

Forschungsbericht BWPLUS

**Beitrag zu einer nachhaltigen und umweltgerechten
Produktentwicklung mittels eines Testverfahrens für die
Bewertung von Biofilmen an Oberflächen - *BioOfT***

von

Iris Trick

Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB

Förderkennzeichen: BWBÖ 17005

Die Arbeiten des Baden-Württemberg-Programms Lebensgrundlage Umwelt und ihre
Sicherung (BWPLUS) werden mit Mitteln des Landes Baden-Württemberg gefördert

April 2018

Beitrag zu einer nachhaltigen und umweltgerechten Produktentwicklung mittels eines Testverfahrens für die Bewertung von Biofilmen an Oberflächen - *BioOfT*

Abschlussbericht
zu der im Rahmen der Ausschreibung
„Konzeptstudien zur Landesstrategie Bioökonomie“
erstellten Studie

Für:

Projektträger Karlsruhe - Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Baden-Württemberg Programme (PTKA-BWP)
Frau Bohrmann
Hermann-von-Helmholtz-Platz 1
76344 Eggenstein-Leopoldshafen

Ansprechpartner:

Dr. Iris Trick
Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB
Nobelstr. 12
70569 Stuttgart

Inhalt

1	Einleitung	2
2	Kurzbeschreibung der Forschungsergebnisse	2
3	Darstellung der Vorgehensweise und Ergebnisse	3
3.1	Ausgangssituation.....	3
3.1.1	Vorkommen von Biofilmen.....	3
3.1.2	Charakterisierung von Biofilmen	4
3.1.3	Entwicklung von Biofilmen	4
3.1.4	Neuartiges Testverfahren mit zahlreichen Optionen bezüglich Steuerung und Regelung der Verfahrensparameter.....	5
3.2	AP 1: Bewertung des Potenzials des am Fraunhofer IGB entwickelten Testverfahrens für die Bioökonomie	6
3.2.1	Vorgehensweise zur Ermittlung von Branchen und Firmen als Grundlage zur Bedarfsanalyse	6
3.2.2	Relevanz der Unternehmen	7
3.2.3	Aufbau der Umfrage.....	7
3.3	AP 2: Ermittlung der Anforderungen für Standardisierung und Normung des Testverfahrens.....	10
3.3.1	Untersuchungen an Oberflächen zur Bewertung der Wechselwirkungen zwischen Mikroorganismen und Materialien	11
3.3.2	Verfahren zur Ermittlung der mikrobiellen Aktivität	13
3.3.3	Identifizierung von Mikroorganismen	13
3.3.4	Objektive Quantifizierung von mikrobiellem Wachstum auf Oberflächen	15
3.3.5	Vorgehensweise zur biologischen Bewertung Oberflächen-assoziierten mikrobiellen Bewuchses	15
3.3.6	Schritte zur Standardisierung am Beispiel eines Testsystems für Fassadenoberflächen	17
4	Literatur	18

Zunehmend werden Produkte aus nachwachsenden Rohstoffen oder mittels biotechnischer Verfahren hergestellt. Um Biofilme langfristig zu vermeiden, werden in der industriellen Herstellung immer neue Lösungen entwickelt, die charakterisiert und bewertet werden müssen. Neben den Anforderungen zur Vermeidung mikrobieller Biofilme an Oberflächen von Polymeren natürlichen als auch anthropogenen Ursprungs muss nachgewiesen werden, dass eine mögliche Freisetzung von Agenzien keine für Mensch und Umwelt schädlichen Auswirkungen hat.

Am Fraunhofer IGB wurde ein Verfahren entwickelt, das ursprünglich mineralische und polymere Oberflächen fokussierte. Da ähnliche Anforderungen für verschiedene biobasierte Produkte bestehen, wurde im Rahmen dieser Studie mittels einer Umfrageaktion ermittelt, für welche Branchen, die sich im Rahmen der Bioökonomie mit neuen Stoffen oder Stoffkombinationen beschäftigen, mit diesem Verfahren oder einer daraus abgeleiteten Variante Vorteile für die Produktentwicklung und -bewertung ergeben.

Geprüft wurde, inwieweit ein solches Verfahren in standardisierter Form von der Industrie nachgefragt und eingesetzt würde und somit ein Normierungsprozess angestoßen werden sollte.

Bedarf besteht, Messverfahren zu identifizieren, mit denen in Ergänzung zu einer (Photo-)Bioreaktoreinheit, den Aufwuchs von Biofilmen ermöglicht Aussagen über Zusammensetzung, Festigkeit, Schichtdicke eines Biofilms zu treffen sind.

Summary

Increasingly, products are produced from renewable raw materials or by means of biotechnological processes. In order to avoid biofilms in the long term, new solutions are constantly being developed in industrial production which must be characterised and evaluated. In addition to the requirements for the prevention of microbial biofilms on the surfaces of polymers of both natural and anthropogenic origin, it must be demonstrated that a possible release of agents does not have any adverse effects on humans and the environment.

At the Fraunhofer IGB a process was developed that originally focused on mineral and polymer surfaces. As similar requirements exist for different biobased products, this study is intended to determine for which industries the method may be important in the development of new substances or substance combinations. In the context of bioeconomy, advantages arise for product development and evaluation.

It was examined if there is an interest of industry to develop standardized procedures to evaluate new products in respect to biofilm prevention.

There is a need to identify measurement methods that complement the described (photo-) bioreactor unit, which enable biofilms to be characterised according to their growth and with which it can be demonstrated that no biofilm has been formed.

Methods that are particularly suitable for determining the composition, strength and layer thickness of a biofilm had been proven to be particularly suitable.

1 Einleitung

Die Erkenntnis, dass die fossilen Ressourcen auf unserer Erde endlich sind und ihre Nutzung in erheblichem Maß zu dem inzwischen deutlich spürbaren Klimawandel beigetragen hat, veranlasst mehr und mehr Politik und Wirtschaft zum Umdenken. Biologische Prozesse werden verstärkt auf ihre Anwendung in industriellen Prozessen untersucht und im Rahmen der so genannten Bioökonomie umgesetzt.

Mit dem Einzug biobasierter Produkte haben sich die Hersteller und die Konsumenten / Nutzer mit der Problematik der Biofilmbildung an Oberflächen verstärkt auseinander zu setzen.

Ein nicht zu unterschätzender Einflussfaktor ergibt sich bei der Anwendung zahlreicher Produkte. Bei ihrer Anwendung sollen die Produkteigenschaften über lange Zeiträume erhalten bleiben und nicht durch mikrobielle Besiedelung der Oberflächen geschädigt werden.

Biofilme sind in der Natur weit verbreitet und können als die älteste Lebensform betrachtet werden. Ihre Anpassungsfähigkeit ist hoch und bietet ihnen Schutz vor ungünstigen Lebensbedingungen wie hohe Temperaturen, intensive Strahlung oder chemische Agenzien.

Dadurch ist die Nutzung von Biofilmen in der Umwelt- und Biotechnik von erheblichem Vorteil. Immobilisierte Biomasse wird in der Abwasserreinigung seit langem erfolgreich eingesetzt, insbesondere zum Abbau von eher schwer abbaubaren Verbindungen aus industriellen Prozesswässern. Als Biokatalysatoren ermöglichen sie kontinuierliche Betriebsweise von Verfahren zur Gewinnung von verschiedensten Produkten wie organische Säuren, Vitamine o. ä.. Bioökonomie bedeutet zwangsläufig eine Auseinandersetzung mit Biofilmen, sei es ihre Vermeidung oder ihre Nutzung.

Um Biofilme langfristig zu vermeiden, werden in der industriellen Herstellung immer neue Lösungen entwickelt, die charakterisiert und bewertet werden müssen. Neben den Anforderungen zur Vermeidung mikrobieller Biofilme an Oberflächen von Polymeren natürlichen als auch anthropogenen Ursprungs muss nachgewiesen werden, dass eine mögliche Freisetzung von Agenzien keine für Mensch und Umwelt schädliche Auswirkungen hat.

Die Überprüfung von Produkten stellt damit eine erhebliche Herausforderung dar. Die vorliegende Studie soll einen Beitrag leisten, die Wechselwirkungen von Mikroorganismen mit neu entwickelten oder modifizierten Oberflächen reproduzierbar und in überschaubaren Zeiträumen zu untersuchen und damit Entwicklungsprozesse zu beschleunigen und Markteinführungen von biobasierten Produkten zu einem früheren als bisher möglichen Zeitpunkt zu ermöglichen.

2 Kurzbeschreibung der Forschungsergebnisse

Die Studie hat ergeben, dass im Bereich der biologischen Bewertung von Oberflächen Verfahren entwickelt und für die Industrie zugänglich gemacht werden müssen, die die bisher für Baustoffe üblichen Freilandexperimente zwar nicht vollständig ersetzen, aber Entwicklungszyklen verkürzen und anwendungsnahe Ergebnisse liefern können. Der Nutzen eines reproduzierbaren Verfahrens, das die Wechselwirkungen zwischen Oberflächen und Mikroorganismen in überschaubaren Zeiträumen von wenigen Wochen

experimentell überprüfbar macht, ist dabei von hohem Wert. Es kann ermittelt werden, wie hoch die Wahrscheinlichkeit hygienisch bedenklicher Situationen einzuschätzen ist. Gleichzeitig lassen sich auch evtl. auftretende Einflüsse für die Umwelt beispielsweise durch Freisetzung von Additiven in einem sehr frühen Entwicklungsstadium neuer Produkte / Produktmodifikationen detektieren und quantifizieren. Das Interesse von Herstellern biobasierter Produkte ihre Produkte in dieser Hinsicht zu bewerten, war eher gering, obwohl gerade bei biologisch abbaubaren Produkten mit einem Bewuchs an der Produktoberfläche gerechnet werden muss. Das liegt vermutlich daran, dass hier die Verbreitung noch nicht soweit fortgeschritten ist, wie bei dem Einsatz von Bauprodukten oder die Anwendungsgebiete derzeit für einen Langzeiteinsatz noch nicht in Frage kommen.

Der Bedarf Biofilmentwicklung quantifizierbar zu machen, wurde durch Recherchen und die durchgeführte Umfrage konkretisiert.

Fazit der Studie ist es, dass die für die Weiterentwicklung der im Fraunhofer IGB als Demonstrator verfügbaren Anlage erforderlichen Maßnahmen weiterverfolgt werden sollten. Eine Standardisierung und Normierung des Verfahrens ist anzustreben.

3 Darstellung der Vorgehensweise und Ergebnisse

3.1 Ausgangssituation

Mikroorganismen wie Pilze und Bakterien kommen überall in der Natur vor. Sie spielen eine wesentliche Rolle in den natürlichen Stoffkreisläufen und sind damit von elementarer Bedeutung für den Fortbestand der Ökosysteme. In der Lebensmitteltechnik oder zur Produktion antibiotisch wirksamer Substanzen für die Pharmazie oder zur Gewinnung von Basischemikalien für die nachhaltige Produktion werden Mikroorganismen industriell genutzt (Cheng et al., 2010; Muffler et al., 2014). Auch in der Abwasserreinigung und Abfallbehandlung sind sie von unschätzbarem Wert.

Andererseits verursachen Bakterien und Pilze erhebliche Schäden, wenn sie Krankheiten hervorrufen, als Verunreinigungen in der Produktion auftreten und Produkte verderben oder technische Probleme verursachen, weil ihr Wachstum Werkstoffe oder Einrichtungen zerstört oder unbrauchbar macht. Beispiele sind pilzbedingte Schäden in Altbauten, die Verschlechterung des Wirkungsgrades von Wärmetauschern durch Biofilme und mikrobiell bedingte Korrosionsschäden. Auch im Gesundheitssektor werden enorme Anstrengungen unternommen, um das Wachstum von Biofilmen an natürlichen Oberflächen wie Zahnmaterial, aber auch an synthetischen Materialien wie Implantaten, Kathetern oder medizinischen Geräten zu verhindern – auch wegen enormer Folgekosten im Falle einer Schädigung des Menschen.

Die Studie soll einen Beitrag leisten, die Wechselwirkungen von Mikroorganismen mit neu entwickelten oder modifizierten Oberflächen reproduzierbar und in überschaubaren Zeiträumen untersuchen zu können. Darüber hinaus soll bei dem Verfahren die Möglichkeit bestehen, Produkte, deren Wirksamkeit von Umweltparametern wie Temperatur, Feuchte, Strahlung, wässrige Phase beeinflusst wird, zu charakterisieren. Bei Oberflächen, aus denen aktive Stoffe freigesetzt werden, soll die Freisetzung quantifizierbar sein.

3.1.1 Vorkommen von Biofilmen

Um die Relevanz von Biofilmen und geeigneten Nachweisverfahren, insbesondere im Hinblick auf eine Standardisierung und Normung des vorgeschlagenen Verfahrens zu

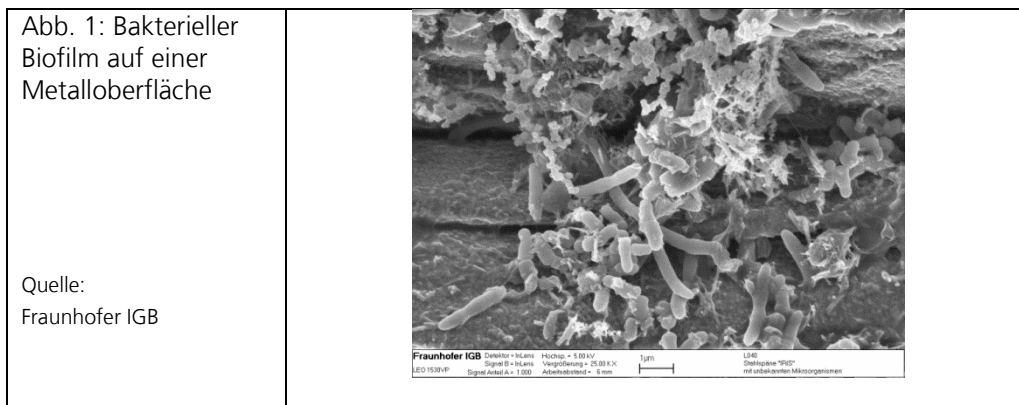
ermitteln, ist die Darstellung ihres Vorkommens und ihrer Eigenschaften im Folgenden in die Studie aufgenommen.

.....
Darstellung der Vorgehensweise
und Ergebnisse
.....

In der Natur stellen Biofilme die am weitesten verbreitete Lebensform dar. Sie verschafft den Organismen erhebliche Vorteile. Ein Beispiel ist die Flechte, bei der die Alge die Nährstoffe liefert und der Pilz die Alge vor Strahlung und Austrocknung schützt. In technischen Systemen werden Biofilme meist als Problem empfunden. Sie führen zur Verstopfung von Systemen, zur Reduzierung der Effizienz und häufig auch zu hygienischen Problemen. In der Medizin sind Biofilme oft die Quelle für Erkrankungen, z. B. bei der Besiedelung von Implantaten, Kathetern, Infusionsbesteck oder Beatmungsmaschinen. Aber auch Verpackungsmaterial oder Baustoffe sind von der Besiedelung durch Organismen betroffen – allerdings mit unterschiedlichen Auswirkungen. Letztendlich beziffern sich die Schäden, die Mikroorganismen verursachen jährlich auf Beträge im Bereich von vielen Milliarden Euro.

3.1.2 Charakterisierung von Biofilmen

Biofilme sind definiert als symbiotisch wachsende Populationen von Mikroorganismen, die an lebenden oder inerten Oberflächen adhärirt sind. Diese Lebensgemeinschaften sind sehr komplex aufgebaut und von einer Schleimschicht umgeben, die sich aus Polymeren zusammensetzt (Abb. 1). Der Vorteil der an Oberflächen wachsenden Organismen besteht darin, dass sie an ihre Umgebungsbedingungen angepasst sind und gegenüber physikalischen und chemischen Umwelteinflüssen deutlich widerstandsfähiger sind als ihre nicht an Oberflächen wachsenden Vertreter. Biofilme können sich aus Bakterien, Pilzen und Algen zusammensetzen.



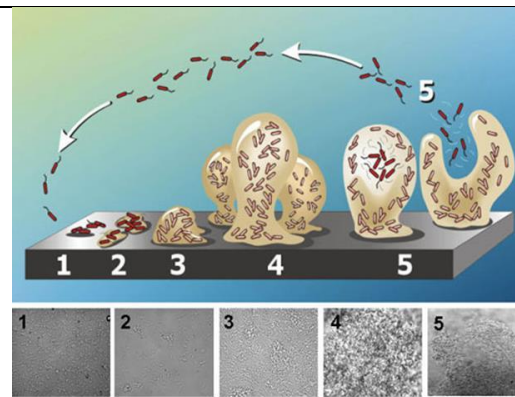
3.1.3 Entwicklung von Biofilmen

Die Entwicklung von Biofilmen erfolgt schrittweise in verschiedenen Stadien. Soll die Biofilmbildung beeinflusst werden, ist die Kenntnis dieser Phasen von Bedeutung, da die Adhärenz und Resistenz mit zunehmendem Fortschreiten der Immobilisierung zunimmt.

Entwicklungsphasen eines Biofilms (Abb. 2)

1. Adhäsion der planktonischen Zellen an Materialoberflächen
2. Bildung einer Monolayer
3. Entwicklung von Mikrokolonien
4. Wachstum der Organismen in dem Biofilm, einhergehend mit der Produktion von Polysacchariden, Proteinen und Signalmolekülen. Der Biofilm wird in dieser Phase von einer Speziespezifischen Schleimschicht durchzogen und umgeben.
5. Aus dem Biofilm werden mit der Zeit wieder Zellen freigesetzt, die den Biofilm verlassen und sich an anderer Stelle niederlassen.

Abb. 2: Schematische Darstellung der Entwicklungsphasen eines mikrobiellen Biofilms



Houdt et al., 2005

3.1.4 Neuartiges Testverfahren mit zahlreichen Optionen bezüglich Steuerung und Regelung der Verfahrensparameter

Am Fraunhofer IGB wurde in einem abgeschlossenen Projekt (FoAM-BUILD: Functional Adaptive Nano-Materials and Technologies for Energy Efficient Buildings. EU Project N°: 609200) ein Verfahren entwickelt, das ursprünglich mineralische und polymere Oberflächen fokussierte, die vorwiegend im Baubereich in Form von Putzen und Farben eingesetzt werden (Abb. 3). Das Verfahren ist folgendermaßen aufgebaut und verfügt über mehrere Vorteile, die u. a. für die Beurteilung biobasierter Produkte geeignet sind und zu belastbaren Ergebnissen in relativ kurzen Zeiträumen führen.

Gleichzeitig sind derzeit bis zu 24 Prüfkörper in einem Untersuchungsansatz einsetzbar. Die Untersuchungen erfolgen unter definierten Bedingungen und unter Berücksichtigung der Eigenschaften der eingesetzten Spezies oder Mischpopulation, wie sie in der Technik häufig vorkommen. Die Zellkonzentration, die Temperatur, der pH-Wert und die Feuchte sind einstellbar. Die technischen Parameter sind regulierbar. Der als Testapparat ausgelegte Bioreaktor lässt sich aufgrund der vorgesehenen LED-Beleuchtung auch mit Mikroorganismen betreiben, die photosynthetisch aktiv sind. Beleuchtungsquelle und -intensität sind wählbar bzw. regulierbar. Die Testeinheit ist mit einer Steuerung versehen, die die Realisierung zeitlich unterschiedlicher Bedingungen ermöglicht. Das Verfahren kann im batch-Ansatz als auch im kontinuierlichen Betrieb angewendet werden.

Die Testanlage wurde für Untersuchungen von Wechselwirkungen von Mikroalgen mit Oberflächen aus dem Bausektor (Putze, Farben) entwickelt und bietet insbesondere die Vorteile, dass im Gegensatz zur Durchführung von Freilanduntersuchungen reproduzierbare Bedingungen herrschen und Resultate für Material-/ Produktentwicklung in überschaubaren Zeiträumen und unter definierten Bedingungen verfügbar sind.

Da ähnliche Anforderungen auch für andere Branchen Herausforderungen darstellen, soll im Rahmen dieser Studie ermittelt werden, für welche Branchen, die sich im Rahmen der Bioökonomie mit neuen Stoffen oder Stoffkombinationen beschäftigen, mit diesem Verfahren oder einer daraus abgeleiteten Variante Vorteile für die Produktentwicklung und -bewertung ergeben. Außerdem sollen in Ergänzung zu dem Teststand Verfahren identifiziert werden, die für die Charakterisierung der Biofilmbildung an den zu testenden Oberflächen geeignet sind und im industriellen Bereich angewendet werden können. Die Vorgehensweise sowie die Ergebnisse sind in den Arbeitspaketen 1 und 2 beschrieben.

Bild 3:

Gesamtansicht des im Fraunhofer IGB im Rahmen des durch die EU geförderten Projektes *FoamBuild* entwickelten Photo-Bioreaktors zur Untersuchung der Biofilmbildung an Oberflächen.

Testapparatur mit Nährstoffversorgung und Steuereinheit.

(Quelle: Fraunhofer IGB)

Experimentelle Überprüfung mit Mikroalgenkulturen ist erfolgt



.....
Darstellung der Vorgehensweise
und Ergebnisse
.....

3.2 AP 1: Bewertung des Potenzials des am Fraunhofer IGB entwickelten Testverfahrens für die Bioökonomie

Zunächst soll in AP 1 ermittelt werden, für welche Produkteigenschaften das Testverfahren geeignet sein soll. Dabei ist die Relevanz der Biofilmbildung in verschiedenen Bereichen von Bedeutung. Abhängig vom Einsatzort der Oberflächen und Beschichtungen sind Biofilme unterschiedlicher Spezies zu berücksichtigen.

In AP 1 werden Branchen und Unternehmen ermittelt, bei denen ein Bedarf an Testverfahren für neu entwickelte, biobasierte Produkte oder für Produkte mit Umweltrelevanz besteht. Identifiziert werden außerdem Unternehmen, die einen Bedarf an Verfahren formulieren, die eine Messmethode benötigen, um Produktentwicklungen in einem frühen Entwicklungsstadium zu bewerten, beispielsweise um den Zusatz von antimikrobiellen Stoffen aus Kostengründen zu optimieren oder Freisetzungverhalten von Stoffen aus Produktoberflächen zu charakterisieren.

3.2.1 Vorgehensweise zur Ermittlung von Branchen und Firmen als Grundlage zur Bedarfsanalyse

In AP 1 ging es darum, Branchen und Firmen zu identifizieren, die prinzipiell Nachweisverfahren zur biologischen Charakterisierung von Oberflächen zur Produktentwicklung und -charakterisierung benötigen. Es wurde folgendermaßen vorgegangen:

- Identifizierung der Anwendungsfelder, in denen mit mikrobiellen Biofilmen zu rechnen ist und diese vermieden werden müssen.
Nicht berücksichtigt wurden Anwendungen im medizinischen Sektor, da dort besondere Anforderungen bestehen, die für bioökonomische Ansätze und Lösungen nicht relevant sind.
- Aus der Identifizierung der Anwendungsfelder wurden die Branchen abgeleitet, die durch ihre Produktgestaltung einen Nachweis der Biofilmentwicklung bzw. -vermeidung benötigen.
- Der Fokus der Auswahl wurde zunächst auf Baden-Württemberg ausgerichtet.
- Die Auswahl der Firmen wurde anhand bestehender Kontakte getroffen sowie nach Internetrecherchen und einschlägigen Ausstellerkatalogen. Genutzt werden konnte auch die Fraunhofer-interne Datenbank.
- Ein Fragebogen wurde aufgestellt, der in einer internetbasierten Umfrage verschickt wurde mit der Bitte um Beantwortung der aufgeführten Fragen.
- Es erfolgte eine Auswertung der Fragebögen und eine Kontaktaufnahme mit Unternehmen, durch die eine Rückmeldung erfolgt war.

3.2.2 Relevanz der Unternehmen

.....
Darstellung der Vorgehensweise
und Ergebnisse
.....

Die Auswahl der Unternehmen basierte auf der Kenntnis der Branchen, die entweder entsprechende Prüfverfahren anwenden oder vermutlich anwenden oder die ihre Produkte hinsichtlich Biofilmbildung schützen und prüfen sollten. Konzentriert wurde sich zunächst auf folgende Zielgruppen:

- Hersteller von Baumaterialien (Farben, Lacke, Putze, Dichtstoffe, Fugenmaterial) und biobasierten Dämmstoffen
- Hersteller von Kunststoffen (Leitungen, Schläuche,...) und
- Verarbeiter von Kunststoffen
- Verpackungen

Aufgrund der Informationen auf den Internet-Seiten der Unternehmen wurden Hinweise der Hersteller auf biobasierte Produkte besonders geachtet. Schwerpunktmäßig wurden Firmen aus Baden-Württemberg kontaktiert. Von ursprünglich 108 Kontaktadressen wurde konzentriert auf 49 Adressaten. 73 % davon waren der Baustoffindustrie, 27 % der Kunststoffbranche zuzuordnen. Baustoffe nahmen einen relativ breiten Rahmen ein, da sich darunter Farben, Lacke, Putze sowie Dämmstoffe summierten. Bei den Kunststoffen wurde fokussiert auf Unternehmen, die bereits mit biobasierten Materialien arbeiten.

3.2.3 Aufbau der Umfrage

Ziel der Umfrage war es, möglichst viele Unternehmen zu kontaktieren und ihr Interesse an einem Testsystem zur Bewertung ihrer Produkte zu ermitteln bzw. ihren Bedarf zu erfassen.

Die Umfrage wurde in folgendem Format angelegt:

1. Anschreiben:
Im Anschreiben wurde das Anliegen der Umfrage dargestellt und um Beantwortung der neun Fragen gebeten, die als Attachment zur E-Mail angefügt waren. Außerdem wurde auf einen Link hingewiesen, über den der Befragte die Internet-Seite des Fraunhofer IGB erreichen konnte.
2. Fragenkatalog:
Der Fragenkatalog umfasste neun Fragen, die die Branchen adressierten sowie die derzeitige Situation in der Firma umrissen und die Bedarfsermittlung für Testverfahren einbezogen.

Die Fragen waren auf drei Seiten angeordnet, jeweils mit ausreichend Platz eigene Kommentare und Bemerkungen einzubringen. Die Fragen sind aus folgender Auflistung zu ersehen.

Inhalt des Fragebogens:

.....
Darstellung der Vorgehensweise
und Ergebnisse
.....

Frage 1: Zu welcher Branche gehört Ihr Unternehmen?

- Bau – Farben, Lacke, Putze, Dämmstoffe
- Verpackungsmaterial
- Kunststoffherstellung
- Andere

Frage 2: Welche Untersuchungsverfahren werden in Ihrer Firma angewendet?

- a) Werden Normierte Verfahren angewendet? Wenn ja, welche?
- b) Setzen Sie Verfahren ein, die firmenintern entwickelt wurden?
- Ja
- Nein

Wenn ja, was ist die Motivation, eigene Verfahren anzuwenden?

Frage 3: Mit welcher Zielsetzung werden Normierte Verfahren eingesetzt?

- Ermittlung der Produktqualität in der F&E-Phase
- Qualitätssicherung bei kommerzialisierten Produkten
- Kundenwunsch
- Gesetzliche Vorgaben
- Weitere?

Frage 4: Gibt es aus Ihrer Sicht Bedarf, weitere Standards zu etablieren? Beispielsweise, um in kürzeren Zeiträumen Ergebnisse für die weitere Entwicklungsarbeit zu bekommen.

- Ja
- Nein

Wenn ja, für welche Zielgrößen, Produkte, Produktentwicklungsphasen?

Frage 5: Halten Sie ein standardisiertes Verfahren zur Ermittlung der Biofilmbildung bzw. -vermeidung auf Ihren Produkten für wünschenswert?

- Ja
- Nein

Wenn ja, können Sie dies kurz begründen?

- Bevorzugen Sie ein Verfahren, das in Ihrer Firma angewendet werden kann?
- Würden Sie die Durchführung eher zur externen Bearbeitung in Auftrag geben?

Frage 6: Wo liegen Ihre Präferenzen?

- Mit dem Verfahren wird die Biofilmbildung / der Aufwuchs von Algen auf Oberflächen überprüft bzw. charakterisiert.
- Mit dem Verfahren wird die Biofilmbildung / der Aufwuchs durch Pilze auf Oberflächen überprüft bzw. charakterisiert.
- Bevorzugt Vergleich verschiedener Produktoberflächen im Entwicklungsstadium.
- Bevorzugt Einfluss von Parametern wie Feuchte, Nährstoffversorgung, Lichteinfluss etc.
- Einfluss antimikrobieller Stoffe / Stoffkombinationen auf mikrobielles Wachstum.

Frage 7: Sind Sie an einer Zusammenarbeit mit einem Forschungsinstitut interessiert, um entsprechende Verfahren zu entwickeln bzw. weiter zu entwickeln?

- Ja
- Nein

Wenn ja, wie dürfen wir Sie kontaktieren?

Frage 8: Sehen Sie Möglichkeiten, in einem Konsortium mit anderen Firmen an einer Standardisierung / Normungsverfahren mitzuwirken?

- Ja
- Nein

Warum?

Frage 9: Wie hoch ist der Anteil an biobasierten Produkten in Ihrem Unternehmen?

Erstellung einer Bewertungsmatrix:

Es wurde eine Bewertungsmatrix erarbeitet, die die Vorteile und mögliche Einschränkungen des neuen Messverfahrens beinhaltet und die Bedürfnisse potenzieller Anwender und Nutzer einbezieht.

Es erfolgte eine Bewertung der Relevanz unter Berücksichtigung beispielsweise folgender Kriterien:

- Bedarf, das Verfahren firmenintern beim Hersteller zu etablieren
- Bedarf, Untersuchungen im Auftrag zu vergeben
- Ziel, Verfahren zum Produkt weiter zu entwickeln und auf den Markt zu bringen
- Bewertung des Bedarfs an standardisierten Verfahren / Relevanz der Normung
- Ermittlung des Bedarfs an „Ersatzverfahren“ zu Freilandexperimenten als Screening

Resultate der Recherche:

Schwerpunktmäßig wurden Unternehmen in Baden-Württemberg kontaktiert. Versandt wurden 49 E-Mails. Die Bruttoreücklaufquote betrug 10,2 %, die Nettorücklaufquote 6,1 %. 63,6 % der Adressaten verfolgten den Link zum Fragebogen, davon 22,7 % an demselben Tag, an dem die Nachricht verschickt worden war, 27,3 % am Folgetag. Dies zeigt, dass prinzipiell an dem Thema Biofilme und deren biologische Bewertung ein relativ hohes Interesse besteht. 78,6% der Teilnehmenden öffneten die Datei direkt an ihrem Arbeitsplatzrechner, 14,3 % griffen von ihren mobilen Geräten aus auf den Fragebogen zu.

Enttäuschend war deshalb die doch relativ geringe Rücklaufquote. Da ein prinzipielles Interesse auf Grund der erfolgten Aufrufe des Fragebogens vorausgesetzt wurde, versandte das Fraunhofer IGB nach ca. einem Monat ein Erinnerungsschreiben mit der Bitte mitzuteilen, ob die Thematik aus Sicht des Unternehmens Relevanz hat. Zu Beginn der Aktion war erwartet worden, dass im Bereich der Unternehmen, die mit biobasierten Materialien arbeiten bzw. auf der Basis nachwachsender Rohstoffe neue Produkte entwickeln, sowohl Interesse als auch Bedarf vorhanden sein müsste, da diese Produkte aus mikrobiologischer Sicht am ehesten besiedelt oder abgebaut werden können.

Der auswertbare Rücklauf an Fragebögen kam aus der Branche Bau (Farben, Lacke, Putze, Dämmstoffe). Ein wichtiges Argument könnte dabei sein, dass für die Produktentwicklung beispielsweise im Bausektor der Zusatz von Stoffen zur Reduzierung von Biofilmwachstum bisher üblich war, um optische Veränderungen zu unterdrücken. Jedoch sind viele der bisher verwendeten Substanzen aus Umweltschutzgründen entweder verboten oder der Zusatz ähnlicher Verbindungen ist stark reglementiert. Voraussagen über wirksame Lösungen treffen zu können, hat daher mehrere Vorteile. Bei der derzeit weit verbreiteten Prüfung der Oberflächen in Freilandbewitterung, liegen Ergebnisse erst nach einer Exposition von mehreren Jahren vor. Ein alternatives Verfahren, das reproduzierbare Resultate in überschaubaren Zeiträumen von wenigen Wochen liefert, beschleunigt die Umsetzung gegenüber der bisherigen Vorgehensweise deutlich und verbessert die Aussagen qualitativ und quantitativ.

Die Fragebögen wurden sehr detailliert ausgefüllt und zeigten, dass das Interesse an einer Kooperation mit dem Forschungsinstitut zur Entwicklung geeigneter Prüfverfahren besteht und auch Kooperationen mit anderen Firmen zu diesem Thema erwünscht sind.

Bedarf besteht auf Grund der Analyse der Daten, insbesondere um die Produktqualität in der Produktentwicklungsphase zu ermitteln, aber auch um Qualitätssicherung zu gewährleisten und gesetzliche Vorgaben, soweit vorhanden, zu erfüllen. Ein Bedarf wird bei den Unternehmen darin gesehen, Standards zu etablieren, die eine Zeiteinsparung bei der Produktentwicklung ermöglichen und über objektive technische Messparameter verfügen. Gefragt nach den Präferenzen wurde deutlich, dass die Biofilmentwicklung von Algen und Pilzen geprüft werden sollte und ein Vergleich von Produktoberflächen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien angestrebt wird. Ein Testverfahren sollte die Einflussparameter Feuchte, Nährstoffversorgung, Lichteinfluss etc. sowie den Einfluss antimikrobieller Stoffe / Stoffkombinationen auf mikrobielles Wachstum bewerten.

Darstellung der Vorgehensweise
und Ergebnisse

Die Bereitschaft zur Zusammenarbeit zur Testentwicklung mit einem Forschungsinstitut sowie mit anderen Unternehmen wurde signalisiert. Biobasierte Produkte werden bei den Unternehmen, deren Antworten auswertbar waren, nicht hergestellt.

Ein wichtiger Rückschluss aus dem eher geringen verwertbaren Rücklauf der Studie könnte sein, dass die bisher kommerzialisierten Produkte aus biobasierten Rohstoffen nur für Kurzzeitanwendungen vorgesehen sind oder noch nicht ausreichend Erfahrungen mit deren Einsatz vorliegen, so dass Probleme mit Biofilmentwicklung bisher noch nicht bekannt sind.

3.3 AP 2: Ermittlung der Anforderungen für Standardisierung und Normung des Testverfahrens

Ausgangssituation:

Mikroorganismen kommen ubiquitär vor und waren über lange Zeiträume hinweg nur mittels mikroskopischer Verfahren oder über ihre biochemischen Reaktionen auf verschiedenen Substraten nachzuweisen. Allerdings wurden die Effekte von Mikroorganismen schon lange vorher makroskopisch wahrgenommen, nur war ihre Existenz nicht bekannt und das Phänomen der Biofilmbildung nicht beschrieben. Inzwischen haben sich zahlreiche Arbeitsgruppen mit der Biofilmentwicklung beschäftigt, so dass die biologischen Zusammenhänge weitgehend geklärt sind (Costerton et al., 1995; Stoodley et al., 2002; Weber et al., 2014; Weber et al., 2011; Trick, 2011). Um Biofilme zu vermeiden oder zu entfernen, bedarf es aber nach wie vor einer intensiven Forschung, da diese mikrobiellen Strukturen sich auf unterschiedlichsten Oberflächen ansiedeln und eine hohe Resistenz gegenüber physikalischen und chemischen Einwirkungen entwickeln, was zu schwerwiegenden Folgen führen kann.

Schädigungen und Beeinträchtigungen der Funktion sind in Tab.1 zusammengefasst. Die Tabelle 1 zeigt an einigen Beispielen auf, dass die Folgen von Biofilmentwicklungen mit hohen Kosten, aber auch mit gesundheitlichen Beeinträchtigungen einhergehen. Im medizinischen Bereich tragen sie in besonders tragischen Fällen als Todesursache auf.

Einen großen Einfluss auf die Biofilmentwicklung haben die Materialeigenschaften der besiedelten Oberflächen (Müller-Renno, et al.; 2014). Es ist daher erforderlich, im Rahmen einer Produktentwicklung soweit möglich Wechselwirkungen zwischen Mikroorganismen und Materialoberfläche mit geeigneten Verfahren zu charakterisieren. Dazu wurden eine Reihe normierter Verfahren erarbeitet, an denen sich die entsprechenden Untersuchungen orientieren, die aber nicht alle Anwendungsfälle abdecken und in vielen Fällen die reale Anwendung nicht oder nur bedingt abbilden.

Tabelle 1: Schäden und Beeinträchtigungen durch Biofilme

Schaden / Beeinträchtigungen	Konsequenz	Maßnahmen	Nachteile
Optische Beeinträchtigungen	Oberflächen unansehnlich	Reinigung / Instandhaltungsmaßnahmen	Kosten
Materialabbau	Schäden an Oberflächen	Austausch von Bauteilen, Strukturelementen, ...	Kosten, Funktionsstörungen, Auslöser für toxische und /oder pathogene Faktoren
Technische Störungen	Verstopfung von Leitungen, Beeinträchtigung von Funktionen von Anlagen	Ermittlung der Ursachen, Reinigung, Wartung, evtl. Austausch von Anlagenteilen, Beseitigung von Folgen der Störung	Kosten, Verlust technischer Einrichtungen, Situationsabhängig hygienische Beeinträchtigungen
Hygienische Belastung und / oder Gesundheitsschäden	Allergische Reaktionen und /oder akute Krankheitsbilder bei Nutzern	Ermittlung der Ursachen, technische Maßnahmen zur Beseitigung der Ursachen	Gesundheitliche Beeinträchtigungen, Kosten

3.3.1 Untersuchungen an Oberflächen zur Bewertung der Wechselwirkungen zwischen Mikroorganismen und Materialien

Die Untersuchung von mikrobiellem Wachstum auf Materialoberflächen stellt eine große Herausforderung dar, da zahlreiche verschiedene Parameter einen Einfluss auf das Ergebnis haben. In der Literatur werden verschiedene Testmethoden beschrieben, einige wurden in die Normverfahren aufgenommen. In Tab. 2 sind die wichtigsten der bestehenden Verfahren zusammengefasst.

Alle aufgeführten Verfahren haben ihre Berechtigung, aber auch enorme Limitierungen. Eine wesentliche Einschränkung besteht darin, dass die Bewertung sich an morphologischen Merkmalen orientiert, die eine zuverlässige Quantifizierung und objektive Bewertung erschweren. Außerdem handelt es sich weitgehend um statische Verfahren, die auf einer vorab zu wählenden festen Einstellung der experimentellen Parameter basiert.

Für die Überwachung der Biofilmentwicklung an Oberflächen wurden einige Messverfahren entwickelt, die direkt in technischen Systemen angewandt werden können (Tabelle 3). Diese Messeinrichtungen sind nicht für alle Anwendungen geeignet. Mit einigen, wie den elektrochemischen Verfahren sind Messungen nur an elektrisch leitfähigen Oberflächen möglich. Für alle in Tabelle 3 erwähnten Messverfahren gilt, dass ein Monitoring der Biofilme erst bei bereits relativ weit entwickelten Biofilmen möglich ist.

Tab. 2: Zusammenfassung von Testmethoden zur Prüfung auf mikrobielles Wachstum auf verschiedenen Materialoberflächen (Auswahl)

Methode	Titel	Charakteristika	Bewertung	Kommentare
ISO 846	Prüfung der Wirkung von Mikroorganismen auf polymere Substanzen	Prüfung polymerer Oberflächen in ihrer Wirkung gegen Pilze, Algen und Bodenbakterien, speziell um Abbaueigenschaften zu erfassen	-Visuelle Änderungen - Massenänderungen -Änderung der physikalischen Eigenschaften	Interessant um Materialabbau zu untersuchen
ASTM G21-096	Standard Practice for Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials to Fungi	Synthetische polymere Materialien mit unterschiedlicher Morphologie, Produkte, Tubings, flache Substrate, Folien	5 verschiedene Pilzspezies, Mineralsalz-medium, Temperatur:30°C. Relative Feuchte minimal 85 %. Analyse makroskopisch nach 4 Wochen nach Inkubation	Interessant um Materialbeständigkeit zu prüfen
Mil-STD-810F method 508.5	Laboratory test method – fungi	Prüfung gibt Ergebnisse über das Verhalten von Pilzen auf verschiedenen Materialien	Organismen:12, verschiedene Pilzspezies Mineralsalz-medium, Temperatur: 30 °C. Relative Feuchte: minimal >90, aber <100 %. Analyse: makroskopisch Prüfung nach minimal 28 bis 84 Tagen	Materialresistenz
ASTM D 3456-2012	Standard practice for Determining by Exposure Tests the Susceptibility of Paint Films to Microbiological Attack (outdoor exposure)	Empfindlichkeit von Farbschichten gegenüber mikrobiellen Angriffen bei Außenanwendungen	Pilzwachstum makroskopisch nach 3, 6, 9, 12, 18 und 24 Monaten	Wachstumsverhalten
ASTM D 3274 (reapproved 2013)	Standard Method for Evaluating Degree of Surface Disfigurement of Paint Films by Fungal or Algal Growth, or Soil and Dirt	Abbauverhalten von Oberflächen Bewertung von Schimmelpilz-und Algenwachstum sowie Abbau von Farbschichten bei Außenanwendungen	Makroskopische Bewertung	Wachstumsverhalten
CSTB chamber	Measurement procedures for fineries and coatings	Die Proben werden mit einer Nährlösung besprüht Oberfläche wird bestrahlt, um Algenwachstum zu ermöglichen	Makroskopische Bewertung	Wachstumsverhalten insbesondere von Algen

Tabelle 3: Messverfahren zur Biofilmentwicklung in technischen Systemen

Methode	Produktname	Kontakt
Optical Fiber Sensor	Nicht bekannt	M. Zhaoz mf@cjit.edu.cn
Optospektroskopische Messung	Biosens	Fa. Optosens
Mikrothermaler Diffusions-sensor	MTD Fouling Sensor	Advantage Controls
Wärmetransfer	HydroBio Advance	ICL-Group, BK-Giulini; AquaDyn Technologies
Elektrochemische Messung	BioGeorge	Kema Power Generation and Sustainables
Elektrochemische Messung	ALVIM	Alvim Clean Tech
Integrated testing device	Coupointechnik	IWW (Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasserforschung)

3.3.2 Verfahren zur Ermittlung der mikrobiellen Aktivität

Die im Rahmen der Studie durchgeführte Umfrage unter Unternehmen hat ergeben, dass ein objektives Messverfahren zur Beurteilung eines Biofilms an einer Oberfläche erforderlich ist. Bisherige Verfahren decken diesen Anspruch entweder nicht ab oder sind für eine Produktentwicklung ungeeignet, da mit den Messanordnungen die verschiedenen Einflussparameter nicht ausreichend bewertet werden können.

Die gängige Vorgehensweise zum Nachweis der Vermehrungsfähigkeit von Bakterien erfolgt nach wie vor häufig mittels Kultivierung. Nachteil: nicht alle relevanten Organismen sind kultivierbar, der Zeitbedarf ist sehr hoch. Probenentnahme von Biofilmen an Oberflächen ist stark eingeschränkt und nur schwierig quantitativ zu erfassen.

Weitere Möglichkeiten, die sich in der Routineanwendung in verschiedenen Bereichen etabliert haben, funktionieren über die Bestimmung des Adenosintriphosphats (ATP), einem stoffwechselphysiologisch äußerst wichtigen (mikrobiellen) Energieträger. Eine Probenentnahme und Aufarbeitung ist erforderlich, dann aber eine zeitnahe Aussage möglich. Eine Korrelation zu Zellzahlen ist ebenfalls nur bei suspendierten Zellen möglich sowie eine Aussage über die Aktivität vorhandener Organismen.

Enzym-Substrat-Umsätze sind geeignet, um mikrobielle Aktivität zu quantifizieren. Diese Messmethoden sind allerdings nicht direkt auf einer Probe, die mit einem Biofilm bewachsen ist, anzuwenden. Eine vorherige Probenahme und Probenaufarbeitung sollte vorgesehen werden.

Zur Quantifizierung von Algenwachstum ist die Messung der Fluoreszenz von Chlorophyll möglich, die über Sondentechnik erfolgen kann (Beispiel: PAM Fluoreszenzdetektionssysteme von Walz, Effeltrich). Dieses Verfahren ist für Algenwachstum sensitiv. Tritt makroskopisch sichtbares Wachstum an Oberflächen auf, ist eine optische Auswertung über entsprechende Softwaresysteme nach Adaptation und Methodenentwicklung anwendbar.

3.3.3 Identifizierung von Mikroorganismen

Die Identifizierung von Mikroorganismen in einem Biofilm ist dann von Bedeutung, wenn sich in einem technischen System, zum Beispiel im medizinischen Bereich, Mikroorganismen unbekannter Spezies angesiedelt haben, und sich daraus eine gesundheitliche Beeinträchtigung ergeben könnte. Häufig ist die Kenntnis der beteiligten Organismen auch von Bedeutung für eine gezielte und erfolgreiche Strategie der Vermeidung.

Eine direkte Identifizierung auf Oberflächen ist bislang nicht möglich, wie aus der folgenden Zusammenfassung des derzeitigen Standes der Technik geschlossen werden kann:

.....
Darstellung der Vorgehensweise
und Ergebnisse
.....

Ist über eine Quantifizierung der Biofilmentwicklung hinaus eine Identifizierung der Organismen erforderlich, werden zunehmend mit molekularbiologischen Verfahren, wie die Polymerase Kettenreaktion (PCR) oder die Reverse Transcriptase Reaktion (RT-PCR) (Kalland, 2009; Whitehouse, 2009). Die Identifizierung von Mikroorganismen erfordert dabei trotz moderner Techniken nach wie vor eine Probenentnahme und Probenaufarbeitung und in vielen Fällen auch einen zeitaufwändigen Kultivierungsschritt. Neben den DNA- und RNA-basierten Verfahren eignen sich Nachweissysteme, die über die Fluoreszenz-Markierung von Antikörpern mit den sogenannten FISH-Techniken spezifisch bestimmte Bakterienarten oder serologisch unterschiedliche Stämme identifizieren und sogar in Biofilmen anwendbar sind. Ihre Bewertung erfordert entweder die Probenentnahme mit nachfolgender Reaktion in einem Testkit oder die mikroskopische Beurteilung und bleibt somit weitgehend auf eine Identifizierung auf Laborebene beschränkt. Für einen raschen Nachweis in einem inline-Messsystem sind beide Vorgehensweisen ungeeignet. Basierend auf dem Nachweis von Stoffwechselprodukten, die zum Teil als flüchtige Substanzen im bakteriellen Metabolismus entstehen, lassen sich ebenfalls Rückschlüsse auf das Vorkommen bestimmter Bakterienarten ziehen (Tait et al. 2014). Ihr Nachweis ist dabei allerdings auch extrem beeinflusst durch die Bakterienkonzentration in einer bestimmten Umgebung und damit eher für hohe Zellkonzentrationen geeignet. Um Schadensereignisse zu vermeiden, sollten jedoch bereits geringe Konzentrationen an möglichen Krankheitserregern nachweisbar sein.

MALDI-TOF-Massenspektrometrie und FT-IR-Spektroskopie sind als physikalische Messverfahren für die Bakterienidentifikation bis zur Produktreife entwickelt worden, aber nicht in inline-Messsystemen verfügbar (beispielsweise: Bruker Maldi Biotyper, Bruker FT-IR). Anwendungen, bei denen es wie in wässriger Umgebung auf einen raschen und sicheren Nachweis ankommt, finden sich vor allem auch in der Lebensmitteltechnik, wo sich beide Verfahren etabliert haben (Wenning, 2004; Wenning et al., 2014). Beide Verfahren bedürfen derzeit noch entsprechend standardisierter Probenvorbereitung, die vor allem bei FT-IR einen Einfluss hat.

Zum Nachweis, der Quantifizierung und ggf. Identifikation von Bakterien stehen folgende Verfahren zur Verfügung:

- Bestimmung der Keimzahl auf Agarplatten, Identifizierung mittels spezifischer Substrate
- Identifizierung anhand der DNA: PCR, DNA Microarrays, Quantum dots
- Next Generation Sequencing
- Whole Genom Sequencing
- Identifizierung über Antikörper: ELISA, Durchflusszytometrie, FISH, Lateral Flow Assays
- Eine weitere Nachweismethode ist die Raman-Spektroskopie

Nachteile:

zeitintensive Batch- und Off-Site-Verfahren, hoher apparativer Aufwand und geschultes Personal notwendig;

Nicht für Anwendungen bei Biofilmen ohne vorherige Probenentnahmen und – aufarbeitung geeignet.

3.3.4 Objektive Quantifizierung von mikrobiellem Wachstum auf Oberflächen

.....
Darstellung der Vorgehensweise
und Ergebnisse
.....

Aus der Befragung (Kapitel 3.2) von Unternehmen hat sich ergeben, dass ein standardisiertes Verfahren für die Bewertung von Oberflächen erwünscht ist und hier ein Bedarf ausdrücklich formuliert wurde. Eine wesentliche Anforderung war dabei, eine objektive Quantifizierung des Bewuchses an den zu untersuchenden Oberflächen zu erreichen. Wie die bisherigen Ausführungen belegen, sind derzeit keine auf die Fragestellung direkt anwendbaren Verfahren verfügbar. Die Fragestellung gewinnt zusätzlich noch dadurch an Komplexität, weil bei der Entwicklung von Biofilmen nicht nur optische Faktoren eine Rolle spielen, sondern auch die Identität der beteiligten Spezies oder die Zusammensetzung der Population von Bedeutung sind. Darüber hinaus sind auch die Anteile an lebenden oder abgestorbenen Zellen in einem Biofilm von Bedeutung sowie die Festigkeit, mit der er an einer Oberfläche anhaftet und die besiedelte Fläche belegt.

Unter diesen Gesichtspunkten wurden verschiedene Verfahren betrachtet und in Tab. 4 zusammengestellt.

Tabelle 4: Betrachtung verschiedener Verfahren hinsichtlich der quantitativen Bewertung von Oberflächenbewuchs

Verfahren	Qualitative Aussage	Quantitative Aussage	Online anwendbar	Probenentnahme erforderlich
Makroskopische Bewertung mit Auswertesoftware	+	+	+	-
Anfärbung Confokale Laser- mikroskopie	+	- ¹	-	+
Rasterelektronenmikroskopie	+	-	-	+
Messung der magnetischen Kraft mit Partikeln	+	+	- ²	- ²
Anfärbung mit Vitalfarbstoffen	+	- ¹	-	+
Nachweis mit spezifischen Antikörpern	+	+	+	+/-
FISH-Technik	+	+	-	+
qPCR	+	+	-	+

1 bei geeigneter Probenentnahme und Kombination mit geeigneter Software möglich

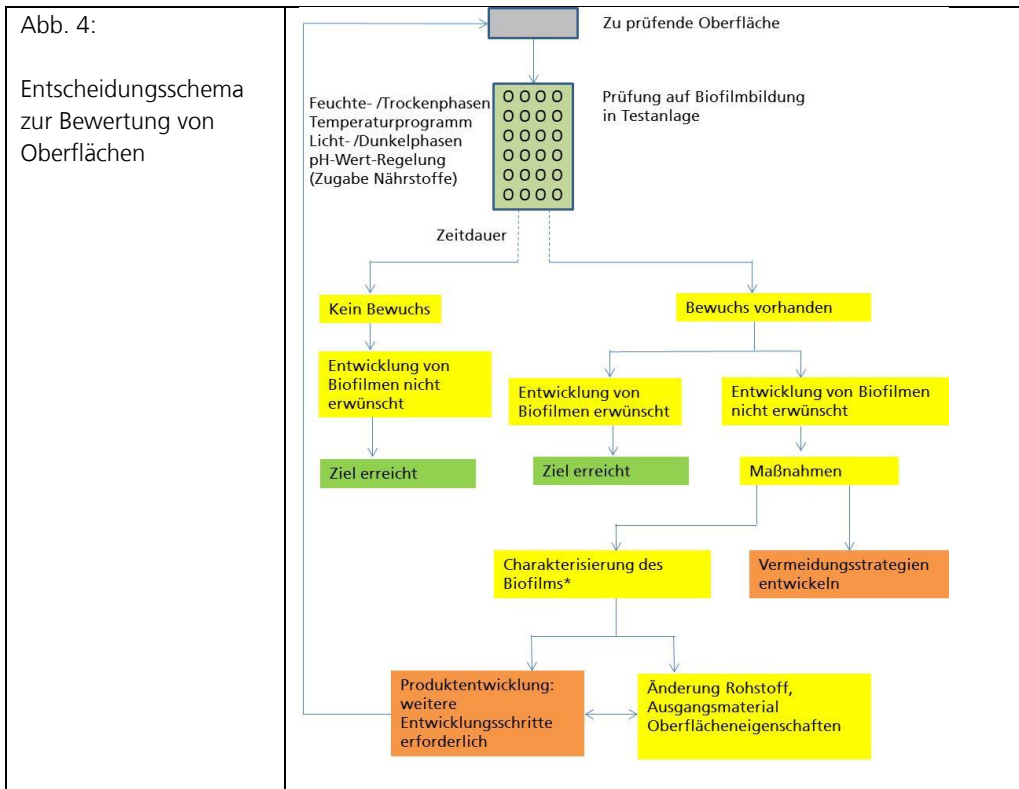
2 bei Weiterentwicklung des Verfahrens möglich

Weitere alternative Verfahren sind Impedanzmessungen, die aber nicht für alle Materialoberflächen anwendbar sind und in hohem Maß von den Umgebungsbedingungen beeinflusst werden. Eine aufwändige Auswertung ist erforderlich.

Fazit: Es besteht ein Bedarf, Verfahren zur Quantifizierung von Biofilmen zu entwickeln.

3.3.5 Vorgehensweise zur biologischen Bewertung Oberflächen-assoziierten mikrobiellen Bewuchses

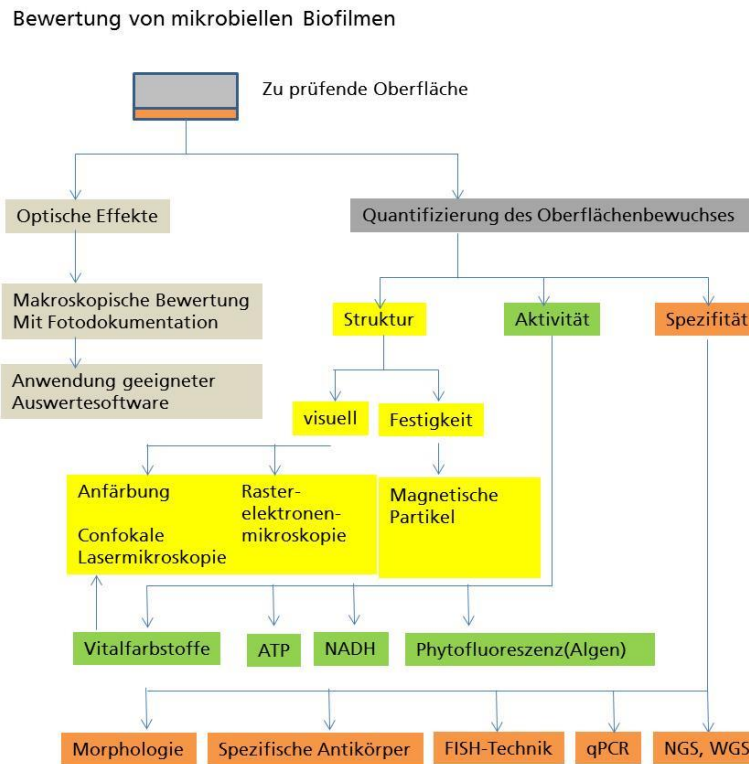
In der Studie wurde ein Entscheidungsschema entworfen, das bei der Entwicklung von Produkten eingesetzt werden kann, um die Wahrscheinlichkeit eines möglichen Bewuchses zu eruieren (Abb. 4). Mikroorganismen besiedeln sowohl natürliche Oberflächen als auch Oberflächen anthropogenen Ursprungs. Ihre Entwicklung wird jedoch gefördert durch biologisch verwertbare Grundstoffe und / oder Additive, die oft nicht auf Anhieb erkennbar oder bekannt sind. Deshalb ist eine experimentelle Prüfung erforderlich, die den realen Bedingungen nahe kommt, aber unter definierten Bedingungen ablaufen kann.



Die Studie hat aber auch gezeigt, dass das Anliegen der Quantifizierung der verschiedenen Faktoren eines Biofilms noch eine Herausforderung darstellt und hier erheblicher Forschungsbedarf besteht, da die in Abb. 5 aufgenommenen Verfahren zwar weitgehend verfügbar, in den meisten Fällen jedoch auf Oberflächen nicht direkt anwendbar sind.

Abb. 5:

Schematische Darstellung einer möglichen Vorgehensweise zur Bewertung von Materialoberflächen, auf denen mikrobielles Wachstum vermieden oder bewertet werden soll



Darstellung der Vorgehensweise und Ergebnisse

3.3.6 Schritte zur Standardisierung am Beispiel eines Testsystems für Fassadenoberflächen

Es existiert eine Reihe von normierten Verfahren, um die Einflüsse von Mikroorganismen auf Materialien zu bewerten (3.3.1). Dies gilt auch hinsichtlich des Abbaus der Materialien als der Besiedelung durch ausgewählte Testorganismen. Diese Verfahren sind für zahlreiche Anwendungen ungeeignet als Maß der Eignung für bestimmte Anwendungen oder sie decken in dem, was untersucht wird, nicht unbedingt die Zielsetzungen ab, die erforderlich wären, um praxisrelevante Aussagen zu erhalten.

Gleichzeitig sind aber zur Bewertung von Produkten, die entwickelt oder eingesetzt werden sollen, validierbare Ergebnisse notwendig, die die Einflussfaktoren weitestgehend abdecken.

Die Vorteile eines solchen standardisierten Verfahrens sollten umfassen:

- Ergebnisse in kurzen, überschaubaren Zeiträumen, speziell auch für Organismen, die einen relativ hohen oder speziellen Bedarf an Wasser, Nährstoffe oder Licht haben.
- Möglichkeit, Experimente so durchzuführen, dass sie die Bedingungen, die regional und global unterschiedlich sind, annähernd abbilden können
- Ausrüstung mit Mess- und Regeltechnik, damit die Bedingungen eingestellt und geregelt werden können
- Möglichkeit, Freisetzung von Stoffen zu quantifizieren
- Möglichkeit, Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen zu erfassen
- Evaluierung der Biofilmentwicklung anhand weitergehender Verfahren
- Ersatz von Freilandexperimenten
- Wiederholbarkeit, Reproduzierbarkeit der Resultate
- Flexibilität

Da sich aus der durchgeführten Umfrage ergeben hat, dass zumindest für eine Branche der Bedarf an standardisierte Verfahren erforderlich ist, sollen in direktem Kontakt mit zukünftigen Nutzern von Testverfahren Anforderungen und zu messende Parameter abgestimmt werden und in die Entwicklung geeigneter Verfahren einfließen. Zu einem späteren Zeitpunkt kann dann über den Einstieg in eine Normung des Verfahrens entschieden werden. Von Seiten der Industrie und Normungsgremien wurde bereits Interesse signalisiert, einen solchen Prozess anzustoßen.

Aus Sicht der Bioökonomie, die auf der Nutzung biobasierter Materialien und Prozesse basiert, herrscht offensichtlich noch Aufklärungsbedarf. Biofilmbildung oder mikrobiell verursachte Materialschäden von biobasierten Materialien sind hier offensichtlich noch nicht im Fokus. Hier sollte Aufklärungsarbeit durch weiterführende Gespräche erfolgen, um zu einem frühen Zeitpunkt für den Gesamttrend ungünstige Folgen zu vermeiden. Eventuell sind bei den biobasierten Produkten bislang eher Kurzzeitanwendungen im Fokus oder es liegen noch nicht ausreichend praktische Erfahrungen vor, die einen Bedarf zur Überprüfung der Produkte hinsichtlich biologischer Besiedelung dringend erscheinen lassen.

4 Literatur

Amy M., Anderson, B.M., Spears, H.V., Lubarsky, I D., Gerbersdorf, S.U., Paterson, D.M.: Magnetic Particle Induction and Its Importance in Biofilm Research. Chapter from the book *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges*, Downloaded from: <http://www.intechopen.com/books/biomedical-engineeringfrontiers-and-challenges>. PUBLISHED BY World's largest Science, Technology & Medicine. Open Access book publisher

Cheng, K.C., Demirci, A., Catchmark, J.M.: Advances in biofilm reactors for production of value-added products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87(2): 445-456 (2010)

Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M.: Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49:711-45

Kalland, K.-H. in Walker, J.M., Rapley, R. (eds.): *Molecular Biology and Biotechnology*. Chapt.4, 76-86 (2009); RSC Publishing

Muffler, K., Lakatos, M., Schlegel, C., Strieth, D., Kuhne, S., Ulber, R.: Application of biofilm bioreactors in white biotechnology. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 146:123-161 (2014)

Müller-Renno, C., Buhl, S., Davoudi, N., Aurich, J.C., Ripperger, S., Ulber, R., Muffler, K., Ziegler, Ch.: Novel materials for biofilm reactors and their characterization. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 146:207-233 (2014)

Stoodley P., Sauer K, Davies DG, Costerton JW.: Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.*; 56:187-209. (2002)

Tait, E., Perry, J.D., Stanforten, S.P., Dean, J.R.: Use of volatile compounds as a diagnostic tool for the detection of pathogenic bacteria. *TrAC Trends in Analytical Chem.*, 53, 117-125 (2014)

Trick, I.: Biomimetische Strategien im Einsatz gegen Biofilme, V2011 »Vakuumbeschichtung und Plasmaoberflächentechnik« (Industrieausstellung & Workshop-Woche), Workshop: Beschichtung für Biologie und Medizintechnik, 17.-20. Oktober 2011, Dresden, Germany

Van Houdt, R., Michiels, C.W.: Role of bacterial cell surface structures in Escherichia coli biofilm formation. *Research in Microbiology*, Volume 156, Issues 5–6, June–July, 626-633 (2005)

Weber, C. G.; Burger-Kentischer, A.; Müller, M.; Trick, I.; Hirth, T.: Biofilmvermeidung durch natürliche Wirkstoffe – gezielte und langfristige Freisetzung durch ein PEG-basiertes Depotsystem, *Biomaterialien*. *Journal of functional materials, biomechanics, and tissue engineering* 12 (1-4): 2 (2011)

Weber, C., Mueller, M., Vandecandelaere, N., Trick, I., Burger-Kentischer, A., Maucher, T., Drouet, C.: Enzyme-functionalized biomimetic apatites: concept and perspectives in view of innovative medical approaches. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 25(3): 595-606 (2014).

Wenning, M., Breitenwiese, F., Konrad, R., Huber, I.: Identification and differentiation of food-related bacteria: a comparison of FTIR spectroscopy and MALDI-TOF mass spectrometry. *J. of Microbiological Methods*, 103, 44-52 (2014),

Wenning, M.: Identifizierung von Mikroorganismen aus Lebensmitteln durch Fourier-transformierte Infrarot (FTIR)-Mikrospektroskopie. Diss. TUM (2004)

Whitehouse, D.B. in Walker, J.M., Rapley, R. (eds.): *Molecular Biology and Biotechnology*. Chapt.5, 126 (2009); RSC Publishing