

Schlussbericht vom 29.02.2024

zu IGF-Vorhaben Nr. 21670 N

Thema

Antimikrobielle Peptide zur Vermeidung der Biokorrosion

Berichtszeitraum

01.03.2021 - 30.11.2023

Forschungsvereinigung

DECHEMA e.V.

Forschungseinrichtung(en)

1. Technische Hochschule Mittelhessen
2. DECHEMA-Forschungsinstitut

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Wirtschaft
und Klimaschutz

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Inhaltsverzeichnis

Thema.....	1
Berichtszeitraum	1
Forschungsvereinigung.....	1
Forschungseinrichtung(en)	1
Darstellung des wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzens der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihres innovativen Beitrags und ihrer industriellen Anwendungsmöglichkeiten	3
Darstellung der durch die Förderung erzielten Ergebnisse im Einzelnen mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele.....	5
Zusammenfassung der Forschungsarbeiten der Technischen Hochschule Mittelhessen .	9
Zusammenfassung der Forschungsarbeiten des DECHEMA-Forschungsinstitutes	16
Kultivierung von korrosionsfördernden Biofilmen.....	16
Verwendung der Zuwendung	30
Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	30
Fortgeschriebener Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft.....	31
Einschätzung der Realisierbarkeit des Konzeptes zum Ergebnistransfer	34

Darstellung des wissenschaftlich-technischen und wirtschaftlichen Nutzens der erzielten Ergebnisse insbesondere für KMU sowie ihres innovativen Beitrags und ihrer industriellen Anwendungsmöglichkeiten

Angesichts steigender Resistenzen durch eine kontinuierliche Biozid-Zugabe und einer geringen Auswahl an möglichen Bioziden werden zunehmend höhere Biozid-Konzentrationen zur erfolgreichen Beseitigung von Biokorrosionsbakterien benötigt. Diese Bakterien stellen in industriellen Anlagen eine immense Gefahr dar, da diese aufgrund von diversen Reaktionen, insbesondere durch die Ausbildung eines sogenannten Schwefel-Kreislaufs durch Sulfat-reduzierende (SRB) und Schwefel-oxidierende Bakterien (SOB), immense Schäden an Metallen hervorrufen können. Insbesondere seit dem Leck in der Alaska-Öl-Pipeline im Jahr 2006, welches aufgrund von bakterieller Beteiligung hervorgerufen wurde, und welches neben hohen Reparaturkosten auch zu einer immensen Umweltschädigung durch ausgelaufenes Öl führte, gewinnt die Biokorrosionsbehandlung immer mehr an Bedeutung. Da die Biozide jedoch eine immense Gefahr für Mensch, Tier und Umwelt darstellen, ist eine umweltfreundlichere Behandlungsstrategie zum Schutz betroffener metallischer Oberflächen wünschenswert. Hierbei kommen antimikrobielle Peptide (AMP) als mögliche Kandidaten in Frage. Diese haben sich bereits in den letzten Jahren im medizin-technischen und pharmazeutischen Kontext als neue Wirkstoffkandidaten immer mehr etabliert, da sie eine gute Aktivität bereits bei sehr geringen Konzentrationen im einstelligen μM -Bereich aufweisen, eine geringe Resistenzrate bieten und zudem ihre Aktivität aufgrund von spezifischen Wirkmechanismen auf bakterielle Systeme beschränken und somit keine Toxizität für Mensch, Tier und Umwelt besteht. Eine Erweiterung des Anwendungsbereichs der AMPs, wie sie hier in Form der Bekämpfung von Biokorrosionsbakterien erstmals in klassische industrielle Anwendungen hinein angestrebt wird, ist somit durchaus sinnvoll.

Im Rahmen dieses Projekts konnten mit Hilfe von maschinellem Lernen und biochemischem Domänenwissen antimikrobielle Peptide gegen biofilmbildende, korrosionsfördernde Bakterien identifiziert und hinsichtlich ihrer Wirksamkeit optimiert werden. Als Modellorganismen wurden hierbei die Sulfat-reduzierenden Bakterien (SRB) *D. vulgaris*, *D. intermedia*, *D. desulfuricans* und der Schwefel-Oxidierer (SOB) *Thiomonas intermedia* verwendet. Vier der optimierten Peptide, nämlich DASamP1, S6L3-33, L5K5W und Bactenecin weisen bei Konzentrationen $<15 \mu\text{M}$ eine 95%-Wachstumsinhibition (MHK95) für die Modellorganismen auf und können somit als sehr wirksam klassifiziert werden. Das Peptid S6L3-33 erwies sich hierbei mit einer MHK95 von $<10 \mu\text{M}$ als das effektivste. Im Vergleich zu den in den Datenbanken annotierten Aktivitäten von antimikrobiellen Peptiden gegen diese Bakterien stellen die genannten Werte, die bisher niedrigsten dar.

Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Peptide DASamP1 und S6L3-33 effektiv gegen Biofilme aus *D. vulgaris* eingesetzt werden können. Mit einem MBIC95-Wert für DASamP1 von 26 μM , was nur ungefähr dem doppelten MIC95-Wert entspricht, konnte hier ein sehr effektiver Biofilm-Inhibitor dargestellt werden. Für die Biofilm-Entfernung weist das Peptid S6L3-33 bezüglich der Bakterienabtötung eine gute Aktivität von 75 μM auf. Die Entfernung der kompletten Biofilm-Matrix gelang mit Bactenecin bei einer Konzentration von 336 μM .

Das Peptid S6L3-33 wies weiterhin mit einem MBIC95-Wert von 99 μM für die Biofilm-Inhibition und einem MBEC95-Wert für die Biofilm-Entfernung von 298 μM eine moderate Effektivität gegen *T. intermedia* auf.

Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Immobilisierung der AMP an einer Stahloberfläche über einen Glycinlinker ohne merkliche Aktivitätsabnahme möglich ist.

Nach dem Einbringen der AMPs in ein Testlack-System konnte jedoch keine Inhibition der Biokorrosion festgestellt werden. Eine Erklärung hierfür könnte die eingeschränkte Beweglichkeit der antimikrobiellen Peptide im Lack darstellen. Um wirksam zu sein, müssen sich in vielen Fällen die antimikrobiellen Peptide parallel zur Membranoberfläche der Bakterien anlagern. Eine Einlagerung mit zufälliger Orientierung im Lack verhindert dies vermutlich.

Um sinnvoll als Korrosionsschutz im Lack eingesetzt werden zu können, müssen die Peptide geeignet orientiert in das Lacksystem eingebracht werden. Geeignete Technologien hierfür sollten vor einer wirtschaftlichen Verwertung der Ergebnisse dieses Projekts in einem Anschlussvorhaben entwickelt werden.

Das besondere Innovationspotenzial des vorliegenden Vorhabens liegt in der durch den Einsatz von AMPs erstmals vollständig biozidfreien Behandlungsstrategie von Biokorrosionsbakterien, welche zudem auch noch umweltfreundlicher ist. Da Biokorrosion zahlreiche industrielle Anwendungen betrifft, wie Rohrleitungen, Lagertanks, Anlagen und Bauteile in maritimer Umgebung (z.B. Schiffsrümpfe, Hafenspundwand) usw., steht ein breites Anwendungsspektrum für die AMPs zur Verfügung. Somit können KMU aus zahlreichen verschiedenen Industriebereichen von der hier verfolgten Entwicklung profitieren.

Im folgenden Abschnitt wird in tabellarischer Form eine Gegenüberstellung der wichtigsten Ziele des Vorhabens und der im Rahmen der Förderung erzielten Ergebnisse vorgenommen.

Darstellung der durch die Förderung erzielten Ergebnisse im Einzelnen mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Arbeitspaket	Wesentliche aus den Zielen abgeleitete Arbeiten	Erzielte Ergebnisse
<p>AP1: Datamining AMPs gegen SRB und SOB zwecks Auswahl von vielversprechenden AMP-Kandidaten</p>	<p>1) Erstellung einer Gesamtdatenbank für antimikrobielle und biofilmaktive Peptide aus einschlägigen, öffentlich zugänglichen Datenbanken</p> <p>2) Training und Validierung von Regressoren zur Vorhersage von minimalen Hemmkonzentrationen von schleimbildenden korrosionsfördernden Bakterien anhand von Daten zu Peptiden aus der Gesamtdatenbank.</p> <p>3) Erstellung einer Liste von Kandidaten mit vorhergesagten, bzw. annotierten minimalen Hemmkonzentration < 15 µM gegen mindestens zwei der korrosionsrelevanten Bakterienfamilien.</p>	<p>Liste von Kandidaten (20) mit vorhergesagten, bzw. annotierten minimalen Hemmkonzentrationen < 15 µM gegen mindestens zwei der korrosionsfördernden Bakterienfamilien</p>
<p>AP2: Identifizierung von AMPs aus biochem. Ansätzen zwecks Auswahl von vielversprechenden AMP-Kandidaten</p>	<p>Auswahl potenzieller AMPs aus zwei Datenbanken (AMP3 + BaAMPs) anhand Ladung, Hydrophobizität, Amphiphilie, Länge und Simplizität der Sequenz</p>	<p>Auswahl (40x) und Kategorisierung anhand der Parameter (12x als sehr gut bis gut geeignet eingestuft)</p>

<p>AP3: Chem. Synthese und Aufreinigung der als potenziell geeignet identifizierten AMPs</p>	<p>Festphasenpeptidsynthese der 12 Kandidaten bzw. im weiteren Projektverlauf der modifizierten AMPs, Reinheitsbestimmung via RP-HPLC und ggf. Aufreinigung via FPLC, Identitätsbestimmung via LC-MS</p>	<p>Erfolgreiche Bereitstellung der Peptide in ausreichender Menge und Reinheit für nachfolgende Versuche</p>
<p>AP4: Bestimmung der Hemmstoffwirkung auf korrosionsrelevante Mikroorganismen</p>	<p>1) Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration für 3 Sulfat-reduzierende Bakterien SRB (<i>Desulfovibrio vulgaris</i>, <i>Desulfovibrio desulfuricans</i>, <i>Desulfovibrio indonesiensis</i>) und 1 Schwefel-oxidierendes Bakterium SOB (<i>Thiomonas intermedia</i>)</p> <p>2) Adaption eines Antibiofilm-Assays (Calgary-Device) an Biokorrosions-Bakterien</p> <p>3) Bestimmung der minimalen Biofilm-Inhibierungs- bzw. der minimalen Biofilm-Entfernungskonzentration für SRB (<i>D. vulgaris</i>) und SOB (<i>T. intermedia</i>)</p>	<p>1) Potenzielle Kandidaten konnten auf 4 Favoriten-AMPs reduziert werden, die eine gute Wirkung im geringen zweistelligen μM-Bereich zeigten.</p> <p>2) Durch Modifikation mit Mikrozentrifugen-Tubes als Wachstumsoberfläche für SOB bzw. mit Stahlmatten für SRB konnte ein flexibler, einfacher, günstiger und, insbesondere im letzten Fall, realitätsnaher Antibiofilm-Assay entwickelt werden.</p> <p>3) Leicht geringere Aktivität für Biofilm-Inhibierung und geringere Aktivität für Bakterien-Abtötung im vorhandenen Biofilm im Vergleich zur plankt. Aktivität. Entfernung des SRB-Biofilms nur durch Bactenecin möglich.</p>

<p>AP5: Steigerung der Aktivität durch Kombination von Wirkstoffen und Optimierung der Struktur</p>	<p>1) Untersuchungen zur Wirksamkeit bei Kombination mehrerer AMPs, sowie AMP + Biozide</p> <p>2) Optimierung zweier Peptide (L5K5W + S6L3-33) durch Aminosäure-Austausch, C-Terminus Amidierung, N-Terminus Lipidierung</p>	<p>1) Keine Synergien in der Kombination zwischen AMP+AMP aus Favoriten (lediglich AMP + Indolicidin führte zum FIC = 0.5) bzw. AMP+Biozid</p> <p>2) Strukturoptimierung führte zur immensen plankt. Aktivitätssteigerung mit minimalen Hemmkonzentrationen im unteren einstelligen µM-Bereich</p>
<p>AP6: Skalierung der Synthese / Bereitstellung ausreichender Mengen</p>	<p>Aufgrund der nicht erfolgten Expansion der Experimente (siehe AP9), war eine Skalierung der Synthese und die Bereitstellung größerer Peptidmengen nicht erforderlich.</p>	<p>-</p>
<p>AP7: Kultivieren von Biofilmen korrosionsfördernder Organismen in Rein- und Mischkultur</p>	<p>Kultivierung von <i>D. vulgaris</i>, <i>T. intermedia</i> und <i>L. mobilis</i> in ihren jeweiligen Medien.</p>	<p>Die Kultivierung von <i>D. vulgaris</i> und <i>L. mobilis</i> war erfolgreich. Die Kultivierung von <i>T. intermedia</i> ist fehlgeschlagen. Mischkulturen konnten aufgrund der begrenzten Laufzeit und von Personalwechseln nicht vorgenommen werden.</p>
<p>AP8: Werkstoff-orientierte Untersuchungen zum Einfluss von MIC / Biofilmanalytik</p>	<p>Es wurden an den Proben Massenverlust- und Ruhepotentialmessungen, CLSM-Untersuchungen zur Biofilmanalytik und REM-Untersuchungen zur Schadensanalytik durchgeführt.</p>	<p>Die Messung des Masseabtrags hat sich als unwirksam erwiesen. Über das Ruhepotential kann das Wachstum der Bakterien verfolgt werden. Aus CLSM-Aufnahmen ist ersichtlich, dass die Peptide in Lösung wirksam einen Biofilm verhindern. Dies wird bestätigt durch REM-Aufnahmen.</p>

		Das Medium ohne Peptid zeigt Lochfraß, hingegen zeigt das Medium mit Peptid keinen Lochfraß.
AP9: Effekt von AMPs unter realitätsnahen Bedingungen im geschlossenen Kreislauf	Eine Anlage mit geschlossenem Kreislauf konnte im Bearbeitungszeitraum nicht aufgebaut werden.	-
AP10: Effekt von AMPs auf Korrosionsschutzwirkung von Lacken	Testung der Lacke und Ermittlung der optimalen Lackierbedingungen. Ansatz von Lack mit Peptid. Untersuchung der Wirkung der Peptide im Lack.	Es ist gelungen die Peptide mit einem Emulgator homogen in die Lackformulierung einzubringen. Allerdings zeigen die Peptide im getrockneten Lack keine sign. Wirkung.
AP11: Immobilisierung der AMPs und Charakterisierung der Immobilisate	<p>1) Immobilisierung via Solid-binding-peptides SBP auf Stahl: Synthese von 4 SBPs, Immobilisierungsausbeute, Immobilisierungsoptimierung, Linker-Tests</p> <p>2) Eine Immobilisierung konnte im Bearbeitungszeitraum seitens des DFI nicht durchgeführt werden</p>	<p>1) Immobilisierungsausbeute <20%, selbst nach Optimierung diverser Parameter. Starke Korrosion der Stahlproben erschwerte Analytik. Linker-Einbau (GGGGG) ohne Beeinträchtigung der AMP-Aktivität</p> <p>2) /</p>

Zusammenfassung der Forschungsarbeiten der Technischen Hochschule Mittelhessen

Die Forschungsarbeiten an der THM waren zunächst auf die Auswahl geeigneter Peptid-Sequenzen fokussiert. Hierbei wurden zwei Ansätze genutzt. Für den ersten Ansatz (AP1 – Datamining AMPs gegen SRB und SOB) wurde aus den öffentlich zugänglichen Datenbanken für antimikrobielle und biofilmaktive Peptide eine Gesamtdatenbank geschaffen, in der Informationen zu Peptidsequenzen, minimalen Hemmkonzentrationen (MHK), Aktivitäten gegen Biofilme (MBIC/MBEC), zur hämolytischen, oder zytotoxischen Wirkung sowie bekannte Wirkmechanismen gemeinsam abgelegt wurden.

Von den insgesamt 35915 dopplungsfreien Sequenzen der Datenbank sind jedoch nur 181 bzgl. ihres Wirkungsmechanismus annotiert. Diese Anzahl ist viel zu gering, um damit, wie im Antrag vorgeschlagen, funktionelle Klassifikatoren zur Vorhersage des Wirkungsmechanismus unbekannter AMP-Sequenzen zu trainieren. In der Tat wies der beste Klassifikator, der für diesen Zweck trainiert wurde, nur eine ungenügende Genauigkeit von 0.7 auf, so dass dieser Weg nicht weiterverfolgt wurde.

Um dennoch geeignete Peptide mit guter Wirkung gegen biofilmbildende, korrosionsfördernde Bakterien zu finden, wurden Regressoren zur MHK50-Vorhersage von schleimbildenden, korrosionsrelevanten Bakterienfamilien trainiert, für die eine hinreichende Anzahl (> 800) an Einträgen zu Sequenzen mit entsprechenden MHK50-Werten in der Datenbank vorlagen. Die Bakterienfamilien Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Micrococcaceae, sowie Bacillaceae erfüllten diese Voraussetzung. So konnten für diese Familien Regressoren für die MHK50-Werte mit guter Vorhersagegenauigkeit implementiert und validiert werden. Als mittlere quadratische Abweichungen der vorhergesagten MHK50-Werte von den annotierten ergab sich hierbei für den Validierungsdatensatz ein Maximalwert über alle Familien von $\pm 0,2 \log(\mu M)$.

In der Abbildung 1 sind im linken Panel die vorhergesagten MHK50-Werte über den tatsächlichen, d.h. in der Datenbank hinterlegten Werten beispielhaft für den Pseudomonadaceae-Regressor dargestellt. Hierbei wurden Validierungsdaten benutzt, also Datenbankeinträge, mit denen der Regressor nicht trainiert wurde. Die rote, durchgezogene Linie entspricht einer Geraden mit Steigung eins. Exakt vorhergesagte Werte liegen genau auf dieser Linie. Im rechten Panel sind für das gleiche Modell die Residuen, d.h. die Differenzen zwischen den vorhergesagten und den tatsächlichen MHK50-Werten, über den tatsächlichen Werten aufgetragen. Die gestrichelten roten Linien entsprechen der Standardabweichung der Residuen. Die Standardabweichung von $0.35 \log(\mu M)$ belegt die hervorragende Vorhersagequalität des Modells.

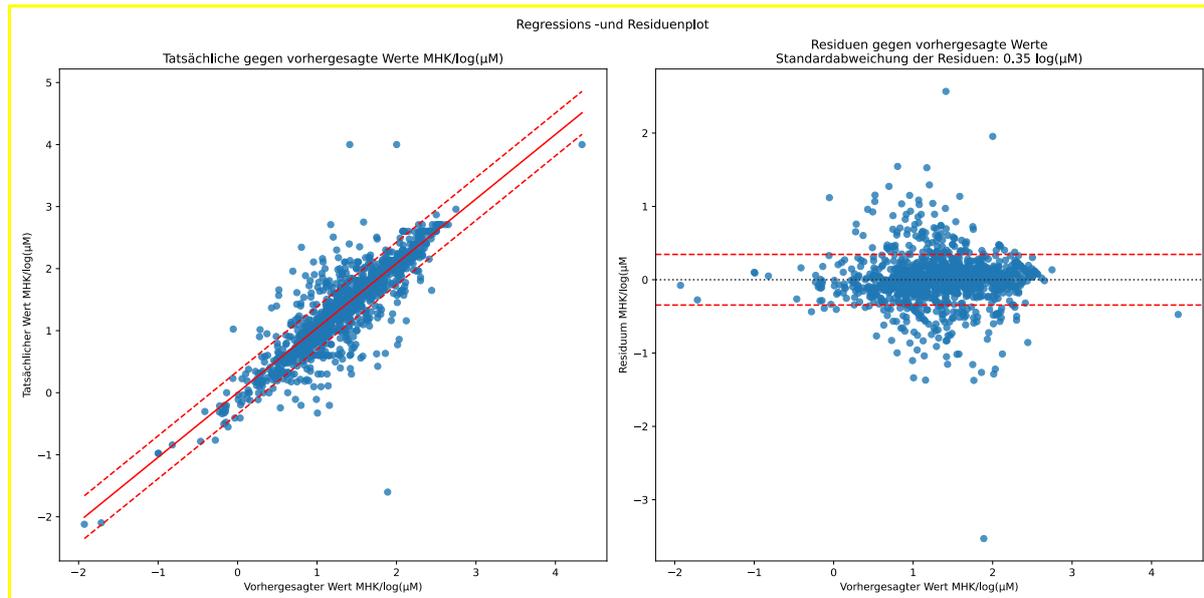


Abbildung 1: Auftragung der tatsächlichen MHK50-Werte gegen solche die mit dem Regressor für Pseudomonadaceae vorhergesagt wurden (rechtes Panel). Dargestellt sind Daten des Validierungsdatensatzes, die nicht zum Training des Regressors verwendet wurden. Die rote durchgezogene Linie stellt eine Gerade mit der Steigung eins dar. Exakt vorhergesagte Werte liegen genau auf dieser Geraden. Rechtes Panel: Auftragung der Residuen, d.h. der Differenzen zwischen den tatsächlichen und den vorhergesagten MHK50-Werten, über den vorhergesagten MHK50-Werten. Die gestrichelten Kurven entsprechen in beiden Panels der Standardabweichung der Residuen.

Für die 241 in der Datenbank als biofilmaktiv annotierten Peptide wurde, falls für diese kein Eintrag zu deren jeweiligen MHK50-Werten für die Bakterienfamilien vorlag, eine Vorhersage mittels der Regressoren durchgeführt.

Mithilfe des Python-Paketes `peptides.py` konnte zusätzlich das hydrophobe Moment dieser Peptide vorausgesagt werden.

Von den 241 biofilmaktiven Peptiden sind in der Datenbank 198 bezüglich ihrer Aktivität annotiert. Aus diesen wurden 20 Peptide mit hoher Biofilmaktivität und vorhergesagten bzw. annotierten MHK50-Werten $< 15 \mu\text{M}$ (sehr aktives AMP) gegen mindestens zwei der vier genannten Bakterienfamilien herausgesucht.

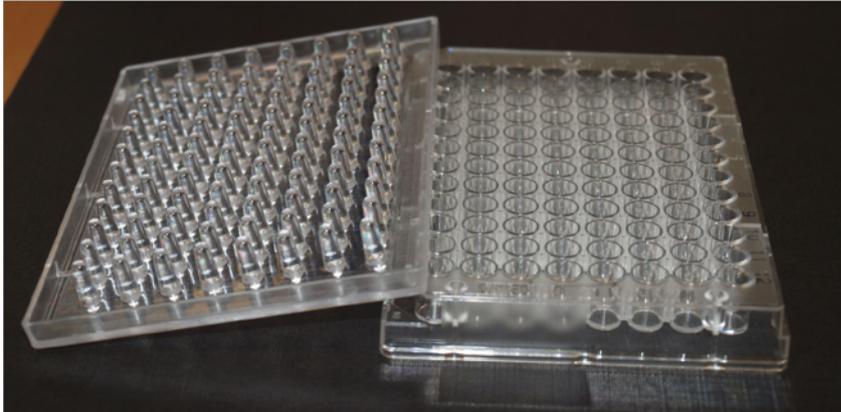
Beim zweiten Ansatz (AP2 – Identifizierung AMPs aus biochem. Ansätzen) wurden potenzielle AMP-Sequenzen aus zwei gängigen Peptiddatenbanken, APD3 und BaAMPs, anhand folgender biochem. Parameter ausgewählt: Ladung von $\sim +5$, Hydrophobizität $\sim 50\%$, Amphiphilie so hoch wie möglich, Sequenzlänge < 25 Aminosäuren und möglichst simple Sequenz mit einer möglichst geringen Anzahl an verschiedenen Aminosäuren zur Kostenreduktion. Insgesamt konnten so 40 potenzielle Sequenzen ausgewählt und kategorisiert werden. Insgesamt wurden die 12 vielversprechendsten Peptide via Festphasenpeptidsynthese hergestellt (AP3 - chem. Synthese und Aufreinigung als geeignet identifizierter AMPs). Hierfür ist an der Forschungseinrichtung der Peptid-Roboter

„LibertyBlue“ der Firma CEM etabliert, welcher die Harz-basierte Synthese von Peptiden im Labormaßstab (hier verwendet: 0.1 M) erlaubt. Zudem stehen die hier etablierten Methoden der RP-HPLC zur Reinheitsbestimmung, die FPLC zur eventuellen Aufreinigung der Peptide auf min. 70%, sowie der Identitätsbestimmung mittels LC-MS zur Verfügung und wurden entsprechend verwendet.

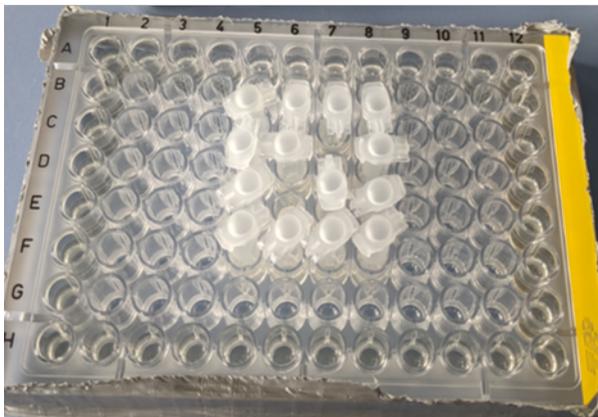
Im anschließenden Arbeitspaket (AP 4 - Bestimmung der Hemmstoffwirkung auf Mikroorganismen) wurden zunächst planktonische Wachstumskurven für SRB und SOB aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Anpassung der Inkubationszeit auf 24 h (SOB) bzw. 48 h (SRB). Mittels Mikrodilutions-Assay wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) der 12 Peptid-Kandidaten für 3 SRB (*D. vulgaris*, *D. intermedia*, *D. desulfuricans*) und 1 SOB (*T. intermedia*) bestimmt. Da *D. vulgaris* ein häufig verwendeter Modellorganismus für SRB und Biokorrosions-Untersuchungen darstellt, lag der primäre Fokus auf diesem Bakterium. Hierbei konnte bei 4 Peptiden bei Konzentrationen $<15 \mu\text{M}$ eine 95%-Wachstumshemmung erreicht werden. Bestes Peptid war hierbei das Peptid S6L3-33 mit einer MHK₉₅ von $6 \mu\text{M}$. Dieses Peptid zeigte ebenfalls gegen *T. intermedia* sowie die verbleibenden SRBs eine sehr gute Aktivität auf.

Die erwähnten 4 Favoriten-Peptide wurden anschließend zudem mittels Antibiofilm-Assay untersucht. Hierbei wurde der kommerziell erwerbliche Calgary-Device (Abbildung 2 A), eine 96-Wellplatte mit Pegs als Biofilm-Wachstumsfläche, bereits in Vorversuchen mit Mikrozentrifugen-Tubes als Wachstumsfläche zur Gewährleistung von Flexibilität, Simplizität und Kostenreduktion modifiziert (Abbildung 2 B). Anhand dieses Assays kann die minimale Biofilm-Inhibierungskonzentration (MBIC), sowie die minimale Biofilm-Entfernungskonzentration (MBEC) bestimmt werden. Hierbei erfolgt eine Auswertung beim MBIC über OD₆₀₀ der gewachsenen Bakteriensuspension, sowie über Anfärbung des Biofilms mittels Kristallviolett. Beim MBEC erfolgt ebenfalls eine Auswertung der Gesamtbiofilm-Masse mittels Kristallviolett sowie eine Entfernung des Biofilms mittels Ultraschall ins Medium und der anschließenden Inkubation zur Detektion der lebenden Zellen im Biofilm. Dieser modifizierte Calgary-Assay wurde für die Untersuchungen an *T. intermedia* angewendet. Hierbei wurde zunächst eine sessile Wachstumskurve aufgenommen und die Inkubationszeit auf 24 h festgelegt. Bestes Peptid war hierbei wieder S6L3-33, bei dem sowohl für die Inhibition als auch für die Entfernung des Biofilms die niedrigste Konzentration benötigt wurde. Erwartungsgemäß stieg jedoch aufgrund der Biofilm-Komplexität die benötigte Peptidkonzentration auf $99 \mu\text{M}$ für die Biofilm-Inhibition und $298 \mu\text{M}$ für die Biofilm-Entfernung (OD₆₀₀) an.

A



B



C

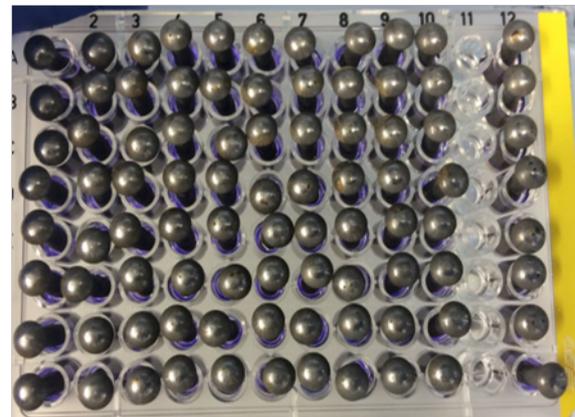


Abbildung 2: A) Calgary Device (Innovotech Inc.), Quelle: DOI: 10.5772/13861; B,C) Modifikation mittels Mikrozentrifugen-Tubes (B) bzw. Stahl-Nieten (C) als Wachstumsoberfläche

Für die Antibiofilm-Messungen gegen *D. vulgaris* erfolgte eine weitere Modifikation der Wachstumsoberfläche durch Stahl-Nieten (Abbildung 2 C) aufgrund von einer sehr geringen und stark schwankenden Biofilmdicke auf PCR-Tubes. Die Stahlnieten wurden auf drei verschiedene Arten verwendet: 1) unbehandelt, 2) angeraut mit Siliziumcarbid-Schleifpapier (2x Umdrehung) mit einer Körnung von 180, 3) poliert mit Siliziumcarbid-Schleifpapier (je 2x Umdrehung) mit einer seriellen Körnung von 320, 400, 600, 800, 1200. Wie zu erwarten war, nahm der Biofilmanteil auf den Stahlnieten mit steigender Vorbehandlung aufgrund der vergrößerten Oberfläche zu (siehe hierzu auch Abbildung 3). Folglich wurde mit den polierten Stahl-Nieten weitergearbeitet, die zudem ein realitätsnahes Material der Wachstumsoberfläche darstellen.

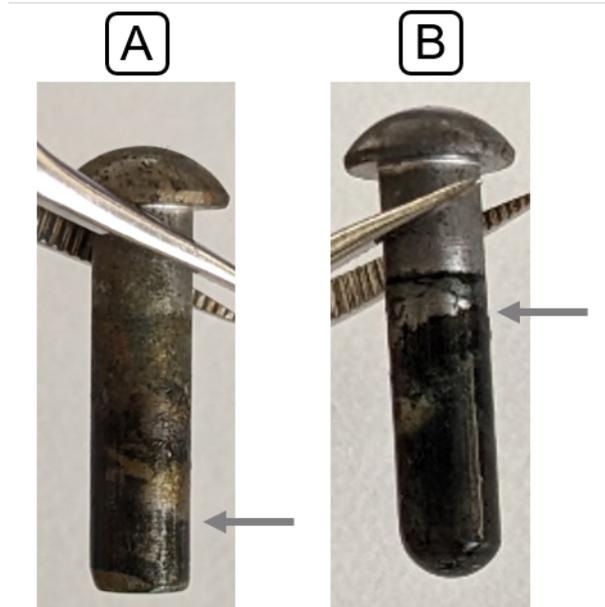


Abbildung 3: Stahl-Nieten unbehandelt (A) bzw. poliert (B); grauer Pfeil markiert die Höhe des Biofilms (*D. vulgaris*), Schwarzfärbung des Biofilms durch Produktion von Eisensulfid

Die Inkubationszeit wurde Zhang et al. (DOI: 10.1080/08927014.2016.1193166) folgend auf 72 h gesetzt. Zur Gewährleistung der Anaerobizität wurden alle Schritte, ausgenommen Kristallviolett-Färbung, im Anaerobier-Zelt durchgeführt. Bestes Peptid für die Biofilm-Inhibition ist DASamP1 mit einer MBIC95 von 26 μM , was nur doppelt-so hoch wie MIC95 ist. Für die Biofilm-Entfernung weist das Peptid S6L3-33 bezüglich Bakterienabtötung die beste Aktivität (75 μM) auf. Zur Entfernung der kompletten Biofilm-Matrix konnte lediglich Bactenecin (336 μM) beitragen. Dies kann durch die zyklische Peptidstruktur und die damit zu vermutende Tensid-ähnliche Wirkung begründet werden.

Das Arbeitspaket 5 (AP 5 - Kombination von Wirkstoffen, Optimierung der Struktur) wurde in zwei Teilarbeitspakete unterteilt. Da *D. vulgaris*, wie bereits oben erwähnt, in Biokorrosions-Untersuchungen einen häufig verwendeten Modellorganismus darstellt, erfolgen die Experimente in diesem Arbeitspaket ausschließlich mit diesem Bakterium. Zunächst fand eine Strukturoptimierung zweier Peptide, L5K5W und S6L3-33, anhand klassischer chem. Peptid-Optimierungsmethoden statt. Für das Peptid L5K5W erfolgte zunächst ein Alanin-Scan (L5K5W-A1 bis L5K5W-A11) mit anschließender Einführung eines weiteren Tryptophans an Position 4 (Position an der Grenzfläche zwischen hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren), was in einer Halbierung der MIC95 resultiert. Anschließend wurde der C-Terminus amidiert, was nochmals in einer MIC95-Halbierung aufgrund der erhöhten Ladung resultiert. Durch Lipid-Anhängung unterschiedlicher Länge (C2-C14) an den N-Terminus konnte die geeignetste Lipidlänge bestimmt werden. Hierbei führte C6 zu einer weiteren Halbierung der MIC95 und somit zum besten Ergebnis. Da das Peptid S6L3-33 bereits an

beiden Grenzflächen-Position ein Tryptophan beinhaltete, wurde direkt mit den End-Modifikationen begonnen. Diese zeigten im Vergleich zum L5K5W zwar ebenfalls eine Aktivitätssteigerung, jedoch nicht im identischen Ausmaß wie mit dem vorherigen Peptid, weswegen die These, dass Strukturoptimierungen peptidabhängig sind, verifiziert werden konnte.

Eine planktonische Kombination zweier Peptide bzw. Peptid und Biozid (Tetrakis Hydroxymethylphosphoniumsulfat) und Bestimmung der Fractional Inhibitory Concentration (FIC) führte, wie aufgrund identischer Wirkungsweise erwartet, zu keiner klassischen Synergie ($FIC \leq 0,5$). Dennoch konnte eine schwache Synergie mit einem niedrigsten FIC von 0,75 (L5K5W-W4I6 und DASamP1) bestimmt werden. In Kombination zwischen den Favoriten-Peptiden und dem Peptid Indolicidin (Mitglied der 12 Kandidaten, jedoch nicht der 4 Favoriten) konnte hingegen ein FIC von 0.5 erreicht werden, was auf eine mögliche intrazelluläre Wirkung von Indolicidin zurückzuführen scheint. Identische Resultate lieferten die Kombinationsexperimente im Antibiofilm-Assay, bei denen eine schwache Synergie, jedoch kein FIC-Index $\leq 0,5$ erreicht werden konnte. Eine Kombination mit Indolicidin war aufgrund fehlender Biofilm-Aktivität von Indolicidin im untersuchten Konzentrationsbereich nicht sinnvoll.

Arbeitspaket 6 (AP 6 - Skalierung der Synthese/Bereitstellung ausreichender Mengen) war nicht von Nöten, da die am DFI zunächst angedachte Mini-Plant-Anlage nicht in Betrieb genommen wurde und folglich keine größeren Mengen Peptid benötigt wurden. Da bei einer kommerziellen Nutzung die Peptidsynthese in einem höheren Maßstab als an dem an der THM verwendeten Gerät nötig ist, und dies optimal mittels Flüssigphasen- anstatt der hier verwendeten Festphasensynthese erfolgen sollte, erschien folglich eine Skalierung an dem vorhandenen Gerät ohne notwendige Peptidnutzung nicht zielführend.

Im abschließenden Arbeitspaket (AP 11- Immobilisierung der AMPs und Charakterisierung der Immobilisate) beteiligte sich die THM an der Entwicklung eines primären Coating-Ansatzes mittels Solid-Binding-Peptides (SBP). Hierfür wurden zunächst fünf verschiedene SBPs synthetisiert und auf die Immobilisierungsausbeute untersucht. Für die Immobilisierung wurden Stahlplättchen (2x2 cm) mit Peptidlösung unterschiedlicher Konzentrationen, i.d.R. 1 mg/ml, geflutet. Da Kontaktwinkelmessungen aufgrund immenser Schwankungen nicht auswertbar waren, wurde die Peptidlösung zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels BCA-Assay analysiert und die Ausbeute berechnet. Hierbei ergab sich für das beste SBP eine Immobilisierungsausbeute von knapp 15%, weswegen eine Optimierung der Immobilisierungsparameter durchzuführen war. Hierbei wurde eine Variation der Inkubationszeit, - temperatur, Peptidkonzentration und Stahlvorbehandlung untersucht. Es

konnte eine Sättigung der Immobilisierungsrate nach ca. 24 h beobachtet werden, jedoch konnte keine signifikante Ausbeutesteigerung erzielt werden. Zudem kam das Problem der immensen Rostbildung auf den verwendeten Stahlplättchen (DC01) zum Vorschein, welches die BCA-Messung immens beeinflusste und Analysen über längere Zeiträume unmöglich machte. Ursache hierfür könnte die in der Peptidlösung befindliche Trifluoressigsäure, welche für die Abspaltung der Seitenschutzgruppen verwendet wird und sich anschließend als Counter-Ion an positiv geladene Aminosäuren setzt, sein. Indizien hierfür sind, dass mit steigender Peptidkonzentration eine höhere Korrosionsrate einhergeht (siehe Abbildung 4). Immobilisierungsversuche unter anaeroben Bedingungen führten zu keinerlei Immobilisierung.

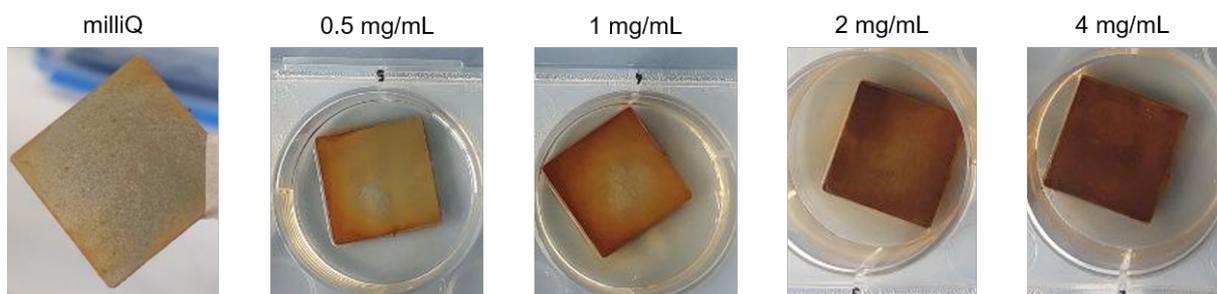


Abbildung 4: Übersicht der Stahlplättchen nach 24 h Inkubation bei 22°C und 100 rpm und unterschiedlichen Peptidkonzentrationen

Bestimmungen der MHK gegen *D. vulgaris* von Peptiden, bestehend aus SBP – Linker – DASamP1 wurden zur Selektion der Linker durch Beurteilung der MHK-Beeinträchtigung durchgeführt. So wurden insgesamt 5 Linker, verschiedene Glycin- als auch verschiedene Prolinlinker, analysiert. Optimal und folglich ohne MHK-Beeinträchtigung im Vergleich zum reinen antimikrobiellen Peptid DASamP1 konnte der 5G-Linker, bestehend aus 5 aneinander gereihten Glycin-Einheiten, identifiziert werden. Durch die Notwendigkeit eines Counter-Ions in der Peptid-Lösung entsteht eine Säurekorrosion und folglich starke Korrosionsbildung, was die Immobilisierung der Peptide erschwert.

Zusammenfassung der Forschungsarbeiten des DECHEMA-Forschungsinstitutes

Kultivierung von korrosionsfördernden Biofilmen

Kultivierung von *D. vulgaris*:

D. vulgaris wurde im Medium Postgate C kultiviert und getestet. Für den Ansatz von einem Liter Postgate C werden drei Lösungen (A,B,C) nach den Rezepturen in Tabelle 1 angesetzt.

	Chemikalie	Menge
Lösung A	K ₂ HPO ₄	0,5000 g
	NH ₄ Cl	1,0000 g
	Na ₂ SO ₄	1,0000 g
	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,0765 g
	Na-lactat Lösung (60%)	8,0 mL
	Hefeextrakt	1,0000 g
	Na-resorcin Lösung (0,1% w/w)	1,0 mL
	MilliQ Wasser	980 mL
Lösung B	FeSO ₄ *7H ₂ O	0,0500 g
	MilliQ Wasser	10 mL
Lösung C	Trinatriumcitrat Dihydrat	0,30 g
	MilliQ Wasser	10 mL

Tabelle 1: Zusammensetzung Postgate C

Die Lösung A wird angesetzt, gerührt, mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt und anschließend bei 120°C für 20 Minuten autoklaviert. Anschließend lässt man die Lösung abkühlen.

Lösung B und C werden erst kurz vor der Zugabe in Lösung A hergestellt. Lösung B und C werden in einer Sterilwerkbank sterilfiltriert und in Lösung A zugegeben. Nach der Rührung der Lösung wird die Lösung in sterile Septenflaschen (100 mL) gefüllt, verschlossen und mit Stickstoff gespült.

Für die Kultivierung wurden 0,5 mL Bakterienstammlösung in eine Septenflasche mit Postgate C injiziert. Die Bakterien wurden bei 37 °C kultiviert und die Wachstumskurve durch optische Dichte bestimmt (Abbildung 5). Durch das Wachstum der Bakterien trübt sich die Nährlösung zunächst ein und wird dann schwarz (Abb. 6).

Kultivierung von *T. intermedia*:

T. intermedia wurde im Thiomonas-Medium kultiviert. Die Lösungen für das Medium werden nach der Rezeptur in Tabelle 2 angesetzt.

	Chemikalie	Menge
Lösung A	NH ₄ Cl	0,100 g
	KH ₂ PO ₄	3,000 g
	MilliQ Wasser	900 mL
Lösung B	MgCl ₂ *6H ₂ O	0,100 g
	CaCl ₂	0,100 g
	MilliQ Wasser	100 mL
Lösung C	Na ₂ S ₂ O ₃ *H ₂ O	5,000 g
	MilliQ Wasser	20,0 mL
Lösung D	Hefeextrakt	1,000 g
	MilliQ Wasser	10,0 mL

Tabelle 2: Zusammensetzung Thiomonas-Medium

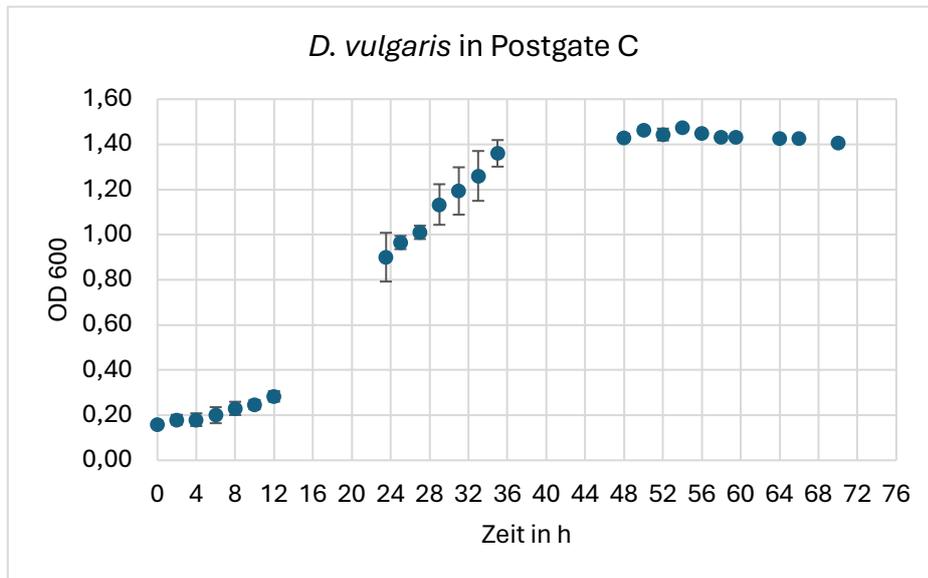


Abbildung 5: Wachstumskurve von *D. vulgaris* auf Basis der optischen Dichte.



Abbildung 6: Verfärbung des Mediums durch das Wachstum von *D. vulgaris*. Links: frisch angeimpft, Mitte: nach 3 Tagen, rechts: nach 3 Tagen und 2 Stunden

Lösung A wird nach dem Ansatz mit NaOH auf pH 6,0 eingestellt. Danach werden die Lösungen A, B und D autoklaviert. Anschließend wird die Lösung B in der Sterilwerkbank in Lösung A gegeben und durchmischt. Dann wird die Lösung C sterilfiltriert dazu gegeben und anschließend Lösung D hinzugefügt. Nachdem die Lösung gut durchmischt ist, wird diese gekühlt bei 5°C gelagert.

Die Kultivierung von *T. intermedia* ist in der Projektlaufzeit nicht gelungen. Deshalb waren Versuche mit diesen Bakterien nicht möglich.

Kultivierung von *L. mobilis*:

Für den Ansatz des Leptothrix-Mediums wurden die Lösungen aus Tabelle 3 hergestellt und anschließend autoklaviert. Danach wurden die Lösungen B, C und D zu Lösung A hinzugegeben und durchmischt. Der pH-Wert betrug 7,55. Die Lösung wurde bis zum Einsatz kühl gelagert.

	Chemikalie	Menge
Lösung A	Hefeextrakt	1,0000 g
	Peptone	1,5000 g
	CaCl ₂	0,0500 g
	MnSO ₄ *H ₂ O	0,0500 g
	MilliQ Wasser	700 mL
Lösung B	MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2000 g
	MilliQ Wasser	100 mL
Lösung C	Ammoniumeisen(III)citrat	0,5000 g
	MilliQ Wasser	100 mL
Lösung D	FeCl ₃ *6H ₂ O	0,0100 g
	MilliQ Wasser	100 mL

Tabelle 3: Zusammensetzung Leptothrix-Medium

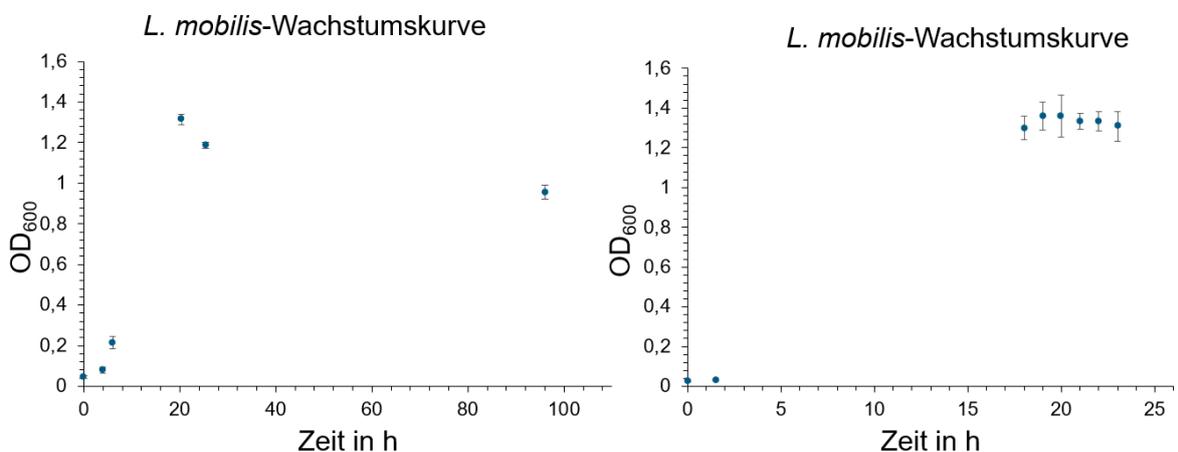


Abbildung 7: Wachstumskurven von *L. mobilis* auf Basis der optischen Dichte.

Werkstofforientierte Untersuchungen zum Einfluss von MIC/Biofilmanalytik

Für die Untersuchungen wurden Versuche mit den Bakterien *D. vulgaris* und *L. mobilis* an St37 und hochlegiertem Edelstahl 1.4301 in den jeweiligen Medien durchgeführt. Zur Bewertung der korrosiven Eigenschaften und der Wirkung der AMPs wurden Masseverlust- und Ruhepotential-Messungen durchgeführt sowie Aufnahmen mittels REM und CLSM gemacht.

Zur Untersuchung des Masseverlustes wurden Blechstreifen aus St37 der Maße 10 mm x 60 mm x 1 mm in 100 ml Postgate C bei 37 °C ausgelagert. Nach festgelegten Zeitabständen wurden jeweils Probekörper entnommen. Der Biofilm wird durch Behandlung mit einer Beize (bestehend aus 500 ml/L HCl 38% und 3,5 g/L Hexamethylentetramin) bei Raumtemperatur für 10 Minuten entfernt. Der Beizabtrag am Grundmaterial wurde bestimmt und ist mit 0,01 µm vernachlässigbar gering.

Ergebnisse zu *D. vulgaris* ohne Peptid

Abbildung 8 zeigt, dass der größte Abtrag innerhalb der ersten Stunden passiert. Danach findet kein signifikanter Abtrag durch *D. vulgaris* mehr statt. Obwohl in der Lösung noch genug Nährstoffe vorhanden sind, greifen offenbar die Bakterien dann den Stahl nicht mehr an.

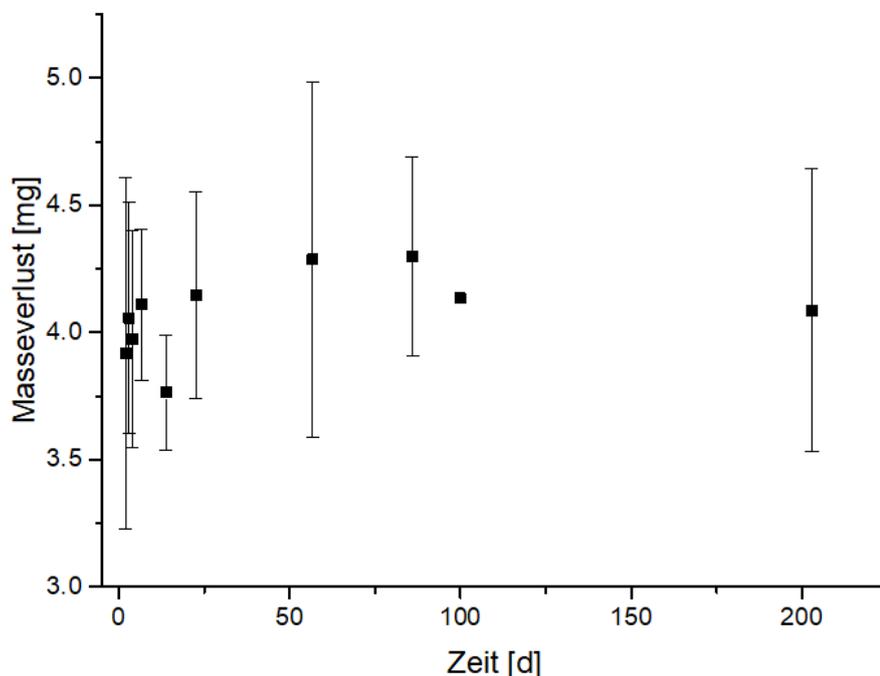


Abbildung 8: Masseabtrag über die Zeit durch *D. vulgaris* an St37

Das Wachstum der Bakterien kann auch über das Ruhepotential verfolgt werden. Hierbei erkennt man Veränderungen an der Probenoberfläche im Bereich von 40 – 60 Stunden. Auch

an einer lackierten Probe konnte das Ruhepotential gut gemessen werden. Man erkennt, dass sich innerhalb von 60 Stunden das Ruhepotential kaum verändert.

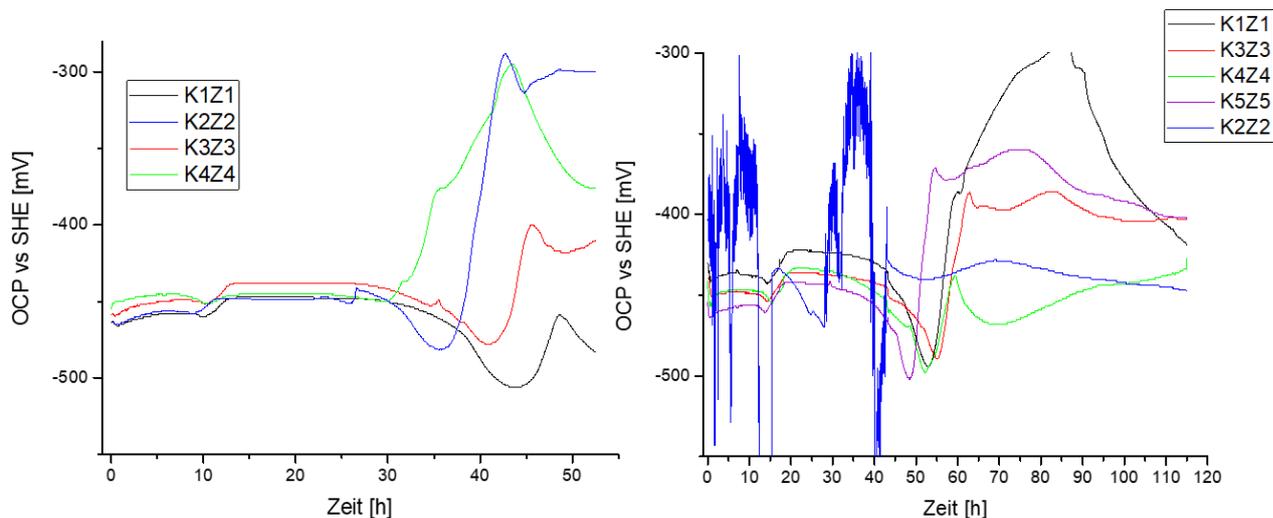


Abbildung 9: Ruhepotentiale der einzelnen Proben mit *D. vulgaris*. Die grüne Kurve im linken Diagramm ist ein Probekörper, der bereits mit Lack U6300VP beschichtet ist. Die blaue Kurve im rechten Diagramm war zeitweise durch eine Gasblase gestört.

CLSM-Aufnahmen belegen das Vorhandensein eines Biofilms mit einer Filmdicke von etwa 20 – 25 μm auf St37 nach 8 Tagen im Medium mit *D. vulgaris* (Abb. 10).

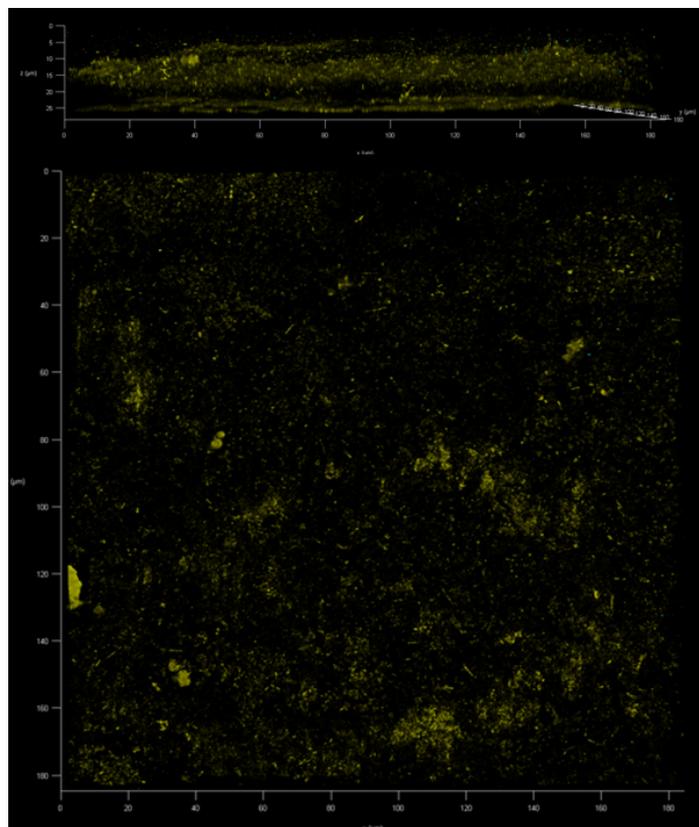


Abbildung 10: CLSM-Aufnahme im Querschnitt (oben) und Blick auf die Biofilmschicht.

Nachdem der Biofilm abgebeizt worden ist, zeigt sich unter dem Rasterelektronenmikroskop der für mikrobiell beeinflusste Korrosion an St37 typische muldenförmige Korrosionsangriff (Abbildung 11).

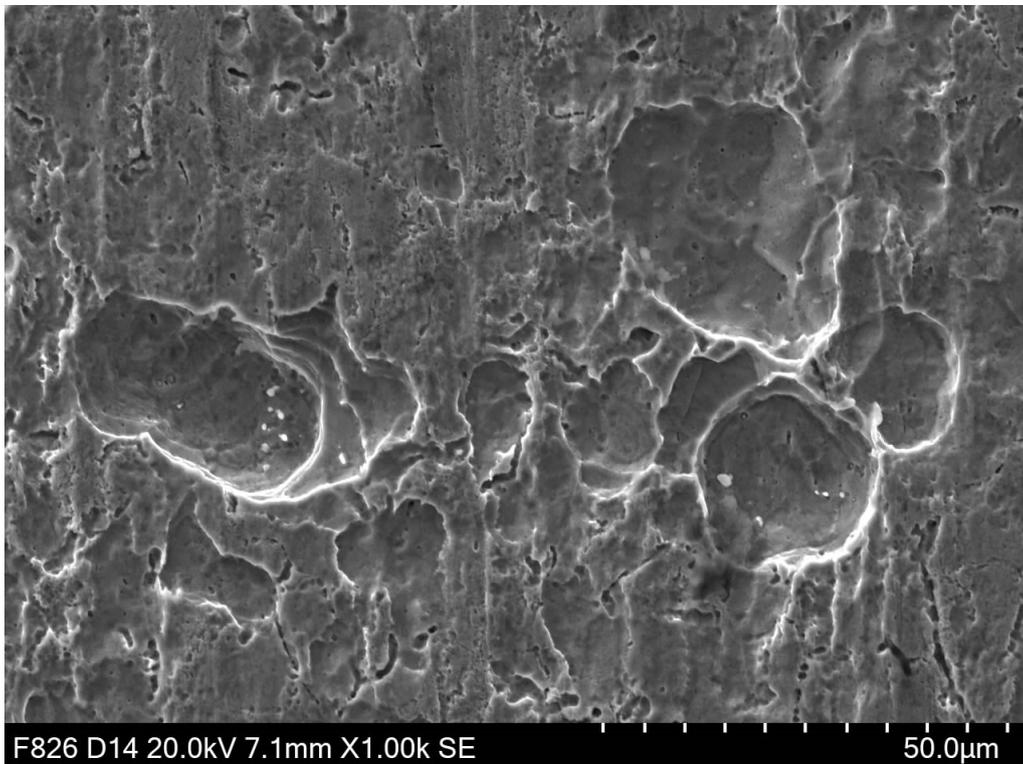


Abbildung 11: Muldenfraß durch *D. vulgaris* in St37-Probenkörper.

Ergebnisse zu *D. vulgaris* mit Peptid L5K5W-A1

In die Septenflasche mit 100 ml Medium wurden vor dem Animpfen jeweils 13 mg Peptid L5K5W-A1 zugegeben. Dies führte zu einer starken Verzögerung des Wachstums. Erst nach ca. 8 Tagen zeigen 2 von 3 Septenflaschen eine dunkle Verfärbung, wie in Abbildung 12 zu sehen ist.

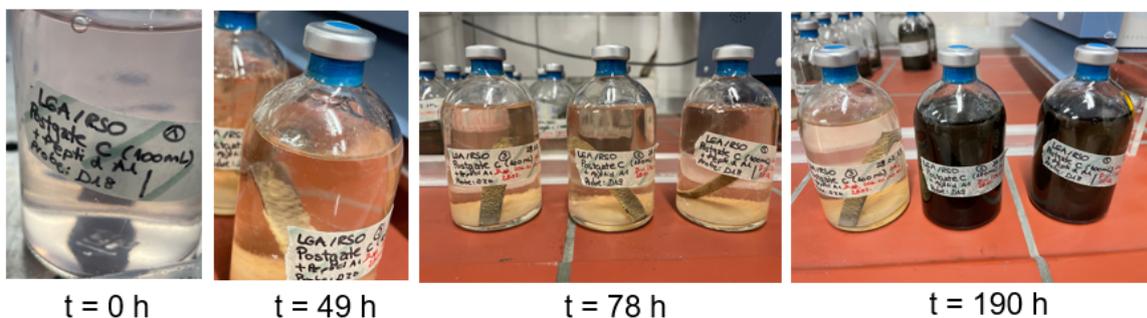


Abbildung 12: *D. vulgaris* in Postgate C mit Peptid L5K5W-A1 über die Zeit.

Die Oberfläche zeigt in CLSM-Aufnahmen nach 8 Tagen keine Anzeichen von Biofilmbildung. Stattdessen sieht man unter dem Mikroskop nur die Metalloberfläche (Abbildung 13).

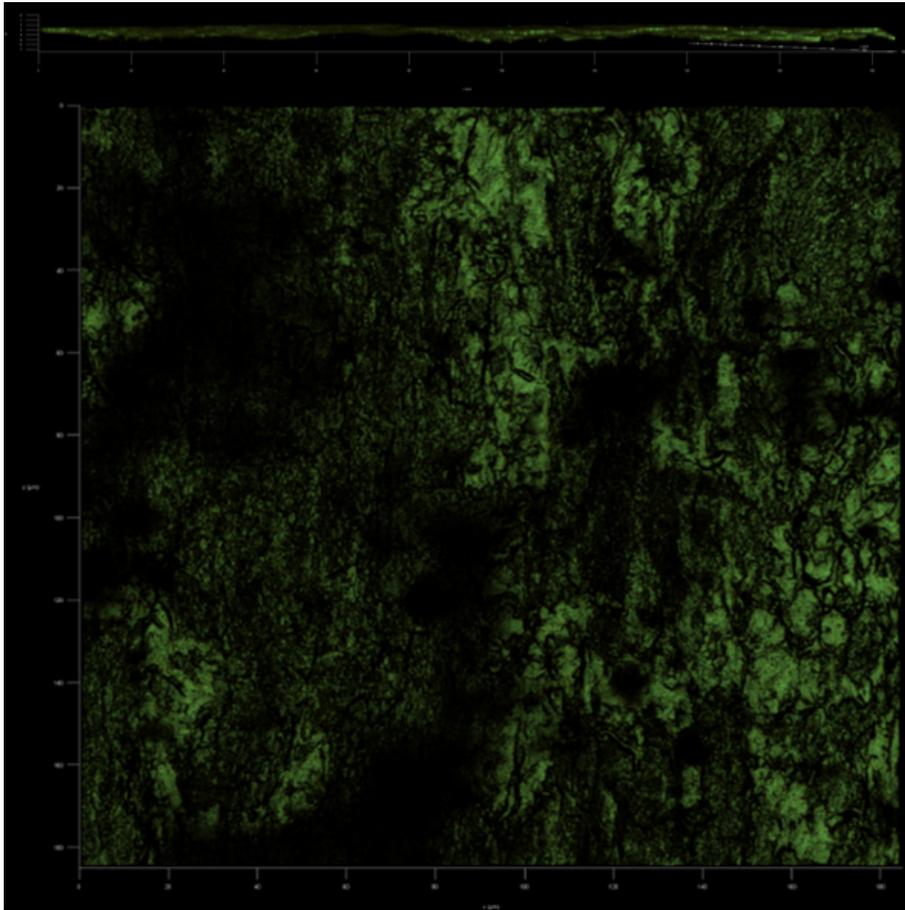


Abbildung 13: CLSM-Aufnahme einer Probe mit Peptid L5K5W-A1. Es ist kein Biofilm erkennbar.

Durch rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen konnte auf dem gesamten Probenkörper kein Lochfraß gefunden werden (Abbildung 14).

Ergebnisse zu *L. mobilis*

Auslagerungen von hochlegiertem Edelstahl 1.4301 in Medium mit *L. mobilis* zeigen kaum Veränderungen des Ruhepotentials. Der Abtrag an den Probenkörpern ist allgemein zu klein, um während der Projektlaufzeit auswertbare Ergebnisse zu erzielen. Deshalb wurde im Anschluss für die Versuche mit Lack nur noch St37 verwendet.

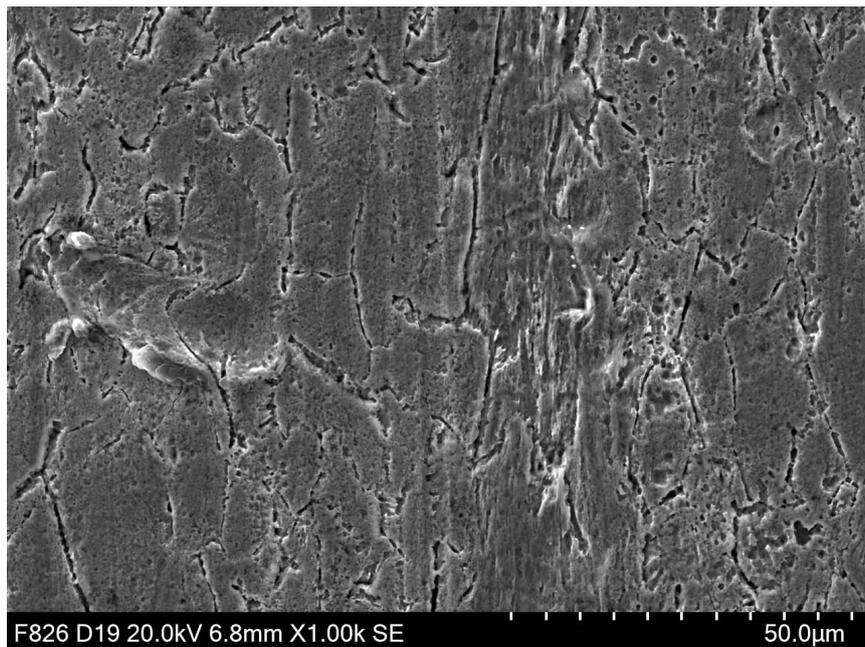


Abbildung 14: REM-Aufnahme einer Probe mit Peptid im Medium. Es tritt kein Lochfraß auf.

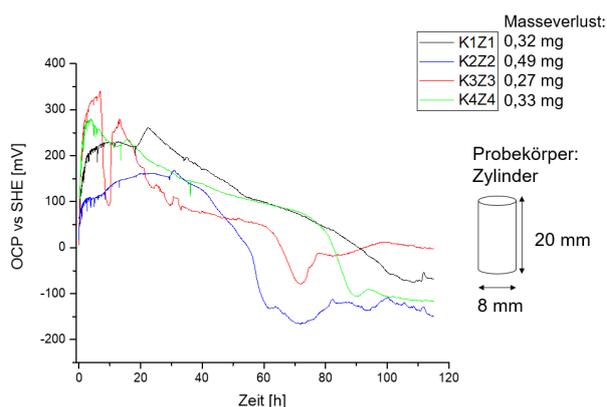


Abbildung 15: Ruhepotential von hochlegiertem Edelstahl 1.4301 in Medium mit *L. mobilis* und Massenabtrag nach Einfluss von AMPs auf korrosionsschützende Wirkung des Lackes.

Korrosionsschutzwirkung von Lacken nach AMP-Zusatz

Für das Projekt wurden von projektbegleitenden Unternehmen die Lacke U6300VP, AC2420VP und CUD4835VP zur Verfügung gestellt. Mit dem Lack U6300 VP wurden erste Tauchziehversuche unternommen, um das Optimum für die maximale Lackdicke zu ermitteln. Dabei stellte sich heraus, dass die optimale Ziehgeschwindigkeit bei 100 mm/min liegt. Gemessen wurde die Filmdicke mittels Rasterelektronenmikroskop.

Ziehgeschwindigkeit [mm/min]	Lackschichtdicke [μm]
1	$3,3 \pm 0,8$
5	$2,6 \pm 0,9$
50	$9,5 \pm 0,6$
100	$14,4 \pm 2,2$
200	$11,3 \pm 2,7$

Tabelle 4: Lackschichtdicke in Abhängigkeit der Ziehgeschwindigkeit.

Beschichtungen mit den Lacken AC2420VP und CUD4835VP wurden eingestellt, da diese die Oberfläche verfärbten und stark zu Rissen neigten. Auch der Zusatz des Additivs Texanol zur Senkung der Filmbildetemperatur lieferte keine zufriedenstellenden Ergebnisse.

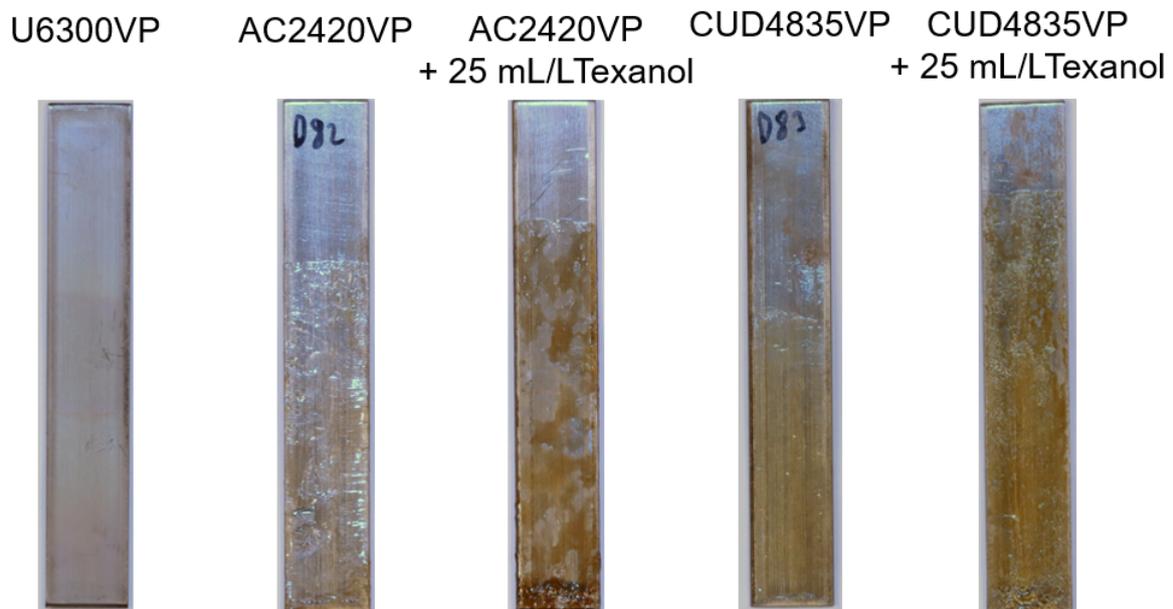


Abbildung 16: St37-Proben beschichtet mit verschiedenen Lacken.

Auslagerungen von einfach lackierten Proben mit U6300VP zeigen eine starke Degradation der Lackoberfläche nach 6 Tagen in Postgate C ohne Bakterien (Abbildung 17).

Die Beobachtung wird durch Untersuchungen mittels Elektrochemischer Impedanzspektroskopie bestätigt. Die lackierte Oberfläche zeigt nach 21 Stunden im Medium nur einen geringen Widerstand (Abbildung 18).

Frischer Lack
(1x U6300VP)

Ausgelagerter Lack (6 Tage)
(1x U6300VP)

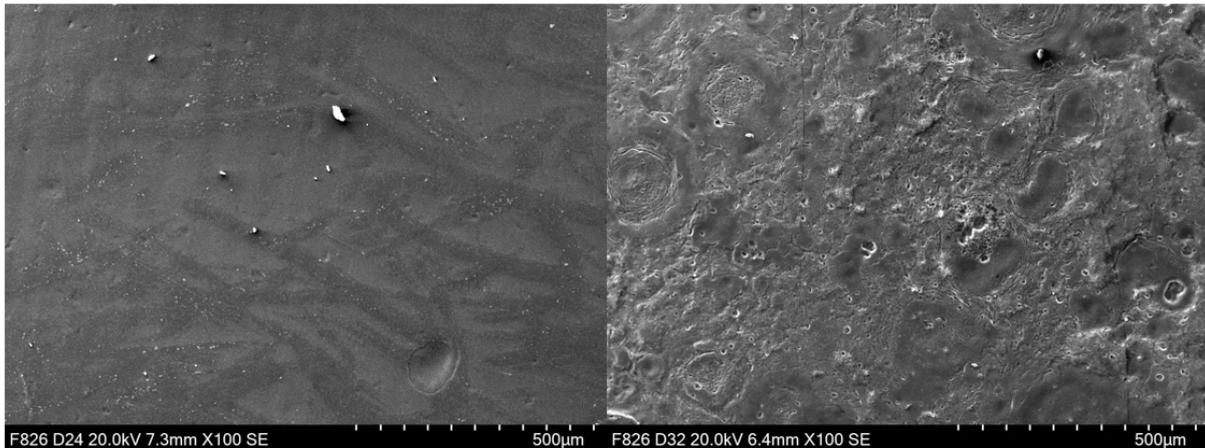


Abbildung 17: REM-Aufnahmen der Lackoberfläche.

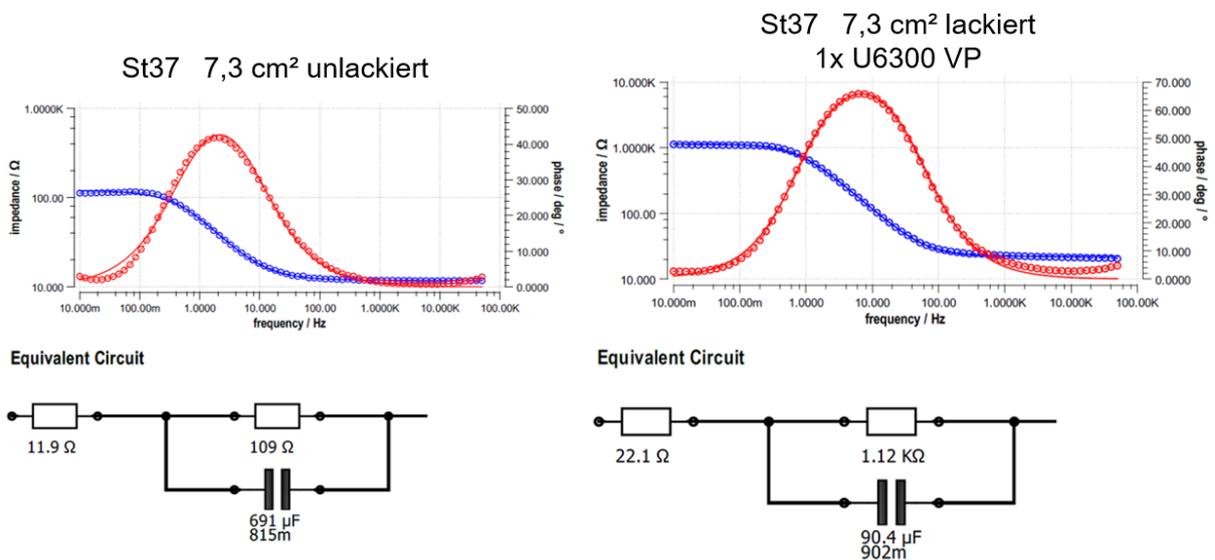


Abbildung 18: Elektrochemische Impedanzspektren an St37 blank (links) und mit Lack U6300 VP beschichtet (rechts)

Nach Auslagerung der Proben für 8 Tage im Medium mit *D. vulgaris* zeigen CLSM-Aufnahmen, dass sich kein Biofilm gebildet hat (Abbildung 19). Es kann davon ausgegangen werden, dass der gequollene Lack für die Bakterien ähnlich wie ein Biofilm ist. In der Lackschicht sind in den mikroskopischen Aufnahmen allerdings keine Bakterien erkennbar. Dabei spielt es jedoch keine Rolle, ob der Lack das Peptid enthält oder nicht. Tamol NN 8906 dient hier als Emulgator, da sonst die Peptide im Lack ausflocken. Auch die selektive Anfärbung der Bakterien mit GelRed war daher nicht möglich, stattdessen wird die ganze Schicht eingefärbt (Abbildung 20).

24 ml U6300VP
1ml MilliQ H2O
14,6 mg Tamol NN 8906

24 ml U6300VP
1ml MilliQ H2O
14,7 mg Tamol NN 8906
15,2 mg Peptid A2

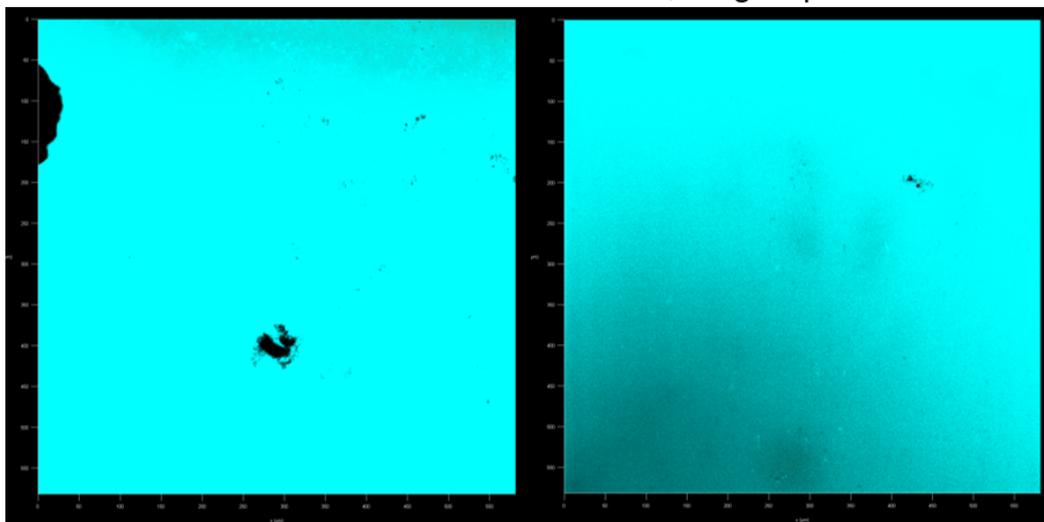


Abbildung 19: CLSM-Aufnahmen an doppelt lackierten Proben nach 4 Tagen Auslagerung im Medium mit *D. vulgaris*.

24 ml U6300VP
1ml MilliQ H2O
14,6 mg Tamol NN 8906

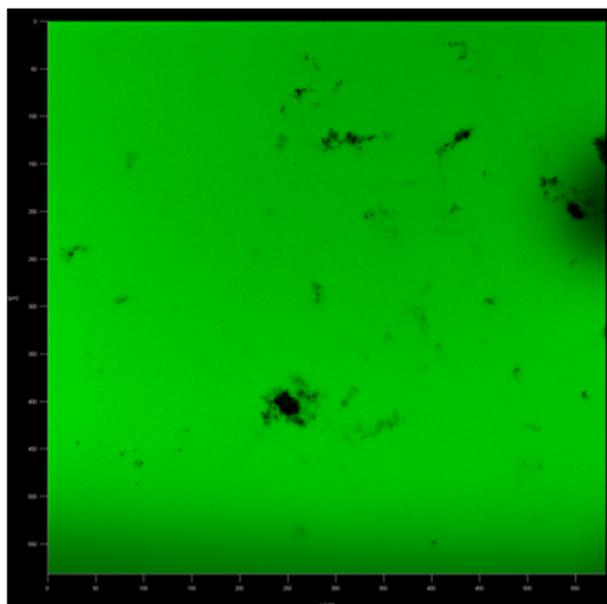


Abbildung 20: CLSM-Aufnahmen an doppelt lackierten Proben nach 4 Tagen Auslagerung im Medium mit *D. vulgaris*, angefärbt mit GelRed.

Die Messung des Ruhepotentials der lackierten Proben zeigt keinen Einfluss des Emulgators Tamol NN 8906 und des Peptids L5K5W-A1 (Abbildung 21). Die Bakterien scheinen sich an allen Proben identisch zu entwickeln.

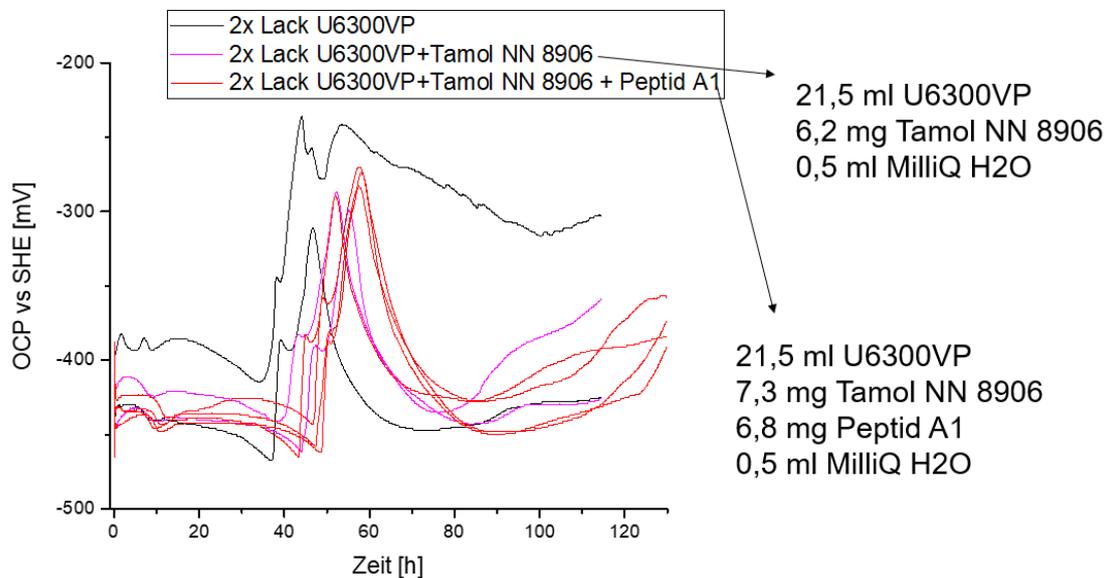


Abbildung 21: Ruhepotentialverläufe doppelt lackierter Proben in verschiedenen Medien

Bei 37 °C in Medium mit *D. vulgaris* für 19 Tage ausgelagerte St37-Proben wurden entlackiert und gebeizt. Dabei zeigen alle Proben Lochfraß, auch die peptidhaltigen Lacke (Abbildung 22).

Da die Peptidkonzentrationen im Lack anscheinend für eine Schutzwirkung nicht ausreichend sind, wurde die Peptidkonzentration nochmals erhöht und Proben lackiert. Dieses Mal wurde jedoch direkt die Lackschicht mittels REM untersucht (Abbildung 23). Auch hier zeigt sich nach 4 Tagen Auslagerung keine Wirkung gegen die Bakterien, diese sind auf allen Proben zahlreich vorhanden. Die Untersuchung der Bruchflächen zeigte allerdings keine Bakterien. Entweder sind diese so gut in die Lackschicht integriert, dass sie von dieser nicht zu unterscheiden sind oder es treten andere Effekte auf, welche die Bakterien während der Trocknung aus dem Lack befördern.

1x U6300VP



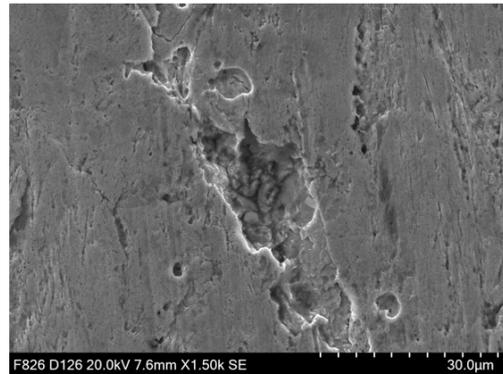
1x
21,5 mL U6300VP
+6,2 mg Tamol NN8906
+ 0,5 mL MilliQ H2O + 6,7 mg Peptid A2



2x U6300VP



2x
21,5 mL U6300VP
+6,2 mg Tamol NN8906
+ 0,5 mL MilliQ H2O



2x
21,5 mL U6300VP
+6,2 mg Tamol NN8906
+ 0,5 mL MilliQ H2O + 6,7 mg Peptid A2

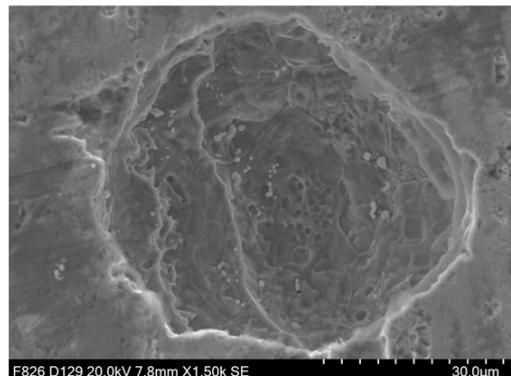


Abbildung 22: Erkennbarer Lochfraß an allen Proben (REM-Aufnahme).

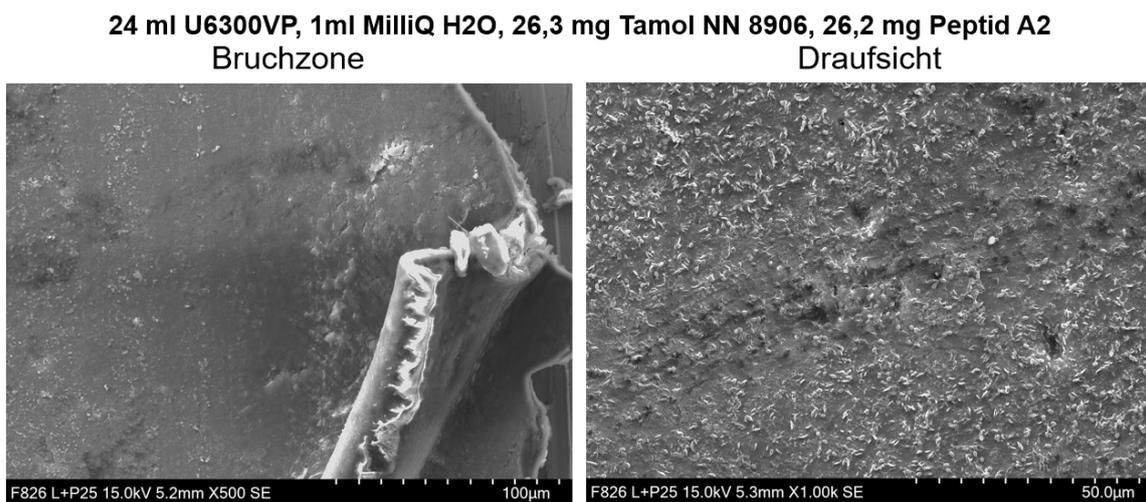
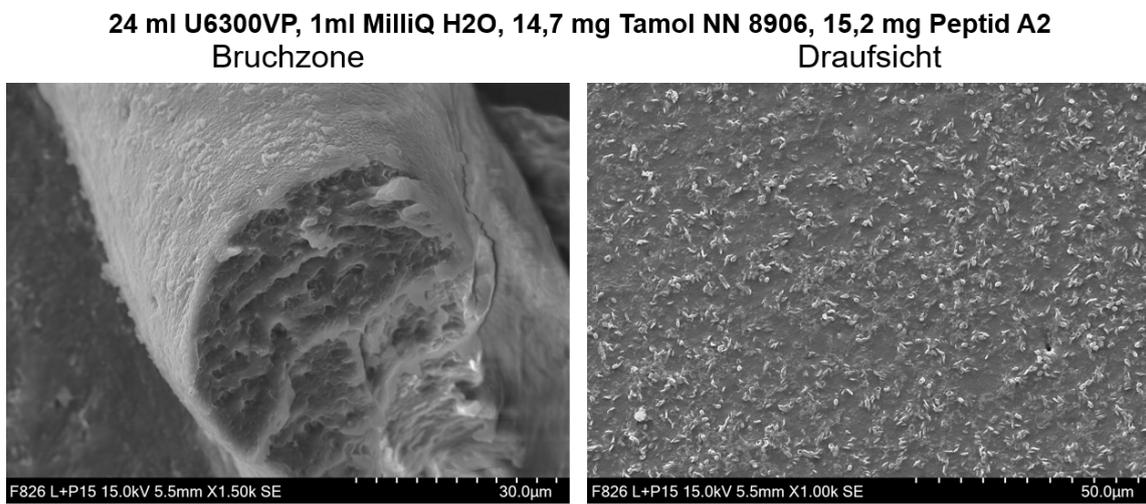
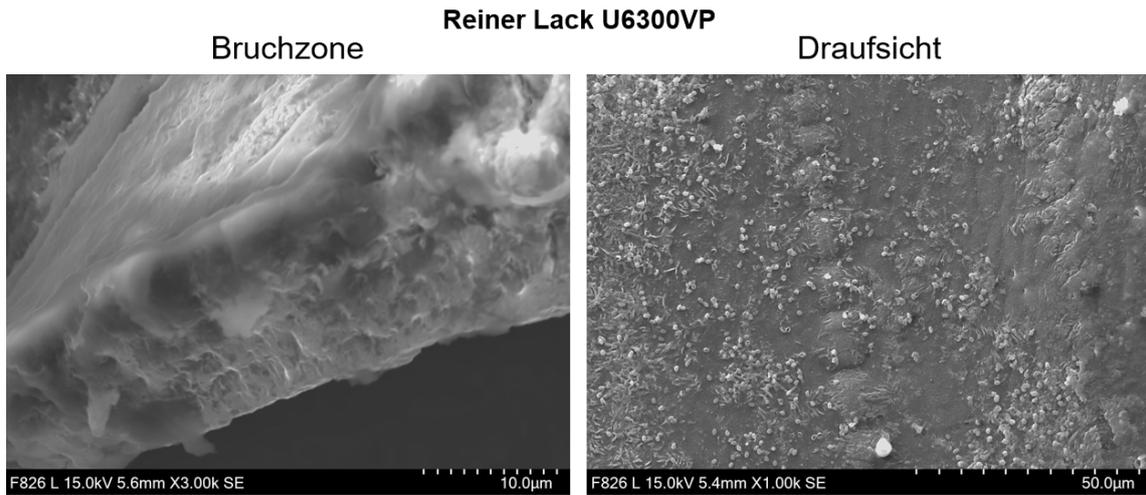


Abbildung 23: REM-Untersuchungen an Ober- und Bruchflächen der Lackschicht.

Verwendung der Zuwendung

THM (Forschungsstelle 1): An der THM wurden im Rahmen des Projektes wissenschaftliche Mitarbeiter im Umfang von 27 PM eingesetzt. Ursprünglich wurden 26,5 PM beantragt. Während der Projektlaufzeit wurde eine Aufstockung auf 29 PM bewilligt. Ausgaben für Geräte und Leistungen Dritter waren nicht beantragt worden.

DFI (Forschungsstelle 2): Am DFI wurden im Rahmen des Projektes wissenschaftliche Mitarbeiter im Umfang von 35,016 PM eingesetzt. Ausgaben für Geräte und Leistungen Dritter waren nicht beantragt worden.

Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Arbeiten im Rahmen dieses Projektes entsprachen dem begutachteten und bewilligten Antrag und waren für die Zielerreichung notwendig und angemessen.

Fortgeschriebener Plan zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft

Die nachfolgende Tabelle zeigt die während der Projektlaufzeit durchgeführten Maßnahmen zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft:

Maßnahme	Rahmen	Ziel	Datum/Zeitraum
Sitzungen des projektbegleitenden Ausschusses	online bzw. Hybrid-Meeting	Steuerung des Projektverlaufs und unmittelbarer Ergebnistransfer in begleitende Unternehmen	21.06.2021 19.01.2022 28.06.2022 15.03.2023 24.10.2023
Vorträge auf wissenschaftlichen Tagungen und Kongressen	16. German Peptide Symposium, Jena	(Inter)nationale Verbreitung aktueller Forschungsergebnisse	28.08- 30.08.2023
Vorträge vor Fachkollegen	DECHEMA/GfKORR-Fachgruppe „Mikrobielle Materialzerstörung und Materialschutz“	Diskussion mit Fachkollegen und Verbreitung von Ergebnissen auf nationaler Ebene	27.04.2022
Laufende Aktualisierung der Projektdarstellung im Internet	Projektseite im Rahmen der Internetpräsenz: https://dechema-dfi.de/Abteilungen/Materialien+und+Korrosion/Laufende+Projekte+Materialien+und+Korrosion/2023+Antimikrobielle+Peptide+gegen+Biokorrosion.html?highlight=peptide	Allgemeiner Zugang zu den Forschungsergebnissen	Kontinuierlich

Einbindung in Lehre	Master-Vorlesung „Ringvorlesung“ an der THM Gießen; Master-Vorlesung „Korrosion und Korrosionsschutz“ an der RWTH Aachen	Schulung junger Fachkräfte	15.12.2022 Ab WS 23/24
Veröffentlichungen in internationalen Fachzeitschriften	Stillger L, Kamm L, Viau L, Holtmann D, Müller D. Optimization of antimicrobial peptides for the application against biocorrosive bacteria. Appl Microbiol Biotechnol 2023. doi:10.1007/s00253-023-12562-9.	Verbreitung der Ergebnisse und wissenschaftlicher Austausch unter internationalen Fachkollegen	05.2023
	Stillger L, Viau L, Holtmann D, Müller D. Antibiofilm-Assay for Antimicrobial Peptides combating the sulfate-reducing bacteria Desulfovibrio vulgaris. MicrobiologyOpen 2023. doi:10.1002/mbo3.1376		08.2023

Folgende Maßnahmen zum Ergebnistransfer in die Wirtschaft sind nach Projektende weiterhin vorgesehen:

Maßnahme	Rahmen	Ziel	Datum/Zeitraum
Weiterführung der Forschung in geförderten Projekten	Gepplant ist ein IGF-Anschlussvorhaben zur Immobilisierung der Peptide als geeignet orientierter self-assembled Monolayer auf Lackoberflächen; ggfs. Entwicklung zum Einbau einer getriggerten Mobilisierungsstrategie	Weiterentwicklung und Qualifizierung des neuen Technologieansatzes zur Beförderung der industriellen Umsetzung	Antragstellung im Sommer 24

Demonstration der Techniken und Verfahren für Vertreter des pbA in den Laboren der Forschungsstellen	Persönlicher Kontakt in den Forschungsstellen	Demonstration und begleitete industrielle Umsetzung	jederzeit
Weitere nationale und internationale Tagungen	Vorträge und Poster	Erhöhung des (inter)nationalen Bekanntheitsgrades der Ergebnisse	2024-2025
Einbindung in Lehre	Bachelor- /Masterstudium Biotechnologie/Biopharmazeutische Technologie an der THM	Erhöhung des Bekanntheitsgrades	Ab SoSe 24
Einbindung in Weiterbildungsangebote	Gepantes neues DECHEMA-Seminar „Korrosionsschutz verstehen“	Schulung industrieller Fachkräfte	Ab Frühjahr 2025
Direkte Industriekontakte durch DFI	Einbindung in thematisch verwandte Industrieaufträge am DECHEMA-Korrosionszentrum	Bekanntmachung bei industriellen Fachkräften	Laufend bei fachlich passender Gelegenheit

Einschätzung der Realisierbarkeit des Konzeptes zum Ergebnistransfer

Schon während der Projektlaufzeit sind die in der ersten Tabelle oben aufgelisteten Schritte zum Ergebnistransfer durchgeführt worden. Sie sind bereits auf vielfältiges industrielles Interesse gestoßen, so dass der Eingang der Ergebnisse in die industrielle Praxis bisher als realistisch erachtet werden kann. Weitere Maßnahmen zur Verwertung und Verbreitung der Projektergebnisse in größerer Breite sind im Anschluss an das Projekt wie oben gelistet vorgesehen.

Über den Austausch zwischen Forschungsstellen und Unternehmen des projektbegleitenden Ausschusses konnte bislang vor allem ein direkter Wissenstransfer in die begleitenden Unternehmen realisiert werden. Dieser kann durch das Angebot bilateraler Demonstrationen in den Laboren der Forschungsstellen noch intensiviert werden. Bereits in anerkannten wissenschaftlichen Journalen erschienene wie auch noch einzureichende Veröffentlichungen sind darüber hinaus geeignet, die Ergebnisse des Projekts einer wesentlich breiteren Fachöffentlichkeit bekannt zu machen. Gleiches gilt für Vorträge auf anerkannten Tagungen, vor allem wenn neben wissenschaftlichem Publikum auch Industrievertreter einen nennenswerten Anteil am Teilnehmerfeld haben.

Die Übernahme der Ergebnisse in die akademische Lehre ist zum Teil bereits erfolgt und wird weitergeführt. Dabei werden sowohl Studierende auf der biotechnologischen Seite als auch solche im Bereich der Materialwissenschaften adressiert. Durch entsprechende Schulung von Nachwuchsfachkräften kann grundsätzlich die Zukunftsfähigkeit neuer Technologien abgesichert werden. Darüber hinaus dienen die Integration der Ergebnisse in berufliche Weiterbildungsmaßnahmen wie auch deren Erläuterung bei bilateralen Industriekontakten, z.B. im Rahmen der industriellen Auftragsforschung, dem Transfer zu bereits in der beruflichen Praxis stehenden industriellen Fachkräften.

Wesentlich für die direkte Nutzbarkeit der Projektergebnisse wird allerdings deren Weiterentwicklung im Hinblick auf eine Anwendung im Zusammenhang mit Beschichtungssystemen sein. Hierzu hat sich der projektbegleitende Ausschuss in seiner letzten Sitzung für ein IGF-Anschlussvorhaben zur Immobilisierung der Peptide auf Lackoberflächen ausgesprochen. Hierzu sollen self-assembled Monolayer (SAMs) verwendet werden, welche die geordnete Anbindung einer Peptidschicht auf dem Lack ermöglichen können, da sich die unorientierte direkte Einbringung der Peptide in ein Lacksystem als hinderlich für deren Wirksamkeit erwiesen hat. Erste Immobilisierungsversuche wurden daher bereits im abgeschlossenen Projekt durchgeführt. Sie zeigen vielversprechende Ergebnisse, auf die in einem Folgeprojekt aufgebaut werden kann. Als Add-on könnte die Anbindung der SAMs gegebenenfalls so gestaltet werden, dass in Analogie zu manchen selbstheilenden

Korrosionsschutzschichtsystemen deren Freisetzung getriggert durch lokale Veränderungen während des Korrosionsprozesses (z.B. von pH-Wert, Redoxpotential, Ionenstärke, ...) erfolgen kann. Ein derart unterstützter Wirkmechanismus könnte die Attraktivität einer Anwendung der AMPs im Beschichtungsbereich sicher noch wesentlich steigern.

Insgesamt erscheint das Konzept zum Transfer der Projektergebnisse als realisierbar und wird von den Forschungsstellen wie geplant weiterverfolgt.