtung mit CD's in Prozent im Vergleich zu einer unbeschichteten Kontrolle nach 21 tägiger Auslagerung. Der Gewichtsverlust der Kontrolle wird dabei mit 100% gleichgesetzt. Zusätzlich wird der Abtrag in  $\mu\text{m/a}$  angegeben. Die Flächenbelegung (Biofilmbildung) wird ebenfalls an St37 gezeigt, nach 3 tägiger Auslagerung. Auslagerung mit *D. vulgaris* in Postgate C (modi) Nähmedium; 28°C; für den Gewichtsverlust ist  $n = 3$  und für die Flächenbelegung ist  $n = 20$ .

Abbildung 25 zeigt beispielhaft, an je einem ausgewählten Bild die Biofilmbildung der in Abbildung 24 ermittelten Flächenbelegung.



**Abbildung 25:** Mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen von *D. vulgaris* auf mit verschiedenen Cyclodextrinen tauchbeschichteten Stahloberflächen. Die Kontrolle ist unbeschichtet, Die Proben G,H und I sind mit CD's beschichtet., G: REBCD, H: ROBCD und I: ACBCD. Die Bilder repräsentieren beispielhaft die in Abbildung 24 gezeigten Flächenbelegungen. Skalierungsbalken entsprechen 10 µm. Beimpft mit *D. vulgaris*, auslagert für 7d bei 28°C in Postgate C (modi) Nähmedium, fluoreszenzmarkiert mit DAPI.

#### **7.6.4 Untersuchungen und Aufbau eines realitätsnahen Simulationssystems**

Die Mini-Plant (Strömungsreaktor) wurde erfolgreich eingesetzt. Es konnten die Parameter pH und Redox-Potential in der Bulklösung gemessen werden. Zusätzlich wurde auch mittels Minielektroden direkt an der Phasengrenze Werkstoff/Flüssigkeit das Redox-Potential gemessen. Hierzu wurden vom Kurt-Schwabe-Institut miniaturisierte Redox-Potential Elektroden nach unseren Vorgaben hergestellt. Selbige können mittels einer Bohrung in den Ringsegmenten (Werkstoff St37 oder 1.4301) der Mini-Plant eingesetzt werden. Im späteren Projektverlauf wurden die Minielektroden von Biofilmen überwachsen und lieferten Messwerte aus der relevanten Phasengrenze Werkstoff/Biofilm. Ebenfalls konnte durch elektronisch gesteuerte Intervall-Begasung mit Druckluft und Stickstoff (6 h Intervall) und Anpassung der Nährmedien ein Sulfuretum aus SRB und SOB simultan in der Mini-Plant realisiert werden. Zu dem Medium Postgate C wurde zusätzliche 1 g Natriumthiosulfat gegeben und die Menge an Laktat von 4,2 mL auf 2 mL reduziert. So konnte der synergistische Angriff von SOB und SRB auf den Werkstoff St37 gezeigt werden. Auf eine Simulation von MIC durch SRB, SOB und MOMO wurde verzichtet. Erfahrungswerte aus der Fachliteratur zeigen, dass manganoxidierende Bakterien keinen Einfluss auf die Korrosion von St37 haben. Ebenfalls zeigte bereits der synergistische Angriff von SRB und SOB dass die aufgetragenen Schutzschichten keinen ausreichenden Schutz unter wechselnden Sauerstoffbedingungen bieten.



In Abbildung 26 wird der Gewichtsverlust in Prozent im Vergleich mit einer nicht beschichteten Referenz dargestellt, zusätzlich wird die Abtragsrate angegeben. Gezeigt sind zwei Läufe der Mini-Plant welche simultan, jedoch in zwei von einander unabhängigen Messtrecken mit eigenen Fermentern, Ring-Segmenten und Proben durchgeführt wurden (zwei separate Mini-Plants). Der Kontrolllauf zeigt den Gewichtsverlust und die Abtragsrate in sterilem Medium und der inokulierte Lauf zeigt das selbe in Anwesenheit des Schadorganismus *D. vulgaris*.

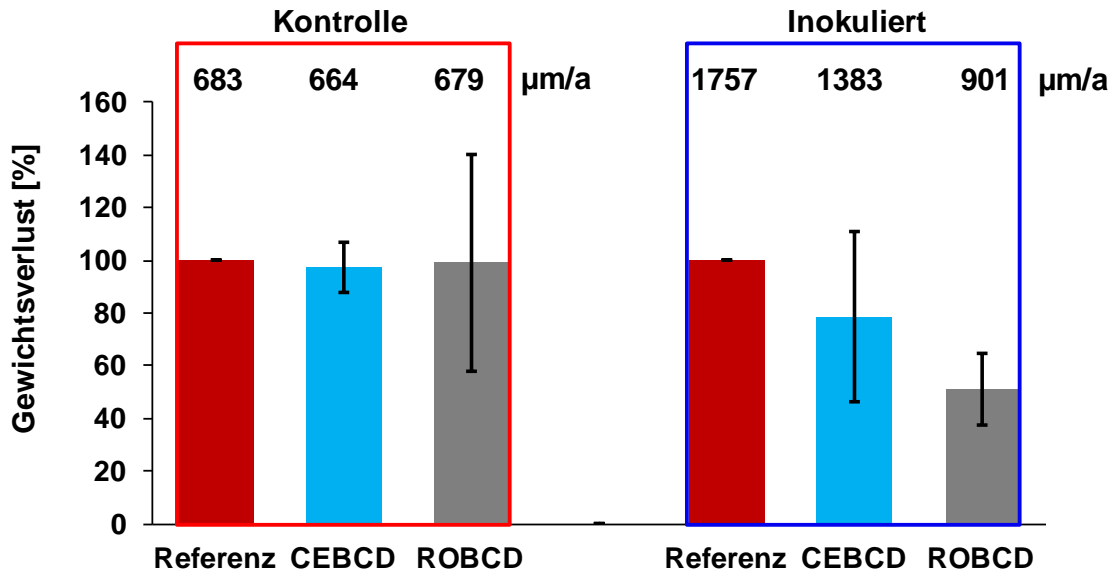


Abbildung 26: Gewichtsverlusttests in der Mini-Plant mit zwei verschiedenen Cyclodextrinen getestet an St37. Dargestellt wird die Verringerung des Gewichtverlusts durch die Beschichtung mit CD's in Prozent im Vergleich zu einer unbeschichteten Kontrolle nach 42 tägiger Auslagerung. Der Gewichtsverlust der Kontrolle wird dabei mit 100% gleichgesetzt. Zusätzlich wird der Abtrag in µm/a angegeben. Auslagerung mit *D. vulgaris* in Postgate C (modi) Nähmedium; 20°C; n = 2.

Für den Kontrolllauf zeigten die Referenz und die beschichteten Coupons vergleichbare Abtragsraten zwischen 664 und 683 µm/a.

Für den inokulierten Lauf lag die Referenz um den Faktor 2,5 höher bei 1757 µm/a und verdeutlicht den Einfluss der Bakterien auf die Korrosionsrate. Es zeigte sich hier auch dass ein weiteres Hochskalieren von Laborversuchen auf ein praxisnahes Simulationssystem mit separatem Reaktor und Laufstrecke zu einer Erhöhung der Abtragsrate führt. Über alle Versuche hinweg zeigte die Mini-Plant die absolut gesehen höchsten Abtragsraten. Die Steigerung in Vergleich zu statischen Versuchen liegt bei bis zu Faktor 80.

ROBCD zeigte mit 49 % Reduktion des Gewichtverlusts im Vergleich zu einer nicht beschichteten Referenz die höhere Schutzwirkung, CEBCD erzielte 20 %. Die Abtragsrate der ROBCD beschichteten Coupons lag im Bereich der Kontrollcoupons. ROBCD zeigt somit eine hohe Schutzwirkung und reduziert die Korrosionsrate um ca. 50%.

Während des gesamten Versuchszeitraums lag der Sauerstoff Gehalt im Bulk-Wasser bei ≤ 0,4 mg/L. Der pH-Wert in der Kontrolle und im inokulierten Reaktor lagen zwischen 7,0 und

8,4 sowie 7,5 und 9,0. Eine detaillierte Betrachtung des Redox-Potentials der Mini-Elektroden kann nicht beigebracht werden da die erzielten Ergebnisse durch häufige Störungen und Fehlmessungen keine Aussage über das Redox-Potential liefern konnten. Es wird angenommen, dass die Mini-Elektroden aufgrund der geringen Ströme, welche zum Messverstärker fließen, sehr stör anfällig sind. Weiter wird angenommen, dass Präzipitate wie Eisensulfid (entstanden aus biogenem  $H_2S$  und im Korrosionsprozess freiwerdenden Eisenionen) sich auf den Mini-Elektroden abgelagert und ein klares Messsignal verhindert haben. Ebenfalls ist es trotz Anschaffung neuer Messverstärker und speziell angefertigter pH Mini-Elektroden nicht möglich gewesen, ein stabiles Signal unter den gegebenen Bedingungen zu erhalten.

Weitere Untersuchungen zu der Schutzwirkung von REBCD und ACBCD in der Mini-Plant zeigten z. T. widersprüchliche Ergebnisse. Eine Schutzwirkung von REBCD konnte zu keinem Zeitpunkt festgestellt werden. Der Gewichtsverlust war vergleichbar mit dem einer unbeschichteten Referenz. Versuche in der Mini-Plant mit ACBCD zeigten, im Gegensatz zu Versuchen im Batchverfahren keine Schutzwirkung oder steigerten den Gewichtsverlust um bis zu 33 % im Vergleich mit einer unbeschichteten Referenz. Diese Ergebnisse sind zwar teils widersprüchlich, jedoch sind sie im Einklang mit den elektrochemischen Untersuchungen welche für REBCD bzw. ACBCD keine Schutzwirkung oder eine Verringerung der Resistenz gegen Korrosion von Stählen anzeigen. Es ist davon auszugehen, dass zwar der Fermenter während des Versuchs unter mikroaerophilen Bedingungen ( $0,4 \text{ mg/L O}_2$ ) gehalten wurde, jedoch bereits geringe Mengen an Sauerstoff zur Bildung von Eisenhydroxid ausreichen, um in Teilen die Adsorbate abzulösen und Angriffsstellen für die Schadorganismen zu bieten. Diese Annahme basiert auf der Beobachtung, dass neben schwarzen Ablagerungen ( $FeS$ ) auch rostrote Ablagerungen (vermutlich Eisenhydroxide) zum Ende der Messung auf den Coupons zu erkennen waren. In Experimenten wie in Abbildung 26 gezeigt, führte die Stoffwechselaktivität der SRB zu derart hohen Konzentrationen von  $H_2S$  (Sensorisch gemessen durch Geruch und Ausfällung in einer Acetat-Lösung), dass der gelöste Sauerstoff lokal keinen Einfluss auf die Korrosion hatte oder dass die niedrigen Redox-Potentiale eine Sauerstoff-Korrosion verhindert haben.

In Abbildung 27 wird der Gewichtsverlust in Prozent im Vergleich mit einer nicht beschichteten Referenz dargestellt, zusätzlich wird die Abtragsrate angegeben. Gezeigt sind zwei Läufe der Mini-Plant, welche simultan, jedoch in zwei von einander unabhängigen Messstrecken mit eigenen Fermentern, Ring-Segmenten und Proben durchgeführt wurden (zwei separate Mini-Plants). Der Kontrolllauf zeigt den Gewichtsverlust und die Abtragsrate in sterilem Medium und der inokulierte Lauf zeigt das selbe in Anwesenheit der Schadorganismen *D. vulgaris* und *Thiomonas (T.) intermedia*. Hier wurde ein Sulfuretum bestehend aus SRB und SOB durch 6 stündige Begasung im Wechsel mit Stickstoff und Druckluft erstellt.

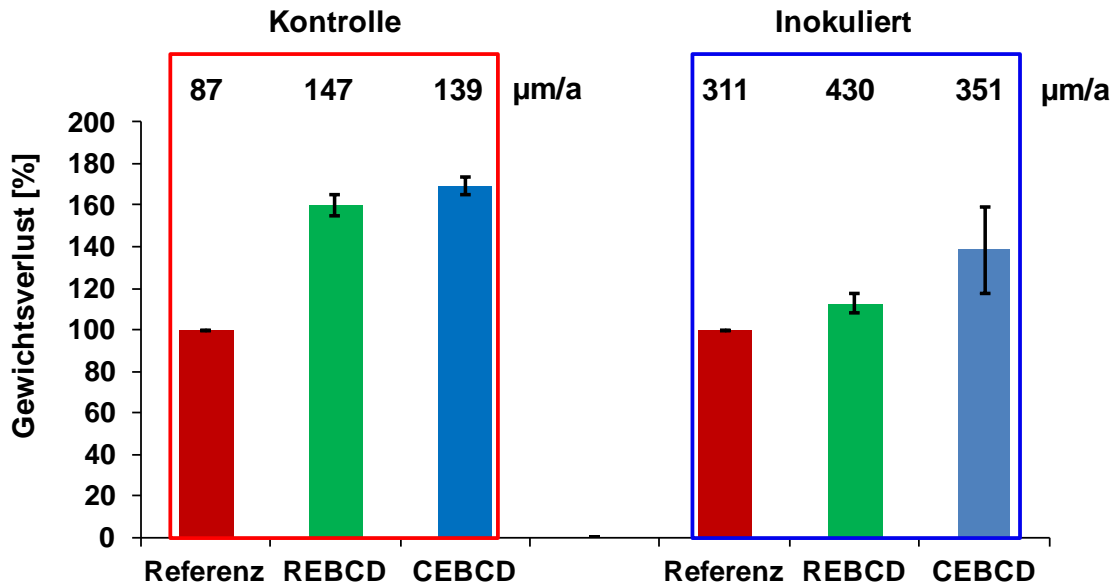


Abbildung 27: Gewichtsverlusttests in der Mini-Plant mit zwei verschiedenen Cyclodextrinen getestet an St37. Dargestellt wird die Verringerung des Gewichtverlusts durch die Beschichtung mit CD's in Prozent im Vergleich zu einer unbeschichteten Kontrolle nach 42 tägiger Auslagerung und 6 stündiger wechsel Begasung mit Stickstoff und Druckluft. Der Gewichtsverlust der Kontrolle wird dabei mit 100% gleichgesetzt. Zusätzlich wird der Abtrag in  $\mu\text{m/a}$  angegeben. Auslagerung mit *D. vulgaris* und *T. intermeda* in Postgate C (modi) Nähmedium; 20°C; n = 2.

Der Gewichtsverlust und die Abtragsrate der beschichteten Coupons sind in beiden Fällen höher als der einer nicht beschichteten Referenz. Dies ist in keinem der bisherigen Experimente beobachtet worden, da dies sowohl für die Kontrolle als auch für die inokulierten Proben gilt, scheint der Sauerstoff der entscheidende Faktor zu sein. Es zeigte sich ebenfalls, dass die Abtragsraten niedriger sind als in vorangegangenen Mini-Plant Experimenten. Die gängige Theorie der Sauerstoffkorrosion besagt, dass nach einer anfänglichen hohen Korrosionsrate sich eine Diffusionsbarriere aus Eisenoxiden bildet, welche den Stahl zum Teil vor weiterer Korrosion schützt. Die Cyclodextrine scheinen hier einen negativen Effekt zu haben. Es zeigte sich aber auch hier, dass die mikrobiell beeinflusste Korrosion zu deutlich höheren Korrosionsraten führt. Dies könnte durch in der Bulk-Lösung und in Biofilmen auf dem Werkstoff entstehende Stoffwechselprodukte wie  $\text{H}_2\text{S}$  und  $\text{H}^+$ -Ionen begründet sein. Die sich ausbildende Diffusionsbarriere aus Eisenoxiden schützt den Stahl dagegen nicht. Während des gesamten Versuchszeitraums lag der Sauerstoffgehalt im Bulk-Wasser zwischen 0,4 und 0,8 mg/L unter Stickstoff Begasung und zwischen 7,8 und 8,1 mg/L unter Druckluft Begasung. Der pH-Wert in der Kontrolle und des inokulierten Reaktors lagen zwischen 8,0 und 8,5 sowie 7,8 und 8,5. Während des Experiments wurden die Fermenter je zu Anfang und Ende beprobt und es wurde qualitativ bestätigt, dass sich SRB und SOB in der Teststrecke befanden. Dies zeigt, dass ein Sulfuretum erfolgreich etabliert wurde. Da der synergistische Angriff von SRB und SOB sowie die Sauerstoffkorrosion nicht vermuten lassen, dass andere Cyclodextrine eine höhere Schutzwirkung aufweisen, wurde auf weitere Tests im Sulfuretum verzichtet. Gleiches gilt für den synergistischen Angriff von SRB, SOB und MOMO.

## 7.7 Praxisnahe Auslagerung von Cyclodextrin beschichteten Proben

Abbildung 28 zeigt die auf einem Probenhalter montierten Proben nach 174 Tagen im Wärmetauscher.

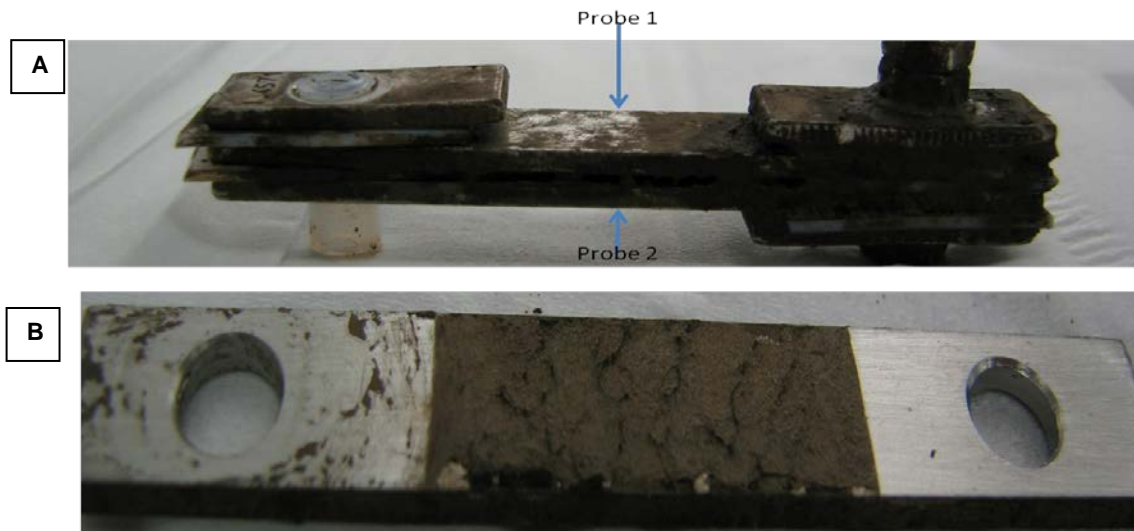


Abbildung 28: Beispielhafte Darstellung des Erscheinungsbilds der Coupons nach 174 Tagen im Wärmetauscher und einer Betriebslaufzeit des Wärmetauschers von 2391 Stunden. Darstellung der montierten Proben (A) und nach Demontage jeder Probe (B).

### 7.7.1 Werkstoffkundliche Untersuchung

Wie die Bilder A und B in Abbildung 28 verdeutlichen, zeigten die mit CEBCD beschichteten Werkstoffproben aus 1.4301 und 1.4571 nach ihrem Ausbau aus dem Wärmetauscher und der Demontage vom Probenhalter eine Ablagerung von Sedimenten auf den Oberflächen beider Werkstoffe. Die abgelagerten Sedimente befanden sich hauptsächlich auf der Probenmitte im Bereich der während der Auslagerung der flüssigen/gasförmigen Phase ausgesetzt war.

Die gereinigte und mit Urotropin-Lösung gebeizte Oberfläche ist in Abbildung 29B dargestellt. Die Proben zeigten unter den turbulenten Bedingungen während der Praxisorientierten Auslagerung in einem Wärmetauscher im Vergleich zu nicht-beschichteten Kontrollen (Ergebnisse nicht dargestellt) keine überlegenen Schutzeigenschaften auf. Wie die roten Markierungen verdeutlichen, neigten die Proben unter den gewählten Bedingungen zur Korrosion in Form von Lochbildung. Abbildung 29A zeigt den mit CEBCD beschichteten hochlegierten Stahl 1.4301 vor der Auslagerung im Wärmetauscher.



Abbildung 29: Darstellung der nach Standardverfahren mit carboxyethyl- $\beta$ -Cyclodextrin (CEBCD) beschichteten Coupons vor (A) und nach (B) Auslagerung und Reinigung der Proben aus hochlegiertem Stahl.

Wie die REM Aufnahme in Abbildung 30 zeigt, konnte keine Cyclodextrin-Beschichtung bzw. Rückstände nach dieser Versuchsreihe gefunden werden. Die EDX-Untersuchung deutet an, dass der Kohlenstoff-Gehalt verglichen mit den CEBCD Proben vor Auslagerung (Ergebnisse nicht gezeigt) insgesamt höher ist. Ein Vergleich der CEBCD beschichteten Proben mit nicht-beschichteten Kontrollen zeigte keine mess- bzw. erkennbaren Unterschiede. Anhand dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die Beschichtungen unter den gewählten Bedingungen (variierende Temperatur und Flussgeschwindigkeit zwischen 0,1 bis 0,2 m/sek.) keine Haft-Stabilität aufweisen und aufgrund der Schichtauflösung keine Verbesserung der Korrosionseigenschaften bewirken.

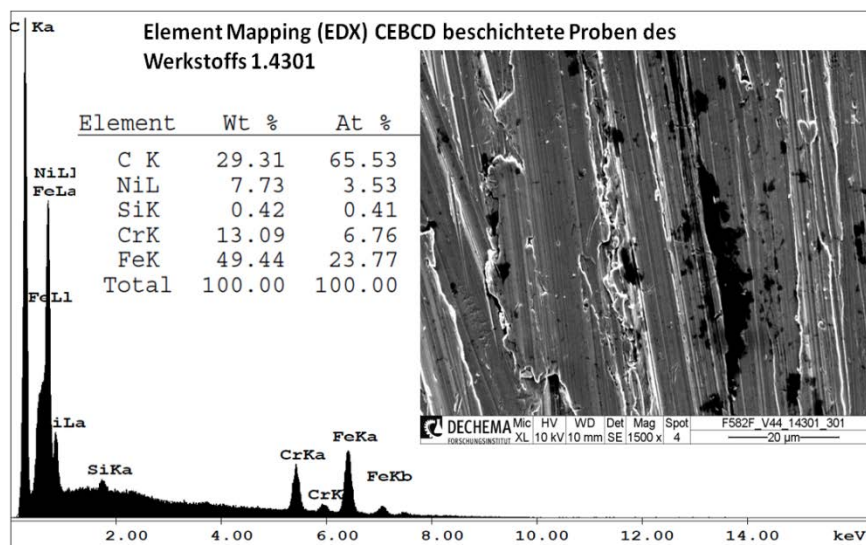


Abbildung 30: REM Aufnahme und Element-Mapping (EDX) von nach Standardverfahren mit CEBCD beschichtetem Werkstoff 1.4301 nach Auslagerung der Proben im Wärmetauscher auf dem Gelände des Industrieparks Höchst und Nachbehandlung der Werkstoffproben. Beschleunigungsspannung 10 keV.

### 7.7.2 Mikrobiologische Untersuchung

Nach der Auslagerung im Industriepark Höchst wurden die Proben mikrobiologisch charakterisiert und die Zellzahlen von 4 Organismen-Gruppen bestimmt (siehe Tabelle 6). Die beprobte Fläche betrug 8 cm<sup>2</sup>.

**Tabelle 6: Die Werkstoffe 1.4301 und 1.4571 wurde je in Doppelbestimmung mit dem Cyclodextrin CEBCD beschichtet, Ausgelagert und anschließend auf vier Gruppen von Mikroorganismen hin untersucht. Die Zellzahlen werden für die moderat acidophilen (A) sowie Mangan oxidierenden Bakterien (B) in Zellen/cm<sup>2</sup> und für die chemoorganotrophen Bakterien (C) sowie für Pilze (D) in KBE/cm<sup>2</sup> angegeben.**

Mikroorganismen	Werkstoffe			
	1.4301 (1)	1.4301 (2)	1.4571 (1)	1.4571 (2)
A	$1,88 \times 10^2$	$5,75 \times 10^2$	$5,75 \times 10^2$	$1,16 \times 10^2$
B	$5,75 \times 10^3$	$1,38 \times 10^3$	$3,00 \times 10^2$	$3,00 \times 10^2$
C	$4,13 \times 10^6$	$6,44 \times 10^5$	$3,88 \times 10^5$	$6,38 \times 10^5$
D	$1,00 \times 10^4$	$8,13 \times 10^3$	$2,38 \times 10^3$	$2,63 \times 10^3$

Im Mittel zeigte der Werkstoff 1.4571 eine leicht niedrigere Besiedlung im Vergleich zum Werkstoff 1.4301. Dies äußert sich aber vor allem durch die starke Besiedlung der Probe 1.4301 (1), welche bis zu einer Log-Stufe höhere Zellzahlen aufweist. Ob dies am Werkstoff oder ggf. an der Einbauposition liegt kann nicht abschließend geklärt werden. Insgesamt sind moderat acidophile Bakterien mit bis zu  $5,75 \times 10^2$  Zellen/ cm<sup>2</sup> am wenigsten häufig vertreten. Mangan oxidierende Bakterien sind mit  $5,75 \times 10^3$  Zellen/ cm<sup>2</sup> stärker vertreten. Die Gesamtzahl an chemoorganotrophen Bakterien liegt mit  $3,88 \times 10^5$  bis  $4,13 \times 10^6$  KBE/mL deutlich darüber. Die Gesamtzahl an Pilzen liegt mit  $2,38 \times 10^3$  bis  $1,00 \times 10^4$  unter der Gesamtzahl an chemoorganotrophen Bakterien. Dies zeigt, dass sich auf der Oberfläche ein heterogener Bewuchs aus verschiedenen Organismen-Gruppen gebildet hat. Die Anwesenheit von moderat acidophilen und Mangan oxidierenden Bakterien ist ein Indikator für die Möglichkeit von MIC und kann die Lochbildung der in Abbildung 29 gezeigten Probe erklären.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Beschichtung mit dem wasserlöslichen Cyclodextrin CEBCD die Besiedlung der Oberfläche nicht verhindern konnte. Dies ist jedoch auch nicht notwendig, da lediglich der Kontakt zwischen Bakterien und dem darunter liegenden Stahl verhindert werden muss, um einer mikrobiologisch induzierten Korrosion vorzubeugen. Die Untersuchungsergebnisse weisen jedoch daraufhin dass die Beschichtung mit CEBCD über den gewählten Zeitraum keine ausreichende Schutzwirkung aufwies.

## **8 Praktischer Nutzen der Ergebnisse**

### **8.1 Wissenschaftlich-technischer Nutzen der erzielten Ergebnisse und Transfermaßnahmen zur industriellen Anwendung speziell durch KMU**

Das System zum Testen von wasserlöslichen sowie nicht wasserlöslichen Cyclodextrinen hinsichtlich ihrer Eignung für den Korrosionsschutz von Eisen- und Stahlwerkstoffen in wässrigen Lösungen wurde weiterentwickelt und vertiefende Analysen der Adsorbate wurden durchgeführt. Cyclodextrine zählen zu der Gruppe der biogenen Substanzen, mit denen der innovative Ansatz des Projekts realisiert werden soll: Der gezielte Einsatz biogener Substanzen, die ohne Gefährdungspotential sind, sollen die bisherigen umweltrechtlich bedenklichen Biozide sukzessive ersetzen. Im Idealfall bilden sich durch die hier entwickelten Cyclodextrine Adsorbatschichten welche sich durch einen einzelnen Tauchgang relevanter Werkstoffe realisieren lassen. Hierzu wurde erheblicher Forschungsaufwand betrieben, welcher zu Erkenntnisgewinn in folgenden Forschungsbereichen geführt hat:

#### Forschungsbereiche:

- Werkstoffkundlich:

Es konnte gezeigt werden, dass zwischen den wasserunlöslichen Cyclodextrinen und den Werkstoffoberflächen Interaktionen erfolgen. Jedoch sind weitere Vorbehandlungen nötig, um eine ausreichend effiziente Adsorbatbildung durch die in Wasser „selbstverkettenden“ Cyclodextrin-Varianten zu erzielen. Insbesondere gilt es, die Stabilität der Adsorbate zu erhöhen. Für KMU ergeben sich hier weitere Betätigungsfelder. Unternehmen, welche Formulierungen für Schutzanstriche entwerfen und solche Substanzen vermarkten, könnten anhand der Ergebnisse durch Entwicklung anwendbarer Applikationsverfahren sowohl die Wettbewerbsfähigkeit als auch die horizontale Diversifikation bezüglich des Produktangebots erhöhen.

- Mikrobiologisch (biologisch-chemisch):

Es konnte gezeigt werden, dass Cyclodextrine eine Wirkung sowohl gegen die bakterielle Besiedlung als auch gegen (Bio-)Korrosion haben. Der Einsatz von wasserunlöslichen Cyclodextrinen, welche sich in wässrigem Milieu selbst verketteten, ist hoch innovativ und stellt eine deutliche Vereinfachung des Beschichtungskonzeptes dar. Ebenfalls bieten die Erkenntnisse aus dem Vorläuferprojekt in Kombination mit den neu entwickelten Cyclodextrinen Anlass, den Zusammenhang zwischen chemischer Struktur und Wirkung auf die bakterielle Besiedlung weiter zu untersuchen und so neue Aktivitätsfelder im Bereich der Mikrobiologie zu etablieren.

- Chemisch–technisch:

Durch die gewonnenen Erkenntnisse im Bereich der Cyclodextrine bietet es sich für KMU an, Cyclodextrine gezielt zu funktionalisieren, ihre Einsetzbarkeit zu erweitern und so die Wettbewerbsfähigkeit der KMU zu steigern. Zudem ist eine industrielle Produktion solcher Substanzen auch in größerem Maßstab umsetzbar.

#### Beitrag zur Steigerung der Leistungs- und Wettbewerbsfähigkeit der KMU

Unternehmen, die diese neuartige Technik in die betriebliche Praxis einbeziehen, befinden sich vor dem Hintergrund der Umweltverträglichkeit und (der zu erwartenden) Preiswürdigkeit des Produktes auf einem hohen Innovationsstand und erfüllen die zunehmend strenger werdenden Umweltschutzrichtlinien in besonderem Maße. Hieraus erklärt sich ein erheblicher Wettbewerbsvorteil. Da die üblich verwendeten Biozide aufgrund der EU-Biozidrichtlinie nicht mehr eingesetzt werden dürfen, besteht ein dringender Bedarf an neuen umweltfreundlichen Schutzmechanismen.

Der besondere Nutzen für KMU kann damit begründet werden, dass Unternehmen, welche Formulierungen für Schutzanstriche entwerfen und solche Substanzen vermarkten, vorwiegend zu den KMU zählen. Der innovative Ansatz des Projekts kann im Sinne einer gesteigerten Wettbewerbsfähigkeit nicht nur die Substitution umweltbelastender Schutzanstriche gewährleisten, sondern auch eine Erweiterung der Produktpalette der KMU, also eine horizontale Diversifikation, ermöglichen. Idealerweise könnte dies auch zur Existenzgründung von neuen KMU führen, die innovative Produkte erfolgreich in einer Marktnische vertreiben.

Die im Projektrahmen gesetzten Teilziele sollen zu einem tieferen Verständnis der (bio)korrosionsinhibierenden Wirkung der funktionalisierten Cyclodextrin-Adsorbate, ihrer Langzeitbeständigkeit sowie potentieller Einsatzgebiete und in der Praxis anwendbarer Applikationsverfahren führen. Aufgrund dessen sind diese Teilziele nicht branchenspezifisch. Der Praxisbezug sollte es Unternehmen kurzfristig ermöglichen, die Ergebnisse selbstfinanziert umzusetzen.

Das Projekt beinhaltet darüber hinaus ein großes Innovationspotential hinsichtlich weiterer Optimierung der Cyclodextrine. Dieses wird aufgrund der grundlegenden Fragestellungen erst mittelfristig wirtschaftlich nutzbar sein. Hierzu sind stärker auf die Anwendung fokussierte Forschungsarbeiten geplant und auch nach Abschluss des Projekts zu erwarten.

## 8.2 Verwendung der Zuwendung

*(In Ergänzung zu den bereits eingereichten Zwischenberichten)*

Im letzten Berichtszeitraum dieses Forschungsvorhabens fielen in der Forschungsstelle I Personalmittel für einen Doktoranden und einen Laboranten und in der Forschungsstelle II Personalmittel für 2 Doktoranden an. Über den gesamten Berichtszeitraum wurden für wissenschaftliches Personal an der Forschungsstelle I insgesamt 34,7 PM und an der Forschungsstelle II insgesamt 45,5 PM aufgewendet.

## 8.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurden an den Forschungsstellen planmäßig mehrere Doktorand/innen, studentische Hilfskräfte sowie ein Laborant eingesetzt. Die durchgeführten Arbeiten waren angemessen und für die erfolgreiche Bearbeitung des Projektes erforderlich.

## 8.4 Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft

### 8.4.1 Bereits durchgeführte spezifische Transfermaßnahmen während der Laufzeit des Vorhabens

Maßnahme	Ziel	Rahmen	Zeitraum
Sitzungen des projektbegleitenden Ausschusses	Diskussion der Resultate und Steuerung durch KMU-Interessen	In den Forschungsstellen oder in den Unternehmen	18.11.15 30.05.16 09.02.17
Berichte im DECHEMA-Ausschuss „Mikrobielle Materialzerstörung“	Breitere Diskussion der Resultate und Einbindung weiterer KMU	Sitzungen im DECHEMA-Haus	18.11.15 30.05.16 09.02.17
Tagungsbeiträge (Vorträge, Poster)	Ergebnistransfer in die Wirtschaft, Diskussion mit Fachkollegen, Kontakt zu weiteren KMU	"Antifouling" Infotag EUROCORR ThGOT IBS DFI-Stiftungstag ISE Kurt-Schwabe-Symposium GfKORR Jahrestagung DFI-Stiftungstag AETOC	23.06.15 6-10.09.15 15-17.09.15 07.10.15 09.12.15 23.08.16 05.09.16 15.11.16 07.12.16 25-28.04.17



Internetdarstellung der Forschungsergebnisse mit laufender Aktualisierung	Ergebnistransfer in die Wirtschaft	Projektseite im Rahmen der Internetpräsenz der Antragsteller	laufend
Anwendungsnahe Praxistests	Demonstration und Evaluation der Ergebnisse	TÜV Süd am Standort Industriepark Höchst	10.08.16-02.03.17

#### **8.4.2 Geplante spezifische Transfermaßnahmen nach der Projektlaufzeit**

<b>Maßnahme</b>	<b>Ziel</b>	<b>Rahmen</b>	<b>Zeitraum</b>
Publikation als Kurzmitteilung der Mitgliedsvereinigungen	Hinweis auf wesentliche Resultate und Schlussbericht	Chemie-Ingenieur-Technik oder Materials and Corrosion	Mitte 2018
Zusammenfassende Darstellung im Internet	Ergebnistransfer in die Wirtschaft	Projektseite im Rahmen der Internetpräsenz der Antragsteller	Ab Mitte 2018
Beratung von Unternehmen bei Versuchen zur Umsetzung der Forschungsergebnisse in die betriebliche Praxis	Technische Umsetzung	Beratung in Unternehmen durch die Forschungsstellen	Ab Ende 2017
Verteilung des Abschlussberichtes an PA	Bekanntmachung der Ergebnisse	Versand an PA-Mitglieder durch FSt 1 nach Erstellung	Ab Mitte 2018
Angebot zur Anforderung des Schlussberichtes	Bekanntmachung der Ergebnisse	Versand auf Anforderung bei den Forschungsstellen	Ab Mitte 2018

#### **8.4.3 Einschätzung zur Realisierbarkeit des vorgeschlagenen und aktualisierten Transferkonzeptes**

Die Einbindung von verschiedenen KMU, welche im Bereich der Korrosionsforschung sowie der Minimierung von Korrosion tätig sind als auch die Einbindung der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung in den projektbegleitenden Ausschuss garantiert einen direkten Kenntnistransfer der Forschungsergebnisse in die relevanten Industriezweige. Aufgrund der breiten Verfügbarkeit der Ergebnisse, Präsentation auf relevanten Messen und Tagungen, Diskussionen im projektbegleitenden Ausschuss, Einbindung der Ergebnisse in Lehre und Forschung, Diskussion in Fachgremien der Projektleiter sowie die Vorbereitung von Fachpublikationen ist eine branchenweite und unternehmensübergreifende Umsetzung gezielt durchführbar. Der schnelle und direkte Transfer der Ergebnisse in die Industrie ist somit gewährleistet.

## **9 Darstellung des Projekts in der Öffentlichkeit**

### **Am Projekt beteiligte Mitarbeiter**

Forschungsstelle I: D. Holuscha, PD Dr. W. Fürbeth

Forschungsstelle II: C. Thyssen, Q. Li, Dr. T. Gehrke, Prof. Dr. W. Sand

## Beiträge der Projektbearbeiter in Form von Fachvorträgen oder Postern

- "Antifouling" Infotag, "Oberflächenschutz durch Beschichtung mit extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) und Analoga" C. Thyssen, D. Holuscha, W. Sand, W. Fürbeth, Frankfurt am Main, Juni 2015
- Eurocorr (2015): „Cyclodextrin modified metal surfaces for inhibition of (a)biotic corrosion“, D. Holuscha, C. Thyssen, A. Kuklinski, W. Fürbeth & W. Sand
- ThGOT (2015): „Modifizierte Cyclodextrine zur Herstellung antimikrobieller Metalloberflächen“, D. Holuscha, W. Fürbeth, C. Thyssen, A. Kuklinski & W. Sand
- IBS (2015): “Biofilm formation and stainless steel corrosion analysis of *Leptothrix discophora*” C. Thyssen, D. Holuscha, J. Kuhn, F. Walter, W. Fürbeth and W. Sand
- Arbeitsausschuss Mikrobielle Materialzerstörung und Materialschutz, Frankfurt am Main, November 2015
- DFI Stiftungstag (2015): „Cyclodextrin- modifizierte Stahloberflächen gegen (a)biotische Korrosion“ D. Holuscha, W. Fürbeth, C. Thyssen, A. Kuklinski & W. Sand
- Arbeitsausschuss Mikrobielle Materialzerstörung und Materialschutz, Frankfurt am Main, Mai 2016
- ISE (2016): “Cyclodextrin-modified steel surface for inhibition of (a)biotic corrosion”, D. Holuscha, C. Thyssen, W. Sand, W. Fürbeth
- Kurt-Schwabe-Symposium (2016): “Potential of Cyclodextrins as biogenic protection against microbial corrosion”, D. Holuscha, C. Thyssen, W. Sand, W. Fürbeth
- GfKORR Jahrestagung, Frankfurt am Main, November 2016 (Posterbeitrag): Surface properties and microbial corrosion of stainless steel (X5CrNi18-10), D. Holuscha, W. Fürbeth
- DFI Stiftungstag (2016): „Cyclodextrin-Einfluss auf mikrobiell beeinflusste Korrosion von Stählen“, D. Holuscha, W. Fürbeth, C. Thyssen & W. Sand
- Arbeitsausschuss Mikrobielle Materialzerstörung und Materialschutz, Frankfurt am Main, Februar 2017
- AETOC (2017): „Electrochemical investigations on biogenic coatings for protection of steel against microbial corrosion“, D. Holuscha, W. Fürbeth, C. Thyssen & W. Sand

## 10 Literaturverzeichnis

- Abdel-Gaber, A. M., et al. 2006.** Inhibitive action of some plant extracts on the corrosion of steel in acidic media. *Corr. Sci.* 48, 2006, S. 2765-2779.
- Argawala, V. S. 1993.** [Buchverf.] A. Raman und P. Labine. *Reviews on Corrosion Inhibitor Science and Technology*. NACE, Houston/TX : s.n., 1993, S. I-5-1.
- Badruddoza, A.Z.M., Tay, A.S.H., Tan, P.Y., Hidajat, K., Uddin, M.S. 2013.** Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/cyclodextrin polymer nanocomposites for selective heavy metal removal from industrial wastewater. *Carbohydr. Poly.* 91, 2013, S. 322-332.
- Beech, I. B. und Cheung, C. W. S. 1995.** Interactions of exopolymers produced by sulfate-reducing bacteria with metal ions. *Int. Biodet. Biodegrad.* 35(1-3), 1995, S. 59-72.
- Beech, I. B., et al. 2000.** Characterization of conditioninh layers formed by exopolymeric substances of *Pseudomonas* NCIMB 2121 on surfaces of AISI 316 stainless steel. *biofouling*. 16(2-4), 2000, S. 93-104.
- Beech, I. B., et al. 1994.** Study of parameters implicated in the biodeterioration of mild steel in the presence of different species of sulfate-reducing bacteria. *Int. Biodet. Biodegrad.* 34(3-4), 1994, S. 289-303.
- Beech, I. W. und Sunner, J. 2004.** Microbe-surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. *Int. Microbiol.* 8(3), 2004, S. 157-168.
- Beech, I.B. und Gaylarde C.C. 1999.** Recent advances in the study of biocorrosion - an overview. *Rev. Microbiol.* 30, 1999, S. 177-190.
- Beech, I.B., Sunner J.A. und Hiraoka K. 2005.** Microbe-surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. *Int. Microbiol.* 8(3), 2005, S. 157-168.
- Bergel, A. 2009.** persönliche Kommunikation, Abschlussveranstaltung der COST-Aktion 33 "Nanoscale electrochemical and bioprocesses (corrosion) at solid-aqueous interfaces of industrial materials. 2009.
- Bom, A., et al. 2002.** A novel concept of reversing neuromuscular block: chemical encapsulation of rocuronium bromide by a cyclodextrin-based synthtic host. *Angew. Chem.* 114, 2002, S. 276-279.
- Branda, S.S, et al. 2005.** Biofilms: the matrix revisited. *TRENDS Microbiol.* 13(1), 2005, S. 20-26.
- Buschmann, H.J. und Schollmeyer, E. 2004.** Oberflächenmodifizierung hautnah getragener Textilien. *Vortrag, 2nd European Conference on Textiles and the Skin.* 2004.
- Butterfield, M.T., Agbaria, R.A. und Warner, I.M. 1996.** Extraction of volatile PAHs from air by use of solid cyclodextrin. *Anal. Chem.* 68, 1996, S. 1187-1190.
- Cheng, Y.-S., Zheng, Y und VanderGheynst, J.S. 2011.** Rapid Quantitative Analysis of Lipids Using a Colorimetric Method in a Microplate Format. *Lipids.* 2011, Bd. 46, S. 95-103.

**Congmin Xu, Yaoheng Zhanga, Guangxu Cheng, Wensheng Zhu. 2008.** Pitting corrosion behavior of 316L stainless steel in the media of sulphate-reducing and iron-oxidizing bacteria. *MATERIALS CHARACTERIZATION*. 59, 2008, S. 245-255.

**Conners, A. 1997.** The stability of cyclodextrin complexes in solution. *Chem. Rev.* 97, 1997, S. 1325-1357.

**Cord-Ruwisch, R. und Widdel, F. 1986.** Corroding iron as a hydrogen-source for sulfate reduction in cultures of sulfate-reducing bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25, 1986, S. 169-174.

*Corrosion 2010.* **Oguzie, E. 2010.** San Antinio/TX : s.n., 2010. S. paper 10148.

**Daniels, L., et al. 1987.** Bacterial methanogenesis and growth from CO<sub>2</sub> with elemental iron as the sole source of electrons. *Science.* 237, 1987, S. 509-511.

**DeBerry, D. W. und Viehbeck, A. 1988.** *Corr.* 44, 1988, S. 299.

**Dentner, U., et al. 1996.** *Modifizierung von Faseroberflächen durch die permanente Fixierung supramolekularer Komponenten, Teil 2 : Cyclodextrine.* 1996.

**dePaiva. 2004.** Dissertation. *Bacterias redutoras de sulfato (BRS): estudo de substancias polimericas extracelulares (SPE) e enzimas nos processos dde adesao a substratos metaalicos e de biocorrosao.* Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasilien : s.n., 2004.

**Dick, G. J., et al. 2008.** Genomic insights into Mn(II) oxidation by the marine Alphaproteobacterium *Aurantimonas* sp. strain SI 85-9A1. *Appl. Env. Microbiol.* 74(9), 2008, S. 2646-2658.

**Dickinson, W., et al. 1997.** Ennoblement of stainless steel by manganese-depositing bacterium *Leptothrix discophora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(7), 1997, S. 2502-2506.

**Dubiel, M., et al. 2002.** Microbial iron respiration can protect steel from corrosion. *Appl. Env. Microbiol.* 68, 2002, S. 1440-1445.

**El Gheriany, I.A., Bocioaga, D., Hay, A.G., Ghiorse, W.C., Shuler, M.L., Lion, L.W. 2009.** Iron requirement for Mn (II) oxidation by *Leptothrix discophora* SS-1. 2009, 75, S. 1229-1235.

**Enning, D. und Garrelfs, J. 2014.** Corrosion of Iron by Sulfate-Reducing Bacteria: New Views of an Old Problem. *Appl. Environ. Microbiol.* 80 (4), 2014, S. 1226-1236.

**EU-Biozidrichtlinie. vom 22. Mai 2012.** VERORDNUNG (EU) Nr. 528/2012 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES über die Bereitstellung auf dem Markt und die Verwendung von Biozidprodukten. vom 22. Mai 2012.

**Eul, U. 1997.** *Entwicklung und Einsatz einer Simulationsapparatur zum Nachweis und zur Verhinderung von mikrobiologisch beeinflusster Korrosion (MIC).* Frankfurt (Main) : Dissertation, Universität Frankfurt, 1997.

*Exopolysaccharide ESP180 as anti-corrosive additives for coatings.* **Ferrari, G. 2009.** Cluj-Napoca, RO : s.n., 2009. Abschlussveranstaltung der COST-Aktion D33 "Nanoscale Electrochemical and Bioprocesses (Corrosion) at solid-aqueous interfaces of industrial Materials.

**Fenyvesi, E., et al. 2005.** Biodegradation of cyclodextrins in soil. *Chemosphere*. 60, 2005, S. 1001-1008.

**Ferrari, G. M. und Breur, H. J.A. 2005.** Biopolymers for the corrosion protection of steels. *Proc. ICC, Peking, PRC*. 2005.

**Flemming, H. C. 1995.** Biofouling und Biocorrosion, die Folgen unerwünschter Biofilme. *Chem. Ing. Tech.* . 67, 1995, S. 1425-1430.

**Flemming, H. K. 1995.** Biofilme und mikrobielle Materialzerstörung. [Buchverf.] W. Anker, et al. [Hrsg.] H. Brill. *Mikrobielle Materialzerstörung und Materialschutz*. Jena, Stuttgart : Gustav Fischer Verlag , 1995, S. 24-47.

**Flemming, H.C. and Wingender, J. 2001.** Relevance of extracellular polymeric substances (EPSs) - Part III: Technical aspects. *Wat. Sci. Tech.* 43, 2001, pp. 9-16.

**Flemming, H.C. 2002.** Biofouling in water systems - cases, causes and countermeasure. *Appl. Microbiol. Biotech.* 59, 2002, S. 629-640.

**Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G. H. 1957.** A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J Biol chem.* 1957, Vol. 226, 1, pp. 497-509.

**Gehrke, T., et al. 2001.** The EPS of *Acidithiobacillus ferrooxidans* - a model for structure-function relationships of attached bacteria and their physiology. *Wat. Sci. Technol.* 43(6), 2001, S. 159-167.

**Gomez-Suarez, C., et al. 2002.** Influence of extracellular polymeric substances on deposition and redeposition of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. *Microbiol.* 148, 2002, S. 1161-1169.

**Gröger, M., Kretzer, E.K. und Woyke, A. 2001.** *Reader mit Hintergrundinformationen zum Thema Cyclodextrine*. Science Forum, Didaktik der Chemie, Universität Siegen. 2001.

**Grooters, M., et al. 2007.** Novel steel corrosion protection by microbial extracellular polymeric substances (EPS) - biofilm induced corrosion inhibition. *Adv. Mat. Res.* 20-21, 2007, S. 375-378.

**Gubner, R., et al. 2000.** The effect of EPS on the attachment of *Pseudomonas NCIMB 2021* to AISI 304 and 316 stainless steel. *Biofouling*. 15(1-3), 2000, S. 25-36.

**Gümpel, P., et al. 2005.** Mikrobielle Beeinflussung des elektrochemischen Potentials nichtrostender Stähle. 2005.

**Gunasekaran, G. und Chauban, L. R. 2004.** Eco friendly inhibitor for corrosion inhibition of mild steel in phosphoric acid medium. *Electrochim. Acta.* 49, 2004, S. 4387-4395.

**Gunasekaran, G., et al. 2004.** Influence of bacteria on film formation inhibiting corrosion. *Corr. Sci.* 46, 2004, S. 1953-1967.

**Haeffner, M. 2009.** in: Westerhaus, C.: Bakterien gegen Seepocken, in der Reihe "Forschung Aktuell" des Deutschlandfunk vom 29.11.2009, Beitrag Nr. 1073715. 2009.

- Hamilton, W. A. 1985.** Sulfate-reducing bacteria and anaerobic corrosion. *Ann. Rev. Microbiol.* 39, 1985, S. 195-217.
- Heyer, A. 2007.** *Effect of different EPS films on attachment and biofilm formation by sulfate-reducing bacteria on metal surfaces.* Universität Duisburg-Essen. 2007. Masterarbeit.
- Hutchens, E. und Crovisier, J. L. 2010.** in: Röhrlich, D.: Schützende Mäntelchen, in der Reihe "Forschung Aktuell" des Deutschlandfunk vom 04.01.2010. 2010. S. Beitrag Nr. 1098217.
- Ismail, K. M., et al. 2002.** Corrosion control of mild steel by aerobic bacteria under continuous flow conditions. *Corr.* 58(5), 2002, S. 417-423.
- Iwu, M., Duncan, A. und Okunj. 1999.** [Buchverf.] J. Janick. *Perspectives on new crops and new uses.* ASHS Press, Alexandria/VA : s.n., 1999.
- Jayaraman, A., et al. 1997.** Importance of biofilm formation for corrosion inhibition of SAE 1018 steel by axenic aerobic biofilms. *J. Industr. Microbiol. Biotechnol.* 18, 1997, S. 396-401.
- Jeromin, J. und Rittman, H. 1998.** *Cyclodextrins in polymer synthesis: free radical polymerisation of cyclodextrin complexes of cyclohexyl and phenyl methacrylate in aqueous medium.* Universität Mainz. Institut für organische Chemie : s.n., 1998.
- Kharshan, M. und Cracauer, C. 2010.** *Corrosion 2010.* San Antonio/TX : s.n., 2010. S. paper 10147.
- Kreikenbohm, R., et al. 2003.** Advanced studies on the influence of manganese on the potential increase of stainless steels. *Mat. Corr.* 54, 2003, S. 510-514.
- Kuklinski, A. 2007.** *Evaluation of biopolymers as protective coating against SRB biofilm formation on steel by application of fluorescence microscopy.* Universität Duisburg-Essen. 2007. Masterarbeit.
- Kumar, A. S., Mody, K. und Jha, B. 2007.** Bacterial exopolysaccharides - a perception. *J. Basic Microbiol.* 47, 2007, S. 103-117.
- Lagona, J., et al. 2005.** The Cucurbit[n]uril family. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 2005, S. 4844-4870.
- Laspidou, C. S. und Rittman, B. E. 2002.** A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, an active and inert biomass. *Wat. Res.* 36, 2002, S. 2711-2720.
- Lee, A. K. und Newman, D. K. 2003.** Microbial iron respiration: impacts on corrosion process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62, 2003, S. 134-139.
- Leinweber, D. und Feustel, M. 2008.** *EP 2 031 092 A2.* 2008.
- Lerliche, V. und Carpentier, B. 2000.** Limitation of adhesion of *Listeria* on steel by *Staphylococcus*. *J. Appl. Microbiol.* 88, 2000, S. 594-605.
- Li, S. und Purdy, W.C. 1992.** Cyclodextrins and their applicatios in analytical chemistry. *Chem. Rev.* 92, 1992, S. 14571470.

**Lindhardt, P. 1997.** Corrosion of metals in natural waters influenced by manganese oxidizing microorganisms. *Biodegradation*. 8, 1997, S. 201-210.

— **2004.** MIC of stainless steel by manganese oxidizing bacteria. *Mat. Corr.* 55(3), 2004, S. 158-163.

**Little, B. und Lee, J. 2007.** *Microbiologically influenced corrosion*. New Jersey : Wiley Series in Corrosion, John Wiley & Sons Inc., 2007.

**Little, B. und Ray, R. 2002.** A perspective on corrosion inhibition by biofilms. *Corr.* 58(5), 2002, S. 424-428.

— A perspective on corrosion inhibition by biofilms. *Corr.* 58(5), S. 424-428.

**Loto, C. A. 2005.** Inhibition of cashew juice on the corrosion of mild steel in sulfuric acid. *Corr. Prev.* 5, 2005, S. 13.

**Maruthamathu, S., et al. 2003.** Control of metallic corrosion through microbiological route. *Ind.J.Exp.Biol.* 41(9), 2003, S. 1023-1029.

**Maruthamathu, S., et al. 1996.** Contributions of oxide film and bacterial metabolism to the ennoblement process: Evidence for a novel mechanism. *Curr. Sci.* 7(4), 1996, S. 315-320.

**Medvedev, D. und Stuchebrukhov, A. A. 2001.** Repair mechanism by photolyase: Electron transfer path from the photolyase catalytic cofactor FADH<sub>2</sub> to DNA Thymine dimer. *J. Theor. Biol.* 210, 2001, S. 237-348.

**Meylheuc, T., van Oss, C. J. und Bellon-Fontaine, M. N. 200691.** Adsorption of biosurfactants on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* 200691, S. 822-832.

*Mini-plant for simulation of metal corrosion and biofouling for evaluation of countermeasures (paper 306).* **von Rège, H. und Sand, W. 1999.** Houston, Texas : NACE International Publications Division, 1999.

**Morikawa, M. 2006.** Beneficial biofilms by *Bacillus subtilis*. *J. Biosci. Bioeng.* 101(1), 2006, S. 1-8.

**Müller, B. und Kurfeß, M. 2004.** *Mat. Corr.* 44(9), 2004, S. 373-378.

**Naguib, A. und Mansfeld, F. 2002.** Evaluation of MICI with EIS and ENA. *Electrochim. Acta.* 47, 2002, S. 2319-2333.

**Oguzie, E. 2005.** *Mat. Lett.* 59, 2005, S. 1076-1079.

— **2006.** *Mat. Chem. Phys.* 99, 2006, S. 441-446.

— **2004.** *Mat. Chem. Phys.* 87, 2004, S. 212-217.

— **2007.** *Corr. Sci.* 49, 2007, S. 1527-1539.

**Oguzie, E., et al. 2004.** *Mat. Chem. Phys.* 84, 2004, S. 363-368.

**Oguzie, E., et al. 2004.** *Mat. Chem. Phys.* 87, 2004, S. 394-401.

**Oguzie, E., Li, Y. und Wang, F. H. 2007.** *J. Col. Sci.* 310, 2007, S. 90-98.

**Oguzie, E., Onuoha, G. und Onuchukwu, A. 2005.** *Mat. Chem. Phys.* 89, 2005, S. 305-311.

**Pedersen, A. und Hermansson, M. 1991.** Bacterial corrosion of iron in seawater in situ and in aerobic and anaerobic model systems. *FEMS Microbiol Lett.* 86(2), 1991, S. 139-147.

—. 1991. Inhibition of metal corrosion by bacteria. *Biofouling.* 3, 1991, S. 1-11.

**Ponmariappan, S., et al. 2004.** Corrosion control by bacterial biofilms - an overview. *Corr. Rev.* 22(4), 2004, S. 307-323.

**Ponmariappan, S., Maruthamathu, S. und Palaniappan, R. 2004.** Inhibition of corrosion of mild steel by *Staphylococcus* sp. *Trans. SAEST.* 93(4), 2004, S. 99-108.

**Potekhina, J.S., et al. 1999.** Role of microorganisms in corrosion inhibition of metals in aquatic habitats. *Appl. Microbiol. Biotech.* 52, 1999, S. 639-646.

**Roehl, Dr. Torsten Angermann & Dipl.-Ing. (FH) Matthias. 2010.** *Entwicklung lösemittelfreier chemisch- und bioresistenter Innenschutzschichten für Biogasanlagen.* [Abschlussbericht Über ein Entwicklungsprojekt gefördert unter dem Az: 26136 von der deutschen Bundesstiftung Umwelt]. 2010.

**Ron, E. und Rosenberg, E. 2001.** Natural role of biosurfactans. *Env. Biotechnol.* 3(4), 2001, S. 229-236.

**Sand, W. 1994.** Mikrobielle Werkstoffzerstörung - Grundlagen: Mikrobielle Schädigungsmechanismen. *Mat. Corr.* 45, 1994, S. 10-16.

**Sand, W. und Gehrke, T. 2003.** MIC of steel in aqueous environment. *Rev. Env. Sci. Biotech.* 2, 2003, S. 169-179.

**Sand, W., et al. 1995.** Sulfur chemistry, biofilm and the (in)direct attack mechanism - a critical evaluation of bacterial leaching. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43(6), 1995, S. 961-966.

**Scheerder, J., et al. 2012.** Exopolysaccharides (EPS) as anti-corrosive additives for coatings. *Prog. Org. Coat.* 75(3), 2012, S. 224-230.

**Schilling, S. 2010.** Electrochemical and physical characterization of surface properties on stainless steel AIS 304L and 316L. *Poster, Corrosion 2010, NACE.* 2010.

**Stadler, R., et al. 2008.** First evaluation of the applicability of microbial extracellular polymeric substances for corrosion protection of metal substrates. *Electrochim. Acta.* 54(1), 2008, S. 91-99.

**Stadler, R., et al. 2010.** *Studies on the application of microbially produced polymeric substances as protecting layers against microbially influenced corrosion of iron and steel.* Corrosion 2010, NACE. San Antonio/TX : s.n., 2010. paper 10209.

**Sugama, T. 2000.** *Advanced coatings from natural based polymers for metals - Final report.* Brookhaven National Lab Upton. NY : s.n., 2000.



- Szklarska-Smialowska, Z. 1993.** [Buchverf.] A. Raman und P. Labine. *Reviews on Corrosion Inhibitor Science and Technology*. NACE, Houston/TX : s.n., 1993, S. I-9-1.
- Tadros, A. B. 2005.** Application of natural materials in marine paint formulations. *Pigment & Resin Technol.* 34(6), 2005, S. 340-346.
- Tanji, Y., et al. 2002.** Chemical analysis of an artificial biofilm that enhances or inhibits carbon steel corrosion. *Corr.* 58(3), 2002, S. 232-239.
- Titz, J.-T. 1999.** MIC of carbon and stainless steel. *Stainless Steel World*. Feb, 1999, S. 25-29.
- van der Veen, B.A., et al. 2000.** Rational design of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 to increase alpha-cyclodextrin production. *J. Mol. Biol.* 2000.
- van Leeuwen, S. S., et al. 2009.** Structural characterization of bioengineered alpha-D-Glucans produced by mutant Glucanase GTF180 Enzymes of *Lactobacillus reuteri* strain 180. *Biomacromol.* 10(3), 2009, S. 580-588.
- Velraeds, M., et al. 1996.** Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(6), 1996, S. 1958-1963.
- Venzlaff, H. 2010.** *Anaerobe Korrosion metallischen Eisens durch sulfatreduzierende Bakterien*. Dechema e. V. Frankfurt a. M. : s.n., 2010. Vortrag, DECHEMA-Arbeitsausschuß "Mikrobielle Materialzerstörung und Materialschutz" (02.03.2010).
- Venzlaff, H., et al. 2013.** Accelerated cathodic reaction in microbial corrosion of iron due to direct electron uptake by sulfate-reducing bacteria. *Corr. Sci.* 66, 2013, S. 88-96.
- Verstichel, S., et al. 2004.** Investigation of the aerobic biodegradability of several types of cyclodextrins in a laboratory - controlled composting test. *J. Polym. Environ.* 12(2), 2004, S. 47-55.
- Videla, H. A. und Herrera, L.K. 2005.** MIC: looking to the future. *Int. Microbiol.* 8, 2005, S. 169-180.
- . 2009. Understanding microbial inhibition of corrosion. A comprehensive overview. *Int. biodegrad. Biodegrad.* 63(7), 2009, S. 896-900.
- Volkland, H. P., et al. 2000.** Bacterial phosphating of mild (unalloyed) steel. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(10), 2000, S. 4389-4395.
- von Wolzogen Kühr, C.A.H. 1961.** Unity of anaerobic and aerobic iron corrosion process in the soil. *Corrosion.* 17, 1961, S. 119-125.
- von Wolzogen Kühr, C.A.H. und van der Vlugt, L.S. 1934.** The graphitization of cast iron as an electrobiochemical process in anaerobic soil. *Water.* 18, 1934, S. 147-165.
- Voordouw, G. 1995.** The genus *Desulfovibrio*: The centennial. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(8), 1995, S. 2813-2819.
- Walencka, E., et al. 2008.** The influence of *Lactobacillus acidophilus*- derived surfactants on *Staphylococcal* adhesion and biofilm formation. *Folia Microbiol.* 53(1), 2008, S. 61-66.

**Wolff, W. 1981.** *Identifizierung von fakultativ chemolithoautotrophen Thiobacillen.* Diplomarbeit, Universität Hamburg : s.n., 1981.

**Zhang, W., et al. 2009.** Novel surface modified molecularly imprinted polymer using acryloyl- $\beta$ -cyclodextrin and acrylamide as monomers for selective recognition of lysozyme in aqueous solution. 2009.

**Zou, C. Z., et al. 2013.** Further study on the inclusion complex of 2-phosphonobutane-1,2,4-tricarboxylic acid with  $\beta$ -cyclodextrin: A new insight of high inhibition efficiency for protecting steel corrosion. *Journal of Petroleum Science and Engineering*. 2013, 103, S. 29–35.

**Zou, C., et al. 2014.** Inhibiting evaluation of  $\beta$ -Cyclodextrin-modified acrylamide polymer on alloy steel in sulfuric solution. *Corrosion Science* . 85, 2014, S. 445–454.

**Zou, C., et al. 2014.** Synthesis of bridged  $\beta$ -cyclodextrin-polyethylene glycol and evaluation of its inhibition performance in oilfield wastewater. *Materials Chemistry and Physics*. 2014, 147, S. 521-527.

**Zucchi, F., Ibrahim, H. O. und Trabanelli, G. 1987.** *Werkstoffe und Korrosion*. 38, 1987, S. 742.

**Zuo, R. 2007.** Biofilms: strategies for metal corrosion inhibition employing microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 2007, S. 1245-1253.

**Zuo, R., et al. 2005.** The importance of living biofilms in corrosion protection. *Corr. Sci.* . 47, 2005, S. 279-287.

## 11 Anhang

### 11.1 Lösungen

#### 11.1.1 Vitaminlösung

Tabelle 11-1: Zusammensetzung der Vitaminlösung für Postgate C (modifiziert) Medium

Substanz	Menge
Biotin	0,002 g
Folsäure	0,002 g
Pyridoxin Chlorwasserstoffsäure	0,01 g
Thiamine-chlorwasserstoffsäure Dihydrat	0,005 g
Riboflavin	0,005 g
Nikotinsäure	0,005 g
Calcium-D-pantothenat	0,005 g
Cyanocobalamin	0,0001 g
4-Aminobenzoessäure	0,005 g
Liponsäure	0,005 g
Vollentsalztes Wasser (VE)	1000 mL

Fertige Lösung im Anschluss steril mit Flaschenaufsatzfilter (0,2µm) filtrieren.

#### 11.1.2 Spurenelementlösung SL-10

Tabelle 11-2: Zusammensetzung der Spurenelementlösung SL-10 für Postgate C (modifizierte) Medium

Substanz	Menge
Salzsäure (25%)	10 mL
Eisen(II)-chlorid-Tetrahydrat	1,50 g
Zink(II)-chlorid	0,07 g
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat	0,10 g
Borsäure	0,006 g
Cobald(II)-chlorid-Hexahydrat	0,19 g
Kupfer(II)-chlorid-Dihydrat	0,002 g
Nickel(II)-chlorid-Hexahydrat	0,024 g
DinatriummolybdatDihydrat	0,036 g
Vollentsalztes Wasser (VE)	990 mL

Zuerst Eisen(II)-chlorid-Tetrahydrat in der Salzsäure lösen, danach etwas Wasser und die anderen Salze hinzufügen. Zum Schluss wird die Lösung mit VE-Wasser auf einen Liter aufgefüllt. Anschließend fertige Lösung steril filtrieren.

#### 11.1.3 Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

Tabelle 11-3: Zusammensetzung des PBS- Puffers

Substanz	Menge
Natriumchlorid	4,0 g
Kaliumchlorid	0,1 g
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	0,9 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,1 g
Vollentsalztes Wasser (VE)	1000 mL

Der pH-Wert wird mit Salzsäure (5M) oder Kaliumhydroxid (5M) mit Hilfe eines pH-Meters auf 7,4 eingestellt. Die Lösung wird bei 121°C und 1,5 bar für 30 Minuten autoklaviert.

## 11.2 Medien SRB

Wegen der großen Bedeutung der SRB für die Problemstellung des Vorhabens sei an dieser Stelle auf die Kultivierung der Schadorganismen hingewiesen. Zur Kultivierung der Mikroorganismen (siehe) werden Lösungen nach Postgate (Eul, 1997) eingesetzt. Charakteristisch sind hohe Gehalte an Laktat und Sulfat und geringe Mengen Eisen und Chlorid. Für marine SRB Stämme musste zusätzlich NaCl in größeren Mengen zugegeben werden. Eine Übersicht ist in Tabelle 11-4 präsentiert. Die Rezeptur und Vorschrift der verwendeten Nährmedien im Einzelnen ist in

Tabelle 11-5 und

Tabelle 11-6 dargestellt.

**Tabelle 11-4: Verwendete Nährmedien zur Kultivierung von SRB-Schadorganismen. Postgate C nach v. Rège wurde nur zur Kultivierung einer Stamm-Kultur der jeweiligen Spezies genutzt. Postgate C (modifiziert), wurde zur Anzucht von Arbeitskulturen verwendet.**

Mikroorganismus	Kulturmedium
<i>D. vulgaris</i>	Postgate C nach v. Rège; Postgate C modifiziert
<i>D. alaskensis</i> , <i>D. indonesiensis</i>	Postgate C nach v. Rège u. Postgate C modifiziert, Zugabe von 2% NaCl

**Tabelle 11-5: Rezeptur und Vorschrift des verwendeten Nährmediums Postgate C nach v. Rège zur Anzucht von SRB-Stammkulturen.**

Lösung A

Bestandteil	Menge für 1 Liter Lösung	Hersteller
$K_2HPO_4$	0,5 g	Riedel de Haen / puriss. p.a.
$NH_4Cl$	1,0 g	Merck / p.a.
$Na_2SO_4$	4,5 g	Merck / p.a.
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	0,04 g	Merck / p.a.
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,06 g	Merck / p.a.

<b>Laktat (90 %)</b>	4,2 ml	Fluka / purum
<b>Hefeextrakt (Difco) <sup>1</sup></b>	1,0 g	Roth
<b>H<sub>2</sub>O VE</b>	970 ml	

## Lösung B

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge für 1 Liter Lösung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>FeSO<sub>4</sub> * 7 H<sub>2</sub>O</b>	0,004 g	Merck / p.a.
<b>Tri-Na-Citrat * 2 H<sub>2</sub>O</b>	0,3 g	Merck/ p.a.
<b>Ascorbinsäure</b>	0,1 g	Merck / p.a.
<b>H<sub>2</sub>O VE</b>	30 ml <sup>2</sup>	

Tabelle 11-6: Rezeptur und Vorschrift für das modifizierte (Hefefreie) Nährmedium Postgate C verwendet zur Anzucht von Arbeitskulturen für nachfolgende Biokorrosion-Untersuchungen.

## Lösung C

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge für 1 Liter Lösung</b>	<b>Kommentar</b>
<b>Spurenelement Lösung SL-10 (aus DSMZ-Medium 320)</b>	1 ml	Rezeptur siehe Tabelle 11-2

## Lösung D

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge für 1 Liter Lösung</b>	<b>Kommentar</b>
<b>Vitamin Lösung (aus DSMZ-Medium 141)</b>	10 ml	Rezeptur siehe Tabelle 11-1

Vorschrift zur Herstellung von Postgate C Medium nach v Rege.

<sup>1</sup> Hefeextrakt wird nur für Postgate C nach v. Rège zur Anzucht von SRB Stammkulturen verwendet. Modifiziertes (Hefe freies) Postgate C wird zur Anzucht von SRB Arbeitskulturen verwendet.

<sup>2</sup> Zur Herstellung vom modifizierten (Hefe freien) Postgate C werden die Bestandteile aus Lösung B in 20 ml gelöst.

Lösung A wird auf pH-Wert 8,5 eingestellt und anschließend autoklaviert. Über Sterilfiltration wird Lösung B in die abgekühlte Lösung A zugegeben. Anschließend wird der pH-Wert der des Mediums mit steriler KOH auf 7,5 bis 8 eingestellt. Vor dem Inokulum wird durch 30 minütiges spülen mit sterilen Stickstoffgas der Sauerstoff aus dem Medium entfernt.

#### Vorschrift zur Herstellung von hefefreien Postgate C (modifiziert)

Lösung A wird auf pH-Wert 8,5 eingestellt und anschließend ebenso wie Lösung C autoklaviert. Lösung B und D werden zu Lösung A steril-filtriert. Die Lösungen werden unter sterilen Bedingungen zusammengefügt und der pH-Wert des Mediums mit steriler KOH auf 7,5 bis 8 eingestellt. Vor dem Inokulum wird durch 30 minütiges spülen mit sterilen Stickstoffgas der Sauerstoff aus dem Medium entfernt.

### 11.3 Medium *Leptothrix discophora*

Zur Kultivierung und Biofilmbildung von *L. discophora* wurde das Medium MSVP-2 (mineralsalts-vitamins-pyruvate 2) nach Gheriany et al. 2008 eingesetzt.

Lösung A wird separat hergestellt, auf pH 7 eingestellt und bei 121°C und 1,5 bar 30 Minuten autoklaviert. Lösung B und C werden steril filtriert und zur autoklavierten Lösung A zu geben. Anschließend auf sterile Gefäße verteilen.

Lösung A:

Stoff	Menge für 1L in mg	Hersteller
CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	58,8	Merck / p.a.
MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	59,15	Merck / p.a.
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> xSO <sub>4</sub>	240,49	Merck / p.a.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	19,44	Riedel de Haen / puriss. p.a.
FeSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	2,78	Merck / p.a.
HEPES	2383,1	Sigma-Aldrich
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	32,9	Roth / p.a.
add	949 mL Deionat	

Lösung B: 10 g Natriumpyruvat in 50 mL Deionat lösen und steril filtrieren (0,2 µm)

Lösung C: 1 mL steril filtrierter (0,2 µm) 1000x Konzentratlösung zu Lösung A geben.  
Finale Konzentration von Biotin= 0,01 und Vitamin B12= 0,00075 µM.

## 11.4 Selektiv Medien

Im folgenden werden die selektiv Medien welcher zu Quantifizierung der Kolonisation der Proben aus Abschnitt 6.6.2.1.

### 11.4.1 Chemoorganotrophe Bakterien

R2A-Agar für die Anzucht chemoorganotropher Bakterien

---

Hefe-Extrakt	0,50	g
Proteose Pepton	0,50	g
lösliche Stärke	0,50	g
Saccharose	0,50	g
Casaminosäuren	0,50	g
Na-Pyruvat	0,30	g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,30	g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,05	g
Agar-Agar	15,00	g
aqua deion.	ad 1000,00	mL

- pH-Kontrolle (pH 7,2), gegebenfalls einstellen mit kristallinem  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  bzw.  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- autoklavieren 30 min bei 0,5 bar Überdruck (111°C)
- in Platten gießen (ca. 10 mL/Platte)

Beimpfung: 100 µL-Inoculum ausspateln

Bebrütung: 28°C im Dunkeln, ca. 1 Woche

Nachweis: Auszählen der Kolonien

### 11.4.2 Pilze

Sabaurand-4%-Maltose-Agar für die Anzucht von Pilzen

---



Pepton	5,0	g
Maltose	20,0	g
Agar-Agar	15,0	g
aqua deion.	ad 990,0	mL

- pH-Kontrolle (pH 5,6), gegebenfalls einstellen mit NaOH bzw. HCl
- autoklavieren 30 min bei 0,5 bar Überdruck (111°C)
- nach Abkühlen auf ca. 60°C 10 mL sterilfiltrierte Antibiotika-Lösung <sup>1)</sup> zugeben (0,22 µm Filter)
- in Platten gießen (ca. 10 mL/Platte)

Beimpfung: 100 µL-Inoculum ausspateln

Bebrütung: 28°C im Dunkeln, ca. 1 Woche

Nachweis: Auszählen der Kolonien

#### 1) Antibiotika-Lösung

40 mg Streptomycin und 10 mg Ampicillin ad 10 mL aqua deion.

### **11.4.3 Moderat acidophile Bakterien**

#### **Flüssigmedium für die Anzucht gemäßigt acidophiler Thiobacillen**

---

##### Lösung 1

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	5,00	g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,13	g
NH <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>	1,00	g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,02	g
Biotin	24,4	mg
Fe-EDTA Stammlösung <sup>a)</sup>	5,00	mL

Spurenelementelösung Ti <sup>b)</sup>	5,00 mL
aqua deion.	ad 700,00 mL

#### Lösung 2

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,40 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,60 g
aqua deion.	ad 300,00 mL

<sup>a)</sup> 40 mg Na<sub>2</sub>-EDTA (bzw. 44 mg Na<sub>2</sub>-EDTA x 2 H<sub>2</sub>O) in 100 mL aqua deion. lösen  
und 20 mg FeCl<sub>3</sub> x 6 H<sub>2</sub>O unter Rühren dazugeben

- Lösungen 1 und 2 vereinigen
- mit Indikator Methylrot (Merck, gelöst in KOH) gelbe Farbe einstellen
- pH-Kontrolle (pH 6,7 – pH 6,9), gegebenenfalls einstellen mit KOH bzw. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- abfüllen in kurze RG (jeweils 4,5 mL)
- autoklavieren 30 min bei 0,5 bar Überdruck (111°C)

Beimpfung: 0,5 mL-Inoculum/Reagenzglas

Bebrütung: 28°C im Dunkeln, ca. 4 Wochen

Nachweis: pH < 6 (Farbumschlag nach rot)

#### <sup>b)</sup> Spurenelementelösung Ti (Vishniac und Santer, 1951)

Na <sub>2</sub> -EDTA	50,00 g
ZnSO <sub>2</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2,20 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	7,34 g
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	5,06 g
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	5,35 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1,17 g
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	1,57 g
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1,61 g
aqua deion.	ad 1000,00 mL

pH-Kontrolle (pH 7), gegebenenfalls einstellen mit KOH bzw. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

#### **11.4.4 Manganoxidierende Bakterien**

Flüssigmedium für die Anzucht Mangan-II-Ionen oxidierender Bakterien

---

MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,5 g	(= 162 mg/L Mn <sup>2+</sup> )
Hefeextrakt	0,5 g	
aqua deion.	ad 1000 mL	

- pH 7 einstellen mit NaOH oder H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (evtl. mit HEPES puffern)
- abfüllen in kurze Reagenzgläser (RG) (jeweils 4,5 mL)
- autoklavieren 30 min bei 0,5 bar Überdruck (111°C)
- Beimpfung: 0,5 mL-Inoculum/RG; Bebrütung: 28°C im Dunkeln, ca. 4 Wochen