

**Titel:**

Biogenic sulfuric acid corrosion in sludge digesters-Characterization of the bacterial groups and the corrosion potential

**Autor:**

Bettina Huber

Technische Universität München, Ingenieur fakultät Bau Geo Umwelt, Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft

**Gutachter:**

Prof. Dr. Ing. Jörg E. Drewes

Prof. Dr. Rudi F. Vogel

Prof. Dr. Hilde Lemmer

**Veröffentlicht:**

2016

**Dissertation:**

Link: [https://mediatum.ub.tum.de/603792?show\\_id=1310546](https://mediatum.ub.tum.de/603792?show_id=1310546)

## ABSTRACT

Biogenic sulfuric acid (BSA) corrosion, a serious and costly problem, usually affects sewerage infrastructure, but typical BSA damage patterns were also observed in the headspace of different full-scale digesters. Thus, this study aimed to verify BSA corrosion in digesters by (i) identifying the relevant bacteria participating in the concrete corrosion process, i.e. sulfate reducing and sulfur oxidizing bacteria (SRB and SOB), and (ii) analyzing the BSA corrosion potential. Additionally, chemical and microbiological sulfuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) experiments with both hardened cement paste representing a concrete binder and concrete specimens reflecting a digester wall were performed to better understand BSA corrosion.

First, digester sludge and biofilm samples from the concrete surface in the headspace of six corroded digesters were collected. SRB diversity within digester sludge was investigated by polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) using the *dsrB* (dissimilatory sulfite reductase beta subunit) -gene. SOB analysis in biofilm samples was carried out by specific enrichment cultivation. PCR-DGGE was applied for in depth community composition analyses with the enriched cultures. BSA production of mixed and pure SOB cultures was tested under laboratory conditions and *in situ* by measuring the concrete sulfate content from the digester headspace and sludge zone.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  experiments with hardened cement paste and concrete at pH values 1.0 and 2.0 were performed over 28 days to analyze and compare concrete degradation to microbially generated  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (pH 1.3-2.4). Biogenic  $\text{H}_2\text{SO}_4$  experiments were performed with *A. thiooxidans*, the key BSA producer originally isolated from digester headspace samples, for periods of 28 days, two, three and six months. To evaluate cement stone/concrete degradation, visual, physical (e.g. weight loss), and chemical parameters (e.g. neutralization depth) were applied using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) and scanning electron microscopy (SEM) with energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX).

Diversity studies revealed the presence of different uncultured SRB and a potential hydrogen sulfide ( $\text{H}_2\text{S}$ ) production. Similar DGGE-profiles from the different sludge samples demonstrated that similar SRB species were present in the digesters. Cultivation yielded three pure SOB species originating from the digester headspace: *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Thiomonas intermedia*, and *Thiomonas perometabolis*. The pure SOB species were also detected with PCR-DGGE in enriched mixed SOB cultures which showed a higher SOB diversity with additional acidophilic and neutrophilic SOB. Mixed SOB cultures achieved sulfate concentrations of 10-87 mmol/L after 6-21 days of

incubation (final pH 1.0-2.0), compared to 433 mmol/L after 42 days with pure *A. thiooxidans* cultures (final pH < 1.0), indicating a high BSA production potential. A significantly higher sulfate content (e.g. ten-times higher) in concrete specimens from the digester headspace compared to the sludge zone further indicated occurrence of *in situ* sulfur/sulfide oxidation.

In controlled biogenic corrosion experiments, *A. thiooxidans* produced high amounts of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> resulting in severe damage patterns on cement stone and concrete. Gypsum was identified as main corrosion product. Chemically and microbially produced H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> resulted in similar corrosion patterns. The biogenic long-term experiments exhibited an increased deterioration over the first three months, but in the three- and six-month set-ups comparable damage patterns were observed. Concrete degradation primarily depended on H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> production by *A. thiooxidans*, but no correlation with incubation periods was revealed. LA-ICP-MS and SEM/EDX proved to be very suitable techniques to assess cement stone/concrete degradation. These techniques allowed elucidating the elemental distributions (e.g., C, Ca, Si, P, and S) in the corrosion layers and the corrosion products (e.g. gypsum). In particular, LA-ICP-MS analysis enabled a clear differentiation between corroded and non-corroded layers.

To conclude, the relevant SRB and SOB, responsible for the BSA process, were identified to be present in six different full-scale digesters. Their ability to produce H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the significant corrosion potential of *A. thiooxidans* on both hardened cement paste and concrete samples revealed a high biogenic sulfuric acid corrosion potential in sludge digesters.

# ZUSAMMENFASSUNG

Biogene Schwefelsäure Korrosion (BSK) ist ein schwerwiegendes und kostspieliges Problem, das vor allem in der Abwasserkanalisation vorkommt. Das Auftreten von typischen BSK Schadensphänomenen im Gasraum verschiedener Faulbehälter weist darauf hin, dass BSK auch eine Rolle in diesen Bauwerken spielen kann. Das Ziel dieser Arbeit war es, den BSK Prozess in Faulbehältern zu untersuchen. Diese Untersuchungen beinhalteten die Identifizierung der am Korrosionsprozess beteiligten Sulfat-reduzierenden und Schwefel-oxidierenden Bakterien (SRB und SOB) und die Analyse des Korrosionspotentials. Für ein besseres Verständnis des BSK Potentials im Faulbehälter wurden chemische und biogene Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ ) Versuche mit Zementstein, welcher als Bindemittel im Beton enthalten ist und Beton, das dominante Baumaterial von Faulbehältern, durchgeführt.

Zunächst wurden Faulschlamm- und Biofilmproben von der Betonoberfläche im Gasraum von sechs korrodierten Faulbehältern entnommen. Die SRB Diversität in den Faulschlammproben wurde mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion und denaturierenden Gradienten-Gelelektrophorese (PCR-DGGE) unter Verwendung des *dsrB* (dissimilatorische Sulfat-Reduktase-beta-Untereinheit) -Gens untersucht. Die SOB wurden in spezifischen Flüssignährmedien angereichert und eine taxonomische Charakterisierung dieser Anreicherungskulturen erfolgte mithilfe der 16S rRNA PCR-DGGE und Sequenzanalyse. Unter Laborbedingungen wurde die Fähigkeit der SOB Misch- und Reinkulturen zur biogenen Schwefelsäureproduktion getestet. Des Weiteren wurde *in situ* der Sulfatgehalt von Betonproben aus dem Gasraum und der Schlammzone gemessen. Die chemischen  $H_2SO_4$ -Experimente mit Zementstein- und Beton wurden bei pH-Werten von 1,0 und 2,0 über einen Zeitraum von 28 Tagen durchgeführt, um den Korrosionsprozess zu analysieren und einen Vergleich zur biogen produzierten  $H_2SO_4$  (pH 1,3 bis 2,4) herzustellen. Die biogenen  $H_2SO_4$ -Versuche wurden mit *A. thiooxidans* (isolierte Reinkultur aus dem Faulbehälter), dem Schlüsselorganismus der BSK, über einen Zeitraum von 28 Tagen, zwei, drei und sechs Monaten durchgeführt. Für die Charakterisierung der Zementstein- bzw. Betonkorrosion wurden die Proben optisch begutachtet und physikalische (z.B. Gewichtsverlust) und chemische Parameter (z.B. Neutralisationstiefe) bestimmt. Darüber hinaus wurden die Proben mithilfe der Laserablation induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie (LA-ICP-MS) und Rasterelektronenmikroskopie (REM) mit energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) untersucht.

Die Diversitätsuntersuchungen identifizierten verschiedene nicht kultivierbare SRB in den Faulschlammproben, was auf ein Potential zur Schwefelwasserstoffproduktion ( $H_2S$ ) hinweist. Vergleichbare DGGE-Profile in den verschiedenen Schlämmen zeigten, dass ähnliche SRB Spezies in den untersuchten Faulbehältern vorhanden waren. Mithilfe von kultivierungsbasierten Methoden wurden drei SOB Reinkulturen aus dem Faulbehälter Gasraum gewonnen: *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Thiomonas intermedia* und *Thiomonas perometabolis*. Diese drei Bakterienarten wurden auch mit PCR-DGGE in den Mischkulturen nachgewiesen. Zusätzlich konnten noch weitere acidophile und neutrophile SOB identifiziert werden. Diese SOB Mischkulturen produzierten Sulfatkonzentrationen von 10-87 mmol/l nach 6-21 Inkubationstagen (finaler pH Wert: 1,0-2,0). In der *A. thiooxidans* Reinkultur wurden noch höhere Konzentrationen von bis zu 433 mmol/l nach 42 Tagen gemessen. Die Sulfatmessungen in den Betonproben aus dem Faulbehälter Gasraum zeigten höhere Werte (bis zu zehnmal so hoch) als die Betonproben der Schlammzone, was auf eine *in situ* Schwefeloxidation hinweist.

In den biogenen Korrosionsversuchen produzierte *A. thiooxidans* große Mengen an Schwefelsäure, welche zu starken Korrosionsschäden an Zementstein und Beton führte. Gips wurde als Hauptkorrosionsprodukt identifiziert. Die Korrosionsexperimente zeigten, dass sich vergleichbare Korrosionsschäden in Anwesenheit von chemisch und biogen erzeugter  $H_2SO_4$  entwickeln. Bei den biogenen Langzeitversuchen wurde in den ersten drei Monaten ein Anstieg der Korrosion beobachtet, doch bei den drei- und sechs-Monate Versuchen wurden vergleichbare Schadensmuster beobachtet. Das Ausmaß der Korrosion war somit primär von der Schwefelsäureproduktion durch *A. thiooxidans* abhängig und korrelierte nicht mit den Inkubationszeiten. Die Korrosionsschäden konnten sehr zielgerichtet mithilfe von LA-ICP-MS und REM/EDX charakterisiert werden, da beide Methoden eine Analyse der Elementverteilung (z.B. C, Ca, Si, P und S) in den Korrosionsschichten sowie eine Identifizierung von Korrosionsprodukten ermöglichten. Darüber hinaus konnte mittels LA-ICP-MS zwischen korrodierten und nicht korrodierten Schichten unterschieden werden.

Schließlich konnten die am Korrosionsprozess beteiligten SRB und SOB in sechs verschiedenen Faulbehältern nachgewiesen werden. Ihre Fähigkeit zur  $H_2SO_4$ -Produktion und die großen Korrosionsschäden von *A. thiooxidans* auf Zementstein- und Betonproben deuten auf ein biogenes Schwefelsäure-Korrosionspotential in Faulbehältern hin.

### **Papers in Peer-Reviewed Journals**

Huber, B., Drewes, J.E., Lin, K.C., König, R., Müller, E. 2014. Revealing biogenic sulfuric acid corrosion in sludge digesters: detection of sulfur-oxidizing bacteria within full-scale digesters. *Water Science & Technology*, **70**(8), 1405-1414.

Huber, B., Herzog, B., Drewes, J.E., Koch, K., Müller, E. 2016. Characterization of sulfur oxidizing bacteria related to biogenic sulfuric acid corrosion in sludge digesters. *BMC Microbiology*, **16**(1), 153.

Huber, B., Hilbig, H., Mago, M.M., Drewes, J.E., Müller, E. 2016. Comparative analysis of biogenic and chemical sulfuric acid attack on hardened cement paste using Laserablation-ICP-MS. *Cement and Concrete Research* **87**, 14-21.

Huber, B., Hilbig, H., Drewes, J.E., Müller, E. 2017. Evaluation of concrete degradation after short and long-term exposure to chemically and microbially generated sulfuric acid. *Cement and Concrete Research* (accepted).