

**Funktionalisierung von Biowerkstoffen durch biomimetische Strukturen auf  
der Basis von Tetraetherlipiden – ein Antifoulingkonzept.**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)

Genehmigt durch das

Zentrum für Ingenieurwissenschaften

als organisatorische Grundeinheit für Forschung und Lehre im Range einer Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Marion Frant, geb. Hildebrandt

am 06. Mai 1970 in Grimma

Geschäftsführender Direktor (Dekan): Prof. Dr.-Ing. habil. Dr. h. c. H. Altenbach

Gutachter:

1. Prof. Dr.-Ing. G. Leps
2. Prof. Dr.-Ing. D. Behrend

Halle (Saale), 11.03.2008

**urn:nbn:de:gbv:3-000013508**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013508>]

<b>ABKÜRZUNGEN, FORMELZEICHEN, SYMBOLE</b>	<b>1</b>
<b>1 MOTIVATION UND AUFGABENSTELLUNG</b>	<b>3</b>
<b>2 KONZEPTENTWICKLUNG</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Thermodynamische Grundlagen</b>	<b>5</b>
2.1.1 Gibbs'sche Fundamentalgleichung	5
2.1.2 Wechselwirkungen	7
<b>2.2 Parametervariation</b>	<b>19</b>
<b>2.3 Bioadhäsion</b>	<b>22</b>
<b>2.4 Antifoulingkonzepte</b>	<b>26</b>
<b>2.5 Gestaltung biomimetischer Oberflächen als Antifoulingkonzept</b>	<b>36</b>
<b>3 BESCHICHTUNGSMATERIAL, SCHICHTCHARAKTERISIERUNG, BIOADHÄSIONSPRÜFUNG UND FUNKTIONALITÄTSTEST</b>	<b>38</b>
<b>3.1 Tetraetherlipid</b>	<b>38</b>
<b>3.2 Beschichtungstechnologie</b>	<b>39</b>
3.2.1 Immobilisierung der Lipidschichten	39
3.2.2 Funktionalisierung der Lipidschichten	42
<b>3.3 Charakterisierung</b>	<b>43</b>
3.3.1 Energetische Charakterisierung	43
3.3.2 Elektrokinetische Charakterisierung	46
3.3.3 Mikroskopische Charakterisierung	48
<b>3.4 Bioadhäsionsprüfung</b>	<b>48</b>
3.4.1 Mikroorganismen / Medien	51
3.4.2 <i>In vitro</i> - Bioadhäsionsprüfung	52
3.4.3 Feldtest	55
<b>3.5 Funktionalitätstests</b>	<b>56</b>
3.5.1 Optische Funktionalität	56
3.5.2 Elektrochemische Funktionalität	57
3.5.3 Biokompatibilitätsprüfung	57
<b>3.6 Statistik</b>	<b>57</b>
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>58</b>
<b>4.1 Nachweis der Beschichtung</b>	<b>58</b>
<b>4.2 Energetische, elektrokinetische und mikroskopische Charakterisierung</b>	<b>60</b>
4.2.1 Charakterisierung der Tetraetherlipidschichten	60
4.2.2 Charakterisierung der biologischen Systeme	64
4.2.3 Charakterisierung der Medien	66
<b>4.3 Ergebnisse der Bioadhäsionsprüfung</b>	<b>66</b>
4.3.1 Bioadhäsionsprüfung für das Gewässermonitoring	66
4.3.2 Bioadhäsionsprüfung für medizinische Applikationen	69
4.3.3 Ergebnisse der Feldtests	71

<b>4.4</b>	<b>Ergebnisse der Funktionalitätstests</b>	<b>73</b>
4.4.1	Optische Funktionalität	73
4.4.2	Elektrochemische Funktionalität	74
4.4.3	Biokompatibilitätsprüfung	75
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>76</b>
<b>5.1</b>	<b>Analyse der erreichten Beschichtungsqualität</b>	<b>76</b>
<b>5.2</b>	<b>Darstellung des Antifoulingpotenzials</b>	<b>81</b>
5.2.1	Unmodifiziertes Tetraetherlipid - Gewässermonitoring	81
5.2.2	Unmodifiziertes Tetraetherlipid – medizinische Applikation	83
5.2.3	Funktionalisiertes Tetraetherlipid - Gewässermonitoring	84
5.2.4	Funktionalisiertes Tetraetherlipid – medizinische Applikation	87
<b>5.3.</b>	<b>Betrachtung der Wechselwirkungen</b>	<b>92</b>
5.3.1	Korrelationsbetrachtungen	92
5.3.2	Applikation des theoretischen Modells	97
<b>5.4.</b>	<b>Produktentwicklung</b>	<b>111</b>
	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>114</b>
	<b>SUMMARY</b>	<b>117</b>
	<b>REFERENZEN</b>	<b>120</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>125</b>
	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>126</b>
	<b>SCHRIFTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>127</b>

**Abkürzungen, Formelzeichen, Symbole****Abkürzungen**

AB	Acid-Base bzw. Säure-Base
AFM	Atomkraftmikroskopie
API	Analytical Profile Index
APTMS	Aminopropyltrimethoxysilan
AW	Abwasser
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
CAD	Computer Aided Design
CAPD	kontinuierliche ambulante peritoneale Dialyse
CLSM	konfokale Laserscanningmikroskopie
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DLVO	Theorie nach Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek
DSMZ	Deutsche Stammsammlung der Mikroorganismen und Zellen
EPS	extrazelluläre polymere Substanz
FW	Flusswasser
IEP	Isoelektrischer Punkt
IHP	Inneres Helmholtzschicht
IWW	Institut für Wasserwirtschaft, Mülheim
KW	Kontaktwinkel
MATS	Microbial Adhesion To Solvents
OHP	Äußere Helmholtzschicht
OS	Oberflächenspannung
PC	Phosphorylcholin
PDFL	peritoneale Dialyseflüssigkeit
PEG	Polyethylenglykol
PET	Polyethylenterephthalat
PLA	Polylaktid
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVC	Polyvinylchlorid
REM	Rasterelektronenmikroskopie
SA	Standardabweichung
SAM	Self-Assembling Methode
TEL	Tetraetherlipid
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TW	Trinkwasser
V4A	Edelstahl (Werkstoffnummer: 1.4401)
ZP	Zetapotenzial

**Lateinische Buchstaben**

A	Grenzflächeneinheit
A <sub>123</sub>	Hamakerkonstante (Körper 1,2 Medium 3)
b	elektrophoretische Beweglichkeit
c	Konzentration
d	dispers
d	Abstand zwischen Molekülen
D	Abstand zwischen Kugel und Platte im Kugel-Platte-Modell
E	Wechselwirkungsenergie
E	elektrische Feldstärke
F	Faraday-Konstante = 96485,3415 C val <sup>-1</sup>
F	Kraft
F	Helmholtz-Energie (freie Energie)
G	Gibbs'sche Energie (freie Enthalpie)
h	Plancksche Konstante = 6,626 x 10 <sup>-34</sup> J s

I	Ionisierbarkeit
I	Ionenstärke
$k_B$	Boltzmann-Konstante $= 1,380658 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$
l	Länge der Segmente des adsorbierten Polymers (sterische Energie)
$L_0$	Wirkungslänge der adsorbierten Polymere an der Oberfläche
m	Masse
M	Molarität
n	Stoffmenge
n	Anzahl der Segmente des adsorbierten Polymers
n	Anzahl der Bindung
$n_i$	Brechungsindex von i
N	Anzahl der Bindungsmoleküle
$N_A$	AVOGRADRO-Zahl
$N_i$	Überschussgröße, Moleküle des Materials i je Volumeneinheit
p	Druck
p	polar
q	Ladungsmenge
Q	Wärmemenge
r	Radius
R	Radius der Kugel (Kugel-Platte-Modell) bzw. des Mikroorganismus
R	molare Gaskonstante $= 8,3145 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$
S	Entropie
T	Temperatur
U	innere Energie
v	Geschwindigkeit
V	Volumen
W	Arbeit
x	Abstand zwischen den adsorbierten Polymeren an der Oberfläche
z	Ladung eines Ions

### Griechische Buchstaben

$\alpha$	Phasenindex
$\alpha$	Polarisierbarkeit
$\beta$	Phasenindex
$\gamma$	Ober-, Grenzflächenspannung
$\Gamma$	Asorption
$\Gamma$	Kopplungsdichte der adsorbierten Polymere an der Oberfläche
$\varepsilon$	Dielektrizitätskonstante
$\varepsilon$	Potenzialtopf des Lennard-Jones-Potenzials
$\varepsilon_0$	Influenzkonstante $= 8,8542 \times 10^{-12} \text{ C V}^{-1} \text{ m}^{-1}$
$\zeta$	Zetapotenzial
$\eta$	Viskosität
$\kappa$	Debye-Hückel-Parameter
$\lambda_D$	Debye-Hückel-Länge
$\lambda_0$	Abklinglänge
$\mu$	chemisches Potenzial
$\mu$	elektrisches Dipolmoment
$\mu_i$	chemisches Potenzial des Stoffes i
$\nu_e$	Frequenz des geringsten Elektronenübergangs $\approx 3 \times 10^{15} \text{ s}^{-1}$
$\rho$	Ladungsdichte
$\sigma$	Index der Gibbs'schen Zweiphasengrenze
$\sigma$	van der Waals-Radius (Lennard-Jones-Potenzial)
$\psi$	elektrisches Potenzial

# 1 Motivation und Aufgabenstellung

Bereits seit geraumer Zeit beschäftigt sich die Wissenschaft mit der Bekämpfung unerwünschter Biofilme – dem Antifouling. Applikationen dieser Studien finden sich dabei sowohl im medizinischen Bereich, z.B. in der Bekämpfung von Infektionsherden auf Medizinprodukten, in der Lebensmittelindustrie beim Erreichen hygienischer Oberflächen, aber auch in der Umwelt- und Biotechnologie, z.B. in der Entwicklung von Antifoulinganstrichen für Schiffsrümpfe, in Klär- und Abwasseranlagen oder in Trinkwasserleitungen.

Um eine dauerhafte Reduzierung der Adhäsion biofilmbildender Mikroorganismen an technischen Materialoberflächen zu erreichen, ist der kombinierte Einsatz von unterschiedlichen Antifoulingkonzepten notwendig. Hier bieten monomolekulare Filme eine chemische Plattform mit einem hohen Maß an selektiver Modifizierbarkeit. Es wird versucht, über die Beschichtung und Funktionalisierung von Materialoberflächen mit filmbildenden Molekülen antiadhäsive Eigenschaften zu entwickeln, aufgrund derer die Adsorption von Proteinen und die Adhäsion von Mikroorganismen und Zellen reduziert werden kann. Das Promotionsthema ordnet sich in diesen Entwicklungsschwerpunkt ein.

Ausgangspunkt der Untersuchungen bildeten Arbeiten im Sonderforschungsbereich 197 „Bio- und Modellmembranen“ der DFG, in dem es gelang, ein Tetraetherlipid der Membran des Archaea *Thermoplasma acidophilum* zu isolieren, dessen Applikation als biomimetische Oberflächenmodifikation ein innovatives Anwendungsspektrum verspricht.

Derzeit werden verschiedene alternative Antifoulingtechniken diskutiert, die über lange Zeiträume wirksam sind und nach Möglichkeit nicht auf toxischen Komponenten basieren. Die gezielte Modifikation physiko-chemischer Materialparameter stellt dabei neben der Integration spezifisch wirkender Funktionsmoleküle ein aus heutiger Sicht vielversprechendes Antifoulingkonzept dar. Dies gilt in erster Linie, da für die initiale Biofilmbildung die unspezifischen Wechselwirkungen an der Grenzfläche Substrat / biologisches System verantwortlich sind. Insbesondere die Primärbesiedlung wird als physikalisch-chemisch kontrollierter Prozess beschrieben. Das Verständnis der thermodynamischen Relationen der bakteriellen Adhäsion bildet daher die notwendige Grundlage der Entwicklung neuer Antifoulingstrategien. Demgemäß soll in der nachfolgenden Themenbearbeitung die Bewertung der Bioadhäsion an neuen applikationsspezifischen Beschichtungen und die gleichzeitige Wichtung physikochemischer Einflüsse auf die initiale Adhäsion an modifizierten Oberflächen stattfinden.

Somit finden folgende wissenschaftliche Arbeitsziele Eingang in die vorliegende Arbeit:

- Es erfolgt die Analyse und die Ausweitung der existierenden Modifizierungsstrategien für Tetraetherlipide mit dem Ziel, einerseits eine langzeitstabile Kopplung an Substratwerkstoffe und andererseits biorelevante Funktionalisierungen im Sinne von Antifouling zu erhalten.
- Über die Darstellung und Wertung thermodynamischer Grundlagen des Grenzflächengeschehens zwischen Biosystem und Material und die Einschätzung bestehender Antifoulingstrategien lassen sich Hypothesen zur Bioadhäsion entwickeln.
- Der detaillierten Materialcharakterisierung auf der Basis topografischer, energetischer und elektrischer Kenngrößen einschließlich einer analogen Beurteilung des biologischen Systems schließt sich eine applikationsspezifische Bioadhäsions- und Biofunktionalitätsprüfung an.
- Die Kalkulation und Interpretation der Wechselwirkungsenergie in Form einer Modellbetrachtung auf der Basis eigener Messergebnisse führt im Ergebnis zur Entwicklung einer eigenen Modellvorstellung.

Die Entwicklung eines biomimetischen Antifoulingkonzeptes auf Tetraetherlipidbasis beinhaltet konsequent zusätzlich technische Zielstellungen:

- Die Anwendung des Antifoulingkonzeptes wird auf reale, komplexere Systeme ausgedehnt, deren Zielstellungen bakteriozide Katheteroberflächen und das Antifouling von Sensorsystemen im Gewässermonitoring beinhalten. Diese technische Richtung schließt neben dem Antifouling die Funktionalitätsprüfung entsprechend des notwendigen Anforderungsprofils ein.
- Ausgewählte optimierte Lipidbeschichtungen werden in Feldtests unter realen Applikationsumgebungen bezüglich ihres Antifoulingverhaltens getestet.
- Die daraus folgende Kenntnis der die funktionsbezogene Oberflächenkompatibilität eines Biomaterials bestimmenden Faktoren erlaubt die Definition eines weiterführenden Antifoulingkonzeptes.
- Die Grundlagen der technologischen Umsetzung der Beschichtungstechnologie mit Tetraetherlipiden werden erörtert.

## 2 Konzeptentwicklung

„Die Adhäsion ist der Schlüssel eines jeden Oberflächenfouling...“ formulierte H. Barberousse in einem Artikel des Journals „Biofouling“ 2007 als allgemeinen Kerngedanken [1]. Das Grenzflächengeschehen und damit die Bioadhäsion wiederum wird maßgeblich durch spezifische biochemische Interaktionen sowie durch unspezifische physikochemische Wechselwirkungskräfte bestimmt. Für die Konzeptentwicklung des Antifouling ist demgemäss das Verständnis der thermodynamischen Einflussparameter unumgänglich. Obgleich die Grundlagen der Thermodynamik bereits im 19. Jahrhundert gelegt wurden, erfordert die thematische Breite der Bioadhäsion mit ihrem Bezug auf ingenieur- und werkstofftechnische sowie biologische und biophysikalische Ansatzpunkte eine Einführung in die theoretischen Grundlagen, um dann mit einer einheitlichen Sprache die Diskussion dessen herbeizuführen. Das Kapitel 2 zielt daher auf die Darstellung und die Wertung der ausschlaggebenden Wechselwirkungen, gefolgt von der Parametervariation maßgeblicher Kenngrößen mit Bezug auf die Bioadhäsion. Zusätzlich werden Antifoulingkonzepte zusammengefasst und unter Beachtung der Bioadhäsion an sich interpretiert.

### 2.1 Thermodynamische Grundlagen

#### 2.1.1 Gibbs'sche Fundamentalgleichung

Das wissenschaftliche Fundament der Thermodynamik stellt ausgehend von wenigen Postulaten, den sogenannten Hauptsätzen, ein in sich geschlossenes Formelsystem zur Verfügung, mit dessen Hilfe das makroskopische Verhalten der Stoffe beschrieben werden kann. Der Gleichgewichtszustand ist der Zustand, dem ein System ohne innere Hemmnisse entgegen strebt, solange in ihm treibende Kräfte, wie Temperatur-, Druck- oder Konzentrationsdifferenzen vorhanden sind. Der erste Hauptsatz der Thermodynamik besagt, dass es einen physikalischen Parameter geben muss, der die Eigenschaft einer Zustandsfunktion hat, die innere Energie  $U$ . Beide Summanden,  $dQ$  und  $dW$ , sind Ausdruck energetischer Änderungen der Wärmemenge  $Q$  und der Arbeit  $W$ :

$$dU = dQ + dW \quad (1).$$

Der zweite Hauptsatz ermöglicht nun eine Aussage über die Richtung der freiwillig ablaufenden Prozesse und definiert eine weitere Zustandsfunktion - die Entropie  $S$ . Jeder Übergang eines Systems entspricht einer Entropieänderung, wobei bei einer freiwilligen Zustandsänderung die Entropie des geschlossenen Systems zunimmt. Die Entropie des quasireversiblen Prozesses ist abhängig von der Temperatur  $T$ :

$$dS = dQ_{\text{reversibel}} / T \quad (2).$$

Das Arbeitsdifferential  $dW$  lässt sich allgemein aus dem Produkt einer Arbeitskoordinate mit einem Arbeitskoeffizienten ermitteln. Unter Einbeziehung beispielsweise der Volumenarbeit ( $p dV$ ), des chemischen Stoffes ( $\mu dn$ ) und des Ladungstransportes ( $\psi dq$ ) ergibt sich:

$$dW = -pdV + \psi dq + \sum_{i=1}^m \mu_i dn_i \quad (3).$$

Aus den Gleichungen (1) - (3) ergibt sich die Differentialform der Gibbs'schen Fundamentalgleichung:

$$dU = TdS - pdV + \psi dq + \sum_{i=1}^m \mu_i dn_i \quad (4).$$

Neben der inneren Energie werden weitere Zustandsfunktionen eines Systems definiert: die Helmholtz Energie  $F$  für isotherm-isochores Prozesse sowie die Gibbs'sche Energie  $G$  für isotherm-isobare Prozesse. Unter Anwendung der Gibbs'schen Fundamentalgleichung folgt dabei:

$$dF = -SdT - pdV + \sum_{i=1}^m \mu_i dn_i + \psi dq \quad (5),$$

$$dG = -SdT + Vdp + \sum_{i=1}^m \mu_i dn_i + \psi dq \quad (6).$$

Die Wahl der jeweiligen Gleichungen zur Beschreibung eines Systems hängt von den Randbedingungen ab, wobei es für den hier zu beschreibenden Prozess der Bioadhäsion zweckmäßig ist, den Parameter der Gibbs'schen Energie ( $dG$ ) zu verwenden. Gleichzeitig definiert diese Zustandsfunktion das Kriterium der Irreversibilität und des Gleichgewichts. Hier eröffnet sich ein Problem des thermodynamisch begründeten Modells.

Strenggenommen stellt die Bioadhäsion durch die Ausbildung einer neuen Grenzfläche einen irreversiblen Prozess dar. Für die Anwendung der thermodynamischen Potentiale spricht jedoch der Umstand, dass die irreversible Haftung verhindert werden soll, es wird allein die Anordnung selbst bzw. der Prozess der Annäherung der an der Bioadhäsion beteiligten Oberflächen betrachtet.

Die Anwesenheit von Oberflächen/Grenzflächen erfordert eine Anpassung der thermodynamischen Betrachtung. Gibbs führte eine Methode zur Behandlung von Grenzflächenerscheinungen im Zweiphasensystem ein. Die Phasen  $\alpha$  und  $\beta$  werden durch eine exakte, zweidimensionale Grenze  $\sigma$  getrennt. Dieser wird die Spannung  $\gamma$  zugeschrieben und auf sie die Überschüsse von Energie, Entropie und Masse bezogen. An der Grenzfläche ändert sich die molekulare Zusammensetzung, Adsorption findet statt. Unter Betrachtung der Anzahl der Moleküle des Materials  $i$  je Volumeneinheit ergibt sich für die Überschussgröße  $N_i^\sigma$ :

$$N_i^\sigma = N_i - c_i^\alpha V^\alpha - c_i^\beta V^\beta \quad (7).$$

Die Adsorption wird als Grenzflächenkonzentration in Form der Überschussgröße je Grenzflächeneinheit  $A$  wie folgt definiert:

$$\Gamma_i = \frac{N_i^\sigma}{A} \quad (8).$$

Guggenheim stellte später eine dreidimensionale Phasengrenze vor mit einer auf die Grenzfläche bezogenen Dicke, Volumen und Konzentration [2]. Praktisch spielt die thermodynamische Größe der Räumlichkeit in den Betrachtungen keine Rolle, so dass im Allgemeinen von Ober- bzw. Grenzflächeneinheiten gesprochen wird [3, 4].

Aus der, um den Oberflächenterm erweiterten Gibbs'schen Fundamentalgleichung, wird auch die thermodynamische Definition der Oberflächenspannung abgeleitet:

$$dG = -SdT + Vdp + \sum_{i=1}^m \mu_i dn_i + \psi dq + \gamma dA \quad (9)$$

$$\text{und} \quad \gamma = \left. \frac{\partial G}{\partial A} \right|_{T, n_i, p^\alpha, p^\beta}$$

## 2.1.2 Wechselwirkungen

Während die Gibbs'sche Fundamentalgleichung der Beschreibung des Gleichgewichtszustandes eines Systems dient, sollen nachfolgend Wechselwirkungen betrachtet werden, die zum Aufbau von Gleichgewichtsstrukturen an der zu betrachtenden Grenzfläche beitragen und so der Beschreibung der Bioadhäsion dienen können.

### 2.1.2.1 Van der Waals-Wechselwirkung

Bereits 1873 beschrieb J. D. van der Waals ubiquitäre schwache, ungerichtete Anziehungskräfte mit sehr geringer Reichweite [5]. Man unterscheidet drei Arten der Wechselwirkung von van der Waals-Kräften:

- permanenter Dipol – permanenter Dipol (Orientierungseffekt / Keesom-Kräfte) [6],
- permanenter Dipol – induzierter Dipol (Induktionseffekt / Debye-Kräfte) [7] und
- fluktuierender Dipol – induzierter Dipol (Dispersionseffekt / London-Kräfte) [8].

Van der Waals-Wechselwirkungen nach Keesom kommen durch Anziehung zwischen Dipolen zustande und sind somit elektrodynamischer Natur. Nach Debye erzeugen Moleküle mit permanenten Dipolen in benachbarten polaren und unpolaren Molekülen induzierte Dipolmomente, woraus wieder eine Anziehung resultiert. Die Dispersionsenergie, beschrieben durch F. London, entsteht aus quantenmechanischen Betrachtungen der Wechselwirkung zwischen zwei Wasserstoffatomen im großen Abstand zueinander. Sie ist verantwortlich für die Anziehung dipolfreier Teilchen. Es handelt sich somit um elektrodynamische Kräfte, die auf Grund von Ladungsfluktuationen entstehen. London beschrieb für zwei Teilchen mit den Polarisierbarkeiten  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  und den Ionisierungsenergien  $I_1$  und  $I_2$  die Dispersionsenergie nach:

$$E_{London} = -\frac{3}{2} \frac{\alpha_1 \alpha_2}{(4\pi\epsilon_0)^2} \frac{1}{r^6} \frac{I_1 I_2}{I_1 + I_2} \quad (10).$$

Die Besonderheit dieser Wechselwirkungen begründen sich zum einen darin, dass diese dispersen Anziehungskräfte in allen Molekülen vorhanden sind, zum Zweiten zeigen sie einen Retardationseffekt, der besagt, dass die Wechselwirkung bei Abständen  $d > 10$  nm schneller abklingt ( $r^{-7}$ ) als bei kleineren Distanzen. Kommen Moleküle einander sehr nahe, so beginnen die Abstoßungskräfte der Kerne und der Elektronen zu wirken. Mit kleiner werdendem Abstand ( $d < 0,3$  nm) dominieren die Abstoßungskräfte, und das Lennard-Jones-Modell erlaubt es, die Energiebilanz zwischen Abstoßung und Anziehung wie folgt zu beschreiben [9] (Lennard-Jones-(n,6)-Potenzial):

$$E = 4\epsilon \left[ \left( \frac{\sigma}{R} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{R} \right)^6 \right] \quad (11)$$

Dabei bezeichnete  $\epsilon$  die Tiefe des Potenzialtopfes der Energiebilanz und  $\sigma$  den van-der-Waals-Radius, welcher auch als der Radius des betrachteten Teilchens aufgefasst wird.

In der Frage der van der Waals-Wechselwirkung zwischen makroskopischen Körpern existieren in der Literatur im wesentlichen zwei Betrachtungsweisen. Traditionell begründet ist das Konzept der Additivität von Paarwechselwirkungen, auf welchem die Arbeiten von Hamaker [10] und de Boer [11] basieren. Hamaker [10] formulierte für die Wechselwirkungsenergie zwischen einer Kugel mit Radius  $R$  und einer Platte im Abstand  $D$  zueinander folgende Beziehung:

$$\Delta G_{vdw} = -\frac{A_{123}}{6} \left[ \frac{R}{D} + \frac{R}{2R+D} + \ln\left(\frac{D}{2R+D}\right) \right] \quad (12)$$

Ausgehend von unverzögerten London'schen – van der Waals-Wechselwirkungen erhält man mit der Ladungsmenge  $q$  und für die Körper 1 und 3 im Medium 2 folgende Definition:

$$A_{132} = \pi^2 \left( q_1 q_3 \lambda_{13} + q_2^2 \lambda_{22} - q_2 q_1 \lambda_{21} - q_2 q_3 \lambda_{23} \right) \quad \text{mit} \quad \lambda_{12} = \frac{3\alpha_1 \alpha_2 I_1 I_2}{2(I_1 + I_2)} \quad (13)$$

Andere Autoren berechneten auf der Grundlage dieser Arbeiten die Dispersionswechselwirkung zwischen Körpern mit unterschiedlichen Geometrien [12, 13]. Dieser Ansatz nach Hamaker wurde seither durch die Beachtung der elastischen Deformation der Körper [14] und des Einflusses der Rauigkeit [15] erweitert.

Der Lifshitz-Ansatz stellt das zweite theoretische Konzept zur Bestimmung der Dispersionskraft zwischen makroskopischen Körpern dar [16]. Ausgehend von der Kraftwirkung durch die Fluktuation des elektromagnetischen Feldes zwischen zwei Körpern berechneten die Autoren die Wechselwirkungskraft unabhängig von atomaren Parametern. Die interagierenden Körper werden als kontinuierliche Medien behandelt. Für die Wechselwirkung ergibt die Lifshitz-Theorie für die nicht-retardierte Hamakerkonstante:

$$A_{123} = A_{Keesom, Debye} + A_{Dispersion} \\ \approx \frac{3}{4} k_b T \left( \frac{\varepsilon_1 - \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2} \right) \left( \frac{\varepsilon_3 - \varepsilon_2}{\varepsilon_3 + \varepsilon_2} \right) + \frac{3h\nu_e}{8\sqrt{2}} \frac{(n_1^2 - n_2^2)(n_3^2 - n_2^2)}{\sqrt{(n_1^2 + n_2^2)} \sqrt{(n_3^2 + n_2^2)} \left( \sqrt{(n_1^2 + n_2^2)} + \sqrt{(n_3^2 + n_2^2)} \right)} \quad (14)$$

Das Zugrundelegen des Kontinuums-Ansatzes begrenzt jedoch die Gültigkeit der Lifshitz-Theorie auf Distanzen größer als einige Nanometer.

Die exakte Bestimmung der Hamakerkonstanten über messtechnische Parameter ist noch ungelöst. Eine Möglichkeit stellt der Bezug zur Grenzflächenenergie dar, die Energie, die bei der reversiblen Trennung zweier adhätierender Phasen im Gleichgewichtszustand aufgebracht werden muss. Beim Kontakt zweier Körper mit einer geringst möglichen Distanz  $D_0 \approx 0,165$  nm nach B. Bhushan [17] bzw.  $D_0 \approx 0,157$  nm nach van Oss [18] ergibt sich vereinfacht die Definition der Hamakerkonstante aus:

$$A_H = 12\pi\Delta GD_0^2 \quad (15)$$

Van der Waals-Kräfte wirken im Allgemeinen anziehend. Sie sind immer anziehend im Vakuum oder wenn beide Körper aus demselben Material bestehen. In besonderen Fällen treten zwischen verschiedenen Materialien abstoßende van der Waals-Kräfte auf, beispielsweise an einer kondensierten Phase, wenn das Medium 3 stärker von Medium 2 als Medium 1 angezogen wird bzw. bei Flotation. [19]

### **2.1.2.2 Elektrostatische Wechselwirkung / elektrische Doppelschicht**

Die Grundgleichung elektrostatischer Wechselwirkungen beschreibt die Kraft, die zwischen zwei Ladungen  $q$  wirkt, welche sich im Medium mit der Dielektrizität  $\varepsilon$  im Abstand  $r$  voneinander befinden [20]:

$$F_{Coulomb} = \frac{q_1 q_2}{4\pi\varepsilon_0 \varepsilon r^2} \quad (16)$$

Für das elektrische Potenzial  $\psi$  ergibt sich bei Erhöhung der potentiellen Energie der Zusammenhang:

$$E_{pot} = q_1 \psi \quad \text{mit} \quad \psi = \frac{q_2}{4\pi\varepsilon_0 \varepsilon r} \quad (17)$$

Ist die Ladung keine Punktladung, sondern besitzt sie eine gewisse Ausdehnung, so spricht man von der Ladungsdichte  $\rho$ . Eine Oberfläche, exponiert in einem flüssigen Medium, führt zu einer Ladungsverteilung, die ein elektrisches Potenzial erzeugt, das man aus der Lösung der Poisson-Gleichung erhält:

$$\nabla^2 \psi = \frac{\partial^2 \psi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 \psi}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 \psi}{\partial z^2} = -\frac{\rho_e}{\epsilon \epsilon_0} \quad (18)$$

Für den Potenzialverlauf senkrecht zur Oberfläche vereinfacht sich Gleichung 18 zu:

$$\frac{\partial^2 \psi}{\partial x^2} = -\frac{4\pi\rho}{\epsilon} \quad (19).$$

Fixierte Ladungen an einer Grenzfläche erzeugen in ihrer unmittelbaren Umgebung ein elektrisches Feld analog einem punktförmigen Ladungsträger, eine elektrische Doppelschicht entsteht. Die nachfolgende Betrachtung der Modellvorstellungen der elektrischen Doppelschicht setzt voraus: das System befindet sich im thermodynamischen Gleichgewicht und die auftretenden elektrischen Felder sind so schwach, dass das Ohmsche Gesetz gilt, wobei die elektromotorische Kraft dem Potenzialgradienten entspricht. Betrachtet man die Grenzfläche an einem Biomaterial zum biologischen Medium, so kann die Bildung der elektrischen Doppelschicht über verschiedene Wege führen: (i) über die Adsorption von Ionen aus der Lösung und (ii) durch die Dissoziation oder Ionisierung von Oberflächengruppen [12].

### **Helmholtz-Modell**

Das einfachste Modell, das Helmholtz-Modell, geht von der Annahme aus, dass sich die adsorbierenden Ladungen und die solvatisierten Ionen direkt an der Oberfläche des Materials ansammeln. Dieses Modell gleicht einem Plattenkondensator mit einem ladungsfreien Raum ( $\rho=0$ ) zwischen der inneren und äußeren Helmholtzschicht (IHP, OHP). Für den Potenzialverlauf gilt:

$$\frac{d\psi}{dx} = konst. \quad (20)$$

### **Gouy-Chapman-Modell**

Das Gouy-Chapman-Modell nimmt neben den elektrostatischen Kräften die molekulare Wärmebewegung auf mit dem Bestreben, die Ionen in der gesamten Lösung gleichmäßig zu verteilen [21, 22]. Da die Ladungsverteilung nach der Poisson-Gleichung die Kenntnis der Position der einzelnen Ladungsträger voraussetzt, wird aufgrund der freien Beweglichkeit der Ionen in der Lösung eine zusätzliche Information notwendig. Unter der Annahme eines 1-1-wertigen Elektrolyten und der Voraussetzung, dass das Potenzial für  $x \rightarrow \infty$  gegen Null strebt, erhält man mit der Ladung eines Ions  $z_i$  die Boltzmann-Gleichung:

$$n_i = n_i^0 \exp\left(\frac{-z_i e \psi}{k_b T}\right) \quad (21)$$

Setzt man diese Formulierung mit der Ladungsdichte  $\rho$

$$\rho = \sum_i n_i z_i e \quad (22)$$

in die Gleichung 19 ein, so erhält man die zugrundeliegende Poisson-Boltzmann-Gleichung:

$$\nabla^2 \psi = -\frac{4\pi\rho}{\epsilon} = -\frac{4\pi}{\epsilon} \sum_i n_i^0 z_i e \exp\left(\frac{-z_i e \psi}{k_b T}\right) \quad (23)$$

Dies ist eine partielle Differentialgleichung zweiter Art und erfordert für die analytische Lösung zusätzliche Randbedingungen. Die *Debye-Hückel-Annäherung* führt für sehr kleine Potenziale und aufgrund der Elektroneutralität des Systems zur sogenannten linearisierten Lösung der Poisson-Boltzmann-Gleichung:

$$\begin{aligned} \psi(x) = \psi_0 \exp(-\kappa x) \quad \text{mit} \quad \kappa = \sqrt{\frac{8\pi e^2 N_A I}{\varepsilon k_b T}} \quad I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 \quad (24). \\ \text{und} \quad z_i e \psi \ll k_b T \quad \sum z_i e n_i = 0, \end{aligned}$$

Der Debye-Hückel-Parameter  $\kappa$  stellt die reziproke Debye-Hückel-Länge ( $\lambda_D$ ) dar, welche die Entfernung beschreibt, in der das Potenzial auf den e-ten Teil abfällt. Zudem geht das Medium durch die Einführung der Ionenstärke in die Beschreibung der Doppelschicht ein [7].

### **Stern-Modell**

Das Modell nach Stern [23] verbindet das Helmholtz- und das Gouy-Chapman-Modell. Die innere Helmholtzschicht füllt sich mit adsorbierenden Anionen, woran sich eine fixe und eine diffuse Schicht hydratisierter Kationen anschließt. Stern definierte den Parameter Zetapotenzial  $\zeta$  als das Potenzial an der Scherebene zwischen fixer und diffuser Schicht, wie es die Abbildung 1 darstellt. Die Lösung der Gleichung 23 lautet in diesem Fall:

$$\psi(x) = \psi_0 \exp(-\kappa (x - x_{\text{Stern}})) \quad (25)$$

### **GCSG (Grahame)- Modell**

Das sogenannte Grahame-Modell fasst Komponenten der zuvor beschriebenen Modelle zusammen und wird daher auch als GCSG (Gouy-Chapman-Stern-Grahame)-Modell bezeichnet [24]. Der Schicht aus adsorbierten Anionen folgt ein Aufbau der Doppelschicht nach Stern, wobei die fixe Stern-Schicht in eine Schicht dehydratisierter Ionen ( $\cong$  Innere Helmholtzschicht) und eine Schicht noch hydratisierter Ionen ( $\cong$  Äußere Helmholtzschicht) unterteilt wird, der sich die diffuse Schicht anschließt.

Die Poisson-Boltzmann-Gleichung (Gleichung 23) beschreibt das Potenzial an jedem Punkt des betrachteten Systems. Hogg *et al.* [25] entwickelten eine exakte analytische Lösung dieses Ansatzes für konstante und kleine Potenziale (<25 mV) zweier unendlicher Platten:

$$E(D) = \frac{\varepsilon \varepsilon_0 \kappa}{2} (\psi_1^2 + \psi_2^2) \left( 1 - \coth(\kappa D) + \frac{2\psi_1 \psi_2}{(\psi_1^2 + \psi_2^2)} \operatorname{cosech}(\kappa D) \right) \quad (26)$$

Für Systeme abweichender Geometrien und somit auch für die Wechselwirkung zwischen einer Kugel und einer Platte sind derartige exakte Lösungen nicht möglich. Die Anwendung der Derjaguin-Approximation, welche die Wechselwirkungskräfte zwischen willkürlichen Geometrien als Summe korrespondierender Wechselwirkungen je Flächeneinheit definiert, ermöglicht es jedoch unter der Voraussetzung, dass die Distanz zwischen den Körpern kleiner als deren Radien ist, die Wechselwirkungsenergie zwischen einer Kugel mit Radius R und einer Platte wie folgt zu kalkulieren [26] ( $\psi_0 \cong \zeta$ ):

$$\Delta G_{el} = \pi \varepsilon \varepsilon_0 R \left( \zeta_{\text{Platte}}^2 + \zeta_{\text{Kugel}}^2 \right) \left\{ \frac{2\zeta_{\text{Platte}} \zeta_{\text{Kugel}}}{\zeta_{\text{Platte}}^2 + \zeta_{\text{Kugel}}^2} \ln \left[ \frac{1 + \exp(-\kappa D)}{1 - \exp(-\kappa D)} \right] + \ln[1 - \exp(-2\kappa D)] \right\} \quad (27)$$

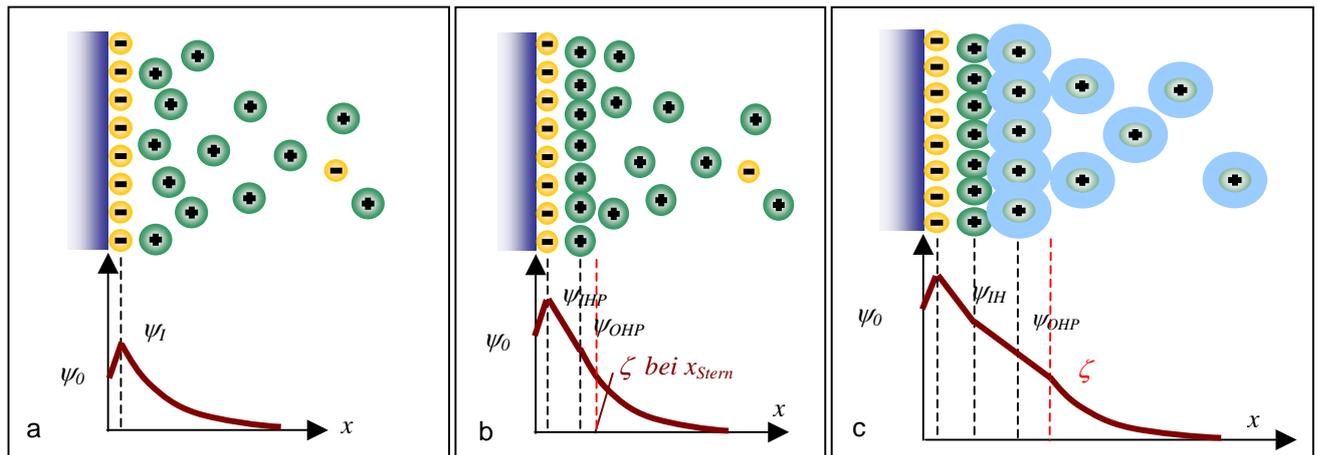


Abb. 1: Schemen der Modelle zur Beschreibung der elektrochemischen Doppelschicht

$\Psi_0$  – Oberflächenpotenzial des Substrates,  $\Psi_1$  – Potenzial der adsorbierten Schicht

$\Psi_{IHP}$  – Potenzial der inneren Helmholtzschicht,  $\Psi_{OHP}$  – Potenzial der äußeren Helmholtzschicht

a) Gouy-Chapman-Modell, b) Stern-Modell, c) GCSG-Modell

Das Zetapotenzial  $\zeta$  stellt ein integrales Mischpotenzial der Oberflächenladungen dar und kann demzufolge Ladungsheterogenitäten der Oberfläche nicht erfassen. Positive Potenziale gelten für die Dominanz der kationischen Komponenten, negative Werte für den Vorrang anionischer Komponenten. Während auf Materialien oberflächengekoppelte dissoziierbare funktionelle Gruppen und die spezifische Adsorption von Ionen zur Ladungsbildung beitragen, spielen auf biologischen Oberflächen Phospholipide z.B. durch das negativ geladene Phosphatidylserin und Glykoproteine durch die Carboxylgruppen der Aminosäuren eine Rolle. Das Zetapotenzial gibt indirekt die Überschussladung der Grenzfläche an.

### 2.1.2.3 DLVO-Theorie

Die elektrostatischen Wechselwirkungen und die van der Waals-Kräfte beschreiben ein Theoriegebäude der Kolloidchemie, welches an die Autoren B.V. Derjaguin, L.D. Landau, E.J.W. Verwey und J.Th.G. Overbeek gebunden ist – die DLVO-Theorie [27, 28]. Die Gesamtwechselwirkungsenergie des zu betrachtenden Systems Kugel-Medium-Platte ergibt sich entsprechend dieses Ansatzes aus:

$$\Delta G_{DLVO} = \Delta G_{vdW} + \Delta G_{el} \quad (28)$$

Der Einfluss des Mediums spielt in der DLVO-Theorie eine wesentliche Rolle. Die Abbildung 2 verdeutlicht den Zustand des Systems anhand der Gesamtwechselwirkungsenergiefunktion  $G(D)$ . Zwei weit voneinander entfernte Oberflächen ziehen sich trotz der gleichsinnigen elektrischen Oberflächenladung an, da die van der Waals-Kräfte überwiegen. Die Funktion  $G(D)$  ist negativ. In der Distanz  $D_{min}$  wird ein Minimum der Wechselwirkungsenergie erreicht. Da bei geringeren Distanzen die elektrostatische Abstoßung überwiegt, verharren die beiden Teile im sogenannten sekundären Minimum. Eine zusätzliche Kraft von außen, wie z.B. die thermische Energiezufuhr oder ein Stoß, führen zur Überwindung der aufgebauten Energiebarriere, es kommt wiederum zu gegenseitiger Anziehung. Das Erreichen des primären Minimums stellt eine irreversible Verbindung der beteiligten Phasen dar. Die Lage des sekundären Minimums und die Höhe der entstehenden Energiebarriere beschreiben den primären Gleichgewichtszustand des Kugel-Platte-Systems. Beispielsweise führt die Reduktion der Oberflächenladungsdichte zum Wegfall des sekundären Minimums, während stark geladene Oberflächen in verdünnten Elektrolyten eine hohe Energiebarriere nach sich ziehen [29].

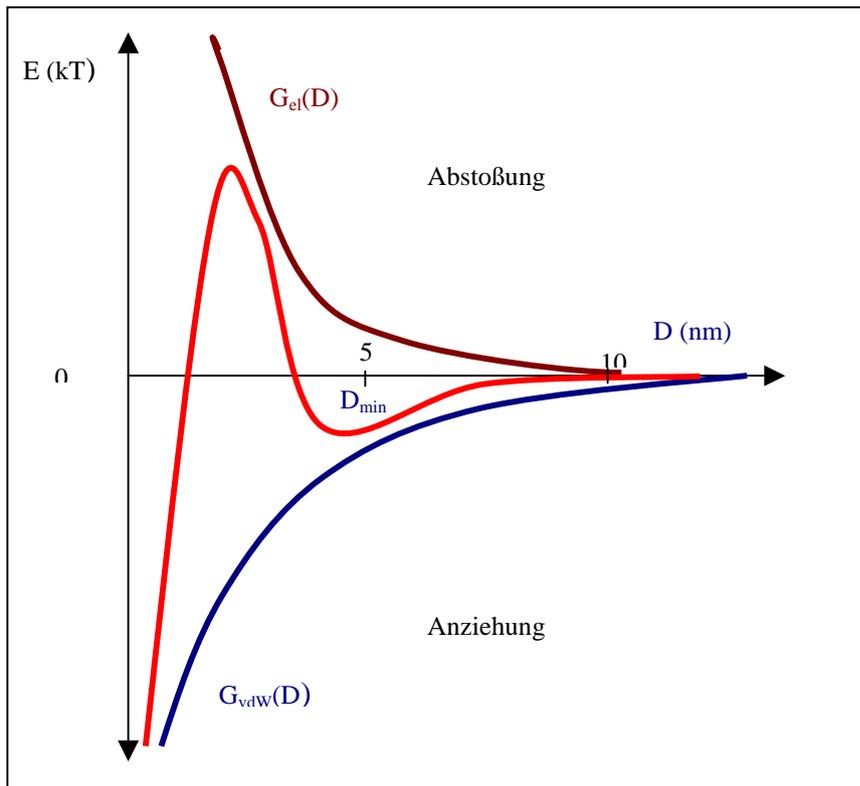


Abb. 2: Gesamtwechselwirkungsenergie in Abhängigkeit der Distanz D  
schematische Darstellung der DLVO-Theorie [30]

#### 2.1.2.4 Non-DLVO-Wechselwirkungen

In den zurückliegenden Jahrzehnten gab es zahlreiche Bemühungen, die Bioadhäsion aber auch die Wechselwirkung von hydrophoben und hydrophilen Oberflächen unter dem Ansatz der klassischen oben beschriebenen DLVO-Theorie zu interpretieren. Jedoch fanden die Autoren z.T. kontroverse und mit dem DLVO-Modell unerklärliche Phänomene, welche eine ausführliche Diskussion der Gültigkeit der DLVO-Theorie nach sich zogen und zwingend auf die Existenz weiterer Wechselwirkungskräfte wiesen [31].

Im Nachgang derartiger Studien, aber auch zunehmend durch die Entwicklung grenzflächensensitiverer Analysesysteme folgte die Darstellung unterschiedlicher NonDLVO-Wechselwirkungen sowie der Versuch einer plausiblen Einordnung [17, 30, 32, 33]. Einige Autoren definieren bis zu 20 verschiedenen Wechselwirkungskräfte [17, 30, 33]. Andere Autoren ordnen die Energiebeiträge in primäre und sekundäre Wechselwirkungen ein [18, 34].

In Anlehnung an die grundlegenden Arbeiten von C. van Oss [18] und J.N. Israelachvili [30] werden den als primär anzusehenden DLVO-Energien zwei weitere primäre NonDLVO-Wechselwirkungen zugeordnet (siehe nachfolgende Übersicht). Die Darstellung der einzelnen Beiträge erfolgt im Nachgang:

- (i) van der Waals-Wechselwirkung
- (ii) elektrostatische Wechselwirkung
- (iii) polare Wechselwirkungen
  - Säure-Base-Wechselwirkungen, Hydratationseffekte, hydrophobe Kräfte,
  - strukturelle, sterische Kräfte,
  - spezifische Interaktionen
- (iv) Brownsche Bewegung

### Säure-Base-Wechselwirkungen, Hydratationseffekte, hydrophobe Kräfte

Unter dem Begriff „polare Wechselwirkungen“ findet sich in der Literatur allein am Modell zweier interagierender Körper in einem Medium ein Spektrum an unterschiedlichen Kräften. Das Fehlen einer allgemein gültigen Definition der polaren Interaktionen erweitert das Feld zusätzlich. Festzuhalten bleibt, dass die polaren Wechselwirkungen nicht zwingend vorhanden sind im Gegensatz zu den dispersen van der Waals-Kräften, welche immer präsent sind.

Treten zwei Oberflächen, umgeben von wässrigen Medien, in einen geringen Abstand zueinander, so wird die Grenzflächenenergie zusätzlich von Hydratationseffekten bestimmt, die in ihrer Höhe die klassischen DLVO-Kräfte deutlich übersteigen können. Solvations- und ionische Wechselwirkungen, strukturelle Effekte durch Wasser als Medium sowie Wechselwirkungen, welche sich auf Wasserstoffbrückenbindungen gründen, werden in die Betrachtung einbezogen [35]. Grundsätzlich lassen sich die Hydratationseffekte wie folgt einteilen:

- oszillierende Anziehung und Abstoßung mit kurzer Reichweite,
- monotone hydrophile Abstoßung mit kurzer Reichweite,
- monotone hydrophobe Anziehung mit langer Reichweite.

Ihr Ursprung liegt in der Wasserstruktur, gegeben durch den Polarisierungseffekt des Wassermoleküls. Die Bindung von Wassermolekülen durch den Einfluss des elektrischen Feldes von Ionen bezeichnet man als Hydratation erster Art. Hydratationseffekte, die nicht primär elektrostatisch interpretierbar sind, zählen zur Hydratation zweiter Art und basieren auf der Vernetzung von Wassermolekülen. Hier spricht man von Protonenakzeptoren und -donatoren bzw. von Säure-Base-Wechselwirkungen [33, 36]. Ein wesentlicher Vorreiter zur Integration derartiger Säure-Base-Wechselwirkungen in einen erweiterten DLVO-Ansatz war C. J. van Oss [37]. Die Orientierung und lokale Dichte dieser Wasserschicht an der Grenzfläche bestimmt den Effekt [34]. Die Hydratation zweiter Art wird im Zusammenhang mit der Bildung supramolekularer Strukturen behandelt und taucht als entropiegetriebene Wechselwirkung auf. [36]

Die kurzreichweitige oszillierende Hydratationswechselwirkung wird auch als „Dichteverteilungsfunktion“ bezeichnet (Abbildung 3). Die Kräfte entstehen durch die strukturierende Wirkung, die zwei sehr glatte Oberflächen auf Moleküle im flüssigen Medium haben, und die sie zwingen, sich in quasi getrennte Schichten zu ordnen [38]. Solche Schichten sind energetisch bevorzugt (Minima der freien Energie) im Gegensatz zu ungeordneten Schichten. Für einfache Elektrolyten wie auch für Wasser sind oszillierende Kräfte anhand einer Anzahl theoretischer Studien und Computersimulationen gut beschrieben. In erster Näherung wird daraus die Energie als Funktion der Distanz zwischen den Oberflächen über eine exponentiell abfallende Cosinus-Funktion dargestellt [17]:

$$G_{\text{oszillierend}}(D) \approx G_0 \cos\left(\frac{2\pi D}{\sigma}\right) \exp\left(-\frac{D}{\sigma}\right) \quad (29)$$

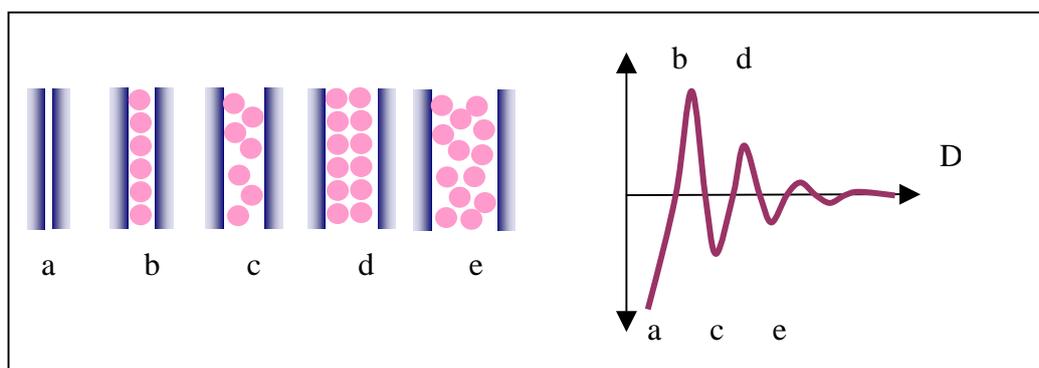


Abb. 3: Oszillierende Hydratationswechselwirkung mit kurzer Reichweite an glatten Oberflächen

Entsprechend der DLVO-Theorie überwiegen in oberflächennahen Bereichen von wenigen Nanometern die anziehenden van der Waals-Kräfte gegenüber den elektrostatischen Wechselwirkungen. Diesem widersprechen zahlreiche Studien, die eine signifikante, messbare Abstoßung zwischen hydrophilen Oberflächen wie Glimmer oder Silica [39, 40], aber auch zwischen Proteinschichten [41] beschreiben und diese auf Hydratationseffekte zurückführen. Das physikalische Modell dieser zusätzlichen Energie mit kurzer Reichweite ist noch nicht eindeutig geklärt, wird jedoch allgemein der oben angesprochenen Hydratation zweiter Art und dabei insbesondere dem Effekt durch unterschiedliche Orientierung des Wassernetzwerkes zugeschrieben [18, 35]. Für abstoßende hydrophile Wechselwirkungen wurde ein exponentieller Abfall mit einer Abklinglänge von über 1 nm ermittelt [42, 43]. Der effektive Wirkungsbereich liegt über dem der oszillierenden Kräfte. Empirisch bestimmt, kann man die hydrophile Abstoßung wie folgt formulieren:

$$G_{hydrophil}(D) = G_0 \exp\left(-\frac{D}{\lambda_0}\right) \quad (30).$$

Für einen 1:1-wertigen Elektrolyten beträgt  $\lambda_0 = 0,6 - 1,1$  nm und  $G_0$  in Abhängigkeit von der Hydrophilie der Oberfläche zwischen  $3 - 30$  mJ/m<sup>2</sup> [44]. Erst 2005 verglichen Valle-Delgado *et al.* [39] in einem Review unterschiedliche Theorien zum Ursprung dieser abstoßenden Hydratationskräfte mit kurzer Reichweite. Der dargestellte exponentielle Verlauf nach R. Pashley [44] stimmt sehr gut mit experimentellen Ergebnissen überein, liefert jedoch keine physikalische Erklärung. Es zeigte sich auch, dass die gesuchte Erklärung durch Betrachtungen der Polarisation, der phänomenologischen Ordnung des Wassers oder des Shifts der Dielektrizitätskonstanten nicht allein geliefert werden kann.

Im Unterschied zur Abstoßung zwischen hydrophilen Oberflächen stellte man zwischen hydrophoben Oberflächen eine starke anziehende Wechselwirkung fest [18, 35, 45, 46]. Diese hydrophobe Anziehung übersteigt die anziehenden van der Waals-Kräfte deutlich. Beispiele zur Wirkung anziehender hydrophober Wechselwirkungen soll die nachfolgende Abbildung 4 verdeutlichen [30].

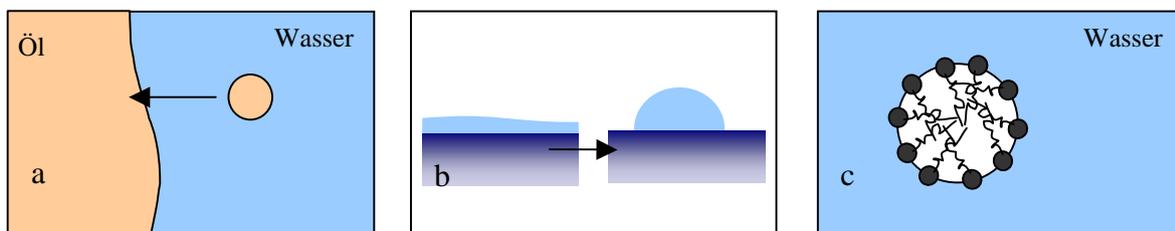


Abb. 4: schematische Darstellung der hydrophoben Wechselwirkung:  
a) geringe Löslichkeit, b) schlechte Oberflächenbenetzung, c) Micellbildung

Auch für die hydrophobe Anziehung existiert derzeit kein anerkanntes physikalisches Modell. N. A. M. Besseling [35] verweist auf den Einfluss der lokalen Dichte des Wassers im grenzflächennahen Bereich. Wird die lokale Dichte in der Grenzfläche verringert, ohne dass die Orientierung der Wassermoleküle beeinflusst wird, folgt eine Anziehung.

Da bisher keine Theorie die experimentellen Daten stützt, führte ein empirisches Fitten zur Beschreibung der vorliegenden Wechselwirkungsenergie. Ähnlich wie die hydrophilen Wechselwirkungen zeigen auch hydrophobe Kräfte einen exponentiellen Abfall mit  $\lambda_0$  bei 1 - 2 nm und  $\gamma = 10 - 50$  mN/m.:

$$G_{hydrophob}(D) = -2G_0 \exp\left(-\frac{D}{\lambda_0}\right) \quad (31)$$

Bei Distanzen kleiner als 10 nm konnte gezeigt werden, dass die hydrophoben Kräfte unabhängig vom Elektrolyten wirken. Demgegenüber wurden bei größeren Distanzen insbesondere in verdünnten Elektrolyten anziehende Effekte in einem Bereich bis zu 80 nm gemessen [46].

Zur Beschreibung von Säure-Base-Wechselwirkungen als ein Ausdruck der Hydratationseffekte und der hydrophoben Abstoßung publizierte C. van Oss grundlegende Ansätze [18]. Anziehende Säure-Base-Kräfte werden den „hydrophoben“ Interaktionen zugeordnet und sind mit  $\Delta G_{AB}(0) < 0$  (Energie im geringst möglichen Abstand) in ihrer Gesamtenergie negativ. Abstoßende Säure-Base-Kräfte beruhen auf hydrophilen Interaktionen und führen mit  $\Delta G_{AB}(0) > 0$  zu einer positiven Gesamtwechselwirkungsenergie. Der Term  $\Delta G_{AB}^{l_0}(0)$  beschreibt die Wechselwirkungsenergie zwischen zwei flachen Platten in minimaler Distanz.

Auch C. van Oss beschreibt einen exponentiellen Verlauf dieser Interaktion und formuliert in mit den Gleichungen 30 und 31 vergleichbarer Weise für die hydrophil/hydrophoben Anteile (Acid-Base / AB) in Abhängigkeit vom Abstand zweier Oberflächen und einem  $\lambda_0$  zwischen 0,6 und 13 nm [47]:

$$\Delta G_{AB}(D) = 2\pi R \lambda_0 \Delta G_{AB}^{l_0}(0) \exp\left[-\frac{D}{\lambda_0}\right] \quad (32)$$

### **Strukturelle, sterische Kräfte**

Oberflächenaktive Substanzen und polymere Makromoleküle tendieren zur Kopplung an suspendierten festen Substraten unter Bildung von Monolayern. Diese adsorbierten oder kovalent gebundenen Moleküle sind weiterhin flexibel und thermisch mobil, wobei sie von der Oberfläche aus in die Lösung reichen und gegebenenfalls mit anderen Oberflächenmolekülen interagieren. Sterische Kräfte resultieren aus der Wechselwirkung dieser Schichten [48, 49] und können sowohl anziehend als auch abstoßend wirken.

Zur Beschreibung der sterischen Stabilisierung hydrophober Partikel in Wasser definierte R. Ottewill [50] :

$$\Delta G_{sterisch} = \Delta G_{entropisch} + \Delta G_{osmotisch} + \Delta G_{Kettenelastizität} \quad (33)$$

Der entropische Beitrag beruht auf der Konformation der gelösten Polymere in apolaren Medien und wirkt stets abstoßend. Ebenfalls abstoßende Interaktionen werden durch den osmotischen Teil der Gleichung beschrieben und werden durch länger-kettige Polymere verursacht z.B. durch Polyethylenglykol [18]. Der Ausdruck der Kettenelastizität umfasst die Deformationsenergie beim Zusammenprall zweier mit Polymeren beladener Partikel

Neben der Größe der Polymere (Kettenlänge) ist für die Kalkulation der sterischen Wechselwirkungsenergie die Packungsdichte in unterschiedlichen Lösungsmitteln, aber auch die Konformation der Polymerkette von entscheidender Bedeutung. Man unterscheidet in Abhängigkeit der Kopplungsdichte die „mushroom“ von der kammartigen Struktur, wie die nachfolgende Abbildung 5 verdeutlicht. Die Kopplungsdichte (Anzahl der gebundenen Moleküle) der Polymere  $\Gamma$  erlaubt die Abschätzung der Wirkungslänge  $L_0$  für hohe Kopplungsdichten über:

$$L_0 = n l \frac{5}{3} \Gamma^{-\frac{1}{3}} \quad (34)$$

mit  $n$  als Anzahl der Segmente des Polymers und  $l$  als Segmentlänge [3]. Die Segmente beschreiben dabei sogenannte Untereinheiten eines Moleküls, welche durch die Konformationsvariation gegeben sind.

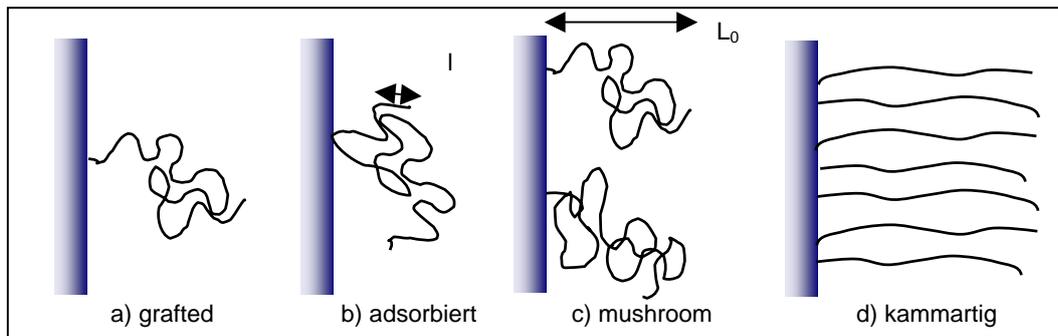


Abb.5: Sterische Wechselwirkung, zahlreiche mögliche Konfigurationen

Die physikalische Basis bilden zwei Effekte: (i) die mit der Volumeneinengung einhergehende Beschränkung möglicher Konfigurationen zwischen zwei Oberflächen (Sinken der Konfigurationsentropie der Ketten) sowie (ii) der Anstieg des osmotischen Drucks durch die steigende Konzentrationen der Polymersegmente zwischen den wechselwirkenden Phasen. Unter der Voraussetzung, dass die Ketten nicht miteinander konkurrieren, gilt nach Alexander de Gennes [49] für zwei parallele polymerbeladene Oberflächen in einem Abstand  $x$  mit  $x$  kleiner als die doppelte Wirkungslänge  $L_0$  die Kraft:

$$f(x) = kT \Gamma^{\frac{3}{2}} \left[ \left( \frac{2L_0}{x} \right)^{\frac{9}{4}} - \left( \frac{x}{2L_0} \right)^{\frac{3}{4}} \right] \quad (35).$$

Die Integration der Kraft für das Kugel-Platte-Modell, bei dem die Platte mit einem Polymer beschichtet ist, unter Anwendung der Derjaguin-Approximation führt zu einer Wechselwirkungsenergie derart:

$$G_{sterisch}(D) = \frac{16\pi}{35} RkTL_0 \Gamma^{3/2} \left[ 12 - 7 \left( \frac{D}{4L_0} \right)^{-5/4} - 5 \left( \frac{D}{4L_0} \right)^{7/4} \right] \quad (36)$$

Für die „mushroom“-Struktur bei einer geringeren Kopplungsdichte der Polymere gilt für den oben erläuterten Zusammenhang (Platte-Kugel, einseitig beschichtet) analog:

$$G_{sterisch}(D) = 2\pi RkT \Gamma \left( \frac{4\pi^2 l \sqrt{n}}{\sqrt{6} D^2} - \frac{\pi^2 l \sqrt{n}}{4L_0^2} + \ln \frac{D}{2} - \ln 2L_0 \right) \quad (37)$$

Neben den abstoßenden sterischen Wechselwirkungen wird in der Literatur eine sterische anziehende Kraft beschrieben – das Polymer-Bridging (Abbildung 10) [51, 52]. Hier kann eine Anziehung mit langer Reichweite erreicht werden, indem Polymerketten an beide Oberflächen binden. Dabei ist die Stärke des Polymer-Bridging ebenfalls vom Bedeckungsgrad der Oberfläche, der Dicke der Polymerschicht und der Löslichkeit des Mediums abhängig. Das Bridging ist nicht additiv zur sterischen Abstoßung.

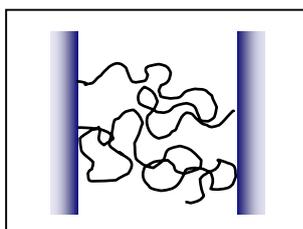


Abb.6: Polymer Bridging

Für die Beschreibung von sterischen Interaktionen wurden inzwischen mehrere Modelle entwickelt. Neben dem Gittermodell nach Scheutjens *et al.* [53], welches durch Ruckenstein *et al.* [54] erweitert wurde, beziehen Milner *et al.* [55] sich auf die Kontinuumsdiffusion, um die Segmentverteilung und die resultierenden Wechselwirkungen zu beschreiben. Aktuell fassen Huang *et al.* [52] in ihrer Theoriearbeit für zwei interagierende Oberflächen mit adsorbierten Polymeren folgende Energien zusammen:

- die Flory-Huggins-Energie für gekoppelte Polymerketten in Medium
- die Energie der Segmentbindung zweier Ketten
- die van der Waals-Energie zwischen Segment und Oberfläche
- die Adsorptionsenergie.
- die Doppelschichtenergie bei geladenen Oberflächen und Segmenten

Sind die Segmente und Oberflächen gleich geladen, wird das Bridging schwächer und die Abstoßung größer. Gleiches gilt bei flexibleren geladenen Polymerketten. Das anziehende Bridging dominiert allein bei geringen Kopplungsdichten und geringen Ladungen.

### **Spezifische Wechselwirkungen**

Zu den spezifischen Wechselwirkungen werden im Zusammenhang mit der Bioadhäsion nichtkovalente Bindungen zwischen Molekülen gezählt, z.B. Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen. Vitte *et al.* [56] führt die spezifischen Wechselwirkungen am Beispiel zwischen einem Biosystem und Material auf 2 alternative Definitionen zurück: (i) den Fokus auf die Funktion und (ii) den Fokus auf die Struktur. Während die erstgenannte Version der spezifischen Interaktion bei Wegfall eines Bindungspartners, z.B. dem Ligand, verloren geht, basiert die zweite auf topografische Parameter und Ladungen der interagierenden Makromoleküle. Um eine direkte Bindung herzustellen, müssen zudem die Brownschen Bewegungen überwunden werden. Die Bindungsstärken sind jedoch aufgrund der Spezifität der wechselwirkenden Komponenten vergleichsweise hoch. Dickinson *et al.* [57] erklärten anhand der theoretischen Modellierung von Energie-Distanz-Funktionen die lange Reichweite derartiger Wechselwirkungen bis zu mehreren hundert Nanometern. Nach Bell *et al.* [58] lässt sich die Grenzflächenenergie in Abhängigkeit von der diskreten Zahl spezifischer Bindungen wie folgt darstellen:

$$G_{\text{spezifisch}}(z) = G_{\text{nichtspezifisch}}(z) + nE_{\text{Bindung}}(z) + kT \ln \left( \frac{N!}{n!(N-n)!} \right) \quad (38)$$

mit  $E_{\text{Bind}}$  - Bindungsenergie einer Bindung  
 $N$  - Anzahl der Bindungsmoleküle  
 $n$  - Anzahl der Bindung.

#### **2.1.2.5 Zusammenfassung / Konzeptfindung**

In den vorangegangenen Abschnitten erfolgte die Beschreibung von verschiedenen, an der Grenzfläche zwischen Biosystem und Material wirkenden Wechselwirkungen. Diese Interaktionen stellen einen Beitrag der Gibbs'schen Energie dar und dienen der thermodynamischen Beschreibung der Bioadhäsion. Parallel dazu verdeutlichen sie die Komplexität des zu betrachtenden Systems.

Die Entwicklung der Gibbs'schen Fundamentalgleichung begründet die allgemein gültige Addition der unterschiedlichen Wechselwirkungsanteile. Die Darstellung der Kinetik des System findet sich in der Beschreibung der Gesamtenergie als Funktion des Abstandes der beteiligten Phasen in dem umgebenden Medium wieder und kann als Zusammenfassung der einzelnen Gleichgewichtszustände geltend gemacht werden. Während viele Autoren die Energien lediglich summarisch listen bzw. auf ursächlich wirkende Kräfte zurückführen [3, 17, 30, 32], definiert van Oss [18] die erweiterte DLVO-Theorie mit der Einteilung in 4 primäre Kräfte. Der Autor ordnete alle weiteren Wechselwirkungsenergien diesen als sekundäre Phänomene unter:

$$G^{TOT}(d) = G^{vdW}(d) + G^{el}(d) + G^{AB}(d) + G^{Brown}(d) \quad (39)$$

H.H.M. Rijnaarts [48] stellt in seinem Modell den DLVO-Wechselwirkungen allein die sterischen Interaktionen als zusätzliche, dominante Wechselwirkungsenergie der Bioadhäsion gegenüber. Der Beitrag zur Gibbs'schen Energie wird auf die nach außen stehenden Polymere zurück geführt.

Mit dem Ziel, neben den Wechselwirkungen der klassischen DLVO-Theorie, Hydratationseffekte, hydrophobe Wechselwirkungen sowie sterische Interaktionen modellseitig zu erfassen, erfolgt nun in Anlehnung an die beiden dargestellten Modelle die Einteilung der in der vorliegenden Arbeit zur Beschreibung der Bioadhäsion dienenden Wechselwirkungsenergien.

Unter diesem thematischen Bezug erfolgen zwei Abgrenzungen:

- (i) Ausgehend von der zu erwartenden Größenordnung der Wechselwirkungskräfte wird die Brownsche Molekularbewegung aufgrund ihres zu erwartenden, geringen Energiebeitrags vernachlässigt (ca. 1 kT [18] )
- (ii) Die Definition der Oberflächenfunktionalisierung für die in dieser Arbeit zu untersuchenden Antifoulingsschichten sowie das breite Spektrum der biologischen Testsysteme lässt die Integration einzelner, spezifischer Interaktionen nicht zu.

Es ergibt sich somit für das den nachfolgenden Ausführungen zugrunde liegende theoretische Konzept die folgende Einteilung der Wechselwirkungsenergien als Beitrag der Gibbs'schen Energie dargestellt in Abhängigkeit der Distanz der Oberflächen des Biosystems und des Materials in einem Medium.

$$G^{TOT}(d) = G^{vdW}(d) + G^{el}(d) + G^{AB}(d) + G^{sterisch}(d) \quad (40)$$

Abschließend werden die unterschiedlichen Wechselwirkungsenergien noch einmal aufgelistet und bezüglich ihrer Charakteristik und Reichweite bewertet.

Tab. 1: Zusammenfassung der DLVO- und NonDLVO-Wechselwirkungen

	<b>alternative Bezeichnung / Untergruppen</b>	<b>Charakteristik / Reichweite</b>
<b>van der Waals-Wechselwirkung</b>	- elektrodynamische Wechselwirkung - Dispersionswechselwirkung - Keesom-, Debye, London-Kräfte	- ubiquitär, anziehend - lange Reichweite, ca. 100 nm
<b>elektrostatische Wechselwirkung</b>	- Coulomb-Kräfte - ionische Kräfte	- abstoßend oder anziehend - lange Reichweite, bis zu 1 µm - abhängig vom Umgebungsmedium
<b>polare Wechselwirkung</b>	- Hydratationseffekte - Lösungswechselwirkung - Elektronendonator / Elektronenakzeptor - Säure-Base-Wechselwirkungen bzw. Protonen-donator / Protonen-akzeptor	- oszillierend oder monoton mit kurzer Reichweite von wenigen Nanometern - hydrophile Abstoßung mittlerer Reichweite - hydrophobe Anziehung langer Reichweite - stärkere Kräfte als van der Waals-Kräfte
<b>Sterische Wechselwirkung</b>	- Polymer Bridging - Doppelschicht-Wechselwirkung - osmotischer Druck - Kräfte entropischen Ursprungs	- stark abstoßend oder stark anziehend - die effektive Weite ist stark von Art und Anzahl der Moleküle und dem Medium abhängig - mittlere Reichweite
<b>Brownsche Bewegung</b>	- Diffusionswechselwirkung - Translationsbewegung	- abhängig von Größe und Form der Moleküle
<b>spezifische Wechselwirkung</b>	- Schlüssel-Schloss-Wechselwirkung	- nicht-kovalente Bindungen mit hoher Spezifität

## 2.2 Parametervariation

Das Kapitel 2.2 dient der Kalkulation der im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Wechselwirkungsenergien und der Variation ihrer Eingangsparameter, um so die Größenordnungen der verschiedenen Energien abzuschätzen. Zur Illustration lässt sich die Energie-Distanz-Funktion verwenden, wie sie bereits zur DLVO-Theorie angewendet wurde. Sie stellt sich als Summenfunktion der Energien dar und kombiniert den Einfluss der Kräfte mit kurzer Reichweite.

Ein wesentlicher Aspekt dieser Betrachtung ist der Bezug der Eingangsgrößen auf das zu betrachtende System Biosystem/Medium/Material. So kommt das Kugel-Platte-Modell zur Anwendung, um die Adhäsion eines Mikroorganismus an eine Materialoberfläche zu simulieren. Die Vereinfachung des Modells setzt sich in der Betrachtung der komplexen Zellwand eines Mikroorganismus als ideal glatte Oberfläche fort. Des weiteren wird von einem wässrigen Medium ausgegangen.

### Van der Waals-Wechselwirkungen

Es werden nachfolgend van der Waals-Wechselwirkungsenergien in Abhängigkeit von der Distanz vorgestellt. Die Abbildung 7 verdeutlicht zum Einen den Einfluss des Kugelradius als Modell der Mikroorganismen, berechnet mit einer durchschnittlichen Hamakerkonstanten von  $10^{-20}$  J. Zum Zweiten wird die Variation der van der Waals-Interaktion in Abhängigkeit verschiedener Hamakerkonstanten bei einem durchschnittlichen Radius von  $2 \mu\text{m}$  zusammengefasst.

Die Größenordnung der Hamakerkonstanten orientierte sich an Literaturangaben, während die Größenordnung der Kugelradien den natürlichen Vorkommen von Bakterien oder Zellen entspricht.

Die Variation des Kugelradius führt nur zu geringen Effekten, wobei mit größerem Radius die Anziehung zunimmt. Die abgebildeten Energie-Distanz-Kurven verdeutlichen den ausschlaggebenderen Einfluss der Hamakerkonstanten hinsichtlich der Stärke der van der Waals-Anziehung und dem Wirkungsabstand (Abb. 7b). Deren Variation wird nach Gleichung 15 maßgeblich durch die oberflächenenergetischen Parameter der Grenzfläche gesteuert.

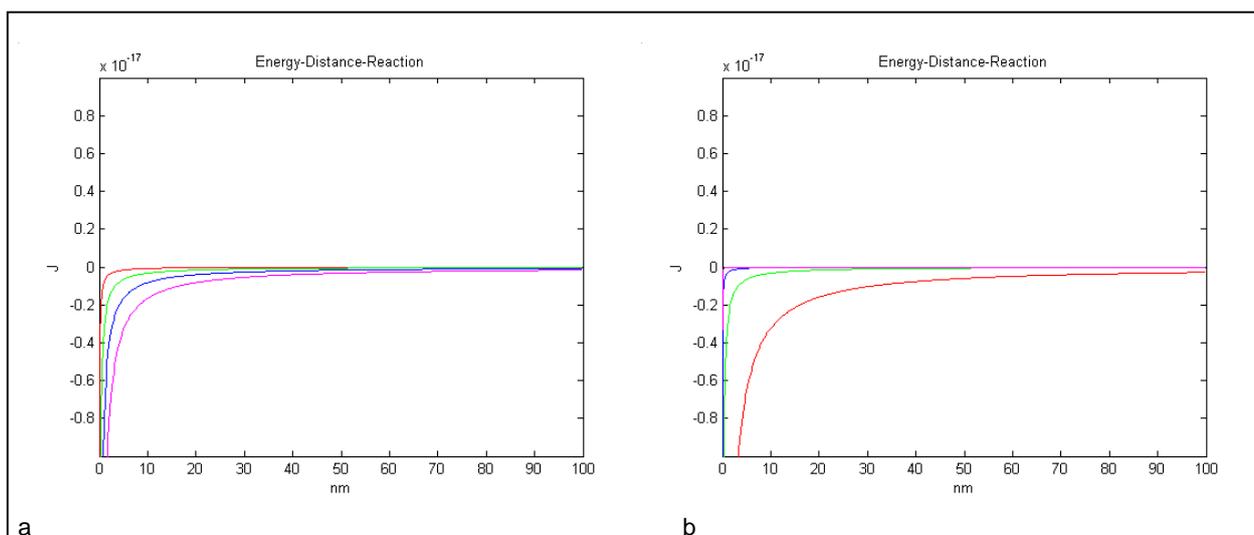


Abb. 7: Parametervariation, Van der Waals-Energie,

- a)  $A=10^{-20}$  J ,  $R = 0,5 \mu\text{m}$  (rot),  $2 \mu\text{m}$  (grün),  $5 \mu\text{m}$  (Blau),  $10 \mu\text{m}$  (magenta)
- b)  $R = 2 \mu\text{m}$ ,  $A = 10^{-19}$  J (rot),  $10^{-20}$  J (grün),  $10^{-21}$  J (Blau),  $10^{-22}$  J (magenta)

### Elektrostatische Wechselwirkung

Die elektrostatische Wechselwirkung lässt sich insbesondere durch die Ionenstärke des Mediums und die Potentiale der beiden Oberflächen beeinflussen. Die nachfolgende Abbildung stellt diese Variation dar, wobei die Oberfläche des Mikroorganismus ( $\varnothing$  2 $\mu$ m) konstant negativ geladen (-20 mV) ist und entsprechend dem Experiment allein das Oberflächenpotenzial der Platte variiert wird bzw. sich die Ionenstärke des Mediums ändert.

Die Abbildung 8 verdeutlicht den Wechsel der Wirkungsrichtung von abstoßend bei gleich geladenen Oberflächen bis zu anziehenden Wechselwirkungen bei entgegengesetzt geladenen Oberflächen. Durch die niedrige Ionenstärke von 0,001 M, welche eine Debylänge von ca. 10 nm nach sich zieht, reichen die Interaktionen bis zu Distanzen von 40 nm. Dass diese Wechselwirkungen deutlich mit dem Anstieg der Ionenkonzentration des Mediums sinken, demonstriert der zweite Teil der Abbildung. In Medien mit einer Ionenstärke, welche einer physiologischen Kochsalzlösung (0,154 mol/l) entsprechen, werden elektrostatische Wechselwirkungen nur im einstelligen Nanometerbereich der Distanz effektiv.

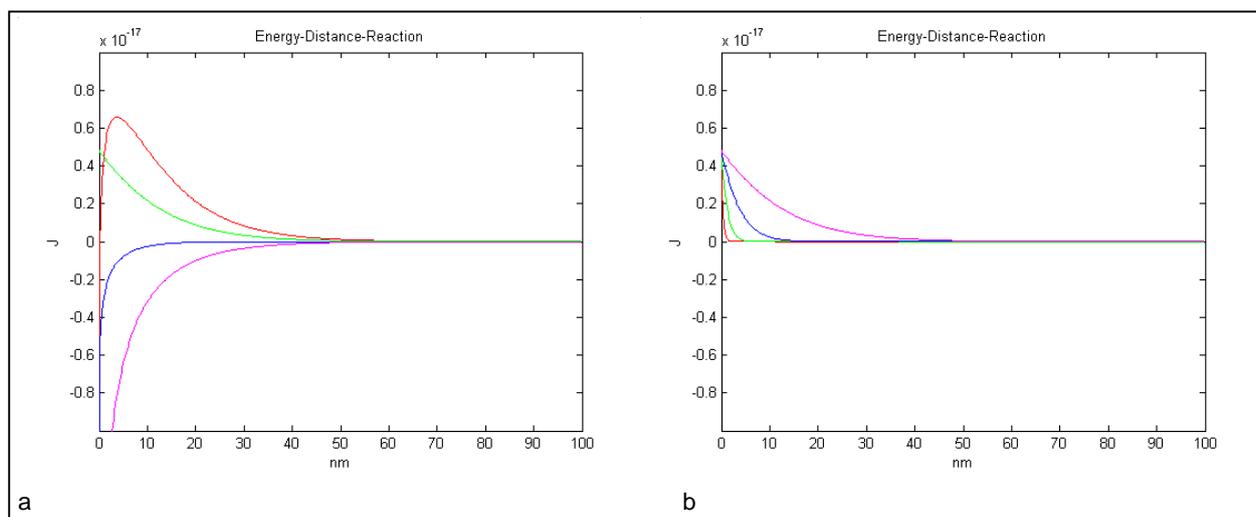


Abb. 8: Parametervariation, elektrostatische Energie,

- a)  $I = 0,001$  mol/l; ZP = -50 mV (rot), -20 mV (grün), 0 mV (blau), 20 mV (magenta)  
 b) ZP = 20 mV;  $I = 1$  mol/l (rot), 0,1 mol/l (grün), 0,01 mol/l (blau), 0,001 mol/l (magenta)

### Hydrophile Abstoßung / hydrophobe Anziehung / Säure-Base-Wechselwirkung

In der Abbildung 9 werden jeweils die zwei Grenzbereiche der Energieeinträge und Abklinglängen der hydrophilen als auch der hydrophoben Wechselwirkungen variiert (Gleichungen 27 und 28). Die Grenzwerte der Wechselwirkungsparameter und der Abklinglängen orientieren sich dabei an den Literaturangaben auf der Basis der theoretischen Simulation und experimentellen Kraftmikroskopie, z.B. für Glasoberflächen und Proteinschichten [17, 35, 39].

Die einzelne Betrachtung der beiden NonDLVO-Wechselwirkungen – hydrophile Abstoßung und hydrophobe Anziehung - zeigt in Abbildung 9 vergleichbare Wirkungsgrößen in jeweils abstoßender bzw. anziehender Richtung. Es wird insgesamt der entscheidende Einfluss dieser Energie deutlich. Es wirken partiell Wechselwirkungskräfte mit einer Größenordnung größer ( $10^{-18}$  J  $\rightarrow$   $10^{-17}$  J) im Vergleich zu den beiden im DLVO-Konzept eingehenden Energien. Zu einem vergleichbaren Ergebnis führt das Konzept nach van Oss unter Anwendung der Gleichung (29). Werden jedoch für die Wechselwirkungsenergie  $\Delta G_{AB}(0)$  z.B. auf der Basis von Kontaktwinkeldaten höhere Werte ermittelt (siehe Roosjen *et al.*), steigt die Gesamtwechselwirkungsenergie in Abhängigkeit von der Distanz in entsprechender Weise um eine weitere Größenordnung ( $10^{-16}$  J). Die Verlaufsform der Energie-Distanz-Funktion bleibt erhalten.

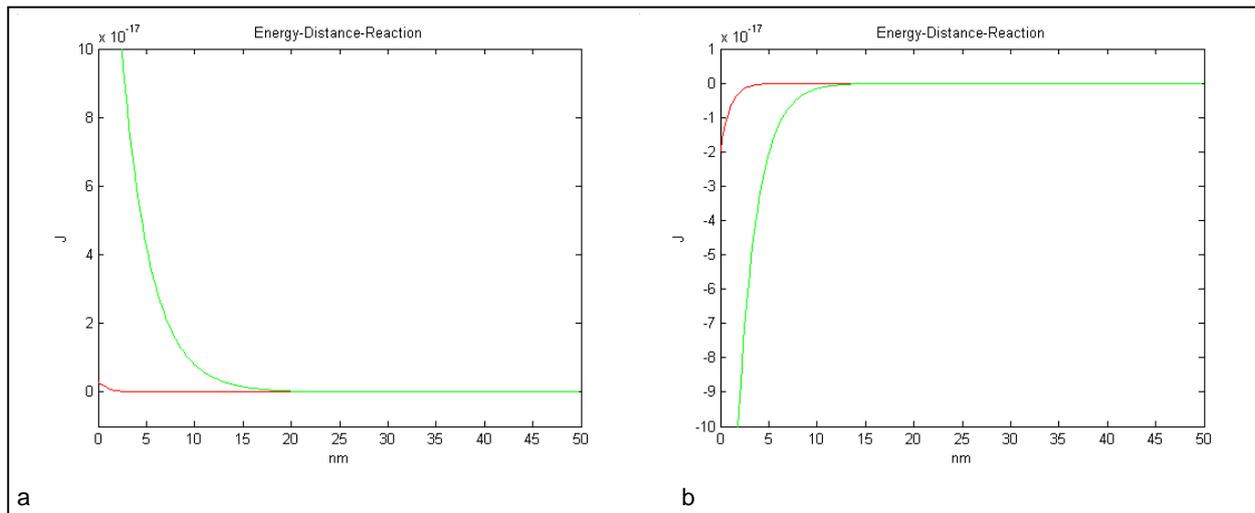


Abb. 9: Parametervariation hydrophile Abstoßung (links) und hydrophobe Anziehung (rechts)

- a)  $E_0 = 3 \text{ mJ/m}^2$ ,  $\lambda_0 = 1 \text{ nm}$  (rot);  $E_0 = 30 \text{ mJ/m}^2$ ,  $\lambda_0 = 3 \text{ nm}$  (grün);  
 b)  $\gamma = 10 \text{ mJ/m}$ ,  $\lambda_0 = 1 \text{ nm}$  (rot);  $\gamma = 50 \text{ mJ/m}$ ,  $\lambda_0 = 2 \text{ nm}$  (grün);

### Sterische Wechselwirkung

Zu einer analogen starken Wechselwirkungsenergie führt die Abschätzung der sterischen Interaktionen. In Abbildung 10 wird beispielhaft ein Vergleich dargestellt zwischen dem van der Waals-, dem elektrostatischen, dem hydrophilen und dem sterischen Energiebeitrag. Beispielhaft wurde in die Kalkulation die Kopplungsdichte von  $10^{18} \text{ /m}^2$  einer Polyethylenglykol (PEG) - Kohlenwasserstoffkette mit einer effektiven Schichtdicke von 22 nm nach Butt *et al.* eingesetzt [3]. Die erneute Steigerung der resultierenden abstoßenden Energie gegenüber den Energiebeiträgen des DLVO-Konzeptes wird ebenso sichtbar wie die weiter reichende Wirkungslänge der sterischen Abstoßung.

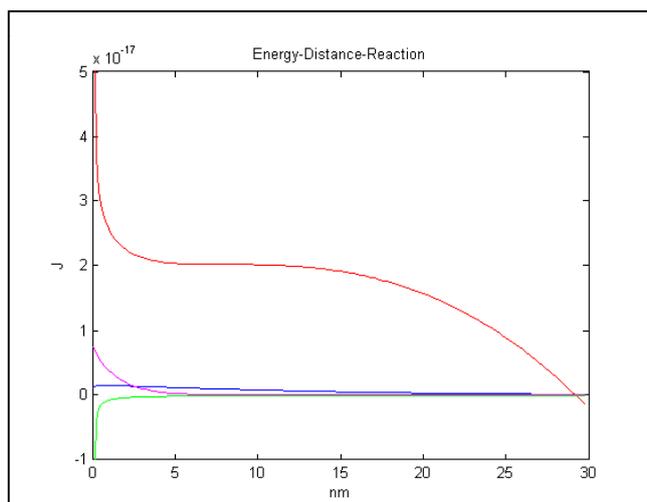


Abb. 10: Vergleich der Wechselwirkungsenergien, van der Waals (grün), elektrostatisch (blau), hydrophil (magenta), sterisch (rot)

## 2.3 Bioadhäsion

Der Biofilm ist ubiquitär und die bevorzugte Lebensform von Mikroorganismen. Seine Entstehung ist ein komplexer, heterogener Prozess, der von den Mikroorganismen selbst, der Materialoberfläche und dem umgebenden Medium, sowie der Temperatur und den hydrodynamischen Bedingungen beeinflusst wird [59]. Es ergibt sich prinzipiell folgende Phaseneinteilung [60]:

### **Induktionsphase**

Im Kontakt mit dem Medium wird das Substrat mit einem Basisfilm bedeckt. Dieser besteht aus adsorptiv an das Substrat gebundenen organischen Stoffen und wirkt an der Grenzfläche konditionierend. Der heterogene „Conditioning Film“ kann in Abhängigkeit von den adsorbierten Molekülen für Primärbesiedler adhäsionsfördernd oder -hemmend wirken. In durchströmten Medien gelangen die Mikroorganismen über Konvektion bis zur laminaren Grenzschicht. Bei Erreichen der Grenzfläche zum Substrat folgt eine reversible Anheftung und die Zusammenlagerung von Zellen, begleitet von der Induzierung genetischer Prozesse und der Bildung extrazellulärer polymerer Substanzen.

### **Akkumulationsphase**

Für die Akkumulation des Biofilms sind 2 Faktoren entscheidend: zum einen das Mikroorganismenwachstum selbst und zum anderen die Adsorption neu hinzukommender Mikroorganismen. In dieser Phase bilden die Primärbesiedler extrazelluläre polymere Substanzen (EPS), nachdem sie die Induktionsphase überdauert haben. Irreversibel haftende Mikroorganismen können sich vermehren, Mikrokolonien bilden und einen mehrlagigen Biofilm aufbauen. Diese Biofilme bestehen aus Primär- und Sekundärbesiedlern.

### **Plateauphase**

Unter wenig veränderlichen Umgebungseinflüssen bildet sich ein Gleichgewicht zwischen Aufwachsen des Biofilms und seinem Abtrag, der Biofilm geht in die Plateauphase über. Die Dicke kann je nach Umgebungsbedingungen (Scherkräfte) wenige Mikrometer bis mehrere Zentimeter betragen. Die heterogene Struktur des gewachsenen Biofilms basiert auf der Zusammensetzung aus zwei Komponenten - der eigentlichen Mikroorganismen und der organischen polymeren Matrix, der EPS.

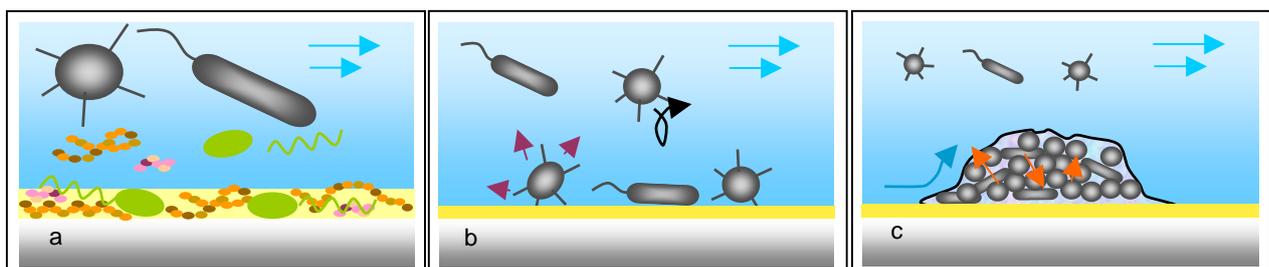


Abb. 11: Biofilmentstehung

a) Induktionsphase, b) Akkumulationsphase, c) Plateauphase

Die morphologische Grundeinheit bilden Mikrokolonien, die meistens aus unterschiedlichen Spezies zusammengesetzt sind und tunnel- oder pilzartige Gebilde bilden. An der dem Medium zugewandten Seite bewirkt die EPS fließende Übergänge benachbarter Mikrokolonien [61]. In den zwischen den Einzelkolonien gebildeten Kanälen finden Transportvorgänge mit einem kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom statt, die dem Nährstofftransport dienen.

Basierend auf Beobachtungen an Biofilmen von *Pseudomonaten* entwickelte Costerton [61] ein allgemein gültiges Biofilmmodell, welches unabhängig von der Art der biofilmbildenden Bakterien und dem Medium Gültigkeit besitzt (Abb. 12).

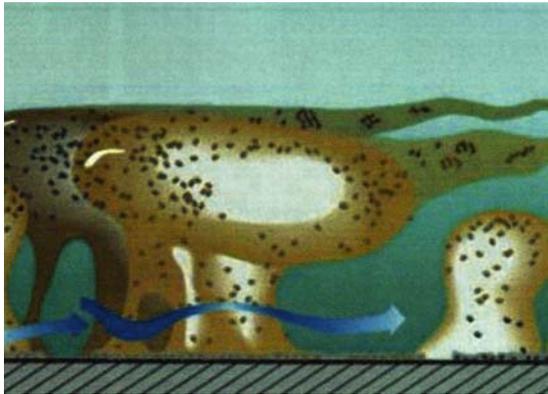


Abb. 12: Biofilmstruktur nach Costerton [61]

Eine Schlüsselstellung bei der Biofilmbildung nehmen extrapolymere Substanzen ein, die allen mikrobiellen Aggregaten gemeinsam sind. Zu diesen Substanzen zählen Biopolymere mikrobieller Herkunft, hauptsächlich Polysaccharide, Proteine, Lipide und Nucleinsäuren [62]. Die EPS stellt eine hydratisierte, gelförmige Schleimmatrix dar mit einem stark variierenden Wassergehalt zwischen 50 – 90% [63]. Die biologischen Funktionen der EPS sind nach [64]:

- 
- **Adhäsion an Oberflächen**  
*Bildung von Primärbiofilmen und Mikrokolonien*
  - **Aggregation von Zellen, Flockenbildung, Biofilmbildung**  
*Immobilisierung von Zellen*
  - **Strukturelement von Biofilmen**  
*z.B. Vermittlung der mechanischen Stabilität, Stofftransport durch Kanäle*
  - **Schutzbarriere**  
*z.B. Erhöhung der Toleranz gegenüber Bioziden, Schadstoffen*
  - **Rückhaltung von Wasser**  
*Verhinderung des Austrocknens*
  - **Sorption organischer und anorganischer Stoffe, Ionen und Partikel**  
*Nährstoffakkumulation*
- 

Die Etablierung komplexer Biofilme und die Anpassung an ständig wechselnde Umgebungsbedingungen erfordert eine interzelluläre Kommunikation. Dieses als „Quorum sensing“ bezeichnete Phänomen des Informationsaustausches beruht dabei vor allem auf der kontinuierlichen Abgabe von Signalmolekülen durch Mikroorganismen in niedriger Konzentration [65].

Im Hinblick auf Antifoulingprinzipien sollen nachfolgend einige biofilmeigene Mechanismen gegenüber antibakteriellen Substanzen aufgezeigt werden. Drei Prinzipien sind für die erhöhte Resistenz gegen Antibiotika möglich [66]. So kann die Verhinderung des Durchdringens eines antibiotischen Wirkstoffes beispielsweise allein durch die Dicke des Biofilms und die damit verbundene unvollständige Diffusion erreicht werden. Zudem werden elektrisch geladene Antibiotikamoleküle durch das gezielte Dominieren entgegengesetzter Ladungen in oberflächennahen Schichten des Biofilms abgewiesen. Unter dem Begriff der funktionellen Kompartimentierung wird die Entstehung von Räumen unterschiedlicher chemischer und physikalischer Lebensbedingungen im Biofilm zusammengefasst. Die Folge ist eine unterschiedliche metabolische Aktivität, welche die Wirksamkeit des eingesetzten Wirkstoffes beeinträchtigen. Der dritte zu beschreibende biofilmeigene Mechanismus ist die Existenz sporenlähnlicher Lebensformen für einen Teil der im Biofilm vorhandenen Bakterien.

Unter dem Begriff Bioadhäsion werden adhäsive Phänomene in Verbindung mit biologischen Systemen definiert, welche in wässrigen Medien an Grenzflächen zu festen Oberflächen stattfinden. Allgemein wird die Bioadhäsion der initialen Phase der Biofilmstehung zugeordnet. Die Bioadhäsion spielt in der Spätphase, dem Biofilmwachstum eine vernachlässigbare Rolle. Prinzipiell lassen sich bei der Bioadhäsion spezifische von nichtspezifischen Prozessen unterscheiden [31].

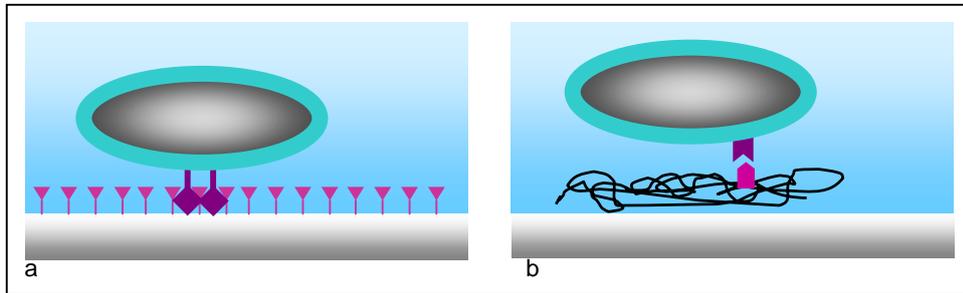


Abb. 13: spezifische Adhäsion

a) Anheftung durch Flagellen, b) Anheftung durch spezifische Rezeptoren

Die Adhäsion ist ein diffusionsgesteuerter Prozess, bei dem die zur Verfügung stehende Zeit entscheidend ist. Sowohl Busscher *et al.* [67] als auch Martienssen [60] gehen von dem Umstand aus, dass die bakterielle Adhäsion eine Annäherung der Bakterien an eine Oberfläche voraussetzt. In dem in der Abbildung 14 dargestellten Modell treten die zuvor beschriebenen Interaktionsenergien auf. Es wird veranschaulicht, dass sich in jeder Distanz zwischen dem Mikroorganismus und der Oberfläche ein eigener thermodynamischer Zustand infolge der vorherrschenden Wechselwirkungen einstellt. Erst in einem Abstand von wenigen Nanometern greift die spezifische Bindung zwischen den beiden Oberflächen.

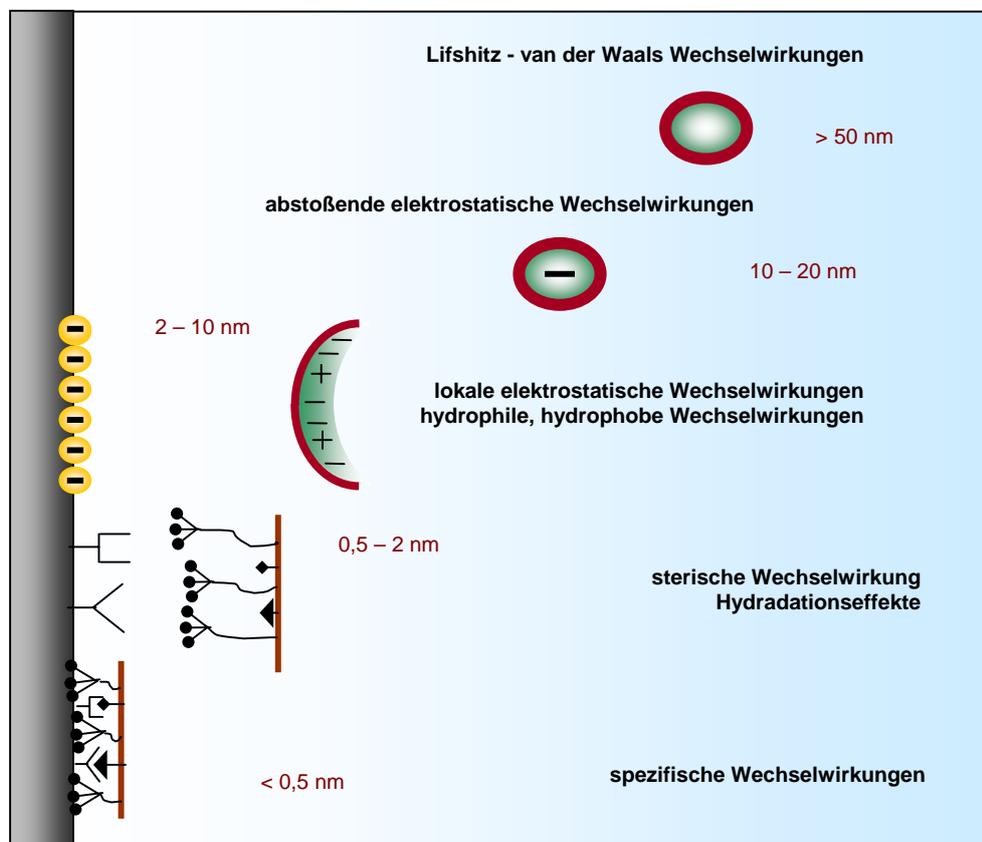


Abb. 14: Nichtspezifische Adhäsion – Modell nach Busscher *et al.* [67]

Als Biofouling bezeichnet man nun „den ungewollten Befall von Oberflächen durch Mikroorganismen und Pflanzengruppen. Dadurch kommt es zu wirtschaftlichen Schäden, die in Deutschland jedes Jahr in Milliardenhöhe liegen.“ [Prof. H. C. Flemming, Internationaler Antifouling-Kongress 2004]. Dies soll an einigen aktuellen Beispielen verdeutlicht werden.

Innerhalb weniger Monate kann beispielsweise ein Bootskörper vollständig mit Organismen bewachsen und dessen Wasserwiderstand um bis zu 15% erhöht werden. Die Zunahme des Kraftstoffverbrauchs kann bis zu 40 % betragen, bzw. das Biofouling so die Gesamtkosten einer Überfahrt um 77% steigern [68]. In einer aktuellen britischen Studie wurde die europäische Fischzucht beleuchtet [69]. Die Kosten durch das Biofouling z.B. für den Ersatz von Netzen liegen in einer durchschnittlichen Lachsfarm bei ca. 120.000 EUR pro Jahr. Werden Austern verkauft, betragen die Kosten für die Reinigung 20 – 40% ihres Marktwertes. Effektiveres Antifouling besitzt daher in der Fischzucht einen geschätzten Marktwert von 5 bis 10%, d.h. in Europa ca. 130 – 260 Mio. EUR. Das Biofouling in Leitungssystemen führt zu enormen hygienischen, gesundheitsschädlichen und ökologischen Schäden. Die Weltgesundheitsorganisation bezifferte deshalb 2002 die Todesrate infolge unsauberer Wasserversorgung, ungenügender Keimbekämpfung und unzureichender Hygiene auf 1,7 Mio. Tote pro Jahr [70]. Der kontinuierliche Einsatz optischer und elektrochemischer Messsysteme über längere Zeiträume in natürlichen Gewässern und Abwässern ist wegen ungenügender Resistenz der Oberflächen gegenüber Ablagerungen und mikrobiellem Bewuchs nur mit erheblichem Wartungsaufwand möglich. Eine Untersuchung an Kläranlagen zeigt, dass bei 80% aller Anwendungen eine monatliche Wartung und Reinigung dieser Messtechnik erforderlich ist und die Forderung nach einer Verlängerung der Wartungszyklen eindeutig gegenüber einer höheren Genauigkeit dominiert [71]. Insbesondere beim Einsatz optischer Sensorik limitiert die Übersichtung der aktiven Flächen mit Mikroorganismen und Zellen die Funktionalität [72]. Der biologische Bewuchs und die Ablagerung von Verunreinigungen auf der Sensoroberfläche reduzieren die Möglichkeiten zur Miniaturisierung. Dies beeinträchtigt den Einsatz mikroelektronischer Bauteile für Steuer- und Regelungseinheiten [73], aber auch die Entwicklung von Mikrosensoren für das Umweltmonitoring [74].

Auf medizinischem Gebiet stellen Infektionen ein spezielles kostenintensives Biofoulingproblem dar, beispielsweise bei der kontinuierlichen ambulanten Peritonealdialyse (CAPD). Dieses alternative Nierenersatzverfahren bietet durch die ambulante Betreuung dem Patienten viele Vorteile, führt jedoch zu einer typischen Komplikation, der Peritonitis, welche auf einer infektiösen Biofilmbildung am Katheter beruht und die zumeist den Austausch des Dialysekatheters zur Folge hat [75]. Die Zahl der Dialysepatienten stieg stetig auf ca. 1,2 Mio. Patienten im Jahr 2002, von denen ca. 115.000 eine Peritonealdialyse als Therapieform wählten. Dies verdeutlicht das große Interesse an wirksamen und langzeitstabilen Antifoulingkonzepten beispielsweise allein für Dialysekatheter [76].

Eine zunehmende Gefahr geht vom multiresistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) aus. Dieser Keim löst bei Patienten gefährliche Infektionen aus und belastet so die Etats der Krankenhäuser erheblich. Nach Schätzungen der Deutschen Gesellschaft für Krankenhaushygiene (DGKH) bewegt sich die Zahl nosokomialer Infektionen auf hohem Niveau: Zwischen 350.000 und einer Million Infektionen werden jedes Jahr neu registriert. Deren Kosten werden auf bis zu 1,5 Milliarden Euro beziffert. Die enorme Belastung für den Gesundheitssektor durch Infektionen im Krankenhaus bestätigt auch der Blick ins Ausland: Nach einer Studie des amerikanischen Center of Disease Control geht jeder vierte Todesfall in einem Krankenhaus in den USA auf eine nosokomiale Infektion zurück.

Bereits seit geraumer Zeit beschäftigt sich die Wissenschaft nun mit der Bekämpfung unerwünschter Biofilme – dem Antifouling. Im September 2004 trafen sich die weltweit führenden Experten zum Internationalen Antifoulingkongress in Mülheim (IWW). Fortsetzung fand dieses Thema unter Anderem im September 2006 in Leipzig unter dem Schwerpunktthema: Biofilme strategisch behandeln.

Es entstanden weltweit in den vergangenen Jahrzehnten unterschiedlichste Antifoulingkonzepte und Lösungsansätze, welche das nachfolgende Kapitel in einer Übersicht zusammenfasst und vergleicht.

## 2.4 Antifoulingkonzepte

Die Einteilung der Biofilmbildung in die initiale Phase und die Phase des Biofilmwachstums ist von Bedeutung, da sich die Entwicklung des Antifouling ebenfalls an den Prozessen orientiert. So zielen verschiedene Studien allein auf die Unterdrückung der Proteinadsorption bzw. die Verhinderung der Ausbildung eines conditioning films in der ersten Phase nach dem Kontakt einer Materialoberfläche mit dem Biosystem. Andere Arbeiten legen ihren Schwerpunkt auf die Bekämpfung der Ausbildung einer komplexen Biofilmstruktur, z.B. auf die Unterdrückung der Adhäsion von Mikroorganismen oder die Störung der Schleimbildung. Grundsätzlich lassen sich Antifoulingkonzepte trotz der unterschiedlichen Applikationen vergleichen und auf analoge Wechselwirkungsprinzipien und wissenschaftliche Modelle zurückführen, so dass sich folgende Einteilung ergibt:

1. Modifizierung physikochemischer und topografischer Parameter der beteiligten Phasen mit dem Ziel, die Wechselwirkungsenergie des Systems zu beeinflussen,
2. Gestaltung biomimetischer Oberflächen, um natürliche Antifoulingmechanismen zu reproduzieren bzw. zu imitieren,
3. Integration toxischer Agenzien in die oberflächennahen Bereiche mit abgegrenzten Freisetzungskinetiken,
4. Kopplung spezifischer Funktionsmoleküle auf der Basis kleiner Kopfgruppen bis zu natürlichen und synthetischen Peptiden.

### Modifizierung physikochemischer Materialparameter

Nach wie vor stellt die gezielte Modifizierung physikochemischer Materialparameter das aus heutiger Sicht vielversprechendste Antifoulingkonzept dar. Aus den vorangegangenen Kapiteln wird die Wirkung spezifischer und unspezifischer Adhäsionsmechanismen auf der Basis thermodynamischer Systemgrößen insbesondere für die erste Phase der Biofilmbildung deutlich. Zusätzlich beeinflussen topografische Oberflächenzustände zusätzlich die Bioadhäsion und Proteinadsorption.

Bereits 1971 fassten Glantz *et al.* [77] diesen Einfluss am Beispiel der Plaquebildung zusammen. An unterschiedlichen Zahn- und Zahnersatzmaterialien wurden Rautiefen ermittelt und Benetzungsuntersuchungen mit Flüssigkeiten zur Bestimmung der Oberflächenspannung nach Zisman durchgeführt. Glantz *et al.* zeigten nur einen geringen Topografieeffekt auf die Plaquebildung. Demgegenüber publizierten die Autoren eine signifikante Korrelation der energetischen Oberflächenparameter des Materials mit der *in vitro*-Plaquebildung, wie sie die Abbildung 15 darstellt. Ein Bereich stark erhöhter Bioadhäsion für hydrophile Materialien (Oberflächenspannung > 50 mN/m) wurde definiert.

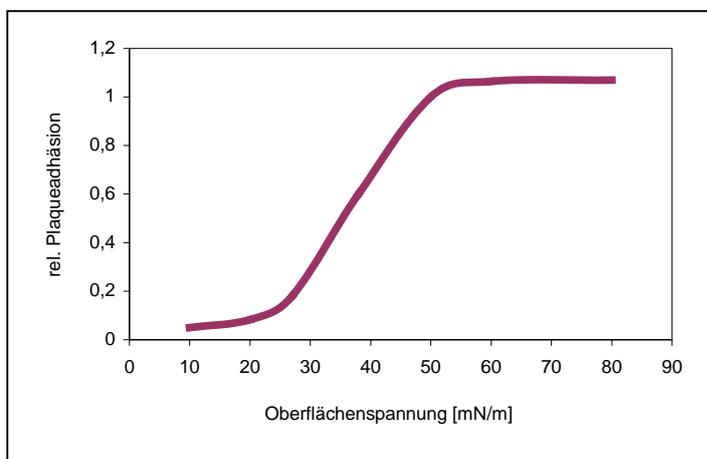


Abb. 15: Korrelation der Plaquebildung und Oberflächenspannung nach Glantz *et al.*

23 Jahre später befassten sich M. Quirynen und C.M.L. Bollen [78] in einem Review erneut mit dieser Themenstellung – dem Einfluss der Oberflächenenergie auf die Plaquebildung. Zusammenfassend kamen sie erneut zu der Aussage, dass hochenergetische hydrophile Oberflächen Plaque sammeln, stärker binden und spezifische Bakterien begünstigen. Zu Beginn stand demzufolge die Korrelation der Hydrophobie von Materialoberflächen mit der sich einstellenden Biofilmbildung im Mittelpunkt. Auf Oberflächen mit hydrophilen Eigenschaften beobachteten Autoren oft eine Zunahme der zellulären Adhäsion. Diese Beobachtungen stützen Busscher *et al.* [79] mit der Darlegung, dass die Grenzflächenspannung zwischen Substrat und Medium ein elementarer Faktor für die Zellanhaftung ist. Steinberg *et al.* [80] stellten mit zunehmender Hydrophilie eine Abnahme der Adsorption von Proteinen fest. Ferreios *et al.* [81] fassten die mikrobielle Adhäsion von 29 *S. epidermidis* Stämmen auf Polymeren mit unterschiedlicher Hydrophilie zusammen und wiesen eine Zunahme der Bioadhäsion mit steigender Hydrophilie nach, wobei ein Optimum der Adhäsion im Bereich vergleichbarer hydrophiler Eigenschaften des Bakteriums und des Materials liegt. Grunz *et al.* [82] erhielten durch die Anwendung von Niederdruckplasma eine signifikante Hydrophilierung von biomedizinischen Polymeren. Parallel dazu stellten sie eine deutliche Zunahme der immobilisierten Biomasse auf dieser Oberfläche fest. Die Immobilisierung des *S. epidermidis* untersuchten Hogt *et al.* [83] an einem Fluorpolymer und einem Celluloseacetat.

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Ergebnissen demonstrierten sie eine stärkere Biofilmbildung auf der hydrophoberen Polymeroberfläche. Diese Ergebnisse bestätigte L. Pedri bei der Adhäsion von *P. aeruginosa*. [84] Die Entwicklung superhydrophober Oberflächen auf der Basis von Fluorpolymeren zielte sowohl auf die Reduzierung der bakteriellen Adhäsion als auch der Plättchenadhäsion als Vorstufe der Thrombose in medizinischen Anwendungen. Toes *et al.* [85] konnten in einer Studie an superhydrophoben PTFE jedoch kein Antifoulingverhalten nachweisen. Chaudhury *et al.* [86] wiesen 2006 zusätzlich den Effekt eines Gradienten der Hydrophobie nach, in dem sie eine zunehmend dichtere Algenadhäsion an gradierten Übergängen von hydrophob zu hydrophil ermittelten.

Mit der Weiterentwicklung der Kontaktwinkelanalyse erfolgte in den letzten Jahren die Definition der Kontaktwinkelhysterese als einen zusätzlichen Parameter der physikochemischen Charakterisierung. Schmidt *et al.* [87] demonstrierten so ein verbessertes Antifouling mit kleinerer Hysterese auf modifizierten Copolymeren.

Die explizite Bezugnahme auf energetische Materialparameter wie Oberflächenspannung und Polarität ist Bestandteil zahlreicher Studien zur Korrelation dessen mit der Bioadhäsion [88-92]. A. Roosjen stellte in ihrer Thesis erneut niedrigenergetische Oberflächen als effektives Antifoulingkonzept dar, wobei diese Modifikationen zusätzlich das Ablösen der Mikroorganismen fördern [91]. Einen zum Teil gegensätzlichen Trend wiesen aktuell Brizzolara *et al.* an silaniserten Oberflächen nach [93]. Des Weiteren publizierten Boulange-Petermann *et al.* 1993 und 2004 [94, 95] Ergebnisse aus Untersuchungen zum Biofouling an Edelstählen und nahmen dabei direkten Bezug auf die energetischen Eigenschaften bzw. explizit auf die Polarität der Stahloberflächen. Die Autoren ermittelten die polaren Anteile der Oberflächenspannung aus Kontaktwinkelmessungen und ordneten ihnen alle ionischen, Säure-Base- und die durch Wasserstoffbrückenbindung induzierten Wechselwirkungen zu. Die biologische Prüfung erfolgte zum einen über die Auszählung adhärierter *St. thermophilus* [96] oder anhand der Sporenbildung und Keimung des *B. cereus* [95]. Im Ergebnis stellten die Autoren die Möglichkeit dar, über die Erhöhung der Polarität der Stahloberfläche die bakterielle Adhäsion einzudämmen bzw. die Oberflächen leichter von Sporen freizuhalten. 2006 beschrieben Allion *et al.* einen Anstieg toter Mikroorganismen an metallischen Oberflächen mit höherer Polarität [92].

Die Betrachtung der energetischen Parametervariation auf die Entwicklung neuer Antifoulingkonzepte wurde sehr bald durch die Bewertung der Ladung bzw. der elektrostatischen Eigenschaft der beteiligten Oberflächen ergänzt [58, 91, 97]. Schon 1987 veröffentlichten Mozes *et al.* [98] Ergebnisse einer Untersuchung zum Wechselspiel elektrostatischer und nichtelektrostatischer Interaktionen. Am Beispiel der *Saccharomyces*, *Moniliella* und *Acetobacter* demonstrierten die Autoren, dass die Adhäsion insbesondere hydrophiler Stämme elektrostatisch kontrolliert ist.

Am Beispiel von fünf dentalen Bakterien untersuchten Weerkamp *et al.* [99] den Effekt der elektrostatischen Abstoßung auf die Plaquebildung. Den Einfluss demonstrierten die Autoren anhand der Induzierung der Plaquebildung bei geringeren Oberflächenladungen, was auf eine Reduzierung elektrischer Wechselwirkungen zurückgeführt werden kann. B. Gottenbos [100, 101] führte Studien an positiv geladenen Materialien als antimikrobielles Modell durch. So modifizierte er Polymethylmethacrylat und Silikon mit quarternärem Ammonium, um eine positive Oberflächenladung zu erreichen. Anhand von *in vitro*- und *in vivo*-Tests demonstrierte er den Effekt unterschiedlich geladener Polymere auf die Adhäsion von *E. coli* und *P. aeruginosa*. Trotz Differenzen zwischen dem Verhalten im Labor und im lebenden Organismus zeigten die Ergebnisse einen signifikanten antimikrobiellen Effekt aufgrund der positiven Oberflächenladung sowohl auf die Anzahl der adhärenierten Bakterien als auch auf deren Vitalität. Jucker *et al.* [102] betrachteten einen positiv und einen negativ geladenen Mikroorganismus in Medien unterschiedlicher Ionenstärke in Kontakt zu Oberflächen. Sie verwiesen auf die Zunahme der Adhäsion bei gegensätzlich geladenen, sich anziehenden Oberflächen, aber auch auf den Anstieg des Effekts durch die elektrische Doppelschicht in Medien mit geringeren Ionenstärken. Die mögliche Steuerung der Proteinadsorption durch eine gezielt eingestellte Oberflächenladung erscheint ebenfalls möglich nach Studien von Brandes *et al.* [103] oder Hu *et al.* [104]. Während die letztgenannten Autoren explizit auf die Ladung der Oberfläche eingehen und verdeutlichen, dass eine höhere Proteinadsorption auf positiv geladenen Oberflächen zu erwarten ist, stellen Brandes *et al.* die Lage des Isoelektischen Punktes (IEP) der Mikroorganismen im Vergleich zu dem des Materials in den Vordergrund ihrer Interpretation. Sie weisen insbesondere für Albumin und Fibrinogen eine reduzierte Adsorption außerhalb des pH-Bereiches des IEP auf. Den Effekt der Ionenstärken des Mediums auf die Mobilität der Mikroorganismen und damit auf die Bioadhäsion diskutierten Vigeant *et al.* [105].

Die Korrelation der Biofilmbildung mit physikochemischen Parametern und die Suche nach einer allgemein gültigen Kalkulation als Basis für die Entwicklung eines Antifouling führte bereits früh zur Anwendung thermodynamischer kolloidchemischer Modellansätze basierend auf der DLVO-Theorie neben den bisher diskutierten Grenzflächenenergiekonzepten. In zahlreichen oben aufgeführten Konzepten tauchen offensichtliche Diskrepanzen z.B. für einzelne Bakterien, für spezifische Medien oder auch für bestimmte Materialoberflächen auf. Diese lassen sich allein auf zusätzlich auftretende Wechselwirkungskräfte zurückführen, so dass sich in der aktuellen Literatur neben den konventionellen DLVO-Modellen sogenannte erweiterte (extended) DLVO-Theorien finden lassen .

Die Arbeitsgruppe um H.J. Busscher [67, 79] war ein wesentlicher Wegbereiter für die Applikation des DLVO-Modells in der Antifoulingentwicklung. Sie bestätigten, dass nichtspezifische und spezifische Wechselwirkungsmechanismen auf der Wirkung gleichartiger physikalischer Kräfte beruhen: der elektrostatischen Interaktion, der van der Waals-Wechselwirkung und der Wasserstoffbrückenbindung. Auch Jucker *et al.* [102] korrelieren die Ergebnisse zur bakteriellen Adhäsion mit dem Verlauf theoretisch abgeleiteter DLVO-Kurven. Die Autoren zeigen, dass die Effizienz der bakteriellen Adhäsion in Abhängigkeit von verschiedenen Ionenstärken mit den kalkulierten Wechselwirkungsenergien langer Reichweite korrelierbar ist. Basierend auf der erweiterten DLVO-Theorie nach van Oss [106] – eine zweite wegbereitende Arbeit - publizierten mehrere Autoren Gegenüberstellungen zwischen theoretischen Modellierungen und experimentell nachgewiesenem Antifouling. Azeredo *et al.* [107] untersuchten die Adhäsion auf einer unbeschichteten und mit EPS beschichteten Glasoberfläche. Parallel dazu simulierten sie sowohl nach dem konventionellen als auch dem erweiterten DLVO-Ansatz die Energie-Abstand-Funktionen. Im Ergebnis zeigt sich die Gültigkeit des eigentlichen DLVO-Modells in einfachen Medien. Spielen zusätzlich hydrophobe Wechselwirkungen oder sterische Brücken eine Rolle, müssen neuartige Modelle gebildet werden, um das Verhalten der Mikroorganismen in Kontakt mit Materialoberflächen zuverlässig zu prognostizieren. Die erweiterte DLVO-Theorie nach van Oss wendeten Triandafillu *et al.* [108] bei der Entwicklung einer Antifoulingoberfläche für die Intubation an. Die Adhäsion von insgesamt 18 Isolaten des *Ps. aeruginosa* auf plasmamodifiziertem PVC wurde in einigen Fällen erfolgreich mit dem Verlauf der DLVO-Funktionen für ein 0,1 M Medium korreliert. Einige Ausnahmen führten die Autoren auf das Vorhandensein von Flagellen an den Bakterienoberflächen zurück.

*Die Zusammenfassung dieser Antifoulingkonzepte, basierend auf der Modifizierung physikochemischer Oberflächenparameter, zeigt einen denkbaren Zugang auf das Grenzflächengeschehen zum Biosystem und die Möglichkeit der Interpretation dort stattfindender Wechselwirkungen über thermodynamische Modellvorstellungen. Gegenwärtige Entwicklungen befassen sich zum einen schwerpunktmäßig mit notwendigen Modellanpassungen für spezifische Adhäsionsphänomene wie sterische Wechselwirkungen, chemische Reaktionen, aber auch Bewegung und Hydrodynamik [48, 95, 108, 109]. Es beschäftigen sich zudem Arbeitsgruppen verstärkt mit dem Einfluss der physikochemischen Parameter der Proteine, Zellen und Mikroorganismen, um ein allgemein gültiges Gesamtbild zu erreichen [64, 100, 101, 110, 111].*

Das Bestreben, eine antiadhäsive Oberfläche unter Einflussnahme auf die Grenzflächenenergie des Systems zu erhalten, erfordert zusätzlich die Integration topografischer Oberflächenparameter. Analog der Analyse physikochemischer Kräfte standen auch hier zunächst Korrelationsuntersuchungen im Vordergrund. Mit dem Ziel, die Adhäsion pathogener Keime auf Titanoberflächen zu reduzieren, erzeugten Harris *et al.* [112] Oberflächentopografien mittels chemischer, elektrochemischer und mechanischer Politur. Am Beispiel immobilisierter *S. aureus* demonstrierten sie einen konträren Einfluss der Oberflächenrautiefe abhängig vom Polierverfahren. Grunz *et al.* [82] untersuchten wiederum die Biomassebildung an plasmamodifizierten Polymeren und stellten einen geringen Anstieg der Bioadhäsion bei zunehmender Rauigkeit fest. Allion *et al.* [92] beschreiben eine Reduzierung der bakteriellen Adhäsion auf rauen Oberflächen. Zusätzlich werden auf den strukturierten Proben mehr Einzelzellen detektiert. Auf der glatten Oberfläche nimmt dagegen die Clusterbildung zu. Am Beispiel der Adhäsion von Sporen definierten in einer aktuellen Studie Schumacher *et al.* [113] eine antiadhäsive Mikrotopografie mit den drei Randbedingungen:

- Strukturraum, in welchem die Organismen nicht zwischen den Strukturen passen
- Strukturgröße, wobei Organismen nicht auf Einzeltopografien sitzen können
- Strukturweite, über welche die Organismen ohne Bodenberührung Brücken bilden.

Die exakte Übertragung natürlicher Topografien am Beispiel eines Mistkäfers wendeten Yan *et al.* [114] für die Entwicklung antiadhäsiver Oberflächen an. Anhand der mathematischen Modellierung (Asperity-Modell) der Oberfläche und der Simulation der Grenzflächenwechselwirkungen entwickelten sie eine numerische Strategie, welche die elektrokinetischen und die Transportvorgänge miteinander verbindet. Ebenfalls auf natürlichen antiadhäsiven Vorbildern basieren die Konzepte von Baum (Kopie der Delfinhaut) [115] und Bechert (Kopie der Haifischoberfläche) [116]. Hier gelingt durch den Transfer der topografischen Struktur eine deutliche Reduktion der Adhäsion in wässriger Umgebung.

Letztendlich wird aktuell die topografische Modellierung superhydrophober Oberflächen mit antiadhäsiven Eigenschaften diskutiert. A. Marmur [117] fasste in einer Übersicht zwei Wirkmechanismen zusammen. Ist die Oberfläche superhydrophil und rau, bewirkt die homogene Benetzung eine gute Abschirmung der Oberfläche. Bei superhydrophoben rauen Oberflächen wird dagegen die benetzte Fläche reduziert und damit auch die Bioadhäsion eingeschränkt.

### **Gestaltung biomimetischer Oberflächen**

Das Vorbild der Natur nutzen ebenfalls zahlreiche Konzepte zur Gestaltung biomimetischer Oberflächen, um natürliche Antifoulingmechanismen zu reproduzieren bzw. zu imitieren.

Durch die Kombination hydrophiler Dextranligosaccharide mit Hexanolgruppen gelang es z.B. Marchant *et al.* [118], biomimetische Strukturen darzustellen, die auf Substraten kovalent fixierbar sind. Die Schichten zeigen eine hohe Orientierung und können definiert in unterschiedliche hydrophil/hydrophobe Verhältnisse strukturiert werden. Parallel dazu beschrieb die Arbeitsgruppe die antiadhäsive Wirkung der glykokalixartigen Oberflächen anhand der reduzierten Proteinadsorption [119], der Plättchenadhäsion [120] sowie über die Reduzierung der Adhäsion von *S. epidermidis* [121]. Das Antifouling beruht dabei auf der Ausbildung büstenartiger Strukturen durch die Dextranmoleküle. Der Vorteil äußert sich dabei insbesondere in der kontaktgekoppelten Wirkung, die eine gezielte antibakterielle Wirkung ermöglicht.

Eine aktuelle Arbeit von Zhu *et al.* [122] stellt ebenfalls eine neuartige biomimetische polymere Schicht vor. Diese wurde durch Selbstassemblierung dendritischer Saccharide auf silaniserten Oberflächen erzeugt und führte zu einer reduzierten Plättchenadhäsion im statischen *in vitro*-Test.

Innovative biomimetische Antifoulingkonzepte zielen ferner auf die Maximierung sterischer Abstoßung zwischen Bakterie und Oberfläche sowie die Abschirmung der Oberfläche durch gebundenes Wasser, um die spezifischen Bindungen zwischen Makromolekülen zu reduzieren. Im Vordergrund steht dabei die Modifizierung von Oberflächen mit Polyethylenglykol (PEG). Emoto *et al.* [123] entwickelten z.B. mit Hilfe eines Copolymers aus PEG und Polylaktid (PLA) eine Antifoulingoberfläche. Die Anwendung reaktiver polymerer Mizellen zur Schichtbildung führt zu einer effektiven Maskierung der Oberflächenladung, was die Autoren über ein Zetapotenzial nahe Null nachwiesen. Die Reduzierung der Albuminadsorption um ca. 70% unterstreicht die antiadsorptiven Eigenschaften der PEG/PLA-Schicht. Den Effekt des PEG-Gehaltes im Copolymer PEG-Polycarbonat auf die Proteinadsorption stellten Tziampazis *et al.* [124] dar. Die Steigerung des PEG-Gehaltes zwischen 0–10% zeigte bereits ab 4% PEG einen sinkenden Wasserkontaktwinkel, welcher linear mit einer abnehmenden Fibrinogenadsorption korreliert. Parallel dazu sinkt die Adhäsionsstärke der Zellen, wobei die Zellbewegung zunimmt.

Im Gegensatz zu den polymerisierenden Schichten präsentierten Dalsin *et al.* [125] eine biomimetische Antifoulingoberfläche, welche einerseits die Eigenschaft des PEG zur Bildung einer membranähnlichen Struktur nutzt und die zusätzlich Peptidsequenzen aus Muscheln zur Modifizierung verarbeitet. Die Autoren demonstrierten an dieser Schicht die Reduzierung der Adhäsion und der Spreitung von Mausfibroblasten auf nahezu 0%. Der antiadhäsive Effekt konnte auch nach einem 14-tägigen *in vitro*-Test wiederholt nachgewiesen werden. Auch die Arbeitsgruppe um Bryers *et al.* [126] arbeitet an der Entwicklung eines effektiven Antifouling über die Biomimetisierung synthetischer Materialien. Zusätzlich zur Peggylung der Oberfläche erfolgte eine kovalente Fixierung von Zelladhäsionspeptiden oder verschiedener Antikörper, welche bereits als adhäsionshemmend bekannt sind. Die Kopplung der Peptide an die Schicht über das PEG variierte, wie aus der Abbildung 16 hervorgeht. Die Autoren zeigten den größten Effekt hinsichtlich der Proteinadsorption an der mit PEG-Tetraether modifizierten Oberfläche. Die Adhäsion von *S. epidermidis* und *P. aeruginosa* verringerte sich bereits allein durch die PEG-Beschichtung. Demgegenüber blieb die direkte Peptidbindung erneut wirkungslos. Koppelt man jedoch Antikörper an die Oberfläche, steigert sich die bakterielle Adhäsion. Nach Meinung der Autoren ist damit nachgewiesen, dass die Adhäsion der untersuchten Bakterien nicht durch spezifische Rezeptoren gesteuert ist und ein zu entwickelndes Antifoulingkonzept allein auf der Unterdrückung nichtspezifischer Wechselwirkungen beruhen sollte.

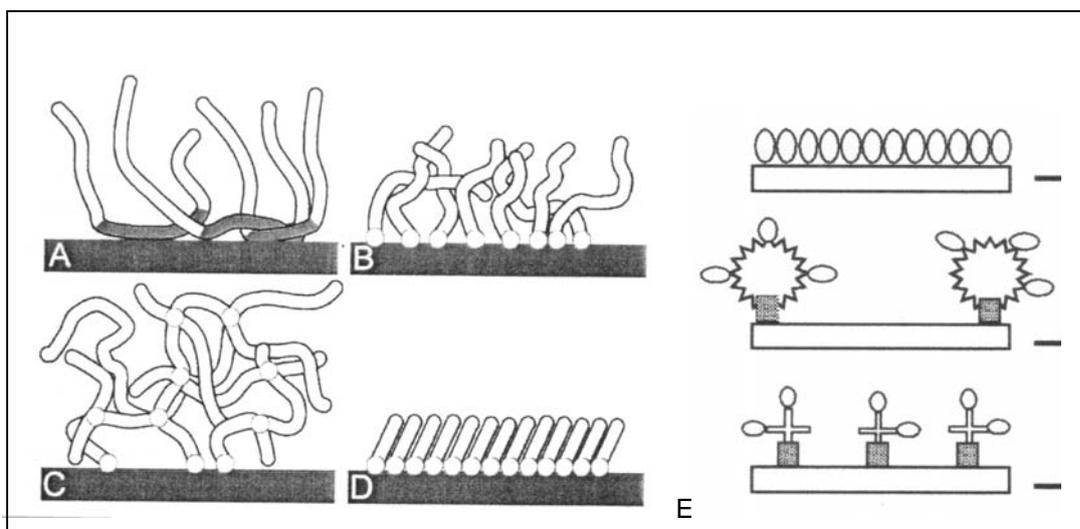


Abb. 16: Variation des PEG an der Oberfläche

- A) adsorbiertes Copolymer, B) kovalent gebundenes PEG, C) kruzvernetztes Polymer  
D) selbst-assimilierte Monoschicht, E) Antikörper gebunden an „star-like“ PEG

Neben der Anwendung von PEG führte auch die Applikation von Substanzen wie z.B. Phosphorylcholin als Biomembrananaloga (Membranphospholipid) durch die Hydratation der zwitterionischen Kopfgruppen zu einer reduzierten Bioadhäsion. Die Antifoulingwirkung wird auf den hohen Anteil freien Wassers in der Schicht zurückgeführt, welches die Wechselwirkungen zwischen Oberfläche und biologischem System unterdrückt. Dies konnten Driver *et al.* [127, 128] an unterschiedlichen Anwendungsbeispielen nachweisen. Aus der zwitterionischen Kopfgruppe inkorporiert in einem Methacrylat wurden Copolymere hergestellt, welche sowohl als Bulkmaterial, aber auch als Beschichtung angewendet werden. Crosslinker-Systeme erlaubten zudem eine partielle Netzwerkbildung, um die Stabilität der Schichten zu erhöhen. Aktuell wurde dieses Wirkprinzip durch eine chinesische Arbeitsgruppe aufgegriffen [129]. Andere Autoren bestätigten die Wirkung des Phosphorylcholins (PC). Iwasaki *et al.* [130] beispielsweise setzten ein PC-Polymer erfolgreich in der Blutfiltration ein. Ishihara *et al.* [131] zeigten an dieser Modifizierung eine Hinderung der Fibroblastenadhäsion. Ebenfalls eine antiadsorptive Oberfläche, modifiziert auf der Basis eines analogen PC-Polymers publizierten Zhang *et al.* [132] am Beispiel eines biokompatiblen Sauerstoffsensors. Die Funktionalität des Polymers wird zumeist auf die Unterdrückung spezifischer Zell-Oberflächen-Wechselwirkungen zurückgeführt. Demgegenüber entwickelte die Gruppe um A.W. Lloyd Biomaterialoberflächen mit gezielter Aktivität, indem sie kationische Ladungen in das PC-Polymer integrierten, um damit neben der Proteinadsorption die Konformität der Proteine zu steuern. So publizierte S.F. Rose in Kooperation mit A.W. Lloyd [133] Ergebnisse einer Untersuchung an PC-beschichteten PET-Oberflächen, welche mit kationischen Peptiden in unterschiedlicher Konzentration modifiziert wurden. Die Autoren demonstrierten einen signifikanten Einfluss der Peptidkonzentration, die sich sowohl im Anstieg der Proteinadsorption, der Zelladhäsion aber auch der Koloniebildung äußerte.

*Zusammenfassend ist die Interpretation des Wirkprinzips biomimetischer Schichten differenziert. Es gibt Theorien, die z.B. die hohe molekulare Mobilität, die Hydrophilie, den osmotischen Druck, das anschwellende Volumen oder die Reduzierung von Proteinbindungsstellen darstellen [134]. Im Allgemeinen stimmig ist die Aussage für die Applikation des PEG, dass durch die Variation der Kopplungsdichte, der Kettenlänge und der Schichtstruktur die Eigenschaften gezielt eingestellt und für das Antifouling genutzt werden können. A. Roosjen [91] fasst zusammen, dass diese Schichten eine abstoßende sterische Wasserbarriere bilden, so dass Bakterien kaum in eine Distanz kommen, die für anziehende van der Waals-Interaktion relevant wäre. Diese Anziehung führt dann zwar zu Adsorption und Adhäsion, lässt aber weiterhin eine leichte Entfernung der Bakterien zu.*

### **Integration toxischer Agenzien**

Die Integration toxischer Agenzien in oberflächennahe Bereiche mit definierten Freisetzungskinetiken bildet einen dritten Komplex im Rahmen der Antifoulingentwicklung. Bereits 1968 veröffentlichte J.R. Saroyan [135] einen Reviewartikel zu Antifoulinganstrichen, die in der marinen Technologie Anwendung finden und insbesondere auf der Freisetzung toxischer Substanzen beruhen. Unter den metallischen Toxinen legte der Autor seinen Schwerpunkt auf die Wirkung von Kupferoxiden, integriert in eine lösliche Matrix auf der Basis von Wachsen. Die Funktionskontrolle über einen Zeitraum von 18 Monaten erfolgte an Schiffsrümpfen und U-Boot-Anstrichen. Trotz der guten Resultate wurden weiterhin als vielversprechend toxische Substanzen wie z.B. Tributylzinn-sulfid oder Triphenylzinnfluorid vorgestellt.

Antiinfektive Beschichtungen im medizinischen Bereich beruhen in zahlreichen Fällen auf der Wirkung von Silber oder silberhaltigen Verbindungen. Zhang *et al.* [136] diskutierten in einer Übersicht zahlreiche derartige Beschichtungen hinsichtlich ihrer Stabilität, ihrer Wirkung und insbesondere bezüglich der Funktionalität als Medizinprodukt z.B. Katheter. Die Applikation des Elementes Silber variierte von einer dünnen metallischen Schicht über Silbermikro- und Nanopartikel bis zum Einsatz von Silberlegierungen, Silberoxiden oder Silbersalzen. Gleichzeitig stellten die Autoren Diskrepanzen zwischen dem *in vitro*- und dem *in vivo*-Verhalten derartiger Beschichtungen heraus und verwiesen deutlich auf notwendige Optimierungen hinsichtlich der Dosierung und der gesteuerten Freisetzung der toxischen Substanzen.

Die Abbildung 17 verdeutlicht das Wirkprinzip der anorganischen Leaching-Verfahren und verweist zugleich auf den Nachteil derartiger Konzepte – die konzentrationsabhängige Wirkungsbegrenzung.

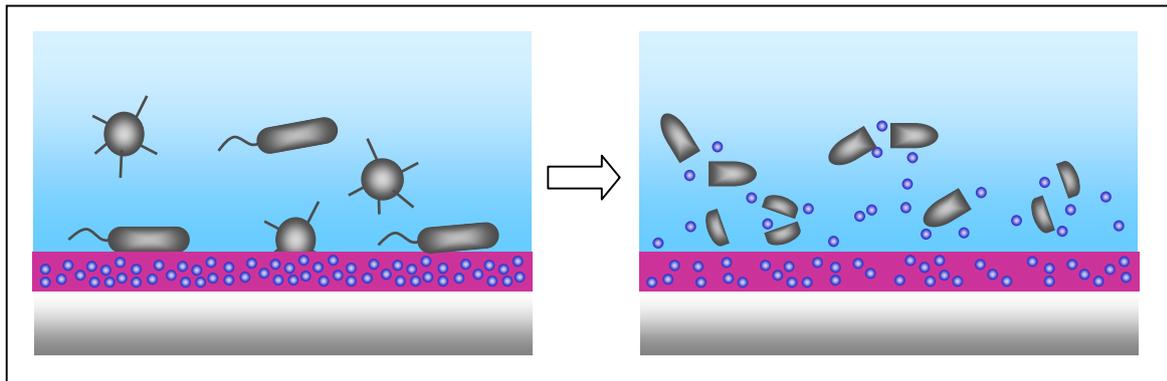


Abb. 17: Anorganisches Leachingverfahren

Alt *et al.* [137] präsentierten erfolgreich die Applikation von Silbernanopartikeln in PMMA-Zement der Prothetik. Die antibakteriellen Eigenschaften konnten signifikant anhand der reduzierten Biofilmbildung durch die Infektionskeime *S. aureus* und *S. epidermidis* nachgewiesen werden. Parallel dazu führte die Integration der Silberpartikel mit einem Durchmesser von 5 – 50 nm in Kontakt mit Fibroblasten zu keiner Zytotoxizität. Schmidt *et al.* [111] untersuchten den Antifoulingeffekt von silbermodifizierten Sol-Gel-Schichten im Vergleich zur Variation der Hydrophilie der Oberflächen. Sie stellten unter realen Umweltbedingungen sowie im Labor eine adhäsionshemmende Wirkung der Silberschicht im Trinkwasser fest. Insbesondere in der initialen Adhäsionsphase zeigte sich der Einfluss durch vermehrte Clusterbildung. Jedoch schlägt dieser Effekt im Langzeitversuch um und auf der Silberschicht wurde eine Biofilmbildung erkennbar, was auf die bereits angesprochene Wirkungsbegrenzung durch das Leaching zurückgeführt werden kann. Neben Silber und silberhaltigen Verbindungen finden zahlreiche weitere Toxine im Antifouling Anwendung. Beispielsweise stellten Domenico *et al.* [138] die Aktivität von Wismutthiolen vor. Die Autoren demonstrierten die Antifoulingwirkung verschiedener Thiole sowohl suspendiert als auch in Form einer Beschichtung gegenüber mehreren *S. aureus*- und *S. epidermidis*-Stämmen. Die Wismutthiole wirkten nachweislich 1000fach stärker antibakteriell im Vergleich mit bisher eingesetzten Wismutsalzen über einen Zeitraum von 40 Tagen. Die Applikation von Furanonen (Bromverbindung) als toxische Substanz ist Gegenstand von Baveja *et al.* [139]. Das Antibiotikum, adsorbiert auf kommerziellen polymeren Biomaterialien, stand über 24 Stunden mit *S. epidermidis* in Kontakt. Im Ergebnis zeigte sich eine reduzierte bakterielle Adhäsion, die mit der herabgesetzten Schleimbildung korreliert wurde. Jedoch wurde eine zytotoxische Wirkung festgestellt. Taylor *et al.* [140] nutzte die Furanone über verschiedene Spacer an der Oberfläche. Die Autoren beschreiben als Wirkprinzip den Effekt dieser Verbindungen auf das Quorum-Sensing und führen die Antifoulingwirkung auf das Stören der Zell-Zell-Kommunikation innerhalb eines Biofilms zurück.

Die Freisetzung von in Katheteroberflächen (Silikon) imprägnierten Antibiotika und des Antifouling untersuchten Kohnen *et al.* [141]. Sie nutzten eine Kombination aus Rifampin und Sparfloxacin, welche in unterschiedlichem Verhältnis und verschiedenen Konzentrationen in das Biomaterial eingebracht wurden. Die Autoren kalkulierten die jeweiligen Freisetzungskinetiken von 1-3 Stunden bis zu einem Jahr und ermittelten parallel dazu die bakterielle Adhäsion. Im Ergebnis stellte man die Möglichkeit heraus, durch die Kombination der Antibiotika auf verschiedene Mikroorganismen zu wirken, aber auch die Freisetzungskinetik zu steuern. Dieses antibakterielle Konzept eignet sich nach Meinung der Autoren sowohl für die initiale Phase als auch im Langzeitversuch.

*Die Integration toxischer Substanzen in oberflächennahe Bereiche bietet als Antifoulingkonzept eine breite Vielfalt bezüglich der eingesetzten Substanzen und der Freisetzungskinetik und folglich ihrer Applikationsbreite. Prinzipiell treten jedoch Probleme infolge der zeitlichen Wirkungsbegrenzung und insbesondere der kumulativen toxischen Wirkung auf.*

### Kopplung spezifischer Funktionsmoleküle

Abschließend soll die Kopplung spezifischer Funktionsmoleküle als Antifoulingkonzept diskutiert werden. Das Wirkprinzip ist beispielsweise zweiphasig: Zunächst treten Wechselwirkungen zwischen dem kovalent gebundenen Molekül und der Oberfläche von Mikroorganismen auf. Im Anschluss ist es bei Vorliegen ausreichender Konzentrationen möglich, Kanäle in Biomembranen zu formen und so den Mikroorganismus zu zerstören (siehe Abbildung 18). Dem Vorteil – die Unterbindung der Freisetzung überschüssiger toxischer Substanzen und die hohe chemische und physikalische Resistenz gegenüber Umgebungsbedingungen – steht der Faktor entgegen, dass die kontaktgekoppelte Wirkung die Adhäsion von Bakterien voraussetzt und somit tote Organismen entfernt werden müssen, die gegebenenfalls die Basis für eine erneute Biofilmbildung bilden.

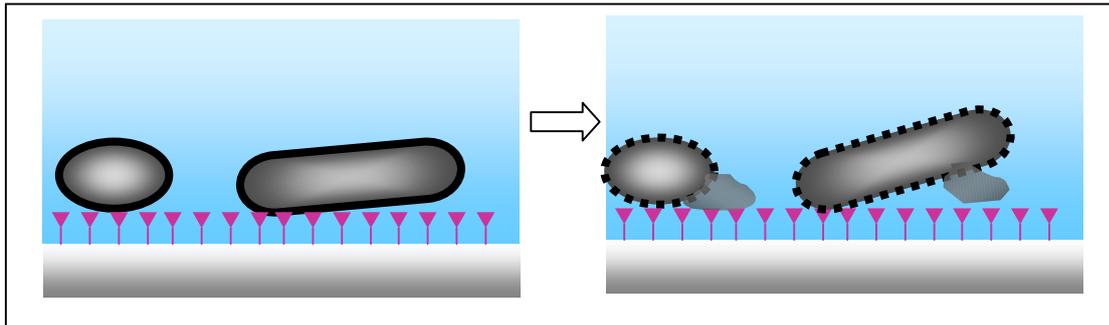


Abb. 18: Membranzerstörendes Peptid

Die Wirkung einfacher funktioneller Kopfgruppen auf die Bioadhäsion diskutierten Geer *et al.* [142] am Beispiel konventionell eingesetzter und modifizierter Werkstoffe für das Zellkulturhandling. Hu *et al.* [104] präsentierten in einer Studie Polymermembranen, welche nach einer Ozonaktivierung mit Chitosan, Chitooligosaccharid sowie zusätzlich mit Hyaluronsäure modifiziert wurden. Die Charakterisierung der funktionalisierten Oberflächen basierte auf der Bestimmung der Oberflächendichte der Carboxylgruppen (Säure) und der Aminogruppen (Saccharide). Im Ergebnis zeigte sich eine reduzierte Infektion aufgrund der kationischen Gruppen der Saccharide, die mit den Anionen der Bakterienzellwand assoziieren und damit die Biosynthese stören. Die Proteinadsorption dagegen wurde durch die Carboxylgruppen behindert, da diese negativ geladenen Moleküle die ebenfalls negativ geladenen Proteine abstoßen. Die zelluläre Adhäsion verlief umgekehrt proportional zur Dichte der Aminogruppen an der Oberfläche. Zusammenfassend verdeutlichten die Autoren einen direkten Weg zur Steuerung der unterschiedlichen biologischen Funktionen und damit auch des Antifouling über die gezielte Funktionalisierung der Oberfläche allein mit einfachen Molekülgruppen.

Eine vergleichbare Bilanz zogen Park *et al.* [143]. Sie stellten ihr Antifoulingkonzept als Kombination aus den antiadhäsiven Eigenschaften einer PEG-Schicht mit dem antibakteriellen Effekt verschiedener oberflächenaktiver Gruppen vor. Auf Polyurethan wurde eine PEG-Schicht aufgebracht, an welche anschließend Hydroxyl-, Amino- oder Sulfatgruppen gekoppelt wurden oder auch Heparin als funktionelles Molekül. Die Autoren demonstrierten eine signifikante Reduktion der Adhäsion der Staphylokokken allein durch die Präsenz funktioneller Gruppen, während die *E. coli*-Adhäsion schon durch das PEG behindert wurde. Aber auch hier konnte der Antifoulingeffekt durch die Kopplung von Hydroxylgruppen und Heparin deutlich verstärkt werden. Erst 2005 stellten Bavington *et al.* [144] eine weitere Strategie zur Verhinderung bakterieller Adhäsion, basierend auf der Kopplung sogenannter Rezeptor-Ligand-Antagonisten vor. Diese Adhäsion-Analoga blockieren die Rezeptor-Bindungen und werden als multifunktional gegenüber mehreren Liganden eingeschätzt. Erste positive Ergebnisse wurden am Beispiel der *P. aeruginosa* beschrieben.

Mit dem Ziel, den Wirkmechanismus der Zerstörung von biologischen Membranen durch kationische Peptide festzustellen, verglichen Friedrich *et al.* [145] antimikrobielle Peptide unterschiedlicher Aminosäuresequenzen und Kettenlängen hinsichtlich ihres Einflusses auf klinische Isolate und Infektionskeime. Die Autoren wiesen die zellzerstörende Wirkung aufgrund der Depolarisierung der Membran nach.

Die Peptide ersetzen dabei divalente Kationen, welche für die äußere Membranintegrität von essentieller Bedeutung sind, zerstören den Bilayer und führen zu einer Permeabilisierung. Diese Permeabilisierung ist notwendig, um ein intrazelluläres Ziel für spezifische anionische Verknüpfungen zu erreichen, reicht aber allein als „Killingmechanismus“ nicht aus. Die elektronenmikroskopische Untersuchung zeigte zudem, dass die einzelnen Organismen unterschiedlich reagieren. Auch die Wirkungsweise der Peptide kann sich unterscheiden. Tiller *et al.* [146] stellten Oberflächen mit kovalent gebundenen Poly(4-vinyl-N-alkylpyridiniumbromid) vor, welche zur Zerstörung der in Kontakt tretenden Mikroorganismen führt. In Abhängigkeit von der Alkyl-Gruppe wurden bis zu 94% der unterschiedlichen Bakterien durch bakteriozide Elemente und die Wirkung der kationischen Peptide abgetötet. Im Fokus weiterer Arbeitsgruppen standen ebenfalls die Membranpolarisierung und die anschließende Proteolyse [147, 148].

Bereits seit längerem ist in der Literatur die bakteriozide Wirkung von Glutaraldehyden publiziert. Die Wirkung dieser Substanz gegenüber planktonischen und sessilen Bakterien untersuchten Pereira *et al.* [149] im Rahmen der Vorstellung eines Antifoulingkonzeptes für Edelstahloberflächen. Es konnte konzentrationsabhängig eine signifikante Reduzierung der Biofilmbildung dargestellt werden, die im wesentlichen auf Wechselwirkungen der Substanz mit exopolymeren Sacchariden zurückgeführt wird. Stanley *et al.* [150] stellte die Antifoulingwirkung von Verbindungen der Zosterischen Säure im Leachingverfahren vor. Den bakterioziden Effekt sehen die Autoren dabei in der Verringerung des pH-Wertes im Kontakt mit der Bakterienmembran und der darauf folgenden Beeinträchtigung des Zellmetabolismus. Diesen Ansatz griffen aktuell Xu *et al.* [151] auf und zeigten in Untersuchungen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Zosterischen Säure das Antifoulingverhalten.

*Die Kopplung nichttoxischer, spezifisch wirksamer Funktionsmoleküle an Oberflächen mit dem Ziel, die bakterielle Adhäsion effektiv zu behindern, entwickelt sich mit dem zunehmenden Verständnis molekularbiologischer und biochemischer Wirkprinzipien. Die Funktion einfacher Oberflächengruppen steht in direktem Zusammenhang mit der Variation physikochemischer Oberflächenparameter, lässt aber ebenso wie der Einsatz komplexer Moleküle eine gezielte bakteriozide Wirkung zu.*

### **Kombination der Konzepte**

Im vorangegangenen Abschnitt wurden zahlreiche Antifoulingkonzepte vorgestellt und hinsichtlich ihrer antiadhäsiven Wirkung auf Proteine, Zellen und Bakterien beschrieben. Publiziert wurden nunmehr auch die verschiedenartige Kombinationen der einzelnen Konzepte, um spezifische Lösungen und intelligente Schichtsysteme zu entwickeln. Beispielsweise beschreibt Subramanyam *et al.* [152] eine Kombination aus der antimikrobiellen Aktivität von Silberhalogenen und der membranlösenden Wirkung von Polyhexamethylbiguanid, wobei sowohl das Silber (Silberthiolat) als auch Biguanidsegmente in der Schicht integriert sind. Andererseits verbanden Dalsin *et al.* [125] die abschirmende Wirkung der Oberfläche durch das PEG gebundene Wasser mit dem gezielten bakterioziden Effekt zusätzlich adsorptiv immobilisierter Muschelproteine. Wagner *et al.* [126] stellten eine ähnliche Kombination aus PEG und Antikörpern vor, wie auch Harris *et al.* [112] das Hydrogel mit Adhäsionspeptiden verbanden.

### **Zusammenfassende Übersicht**

Die nachfolgende Übersicht stellt die beschriebenen Antifoulingkonzepte noch einmal zusammenfassend dar. Sie beinhaltet zudem eine Bewertung bezüglich der Vor- und Nachteile verschiedener Lösungen.

*Bezieht man bei der Bewertung der verschiedenen Antifoulingstrategien die zuvor dargestellten Prozesse der Bioadhäsion und Biofilmentstehung ein, wird aufgrund der ihnen eigenen Komplexität sowie des breiten Applikationsspektrums deutlich, dass es kein allgemein gültiges Antifoulingkonzept geben kann.*

Die Kenntnis der unterschiedlichen Möglichkeiten, den natürlichen Adhäsionsmechanismus zu umgehen, welche neben den physikalisch-chemischen auch biochemische und molekularbiologische Mechanismen einbezieht, sollte die notwendigen Entwicklungsmöglichkeiten eröffnen.

Tab. 2: Antifoulingkonzepte

Wirkprinzip	Charakteristik	Referenzen
<b>Modifizierung physikochemischer Parameter</b>	<p><b>Vorteil:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Eine maßgeschneiderte Modifizierung der Oberflächen für spezifische Applikationen wird möglich.</li> <li>- Der Einfluss auf initiale Wechselwirkungen kann zu einer frühen effektiven Behinderung des Biofouling führen.</li> </ul> <p><b>Nachteil:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Die Interpretation der thermodynamischen Kontrolle erfordert die Integration unterschiedlicher biologischer Systeme und Medien in die kolloidchemischen Modelle</li> <li>- Die Komplexität und zeitliche Veränderung des Biosystems führt zu variierenden Zustandsgrößen.</li> </ul>	[21, 67, 78, 79, 82, 83, 85, 95, 96, 98, 99, 102, 104, 106, 108, 110, 118, 153]
<b>Gestaltung biomimetischer Oberflächen</b>	<p><b>Vorteil:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Die antiadhäsive Wirkung wurde von der Natur bzw. in unterschiedlichen <i>in vitro</i>- und <i>in vivo</i>-Tests nachgewiesen.</li> <li>- Die Nutzung neuester Analyseverfahren erlaubt eine ständige Verbesserung der Kopie.</li> </ul> <p><b>Nachteil:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Der Wirkmechanismus ist aufgrund der Komplexität biologischer Systeme noch nicht vollständig geklärt.</li> <li>- Die Fixierung der Schichten und ihre Stabilität ist unzureichend.</li> </ul>	[52, 118, 119, 121, 123-128, 130-133, 154]
<b>Freisetzung toxischer Agenzien</b>	<p><b>Vorteil:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Die Applikation nachweislich hochwirksamer antibakterieller Substanzen ist einfach möglich und technologisch umsetzbar.</li> <li>- Das Wirkprinzip ist bekannt und kalkulierbar.</li> </ul> <p><b>Nachteil:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Die unzureichende Dosierung und Kontrolle der Freisetzungsraten führt zu einer konzentrationsabhängigen Wirkungsbegrenzung.</li> <li>- Die systemisch toxische Wirkung der freigegebenen Substanzen greift ebenfalls auf ziefremde Organismen, wirkt umweltschädigend und bioakkumulativ.</li> </ul>	[111, 135-139, 141]
<b>Kopplung spezifischer Funktionsmoleküle</b>	<p><b>Vorteil:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Durch kovalent fixierte Funktionsmoleküle wird die Freisetzung überschüssiger toxischer Substanzen unterbunden.</li> <li>- Die Schichten besitzen eine hohe chemische und physikalische Resistenz.</li> </ul> <p><b>Nachteil:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Die kontaktgekoppelte Wirkung setzt die Adhäsion von Bakterien voraus.</li> <li>- Tote Organismen müssen entfernt werden.</li> <li>- Es werden z.T. nur einzelne spezifische Interaktionen angesprochen.</li> </ul>	[104, 142, 145, 147, 148, 155, 156]

Zusätzlich bezieht dieses Resümee erste erfolgreiche industrielle Umsetzungen ein bzw. stellt an Beispielen das Wirkprinzip von Antifoulingbeschichtungen aus Medizin und Biotechnologie zusammen.

Tab. 3: Industrielle Umsetzung

<b>Produkt / Firma</b>	<b>Antifoulingkonzept</b>	<b>Applikation</b>
<b>Photosensitizer www.biolitec.de</b>	Kopplung spezifischer Funktionsmoleküle zur Bildung von Singulett-Sauerstoff und freien Radikalen	Sensor
<b>Pluronic ® BASF</b>	verbesserte Benetzung, Hydrogeleigenschaften	Kontaktlinsen
<b>Bio-Gate Bioinnovative Materials GmbH</b>	Nanosilber in Polymer eingebettet	Katheter
<b>Biocompatible Ltd.</b>	Vernetzung eines methacrylate PC-monomer (2-methacyloyloxy-ethylphosphorylcholine MPC)	Kontaktlinsen, Stents
<b>Bacterin Inc. 2002</b>	Kopplung der Moleküle Minocycline und EDTA	Medizinprodukte
<b>Drei Bond München</b>	Variation der Topografie, Reduzierung der Oberflächenenergie	Umwelttechnologie
<b>Sharklet AF™</b>	Kopie der Haifischhaut	technische Polymere
<b>Poloxamer 407</b>	Copolymer mit Polyethylenglykol	Mundspülung, Kontaktlinsen
<b>Comelec sa</b>	Polyparaxylylen-Schicht als sterische Barriere	Medizinprodukte
<b>Bioglide ® Medtronic Inc.</b>	Polyvinylpyrrolidone als Hydrogel	Katheter
<b>Trillium ® Medtronic Inc.</b>	Heparin gekoppelt an PEG	Katheter
<b>Camouflage ® Hemoteq</b>	Glykocalixartige maskierende Schicht	Stents

## **2.5 Gestaltung biomimetischer Oberflächen als Antifoulingkonzept**

Den Ansatzpunkt der Konzeptfindung in den vorangegangenen Kapiteln bilden thermodynamische Modellansätze und die Beschreibung der Wechselwirkungen, welche direkten Einfluss auf das Grenzflächengeschehen zwischen Biosystem, Material und Medium haben. Des Weiteren werden verschiedenste Antifoulingkonzepte zusammengefasst. Es hat es sich insgesamt als sinnvoll erwiesen, Antifoulingkonzepte auf die Unterdrückung bzw. Verzögerung der initialen Phase der Biofilmbildung zu konzentrieren, da sicher gestellt werden kann, dass trotz der unterschiedlichen Applikationen analoge und in der Regel unspezifische Wechselwirkungen dominant sind. Entscheidend ist dabei zudem, dass diese Phase weitestgehend substratgesteuert verläuft und so ein gezielter Eingriff durch die Funktionalisierung der Materialoberflächen möglich ist. Vor diesem Hintergrund stellt die gezielte Modifikation physikochemischer Materialparameter das aus heutiger Sicht vielversprechendste Antifoulingkonzept dar. Es wurde ebenfalls dargestellt, dass, um eine Reduzierung der Adhäsion zwischen Materialoberfläche und biofilmbildenden Mikroorganismen zu erreichen, letztlich eine Methodenkopplung von Antifoulingstrategien relevant wird.

In der vorliegenden Arbeit werden zur Lösung der Problemstellung archaeale Tetraetherlipide als Basis einer Oberflächenmodifizierung zur Gestaltung eines biomimetischen Antifoulingkonzeptes genutzt. Vergleichbare Biomembrananaloga, welche derzeit als Antifoulingbeschichtung appliziert werden, können nur die innere Monoschicht direkt an der Materialoberfläche verankern. Die darauf aufbauenden Bilayer sind jedoch von geringer Stabilität, so dass der Einsatz auf technischen Funktionsflächen nur bedingt möglich ist. Als Alternative hierzu bieten sich die Tetraetherlipide an, die sich durch gezielte Aktivierung an verschiedenste Materialoberflächen kovalent fixieren lassen. Diese Moleküle bilden eine ideale chemische Plattform, basierend auf einem kovalent fixiertem Spacermolekül mit evolutiv optimierten Eigenschaften und einem hohen Maß an selektiver Modifizierbarkeit.

Das zu entwickelnde Antifoulingkonzept basiert auf der Unterdrückung des initialen Adhäsionsprozesses aufgrund der eingestellten physikochemischen Eigenschaften der Lipidbeschichtung. Als ursächliches Wirkprinzip wird eine Maskierung der Oberfläche im nanoskaligen Maßstab gesehen. Die anknüpfende Funktionalisierung der Lipidschichten zielt auf eine „Abdeckung“ energetisch bevorzugter Adhäsionspunkte. Des Weiteren sollen thermodynamisch begründete abstoßende Wechselwirkungen zum Tragen kommen. Die physikochemische Charakterisierung der Medien und Mikroorganismen bewirkt die Parameterfelder und erlaubt im Anschluss eine umgreifende Interpretation, Wichtung und Diskussion.

Aufgrund ihrer einstellbaren Wechselwirkung mit dem jeweiligen Messmedium sollen Tetraetherlipidschichten auf sensorischen Materialoberflächen eingesetzt werden, um diese feld- bzw. prozestauglich zu machen und zu validieren. Für die gewählten Applikationsbeispiele aus der Gewässertechnologie und auf medizinischem Gebiet folgt die Darstellung und Charakterisierung der spezifischen Tetraetherlipidschichten an relevanten Materialoberflächen. Es wird die Prüfung der Bioadhäsion im Labormaßstab dargelegt und durch die Realisierung von Funktionalitäts- und Feldtests ergänzt. Es ergibt sich so die Möglichkeit, die Bioadhäsionsmessung im Labor in umfassender Weise zu verifizieren.

### 3 Beschichtungsmaterial, Schichtcharakterisierung, Bioadhäsionsprüfung und Funktionalitätstest

#### 3.1 Tetraetherlipid

Die Archaea bilden neben den Bakterien und Eukarioten eine dritte Domäne der Organismen [157]. *Thermoplasma acidophilum* wurde bereits Anfang der 70-er Jahre in selbsterwärmenden Kohleabraumhalden entdeckt und gehört den Archaea an, die auch in extremen Lebensräumen - bei hohen Temperaturen, Säure- oder Salzgehalt leben können [158, 159]. Schon früh wurde als besonderes Merkmal der thermophilen Archaea das Fehlen der Zellwand sowie die charakteristische Struktur der Zellmembran und ihrer Lipide beschrieben, die z.B. die Anpassung an Wachstumstemperaturen von bis zu 90°C und einem pH-Bereich von 0,5 bis 4 ermöglichen [160-162]. Zusammenfassend lässt sich der grundlegende Aufbau der archaealen Membranlipide insbesondere der thermophilen Gruppe wie folgt beschreiben [163-166]:

- Die Grundstruktur besteht aus 2 langen, hydrophoben Kohlenwasserstoffketten, die zu beiden Seiten von jeweils einem modifizierten Glycerol flankiert sind. Bei thermophilen Organismen handelt es sich meist um zwei C<sub>40</sub>-Isoprenoide.
- Die Kohlenwasserstoffketten sind mit dem Glycerolgrundkörper durch Etherbindungen verbrückt. Diese machen die archaealen Membranlipide im Vergleich zu Lipiden aus Eubakterien und Eukaryonten, wo Esterbindungen vorliegen, resistenter gegenüber einem enzymatischen und hydrolytischen Abbau.
- Neben Dietherlipiden (Archaeol), die vor allem bei methanogenen Organismen isoliert werden, finden sich bei thermophilen Archaeas bis zu 90-95% Tetraetherlipide (Caldarchaeol) als Grundgerüst der Membranlipide.
- Die bipolaren Membranlipide können zwei unterschiedliche Kopfgruppen enthalten.
- Das Lipidgerüst enthält keine Doppelbindungen und ist daher unempfindlich gegen Oxidation. Durch die methylverzweigten Phytanylketten wird die Ionenpermeabilität der Membran erniedrigt.

Der Anteil des Hauptphospholipids in der Membran des *Thermoplasma acidophilum* beträgt 46,6 % der totalen Lipidmenge bzw. 80,1% der Phospholipide [160]. Dieses Lipid ist ein bipolares Tetraetherlipid mit isoprenoiden Diolstrukturen, bei dem die freien Hydroxylgruppen des Glycerols unsymmetrisch mit je einer Zuckerkomponente und Phosphorylglycerin substituiert sind [167, 168]. Um eine Versteifung der Kohlenwasserstoffkette bei gleichzeitiger Erhöhung des Phasenübergangs zu erreichen, werden mit steigender Wachstumstemperatur 39°C auf 59°C die C<sub>40</sub>-Alkohole zusätzlich zyklisiert. Der Einbau der Zyklopentanringe erfolgt symmetrisch in beiden Kettensegmenten [169-171].

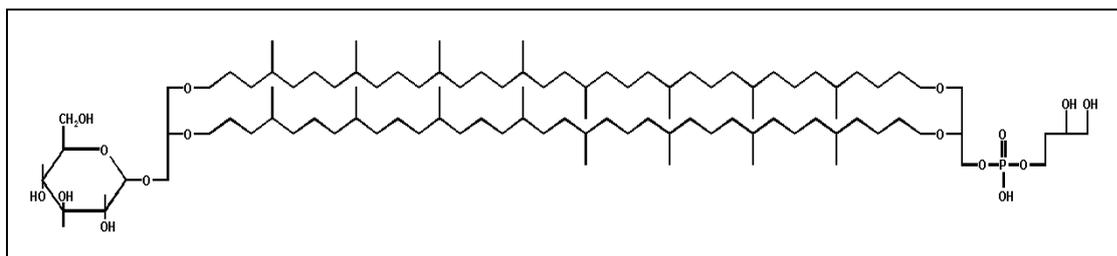


Abb. 19: Tetraetherlipid – Hauptphospholipid des *Thermoplasma acidophilum*

Die besonderen Eigenschaften der Tetraetherlipide machen sie einzigartig mit Blick auf die Anwendung als Antifoulingkonzept. Zusätzlich bieten sich diese Lipide an, da sie sich durch gezielte Aktivierung an nahezu alle Materialoberflächen kovalent fixieren lassen [172, 173].

## 3.2 Beschichtungstechnologie

### 3.2.1 Immobilisierung der Lipidschichten

Voraussetzung für die funktionale chemische Modifizierung der technischen Oberflächen ist eine orientierte, dicht gepackte und kovalent fixierte Lipidschicht. Für die Herstellung ultradünner Lipidmonolayer stehen dabei folgende Methoden zur Verfügung:

- die Übertragung von Langmuir-Blodgett-Schichten,
- die Liposomenfusion an der Substratoberfläche sowie
- die Self-Assembling-Technik (SAM).

Zur Darstellung definierter Lipid-Monoschichten auf festen Substraten mit molekular dimensionierter Strukturierung ist die Langmuir-Blodgett-Technik eine der am häufigsten angewendeten Methoden [174, 175]. Mit Hilfe dieser Filmwaagentechnik lassen sich über die spontane Selbstorganisation der amphiphilen Moleküle an der Grenzfläche Wasser-Luft Adsorptionsfilme erzeugen, die bereits für eine umfassende Charakterisierung der archaebakteriellen Lipide eingesetzt wurden [164, 176, 177]. Es konnten komplexe Strukturen dargestellt werden z.B. durch den Aufbau von Multischichten oder die Integration spezifischer Membranproteine, Rezeptorproteine, Ionenkanäle oder Antibiotika [178-180].

Eine zweite Methode zur Herstellung substratgestützter Lipidschichten stellt die Liposomenfusion dar. Hierbei wird Wasser als dispergierendes „Lösungsmittel“ verwendet, in welchem die langkettigen hydrophoben Kohlenwasserstoffe nur gering löslich sind. Die Präsenz eines polaren Bereiches an den Kopfenden der Ketten führt bei Kontakt mit Wasser zu einer Orientierung in höhermolekularen Strukturen – den Liposomen. Auf hydrophobisierten Oberflächen adsorbieren die Liposome, es kommt zum Spreiten der Vesikel und anschließend entsteht eine Lipidschicht. Auch diese Methode erlaubt in zusätzlichen Schritten die Erzeugung mit Protein gekoppelter Multischichten [181-183].

Aufgrund der meist schwachen Bindungskräfte besitzen viele der mit diesen beiden Verfahren erzeugten Schichten eine geringe mechanische und thermische Stabilität bzw. neigen dazu, ihre zweidimensionale Ordnung beim Transfer auf dem festen Support zu verlieren. Demgegenüber erlaubt die Self-Assembling-Technik als chemisorptive Methode die Anordnung von Molekülen zu einem Monolayer unter Ausbildung kovalenter Bindungen und damit eine deutlich erhöhte Stabilität.

Self-Assembling ist ein Prozess, bei dem Moleküle aus der Lösungsphase auf einer Oberfläche adsorbieren und eine geordnete Monoschicht bilden. Dieser Prozess verläuft spontan und selektiv nur für Monoschichten, wenn die freie Energie der Adsorption negativ ist. Eine zweite Erklärung für den Verlauf des Prozesses ist, dass starke van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den ungebundenen, unpolaren Restmolekülen bestehen und die Molekülgeometrie eine dichte Anordnung in der Monoschicht zulässt (Platzbedarf). Sind diese Voraussetzungen erfüllt, formieren sich die Moleküle zu einem hoch geordneten, dicht gepackten System [184, 185]. Das modulare Konzept, bei dem unterschiedliche Endgruppen durch ein 'molekulares Rückgrat' an die Kopfgruppe und damit an das Substrat gebunden werden können, erlaubt die Präparation von Schichten mit sehr verschiedenen funktionellen Eigenschaften und - auf einer grundlegenden Ebene - die gezielte Veränderung der physikochemischen Wechselwirkungen (z.B. durch Kopplung verschiedener Endgruppen) [186, 187].

Ein Großteil der grundlegenden Arbeiten zur Darstellung supportfixierter Membranen auf der Basis archaebakterieller Tetraetherlipide waren Bestandteil eines Sonderforschungsbereiches 197 der DFG "Lipidorganisation und Lipid-Protein-Wechselwirkungen in Bio- und Modellmembranen" am Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle. Die Arbeitsgruppe von Herrn Priv. Doz. Dr. Ulrich Rothe entwickelte Verfahren zur zielgerichteten Modifizierung von Festkörperoberflächen. Zur Erzeugung der Schichtsysteme des Hauptphospholipids des *Thermoplasma acidophilum* wurde die Übertragung von Langmuir-Blodgett-Filmen, die Self-assembling-Technik und die Liposomenfusionstechnik etabliert.

### 3.2.1.1 Isolierung und Aktivierung des Tetraetherlipids

Die in dieser Arbeit verwandten Tetraetherlipide stammen ausnahmslos vom Mikroorganismus *Thermoplasma acidophilum*. Alle verwendeten Lipidfraktionen und Derivate wurden freundlicherweise von Herrn Priv. Doz. Dr. Ulrich Rothe, Leiter der Arbeitsgruppe der Martin Luther Universität Halle, und Frau Dr. Karin Dölling aufbereitet und bereitgestellt.

Die Kultivierung von *Thermoplasma acidophilum* (1728 DSM, ATCC 25905) erfolgte bei 59°C und einem pH 2 in Fermentern unter etablierten Wachstumsbedingungen [188]. Es wurde ein effizientes Verfahren entwickelt (Patent [189]), um aus der geernteten, getrockneten bakteriellen Rohmasse über eine erschöpfende Hydrolyse in hoher Reinheit das Caldarchaeolgrundgerüst zu isolieren, das strukturell dem Hauptphospholipid der Membran des *Thermoplasma acidophilum* ohne Kopfgruppen entspricht und in gleicher Weise wie die Tetraetherlipidausgangssubstanz an Materialoberflächen kovalent fixiert werden kann.

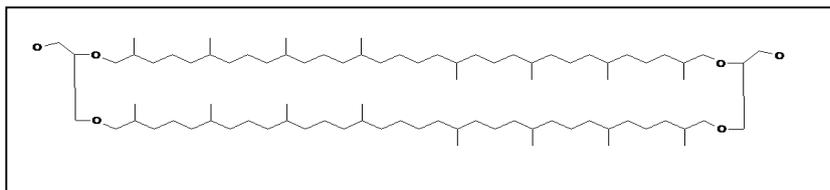


Abb. 20: Tetraetherlipid (Caldarchaeol) - Grundgerüst

Die Realisierung der kovalenten Fixierung über das Self-Assembling-Verfahren erfordert eine zusätzliche Aktivierung des eingesetzten Tetraetherlipids. Die Tetraetherlipidderivate wurden mit dem zur Anbindung geeigneten Cyanurchlorid aktiviert. Dabei kam ein beidseitig aktiviertes Caldarchaeol in einer Konzentration von 1mg/ml in Chloroform zum Einsatz. Die erreichte Qualität des Tetraetherlipids wurde mit Hilfe der Massenspektroskopie und Dünnschichtchromatographie geprüft. Die erfolgreiche Aktivierung konnte zudem infrarotspektroskopisch nachgewiesen werden [190].

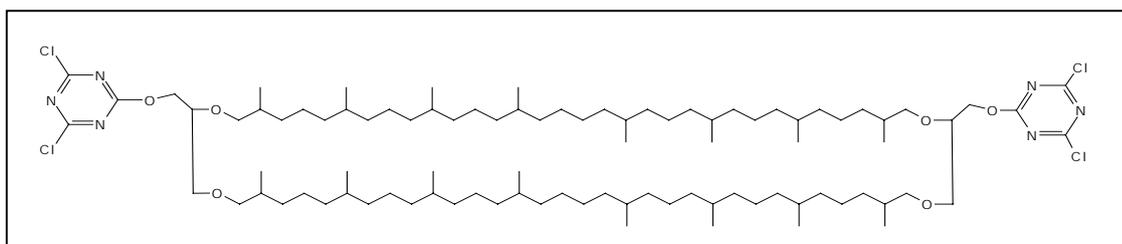


Abb. 21: Cyanurchlorid-Derivat des Caldarchaeols

### 3.2.1.2 Beschichtung der Substrate

#### Substratmaterialien

Die Auswahl der Substratmaterialien orientierte sich an den gewählten Applikationen. Aufgrund der biotechnologischen Problemstellung an sensorischen Funktionsflächen im Gewässermonitoring wurde ein optisches Borsilikatglas – BOROFLOAT B33 (Schott Jena AG) – als Referenzmaterial gewählt. Zur Nutzung im medizinischen Bereich diente das kommerziell erhältliche Silikon – Raumedic SIK 6504 (Rehau AG, Deutschland) als Substrat. Dieses Polymer ist bereits durch die FDA (Food and Drug Administration, US-amerikanische Arzneimittelzulassungsbehörde) zugelassen und wird als Kathetermaterial für die peritoneale Dialyse eingesetzt.

### **Aktivierung der Substrate**

Die kovalente Bindung des aktivierten Tetraetherlipids erfordert eine Aktivierung des Substrates. Für die Aktivierung des Borsilikatglas wurde eine Xeradex-Lampe zur Bestrahlung der Oberflächen mit gepulster UV-Strahlung eingesetzt. Bei dieser Prozedur wird zusätzlich zum Energieeintrag durch die kurzwellige UV-Strahlung Ozon erzeugt, so dass die Oberflächen von organischen Verunreinigungen befreit und zugleich chemisch aktiviert werden (Generierung reaktiver Sauerstoffspezies). Die über 5 Minuten bestrahlten Gläser reagierten dann direkt mit dem Tetraetherlipid.

Das Verfahren zur Oberflächensilanisierung (Einführung reaktiver Aminogruppen) wurde auf dem Silikon in zwei Schritten realisiert. Inerte Silikonpolymere erfordern eine Präaktivierung der Oberfläche, um freie Hydroxylgruppen durch die Spaltung der Si-O-Bindung zu erhalten. Dazu wurde das Polymer mit einer Lösung von 5M NaOH kontaktiert. Im zweiten Verfahrensschritt wurden durch die Umsetzung mit Aminopropyltrimethoxysilan (APTMS) die zur Lipidierung benötigten freien Aminogruppen erzeugt.

### **Beschichtung mit Tetraetherlipid**

Für die Bereitstellung modifizierter Tetraetherlipidbeschichtungen in den Untersuchungen kam ausnahmslos das Self-Assembling-Verfahren zur Anwendung. Es wurden spezifische PTFE-Reaktionskammern entwickelt und für unterschiedliche Probengeometrien, z.B. Objektträgerformat oder Ronden für den Einsatz in Multiwellplatten, modifiziert (Abb. 22).



Abb. 22: PTFE-Reaktionskammer für die Self-Assembling

a) Kammer für Objektträger (75 x 25 mm), b) Kammer für Ronden (Ø 15 mm)

Das aktivierte Tetraetherlipid wurde für die Beschichtung in Chloroform gelöst (Konzentration: 1 mg/ml) und in der dargestellten Reaktionskammer mit den aktivierten Substratoberflächen in Kontakt gebracht. Durch das Bestreben zur molekularen Selbstorganisation kommt es zu einer physikalischen Adsorption der Lipidmoleküle an der Grenzfläche. Nachfolgend bildet sich eine chemische Bindung durch Reaktion der aktivierten Kopfgruppe des Tetraetherlipids mit den funktionellen Gruppen auf der Oberfläche des Glases. Die Reaktion wurde bei einer Temperatur von 70°C über einen Zeitraum von 12 Stunden geführt.

Für die Realisierung der Tetraetherlipidbeschichtung des Silikons wurde als Lösungsmittel Aceton eingesetzt, um drastische Veränderungen der Polymeroberfläche (Quellen, Degradation) durch den fortdauernden Kontakt mit Chloroform zu umgehen. Die aktivierten Silikonsubstrate wurden für 2 Stunden bei 40°C in die Lipidlösung (Konzentration: 1 mg/ml) eingetaucht.

### 3.2.2 Funktionalisierung der Lipidschichten

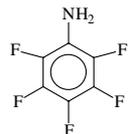
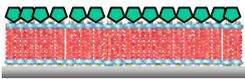
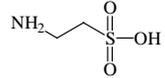
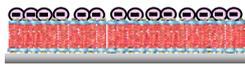
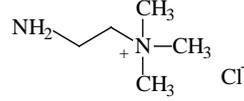
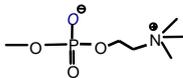
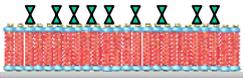
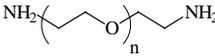
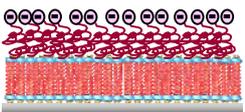
Nach dem Aufbau der Tetraetherlipidschichten folgte die nachträgliche Modifizierung der zweiten, nicht zur Verankerung benötigten, nach außen stehenden Kopfgruppe. Die Auswahl der Funktionalisierungen orientierte sich an dem in Kapitel 2 beschriebenen Antifoulingmodellen.

Als Basis der Modifizierung wurden einfache Tauchverfahren zur Nachfolgederivatisierung der fixierten Tetraetherlipide an der Substratoberfläche etabliert.

Die Funktionalisierung der Tetraetherlipidschicht erfolgte dabei in einer ersten Stufe mit dem Ziel der Variation physikochemischer Oberflächenparameter. Diesem schloss sich ein Optimierungsschritt an, der eine Kopplung spezifischerer funktioneller Gruppen beinhaltete. Als Kopplungsmoleküle wurden Aminogruppen eingesetzt, um eine kovalente Bindung zum Cyanurchlorid zu initialisieren.

Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über die applizierten Funktionalisierungen, die verwendeten funktionellen Gruppen, die Bezeichnung der Proben sowie eine schematische Darstellung der Funktionalisierung.

Tab. 4 : Funktionalisierung der äußeren Kopfgruppe des Tetraetherlipids

Parameter	Verfahren der Modifizierung	Probenbezeichnung	Strukturformel des gekoppelten Moleküls	Schema
hydrophob	Umsetzung mit Pentafluoranilin	TL CF		
hydrophil	Peggylierung mit PEG 3500	TL PEG		
negativ geladen	Kopplung von Taurin	TL neg		
positiv geladen	Kopplung von Cholamin	TL pos		
zwitterionisch	Umsetzung von Chlorphospholan, anschließend mit Trimethylamin zur Reaktion gebracht	TL PC		
hydrophil + negativ geladen	Peggylierung mit einem Di-Amin-Polythylenglykol und Kopplung von Propansulten	TL Kombi	 	

### 3.3 Charakterisierung

Die Rückführung des in Kapitel 2 entwickelten theoretischen Konzepts der Wechselwirkungsenergien der Bioadhäsion auf messtechnisch erfassbare Kenngrößen mündete in die Bestimmung energetischer und elektrokinetischer Oberflächenparameter. Die umfassende Charakterisierung der modifizierten Tetraetherlipidschichten dient zunächst der Bewertung der erreichten Funktionalisierung innerhalb des biomimetischen Antifoulingkonzeptes. In Ergänzung mit der entsprechenden Analyse der Mikroorganismen und Medien ergibt sich ein umfassendes physikochemisches Parameterfeld.

Zunächst erlaubt die Messung des Wasserkontaktwinkels eine erste Aussage bezüglich der Oberflächenhydrophobizität. Die Betrachtung der Oberflächenspannung ermöglicht die Bewertung der Gesamtgrenzflächenenergie zwischen einer Materialoberfläche und dem Biosystem. Weiterführend gestattet die Aufspaltung dieser Kenngröße über spezifische Anteile der Grenzflächenspannung die Interpretation disperser und polarer Beiträge der Gibbs'schen Energie. Der direkte messtechnische Zugang zur Kenngröße des Zetapotenzials und der Ionenstärke ermöglicht die eindeutige Kalkulation der elektrostatischen Wechselwirkungsenergie durch die Anwendung der Gleichung 24.

Die nachfolgende Tabelle 5 fasst die energetische und elektrokinetische Oberflächencharakterisierung einschließlich der verschiedenen Methoden schematisch zusammen.

Tab. 5: Übersicht der Charakterisierung in Abhängigkeit der Kenngrößen

	<b>Oberflächenenergie</b>		<b>Oberflächenladung</b>	
<b>Kenngröße</b>	Hydrophobizität	Oberflächenspannung gesamt / dispers / polar	Zetapotenzial	IEP
Material	<b>Kontaktwinkel</b>	<b>Owens/Wendt - Verfahren</b>	<b>Strömungspotenzial</b>	<b>Titration</b>
Mikroorganismus	<b>Kontaktwinkel</b>	<b>Owens/Wendt - Verfahren</b>	<b>Elektrophorese</b>	<b>Titration</b>
<b>Kenngröße</b>	Oberflächenspannung gesamt / dispers / polar		Ionenstärke	
Medium	<b>tensiometrische Messung</b>		<b>ionische Zusammensetzung</b>	

Ergänzend wurde eine topographische Charakterisierung realisiert mit dem Ziel, die Oberflächenmorphologie der Substratmaterialien einzuschätzen. Die Anwendung mehrerer mikroskopischer Verfahren dient der umfänglichen Bewertung der erreichten Qualität der funktionalisierten Tetraetherlipidschichten. Dem zugeordnet erfolgt die Darstellung der Größe, Geometrie, Oberflächenmorphologie und Schleimbildung der Mikroorganismen mittels Mikroskopie.

#### 3.3.1 Energetische Charakterisierung

Die kurze einführende Betrachtung der Größen Grenzflächenspannung und Grenzflächenenergie dient einer exakten Nomenklatur, da in der Fachliteratur die Begriffe Oberflächenenergie und Oberflächenspannung häufig nicht übereinstimmend angewendet werden.

Ausgehend von der mechanischen Betrachtung einer Grenzflächenschicht zwischen sich berührenden Phasen ist die Grenzflächenspannung  $\gamma$  definiert als die der Differenz des lokalen Tangentialdruckes und des in der homogenen Raumphase herrschenden Druckes entsprechende integrale Eigenschaft [191, 192].

Für die Adsorption  $\Gamma$  der Komponente  $i$ , als eine der Grenzflächenspannung analoge integrale Eigenschaft bezüglich der Konzentrationsdifferenz erhält man Gleichung 9. Die Größen Grenzflächenspannung und Adsorption fließen nun in die thermodynamische Betrachtung der Grenzflächenschicht ein. Mit der Methode nach Gibbs zur Behandlung von Grenzflächen folgt für den auf die Trennfläche bezogenen Überschuss der freien Energie:

$$f = \gamma + \sum_i \mu_i \Gamma_i \quad (41)$$

Dies bedeutet, dass die Grenzflächenenergie und die Grenzflächenspannung sich gleichen, wenn an der gewählten Trennfläche keine Adsorption auftritt.

In der wissenschaftlichen Praxis entwickelten sich nun unterschiedliche Messmethoden der Oberflächenspannung fester und flüssiger Phasen sowohl auf der Basis theoretischer Betrachtungen, mechanischer Verfahren aber auch thermodynamischer Messungen [193, 194]. Aufgrund ihrer universellen Eignung findet die Bestimmung von Kontaktwinkeln an der Dreiphasengrenze fest/flüssig/gasförmig die häufigste Anwendung [195]. Die Grundlage zur quantitativen Bestimmung grenzflächenenergetischer Größen bildet die bereits 1805 von Young aufgestellte Beziehung [196]:

$$\gamma_{sv} = \gamma_{sl} + \gamma_{lv} \cos \theta \quad (42)$$

Mit der Adhäsionsenergie nach Duprè lässt sich diese aus Kontaktwinkeldaten bestimmen [197]:

$$\Delta G_{sl}^{ad} = \gamma_l (1 + \cos \theta) \quad (43)$$

Entsprechend der Darstellung in Kapitel 2, stellt sich das Grenzflächengeschehen als Summe unterschiedlicher disperser und polarer Wechselwirkungskomponenten dar. Der polaren Komponente werden dabei alle nicht dispersen Beiträge einschließlich elektrostatisch, Säure-Base-, hydrophil- und hydrophob zugeordnet, da die Kontaktwinkelmessung als integrale Größe in dieser Applikation keine Unterscheidung ermöglicht. In Übertragung auf die Berechnung der Oberflächenspannung führen D.K. Owens und R.C. Wendt [198] das geometrische Mittel ein, so dass für die Adhäsionsenergie folgt:

$$\Delta G_{sl}^{sl} = 2\sqrt{\gamma_s^d \gamma_l^d} + 2\sqrt{\gamma_s^p \gamma_l^p} \quad (44)$$

Die Kopplung mit der Gleichung nach Young/Duprè lässt nun die indirekte Bestimmung der energetischen Parameter unter Anwendung der Kontaktwinkeldaten mehrerer Messlösungen zu. D.H. Kaelble führte die Anwendung von mehr als zwei Messlösungen zur Kalkulation der Oberflächenspannung basierend auf dem Owens/Wendt-Verfahren ein, ermöglichte eine grafische Auswertung und bewies zudem eine erhöhte Messsicherheit [199].

C.J. van Oss [18] erweiterte diese Berechnung durch die Aufspaltung des polaren Beitrages in den Säure-Anteil (Elektronenakzeptor  $\gamma^+$ ) und den Base-Anteil (Elektronendonator  $\gamma^-$ ) derart:

$$\Delta G_{sl}^{ad} = 2\sqrt{\gamma_s^d \gamma_l^d} + 2\sqrt{\gamma_s^+ \gamma_l^-} + 2\sqrt{\gamma_s^- \gamma_l^+} \quad (45)$$

Von Bedeutung ist zudem, dass sich die beiden polaren Anteil in dem Modell nicht additiv ergänzen. Es gilt für den polaren Säure-Base-Beitrag zur Oberflächenspannung:

$$\gamma^{AB} = 2\sqrt{\gamma^+ \gamma^-} \quad (46)$$

Die Darstellungen verdeutlichen die Problematik der Bestimmung der Oberflächenspannung fester Substratoberflächen. Sowohl das Verfahren nach Owens/Wendt als auch die Methode nach van Oss stellen hypothetische Ansätze dar, deren Gültigkeit bisher nur empirisch bestätigt wurde. Das Verfahren nach Owens/Wendt kam dabei nicht zuletzt aufgrund seiner zeitlich früheren Entwicklung zu einem umfassenderen Gebrauch. Prinzipiell empfehlen einschlägige Arbeiten die Auswahl der Bestimmungsverfahren in Abhängigkeit des zugrundeliegenden Substrats. Beispielsweise entwickelte S. Wu [200] zusätzlich ein spezielles Verfahren für die Analyse niederenergetischer Oberflächen.

### **3.3.1.1 Energetische Charakterisierung der Tetraetherlipidschichten**

Zur Erfassung der Kontaktwinkel der Tetraetherlipidschichten diente ein computergestütztes Messsystem (dataphysics, DCA 20). Die Fortschrittswinkel wurden mit der Methode des liegenden Tropfens erfasst. Nach dem Setzen des Tropfens erfolgte eine stetige Flüssigkeitszugabe bis zum Erreichen des sogenannten „Plateau“-Wertes, der einen Gleichgewichtszustand beschreibt [201]. Vermessen wurden je Testflüssigkeit 10 Tropfen mit einem Starttropfenvolumen von 3  $\mu\text{l}$ . Die Berücksichtigung eines einheitlichen Tropfenvolumens steht dabei ebenfalls im Zusammenhang mit dem Ziel einer reproduzierbaren Charakterisierung der biologischen Oberflächen [202]. Jeder Tropfen wurde zehnfach vermessen.

Aus den Kontaktwinkelmessungen wurden mit der Methode nach Owens/Wendt & Kaelble die Oberflächenspannung des Materials sowie deren polare und dispersive Anteile berechnet. Des Weiteren wurde die Polarität als prozentualer Anteil des polaren Anteils der Oberflächenspannung, bezogen auf die Gesamtoberflächenspannung, ermittelt.

Als Messlösungen dienten neben Dijodmethan als rein disperse Flüssigkeit zusätzlich Wasser, Formamid und Ethylenglykol, deren oberflächenenergetische Parameter nach Busscher et al. [96] in der Tabelle 6 zusammengefasst sind:

Tab. 6: Messflüssigkeiten der energetischen Charakterisierung (\* Angaben nach [96])

<b>Messflüssigkeit</b>	<b>Formel</b>	<b>dispers*</b>	<b>polar*</b>
<b>dest. Wasser</b>	H <sub>2</sub> O	46,8 mN/m	26,0 mN/m
<b>Formamid</b>	CH <sub>3</sub> NO	29,5 mN/m	28,7 mN/m
<b>Ethylenglykol</b>	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	21,3 mN/m	26,4 mN/m
<b>Dijodmethan</b>	CH <sub>2</sub> I <sub>2</sub>	50,8 mN/m	0

### **3.3.1.2 Energetische Charakterisierung der biologischen Systeme**

Die energetische Charakterisierung an den ausgewählten Mikroorganismen basierte ebenfalls auf der Bestimmung der Kontaktwinkel mit der Methode des liegenden Tropfens. Der Einsatz dieser Methode zur Bestimmung der Hydrophobizität biologischer Systeme etabliert sich zunehmend in den aktuellen Untersuchungen gegenüber der länger gebräuchlichen MATS (Microbial Adhesion To Solvents)-Methode, welche auf der Adhäsion der Mikroorganismen an Kohlenwasserstoffen beruht [203].

Die MATS-Methode begrenzt sich im wesentlichen durch Schwierigkeiten hinsichtlich einer uneinheitlichen Interpretation [202]. Dennoch konnte an Beispielen bezüglich der Hydrophobizität eine direkte Korrelation zwischen beiden Analysenmethoden dargestellt werden [204].

Vor der Vermessung der Mikroorganismen wurden Nährlösungen über 36 h inkubiert. Die so erhaltene Bakteriensuspension wurde in 0,15 M NaCl gewaschen, in eine Suspension ( $2,5 \times 10^9$  / ml) überführt und anschließend bei 0,95 mbar mittels einer Vakuumpumpe durch einen Filter mit 0,45  $\mu\text{m}$  Porenweite gezogen. Die zurückgehaltenen Bakterien bildeten danach einen ebenen geschlossenen Rasen, der eine Kontaktwinkelmessung ermöglichte. Unter Beachtung des deutlichen Einflusses der Präparationsmethode auf die physikochemischen Parameter von bakteriellen Zelloberflächen geschah die Vermessung der feuchten Proben zeitnah vor dem Trocknen des Filters analog der Analyse der beschichteten Substratoberflächen [205].

### **3.3.1.3 Energetische Charakterisierung der Medien**

Der Bestimmung der Oberflächenspannung der Medien als dritte beteiligte Phase der betrachteten Grenzflächensituation diente die Wilhelmyplattenmethode, welche invers angewendet auch die Erfassung des dispersen und polaren Anteils ermöglicht [206]. Hierbei erfolgte die dynamische Kontaktwinkelmessung an einer PTFE-Referenzplatte.

### **3.3.2 Elektrokinetische Charakterisierung**

Die elektrokinetische Charakterisierung basiert auf der Bestimmung des Zetapotenzials als Kennparameter der Nettoladung einer Oberfläche. Grundlage dafür ist die Smoluchowsky-Gleichung, gelöst unter der Bedingung, dass die auftretenden Krümmungsradien der Oberfläche um vieles größer sind als die Debye-Hückel-Länge ( $\lambda_D$ ) [207]. Das auftretende elektrische Potenzial an der Scherebene ist das Zetapotenzial und berechnet sich mit der Mobilität  $b$  und der Viskosität  $\eta$  des Mediums:

$$\zeta = \frac{\eta \vec{v}}{\varepsilon_0 \varepsilon \vec{E}} = \frac{\eta b}{\varepsilon_0 \varepsilon} \quad (47)$$

Bei der Strömungspotenzialmethode bildet sich das Strömungspotenzial, wenn man die Flüssigkeit unter Druck an einer Festkörperoberfläche vorbeiströmen lässt. Ladungen der Doppelschicht werden fortgetragen und führen zu einem elektrischen Feld in Abhängigkeit der Elektrolytleitfähigkeit:

$$\frac{U}{\Delta p} = -\zeta \frac{\varepsilon_0 \varepsilon}{\eta \kappa} \quad (48)$$

Die Auswertung der Strömungspotenzialmessung wurde von Fairbrother und Mastin [208] beschrieben, in dem ein Zusammenhang zwischen der spezifischen elektrischen Leitfähigkeit des Elektrolyten und der Geometrie der Kapillare erstellt wird. Für die Bestimmung des Zetapotenzials folgt nun [209]:

$$\zeta = \frac{U \eta \kappa}{\Delta p \varepsilon_0 \varepsilon} \quad (49)$$

#### **3.3.2.1 Elektrokinetische Charakterisierung der Tetraetherlipidschichten**

Die Strömungspotenzialmessungen an den Tetraetherlipidschichten wurden am Electrokinetic Analyser (Fa. A. Paar, Graz) realisiert.

Zur Bestimmung des Zetapotenzials wurde nach der Befüllung der spezifischen Messzelle für Proben mit einer Geometrie von 75 x 25 mm eine Druckrampe durchlaufen, diese Druckrampe (0 – 250 mbar) in beide Fließrichtungen aufgebracht und je zweimal vermessen.

Als Elektrolytlösung für die Bestimmung der pH-Abhängigkeit des Zetapotenzials und die Definition des Isoelektrischen Punktes (IEP) diente eine 1 mmol/l NaCl-Lösung. Die Titration erfolgte mit 0,1 M NaOH- bzw. 0,1 M HCl-Lösung.

Von jedem Material wurden 6 Proben gewonnen, so dass 3 Wiederholungen durchgeführt werden konnten. Die Auswertung der ermittelten Strömungspotenziale erfolgt nach der Methode von Fairbrother und Mastin. Im Ergebnis wird neben dem Zetapotenzial in neutraler Umgebung der Zetapotenzial / pH-Wert-Verlauf dargestellt, um den IEP zu ermitteln.

### **3.3.2.2 Elektrokinetische Charakterisierung der biologischen Systeme**

Es ist möglich, die Partikelladung bzw. das Zetapotenzial über die Bewegung im elektrischen Feld zu bestimmen. Die Zetapotenzialmessung an Mikroorganismen beruht dabei auf der Bestimmung der elektrophoretischen Mobilität unter Anwendung des Zetamaster (Fa. Malvern Instruments, Ostfildern) [96, 210, 211].

Das Zetapotenzial des Partikels wird mit Hilfe der Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung berechnet, in die neben der elektrischen Mobilität  $\mu$  die Dielektrizität  $\varepsilon$  und Viskosität  $\eta$  des Mediums eingehen.

$$\mu_E = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} \quad (50)$$

Die Bakterien wurden in einem Medium suspendiert und in die Küvette des Messsystems gefüllt. Das Anlegen eines elektrischen Feldes an der Messzelle bewirkt eine Bewegung der zu untersuchenden Zellen aufgrund ihrer Oberflächenladung, die Bakterien passieren einen Laserstrahl und streuen dabei das Licht. Der Dopplereffekt führt zu einer Frequenzverschiebung des Lichtes, die abhängig von der Partikelgeschwindigkeit ist.

Als Referenzelektrolyt diente neben dest. Wasser eine 1 mM NaCl-Lösung. Zusätzlich erfolgten die Untersuchungen in den jeweiligen Medien der Organismen aus den Bioadhäsionsprüfungen, sofern die Leitfähigkeit in einem messbaren Bereich lag. Die Einstellung der Konzentration der Mikroorganismen erfolgte über die Optimierungsfunktionen der Gerätesoftware.

Die Organismen wurden in jedem Medium 3 x getrennt angesetzt. Zu Beginn der Messung wurde das Oberflächenpotenzial als Punktmessung in 3 Messungen bestimmt. Anschließend wurde eine Zetapotenzial/pH-Wert-Kurve aufgenommen und der IEP ermittelt. Dabei erfolgte die pH-Titration mit einer 0,1 M NaOH- und 0,1 M HCl-Lösung. Die Messungen wurden in jedem Elektrolyt wiederholt.

### **3.3.2.3. Elektrokinetische Charakterisierung des Mediums.**

Die Bestimmung des charakteristischen Parameters des Mediums - die Debye-Länge als Dicke des diffusen Teils der elektrochemischen Doppelschicht – erfordert die Kalkulation der Ionenstärke der jeweiligen Medien und Messelektrolyten.

Die Ionenstärke der biologischen Medien wurde unter Anwendung der Gleichung (24), basierend auf den definierten Salzkonzentrationen ermittelt. Hierbei wurde der Beitrag der Ladungen durch die Präsenz z.B. von Proteinen, Glukose und Fleischextrakten vernachlässigt [212].

Die Debye-Länge der unterschiedlich konzentrierten Natriumchlorid-Elektrolyten konnte aus Tabellen nach Lagaly [213] ermittelt werden.

### 3.3.3 Mikroskopische Charakterisierung

#### 3.3.3.1 Mikroskopische Charakterisierung der Tetraetherlipidschichten

Die konfokale Laserscanningmikroskopie diente zum Einen der Bewertung der erreichten Oberflächenbedeckung und Homogenität der Tetraetherlipidschicht [214]. Zudem wurde dieses Verfahren zur Analyse der Oberflächenstruktur nach der Funktionalisierung der Lipide sowie für Stabilitätsprüfungen eingesetzt. Die Messungen wurden am konfokalen Mikroskop TCS SP 2 der Firma Leica durchgeführt. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte mit dem Farbstoff DiOC<sub>18</sub> lipophil (mobitec) [215]. Es wurden Bildausschnitte von 200 µm x 200 µm aufgenommen und analysiert. Die Markierung der lipophilen Regionen der Tetraetherlipidschicht eignet sich als Nachweis der Existenz einer Beschichtung auf Oberflächen. Im unbeschichteten Zustand wurde keine Fluoreszenz nachgewiesen, sondern allein die Verunreinigung durch Staubpartikel sichtbar.

Zusätzlich wurden Detailaufnahmen ausgewertet, welche mittels Atomkraftmikroskopie (AFM) einen Bildausschnitt von 2,5 µm x 2,5 µm wiedergeben. Hier kam das Nanowizard-Messsystem der Fa. jpk-instruments Berlin zur Anwendung. Die Analysen wurden im Tapping-Mode unter Luft durchgeführt.

#### 3.3.3.2 Mikroskopische Charakterisierung der biologischen Systeme

Neben der lichtmikroskopischen Betrachtung der unterschiedlichen bakteriellen Kulturen wurden im ZMN der TU Ilmenau elektronenmikroskopische Analysen an den Mikroorganismen der Applikationswässer durchgeführt [216]. Das Ziel dieser Untersuchungen bestand in der Beurteilung der Größen und Form einzelner Organismen. Zusätzlich sollten Erkenntnisse bezüglich der Zellwandstruktur und der Präsenz von Zellwandfortsätzen gewonnen werden. Die Probenpräparation für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde auf Quanti-foil-Netzen (Kohlenstoffbasis) kontrastiert mit Phosphorwolframsäure durchgeführt. Es schloss sich die sofortige Untersuchung der Probe im TEM an, um eine Veränderung durch Trocknung zu vermeiden. In Voruntersuchungen wurde im Hochvakuum des Elektronenmikroskops eine solche Trocknung innerhalb der Untersuchungszeit von ca. 2-6 Stunden bei einer Probe festgestellt.

Eine Färbemethode wurde erarbeitet, um die Größe der Schleimhüllen bzw. der extrazellulären Polysaccharid-Hüllen zu quantifizieren. Diese orientierte sich an für Staphylokokken entwickelten Protokollen [217]. Die erhaltenen Dauerpräparate wurden unter dem Lichtmikroskop (Olympus BX 70, Vergrößerung 100x) untersucht. Die Länge und Breite von 20 einzelnen Organismen einer Bakterienspezies als auch ihrer angefärbten Schleimhüllen wurden gemessen und gemittelt.

### 3.4 Bioadhäsionsprüfung

Von wesentlicher Bedeutung bei der Bewertung des Antifoulingpotenzials ist die Einteilung der Biofilmbildung in die initiale Phase und die Phase des Biofilmwachstums, in der ein möglicher Substrateinfluss darstellbar wird. Dementsprechend fokussieren zahlreiche Studien insbesondere Laborprüfungen allein auf die Unterdrückung der Bioadhäsion und der Ausbildung eines „Conditioning Films“ unmittelbar nach dem Kontakt einer Materialoberfläche mit einem foulingaktiven Medium. Labortests ermöglichen eine hohe Effizienz der Biofilmprüfungen aufgrund der Reproduzierbarkeit in einem verkürzten Messzeitraum. Die Durchführung von Feldtests zielt andererseits auf die Beurteilung der zu prüfenden Materialien unter realitätsnahen Umgebungsbedingungen über die erforderliche Einsatzdauer. Auf aktuellen Tagungen zur Biofilmproblematik (z.B. *Biofilms* 2004 in Osnabrück, 2006 in Leipzig) wurde die anhaltende Problematik bezüglich der Effizienz von Testmethodiken in den folgenden gegensätzlichen Prüfansätzen betont:

<b>einfache definierte Kultur (Monokultur)</b>	⇔	<b>komplexe Kulturen (Mischkultur)</b>
<b>Kurzzeittests</b>	⇔	<b>lang andauernde Prüfungen</b>
<b>Fokus auf Zellen bzw. Bakterien</b>	⇔	<b>Fokus auf Komponenten des EPS</b>
<b>Adhäsion und Biofilmbildung</b>	⇔	<b>Ablösung des Biofilms</b>
<b>experimentelle Studien</b>	⇔	<b>theoretische Modellierung, Simulation.</b>

R. M. Donlan [218] fasste in einem Review mehr als 20 Verfahren zur Biofilmtestung im statischen und dynamischen Modus zusammen und verglich ebenso zahlreiche Methoden zur Quantifizierung des entstehenden Biofilms. Im Ergebnis favorisierte er keine der Messmethoden allein, sondern forderte eine sinnvolle Kombination entsprechend der Aufgabenstellung mit dem Anspruch:

- die Reproduzierbarkeit für jede besondere Methode aufzubauen,
- die neue Methode mit älteren Methoden zu vergleichen (Standardisierung) und
- die Ergebnisse mehrerer Methoden zu korrelieren.

Ebenfalls vergleichen Bos *et al.* [29] verschiedene *in vitro* Methoden zur Bioadhäsionsmessung. Sie favorisieren die Applikation der parallelen Plattenmethode. Schmidt *et al.* [111] untersuchten Materialien in einer Trinkwasseranlage über 4 – 23 Wochen sowie zusätzlich im *in vitro*-Versuch an einer Mischkultur aus drei Trinkwasserorganismen. Sie stellten materialspezifische Unterschiede allein im Frühstadium der Feldtests fest. Bezüglich der notwendigen Versuchsdauer der Laborbioadhäsionsprüfungen besteht in den derzeit existierenden Befunden ebenfalls kein allgemein gültiger Konsens, was sich auch in der unbestimmten Definition der Dauer der initialen Phase der Biofilmbildung begründet. A. Roosjen [91] präsentierte dahingehend mehrere Analysen der bakteriellen Adhäsion unter Anwendung von Plattenfließkammern über eine Dauer von einigen Stunden bis zu mehreren Tagen. Diese Beispiele verdeutlichten aufgrund der Bandbreite der erhaltenen Ergebnisse die Notwendigkeit einer Kopplung mehrerer methodischer Ansätze.

Die zentrale Basis der eigenen Testkonzeption sind Laborbioreaktorsysteme zur Simulation relevanter Milieubedingungen. Die Anwendung von Plattenfließkammern, gekoppelt an den Laborbioreaktor hat sich als möglicher Lösungsweg für die dargelegte Problemstellung bewährt. Den zweiten zentralen Ansatzpunkt der Bioadhäsionsprüfung bilden mehrere applikationsspezifische Mischkulturen. Entsprechend dem Anforderungsprofil des Gewässermonitorings wurden die zu untersuchenden Applikationswässer: Trinkwasser, Flusswasser und Abwasser definiert. Es erfolgten vorbereitende Bioadhäsionsmessungen an 15 Primärbesiedlern mit dem Ziel, den Einfluss der Mikroorganismen selbst auf die Bioadhäsion zu bewerten und eine Grundlage für die so entstehenden Mischkulturen aus jeweils 5 Mikroorganismen zu erhalten. Diese *in vitro*-Prüfungen wurden an unbeschichteten und mit Tetraetherlipid beschichteten Glas in der Multiwellplatte über 24 h realisiert. Die nachfolgende Abbildung 23 fasst die Ergebnisse anhand der Anzahl adhärierter Zellen pro Fläche zusammen und vergleicht dies mit der Adhäsion aus der Mischkultur. Das Ergebnis dieser vorbereitenden Untersuchungen lässt erkennen, dass die Zahlen adhärierter Mikroorganismen der Monokulturen in einem mit der Mischkultur vergleichbaren Level liegen. Die Mischkultur erreicht in der absoluten Zahl nicht die Summe aus den einzelnen Bakterien, was auf eine konkurrierende Adhäsion der Organismen in der Mischkultur weist. Die Adhäsionsneigung variiert drastisch, zwischen den einzelnen Mikroorganismen werden zum Teil Differenzen um das Fünffache gemessen. Auch der Materialeinfluss ist unterschiedlich: die Lipidierung der Oberfläche führt mit zwei Ausnahmen (grauer Pfeil) zu einer Reduzierung der Zahl adhärierter Bakterien. Rijnaarts *et al.* [48] beschreiben in einer vergleichbaren Arbeit die Adhäsionseigenschaften von 7 Bakterienstämmen auf Glas und Teflon. Auch sie stellen bei einzelnen Organismen eine ungleiche Adhäsion fest, ohne zunächst eindeutige Wechselbeziehungen zu finden. Unter ähnlichen Gesichtspunkten analysieren Triandafillu *et al.* [108] die Adhäsion von 18 Stämmen der Spezies *P. aeruginosa*. Bereits nach 2 h Inkubation werden Differenzen zwischen den Mikroorganismen um das Zehnfache erkennbar, welche die Autoren mit der Variation thermodynamischer Interaktionen begründen. Wird das Spektrum des zu untersuchenden biologischen Systems z.B. auf Pilze, Zellen, Blut oder Proteine erweitert, wird eine Vereinheitlichung der Bioadhäsionstestung zunehmend schwieriger bis unmöglich [56, 91, 219].

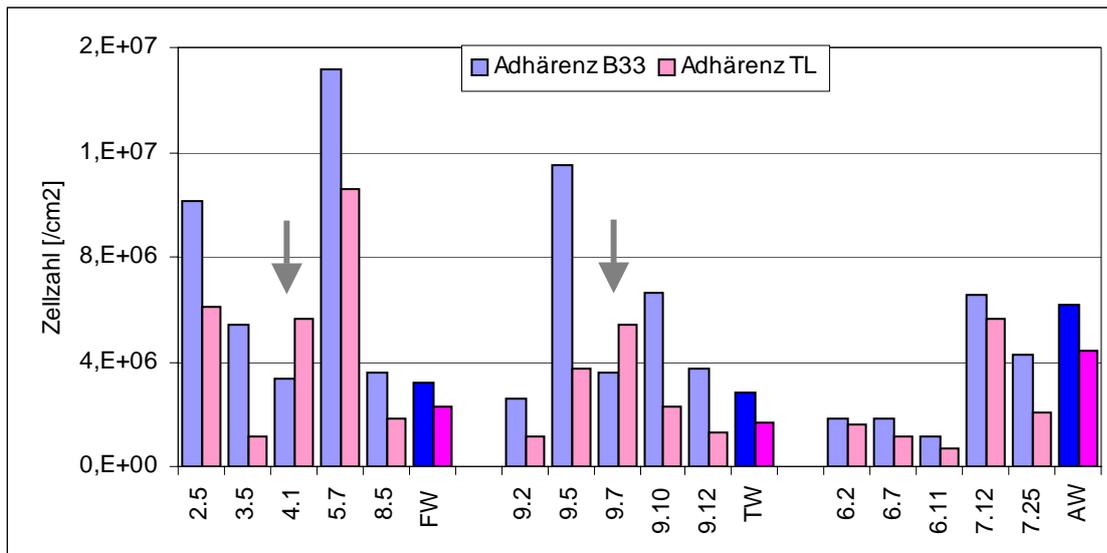


Abb. 23: Zellzahl der 15 Primärbesiedler und Mischkulturen, Substrat: B33, B33 TL

Die Bedeutung einer applikationsspezifischen Mischkultur wird ersichtlich und begründet die in der vorliegenden Arbeit gewählten mikrobiologischen Modelle bestehend aus den definierten Medien Flusswasser, Trinkwasser und Abwasser und jeweils 5 ausgewählten Mikroorganismen mit hoher Adhäsionsneigung und rascher Besiedelungszeit. Gekoppelt mit synthetischen Simulationswässern wurde ein praxisnahes biologisches Modell zur Verfügung gestellt. Analog gelingt dies bei der Untersuchung der medizinischen Applikation in der Anwendung synthetischer Dialyseflüssigkeit und einer Mischkultur aus typischen Infektionskeimen.

Mit dem Ziel, sowohl eine applikationsspezifische Aussage zur initialen bakteriellen Adhäsion zu erhalten, aber auch ein möglichst umfassendes Bild der Biofilmbildung zu gewinnen, gliederte sich die Bioadhäsionsprüfung in verschiedene Stufen, wie die nachfolgende Übersicht verdeutlicht. Zum Zweiten erfolgte die Einbringung der modifizierten Tetraetherlipidschichten in Funktionstests unter realen Feldbedingungen bzw. im Rahmen der Biokompatibilitätsprüfung nach der DIN EN ISO 10993. Diese europäische Norm behandelt die biologische Prüfung von Medizinprodukten und ist für die Vermarktung neuer Produkte essentiell.

Tab. 7 : Übersicht der Bioadhäsionsstudien in Anhängigkeit des biologischen Modells und der Dauer

Biologisches Modell	in vitro - Labortest		in situ - Feldtest	
	Modellwässer	Infektionsmodell	Talsperre, Kläranlage	Implantation
initiale Adhäsion über 5 h	dynamisch	dynamisch		
Adhäsion über 24 h		statisch dynamisch		
Biofilmbildung über mehrere Wochen			dynamisch unter realen Bedingungen	Biokompatibilitätsprüfung

### 3.4.1 Mikroorganismen / Medien

#### 3.4.1.1 Gewässermonitoring

Im ersten Schritt wurden durch die Gerhard Mercator Universität Duisburg, FB Aquatische Mikrobiologie, Primärbesiedler aus relevanten Applikationswässern isoliert. Als Quelle diente für:

Flusswasser	-	Ruhr bei Mülheim-Styrum
Trinkwasser	-	Zulauf, Landesamt für Wasser und Abfall NRW, Versuchskläranlage
Abwasser	-	Wasserwerk-Styrum-Ost, Aktivkohlefilter, Auslauf.

Die Isolate wurden als Biofilmbakterien angezüchtet und bezüglich der Besiedlungsdichte auf Borsilikatglas, Edelstahl und Teflon innerhalb von 24 Stunden bewertet. Es zeigte sich, dass Isolate mit mehr als  $10^8$  Zellen/cm<sup>2</sup> anhafteten. Diese Belegungsdichte ist als relevant für Primärbesiedlung anzusehen und wurde deshalb als Richtwert angenommen. Aus jedem Medium wurden je 5 Isolate selektiert und identifiziert.

Die nachfolgende Übersicht zeigt die für die Modellwässer ausgewählten Mikroorganismenstämme mit hoher Adhäsionsneigung und rascher Besiedlungszeit.

---

<b>Flusswasser</b>		<b>Trinkwasser</b>	
FW 2.5	<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>	TW 9.2	<i>Vibrio fluvialis</i>
FW 3.5	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	TW 9.5	<i>Acidovorax delafieldii</i>
FW 4.1	<i>Pasteurella</i> spp	TW 9.7	<i>Sphingopyxis terrae</i>
FW 5.7	<i>Aeromonas salmonicida</i>	TW 9.10	<i>Citrobacter koseri/ farmeri</i>
FW 8.5	<i>Leuconostoc</i> spp	TW 9.12	<i>Rahnella aquatilis</i>
<b>Abwasser</b>			
AW 6.2	<i>Bacillus cereus</i>		
AW 6.7	<i>Bacillus cereus</i>		
AW 6.11	<i>Propionibacterium avidum</i>		
AW 7.12	<i>Pasteurella</i> spp / <i>Moraxella</i> spp		
AW 7.25	<i>Cellulomonas</i> spp / <i>Microbacterium</i> spp		

---

Zusammen mit den isolierten Primärbesiedlern wurden synthetische Wässer definiert, die hinsichtlich ihrer Zusammensetzung den natürlichen Wässern angenähert sind. Die synthetischen Wässer beschreibt diese Übersicht:

---

<b>Flusswasser [mg/l]:</b>	<b>Trinkwasser [mg/l]:</b>	<b>Abwasser / R2A [g/l]:</b>
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O - 34,6	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O - 34,60	Hefe-Extrakt - 0,5
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O - 112,3	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O - 95,50	Proteose Pepton - 0,5
NaHCO <sub>3</sub> - 126,0	CaSO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O - 358,50	Casamino Acid - 0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - 4,35	NaHCO <sub>3</sub> - 42,00	Glukose - 0,5
NaNO <sub>3</sub> - 85,0	Glukose - 2,15	Lösliche Stärke - 0,5
Glukose - 6,6	Pepton - 2,0	Natriumpyruvat - 0,3
Pepton - 2,0		K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 0,3
		MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O - 0,05

---

### **3.4.1.2 Medizinische Applikation - Infektionsmodell**

Die Darstellung medizinisch relevanter Umgebungsbedingungen orientierte sich am Applikationsbeispiel der kontinuierlichen peritonealen Dialyse (CAPD) [75]. Die Bearbeitung am Beispiel des Einsatzes peritonealer Dialysekatheter erforderte den Einsatz von typischen Infektionskeimen. Hier kamen die Mikroorganismen *Staphylococcus aureus* (S. aureus, ATCC 12600, DSMZ) und *Staphylococcus epidermidis* (S. epidermidis, PCM 2479, DSMZ) zur Anwendung, welche als vorherrschende Infektionskeime der peritonealen Dialyse gelten [76, 220], aber auch charakteristische Vertreter der nosokomialen Infektion sind.

Die Simulation des medizinischen Anwendungsfalles erforderte zudem ein spezifisches Medium, die peritoneale Dialyseflüssigkeit (PDFL). Diese Lösung stellt die im Ausfluss proteinfraktionierte und substanzbeladene Lösung nach der Anwendung eines Katheters im Peritoneum dar. Ihre Zusammensetzung orientiert sich an Holmes et al. [221] und beinhaltet:

---

<b>Peritoneale Dialyseflüssigkeit [g/l]</b>	<i>CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O</i>	- 0,133
	<i>MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O</i>	- 0,081
	<i>NaCl</i>	- 8,0
	<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	- 0,128
	<i>KCl</i>	- 0,197
	<i>Harnstoff</i>	- 1,32
	<i>Kreatinin</i>	- 0,083
	<i>Glukose</i>	- 3,37
	<i>Nutrient Broth</i>	0,1%
	<i>FBS</i>	1%

---

## **3.4.2 *In vitro*- Bioadhäsionsprüfung**

### **3.4.2.1 Bioadhäsionsprüfung in Modellwässern**

Voruntersuchungen zur *in vitro* - Bioadhäsionsprüfung an unbeschichteten und lipidierten Oberflächen wurden im Flusswassermodell im statischen Modus realisiert.

Die Mischkultur des Flusswassermodells wurde dabei als Batchkultur angesetzt, mit der eine Ausgangskonzentration der bakteriellen Suspension von  $10^7$  Mikroorganismen/ml als finale Konzentration erreicht wurde. Die Inkubation im direkten Kontakt mit der zu untersuchenden Oberfläche erfolgte in 24-er Multiwellplatten und dauerte 24 h bei Raumtemperatur. Das Kulturmedium wurde während der Messung nicht gewechselt. Abschließend wurden die Oberflächen mit Medium gespült, um die nicht anhaftenden Mikroorganismen zu entfernen. Die Bestimmung der Zahl und Vitalität der auf der Oberfläche anhaftenden Mikroorganismen geschah nach Ablösung der Bakterien mittels Ultraschall und anschließender Anfärbung mit dem Fluoreszenz-Vitalfarbstoff BacLight®. Die Messung erfolgte an jeweils 5 Parallelen. Sie wurde dreifach wiederholt, jede parallele Zellzahl wurde in der Zählkammer vierfach bestimmt.

Dynamische Bioadhäsionsexperimente erweitern das Methodenspektrum im Labor aufgrund ihrer umgebungs- und strömungsrelevanten Testbedingungen. Die Anwendung eines Rotating-disk-Reaktors [222], von radialen Fließkammern [223] oder, wie es überwiegend gehandhabt wird, von parallelen Plattenfließkammern [224] gestattet nicht nur die Simulation hydrodynamischer Strömungsbedingungen der jeweiligen Applikation sondern zusätzlich eine Analyse des Ablöseverhaltens von Biofilmen.

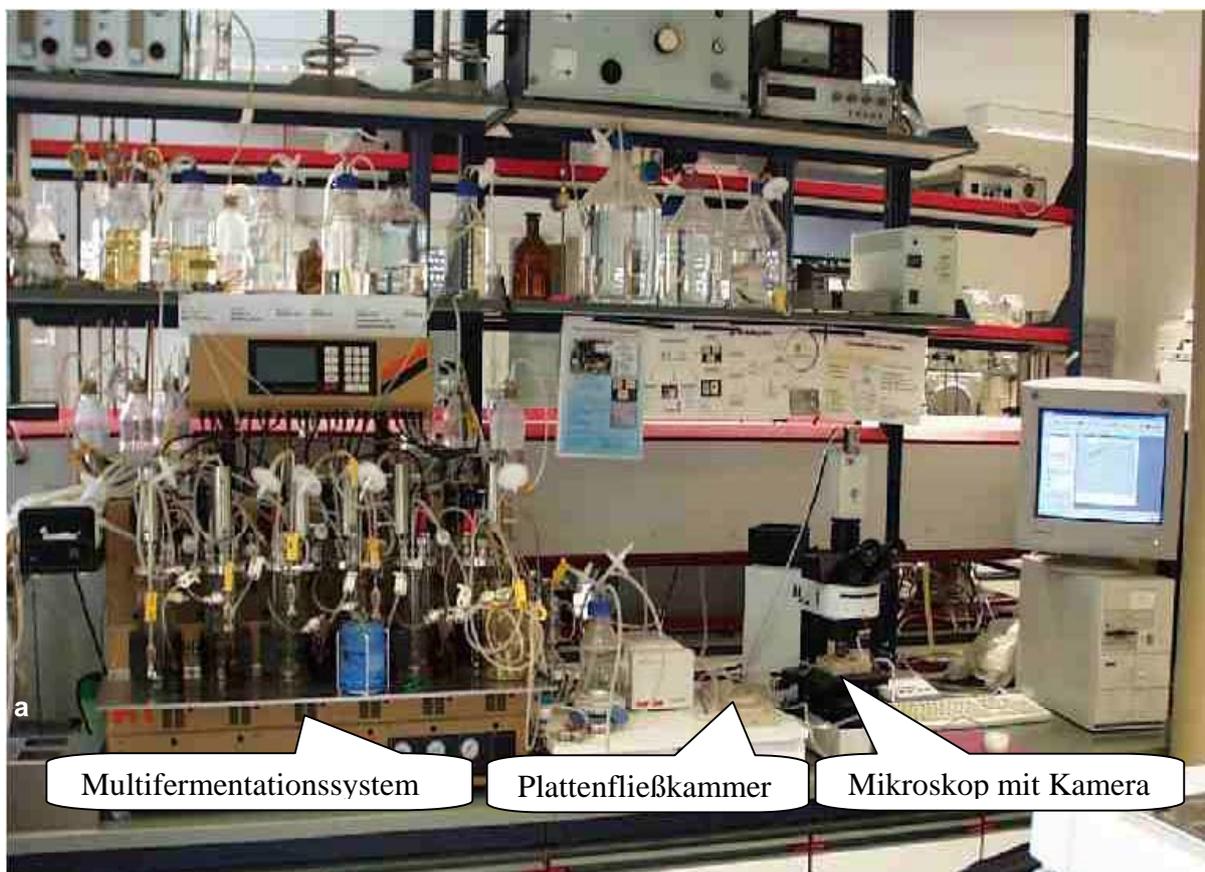
Im Zentrum der dynamischen *in vitro* - Bioadhäsionsprüfung für das Gewässermonitoring wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Multifermmentationssystem etabliert, um die ausgewählten biologischen Modelle zu inkubieren (siehe Abbildung 24).

Die Proben werden in Form von Objektträgern in die Plattenfließkammer eingebracht, deren Fließkanal mit einer Glasplatte abgedeckt wird. Der Fließkanal umfasst somit 60 mm x 15 mm x 1 mm.

Zu Beginn der Messreihe erfolgte eine Konditionierung mit Medium ohne Mikroorganismen. Dies diente zusätzlich der Entfernung von Luftblasen im Schlauchsystem. Das Medium wird mit einer Geschwindigkeit von 3 ml/min in die Fließkammer gespült, wobei vor der Bildaufnahme das komplette Schlauchsystem mit Medium ohne Mikroorganismen ausgewaschen wird, um nicht anhaftende Zellen zu entfernen.

Die Kopplung von vier Plattenfließkammern im Parallelbetrieb ermöglicht den direkten Vergleich unterschiedlich beschichteter Substrate im online-Verfahren. Die Mikroorganismen wurden in den einzelnen Fermentoren des Bioreaktorsystems herangezogen und in eine Mischkultur mit einer Konzentration von  $10^7$  Mikroorganismen/ml überführt. Die anschließende Messung erfolgte über 24 h im jeweiligen Applikationswasser. Je Fließzelle wurden nach 1, 2, 3, 4, 5, 22, 23 und 24 h lichtmikroskopisch Bilder aufgenommen.

Die Auswertung der Bilder erfolgt mittels digitaler Analysesoftware (SIS Analysis®). Dabei wurde zum einen die Bestimmung der Anzahl der anhaftenden Bakterien automatisiert, andererseits bietet die Gliederung der Organismen nach unterschiedlicher Form und Größe (Formfaktor) die Möglichkeit, die Adhäsion unterschiedlicher Stämme abzuschätzen. Je Messpunkt erfolgten fünf parallele Aufnahmen über den Fließkanal verteilt. Insgesamt wurde eine Dreifachbestimmung jeder Modifikation der Lipidbeschichtung realisiert. Zusätzlich wurde die Bioadhäsion an Referenzproben mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) bewertet. Zu diesem Zweck wurden die Mikroorganismen fixiert, getrocknet (kritische Punkttrocknung) und besputtert.



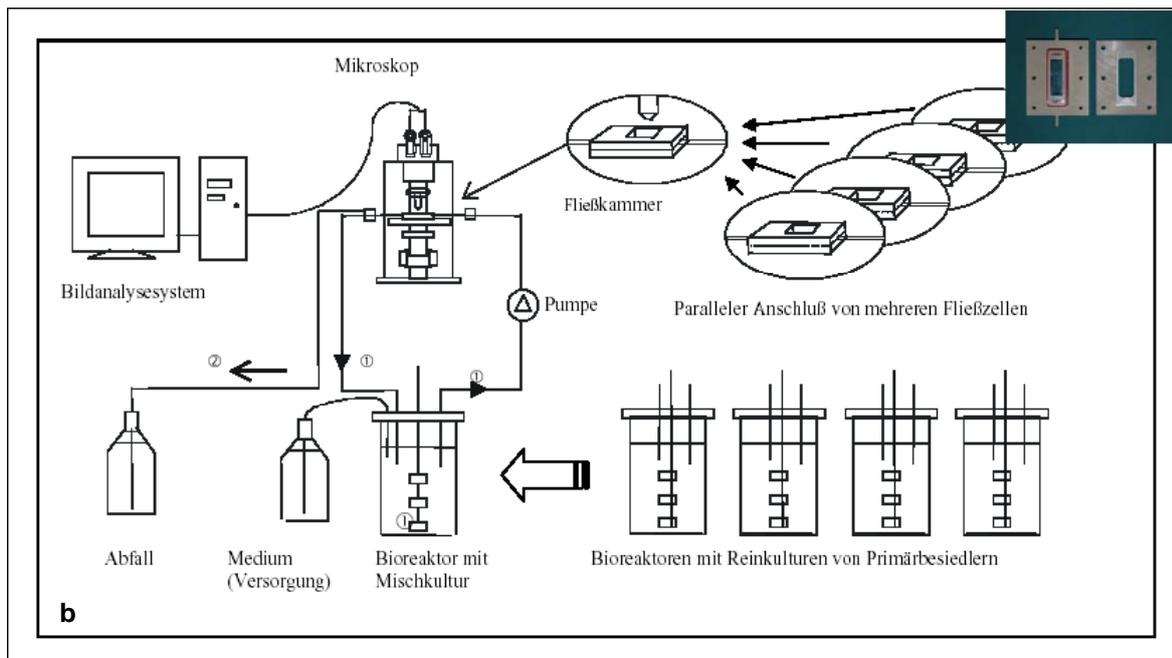


Abb. 24: Messplatz zur Durchführung der dynamischen Bioadhäsionsprüfung im Gewässermonitoring  
 a) Messplatz für Bioadhäsionsprüfungen  
 b) schematische Darstellung

Mit dem Ziel das Strömungsverhalten im Fließkanal zu beurteilen, wurde ein CAD-Modell des Kanals erstellt und die Strömung numerisch simuliert. Die nachfolgende Abbildung 25 zeigt neben dem entstandenen Modell zusätzlich die Strömungsgeschwindigkeit des Wassers in der Fließzelle bei einem Volumenstrom von 3 ml/min. Die Darstellung der Strömung (Schnitt in der Mitte des Kanals) unterstreicht die Realisierung einer laminaren Strömung über den gesamten Probenraum. Die Konstruktion des Fließkanals insbesondere die Verbindungselemente zum Schlauchsystem lassen keine Verwirbelung des Mediums entstehen. Für die Mitte des Fließkanals wird eine maximale Geschwindigkeit von ca. 4,4 mm/s erreicht.

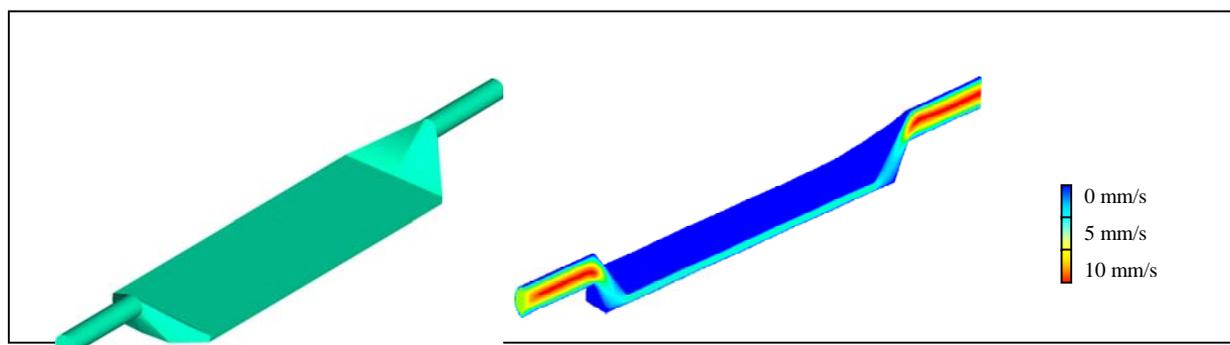


Abb. 25: CAD-Modell des Fließkanals und Darstellung der Strömungsgeschwindigkeit

### 3.4.2.2 Bioadhäsionsprüfung mit dem Infektionsmodell

Entsprechende Voruntersuchungen an unbeschichteten und lipidierten Oberflächen erfolgten mit dem Infektionsmodell (analog der unter 3.4.2.1. dargestellten *in vitro* – Messung) im statischen Modus. Die initiale Konzentration der eingesetzten Keime betrug hierfür  $10^8$  Keime / ml. Die Multiwellplatten wurden entsprechend der Applikation bei 37°C inkubiert. Die Auswertung dieser Messungen erfolgte ebenfalls an 5 Parallelen in dreifacher Wiederholung.

Im Rahmen der dynamischen *in vitro* Bioadhäsionsprüfung wurde eine spezifische Vorschrift entsprechend der peritonealen Dialyse entwickelt, um möglichst physiologisch relevante Messbedingungen zu erhalten. Dabei wurde von einer 120-minütigen Ansiedlungsphase (Seedphase) ausgegangen, gefolgt von einer 20-stündigen Proliferationsphase (Feedphase). Nachdem in der Seedphase die primäre Adhäsion der Bakterien initiiert wurde, erfolgte während der zweiten Phase allein die Proliferation der adhären Organismen, da hier allein mit Medium gespült wurde. Dieser Ablauf entspricht einem üblichen Dialysevorgang. Dem Setzen des Katheters, welcher naturgemäß mit möglichen Infektionskeimen besiedelt ist, folgt ein Zeitraum des direkten Kontaktes mit der Dialyseflüssigkeit im Bauchraum. Erst nach einer definierten Dialysedauer wird die Katheteroberfläche gespült. Diesem Prozess soll die Kombination aus Seed- und Feedphase der Messung folgen. Die Geschwindigkeit zwischen den Spülgängen beträgt 0,5ml / min.

Die Aufnahme der Adhäsion einer Mischkultur mit einer Gesamtkeimzahl von  $10^8$  Keimen / ml (*S. aureus*, *S. epidermidis* 50:50) unter dynamischen Bedingungen erfolgte wiederum in vier parallelen Plattenfließkammern. Die Zellzahl anhaftender Mikroorganismen wurde an 5 Positionen im Fließkanal mittels CLSM quantifiziert, verbunden mit einer Visualisierung über eine Vitalfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff BacLight®. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse wurde mit einem Leica-Messplatz verwirklicht (siehe Abbildung 26). Im dynamischen Modus wurde ebenfalls je Modifizierung die Prüfung dreifach in voneinander unabhängigen Ansätzen der Kultur durchgeführt.



Abb. 26: Bioadhäsionsmessplatz mit Fluoreszenzmikroskop

### 3.4.3 Feldtest

Die Durchführung praxisrelevanter Feldtests im Bereich des Gewässermonitorings oblag im Rahmen einer Forschungs Kooperation der Fa. 4H Jena Engineering GmbH. [225] Der Feldtest konnte aufgrund guter Witterungsverhältnisse in einem Zeitraum mit noch relativ hoher biologischer Aktivität in den Monaten September / Oktober 2004 durchgeführt werden. Hierfür wurden Proben in Objektträgergeometrie an Stellen eingebracht, an denen auch die *in situ*-Messtechnik zum Einsatz kommt. Als Testfeld diente die Trinkwassertalsperre Neustadt / Thüringen. Je Modifizierung wurden 2 Parallelen und eine unbeschichtete Referenz in die Freiwasserzone zwischen Staumauer und Entnahmeturm eingebracht. Die Eintauchtiefe lag bei 2 m unter der Wasseroberfläche. Die Testdauer betrug 7 Wochen. Die Auswertung erfolgte nach Probenbergung unter Anwendung eines Softwaregestützten Videoinspektionssystems visuell. Neben den beschichteten Modellproben in Objektträgerformat wurden zusätzlich Modellplättchen aus Edelstahl und Silikon geprüft. Zusätzlich wurden erstmals lipidbeschichtete Sensoren – pH-Sonden und Sauerstoffelektroden – sowie Fasermesssonden für die laserinduzierte Fluoreszenzspektroskopie eingebracht.

Durch die Forschungskoooperation mit der Sensortechnik Meinsberg GmbH wurden weitere Feldtests in einem Belebbecke der kommunalen Kläranlage Döbeln-Technitz ermöglicht [225]. Diese Langzeituntersuchungen in einem Gewässer mit hohem Potenzial zur Bildung biologisch verursachter Beläge wurden in Eintaucharmaturen an herkömmlichen, unbeschichteten und lipidierten pH-Messelektroden und Sauerstoffsensoren realisiert.

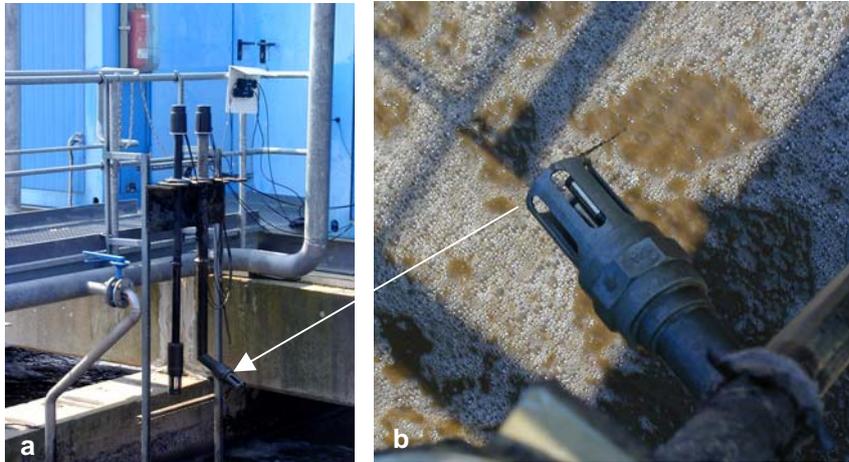


Abb. 27: Feldtest in einer kommunalen Kläranlage  
a) Position in der Anlage, b) Eintaucharmatur

### 3.5 Funktionalitätstests

Parallel zur Schichtcharakterisierung und Bioadhäsionsprüfung stand die Bewertung der bestehenden Funktionalität bezüglich der optischen und elektrochemischen Eigenschaften im Mittelpunkt sowie die Prüfung, inwieweit wesentliche Funktionsparameter der zu beschichtenden Oberflächen beeinträchtigt werden können. Die Funktionsprüfung schloss eine speziell für die medizinische Applikation wichtige Prüfung der Sterilisationsstabilität und Biokompatibilität der Tetraetherlipidschichten ein.

#### 3.5.1 Optische Funktionalität

Die optische Schichtcharakterisierung wurde im Rahmen einer Forschungskoooperation durch die Fa. Innovative Optische Messtechnik GmbH in Berlin durchgeführt.

Ausgangspunkt für das Verständnis der optischen Eigenschaften der Tetraetherlipidschichten war die Charakterisierung der Absorptions- und Transmissionseigenschaften, wobei im Hinblick auf die spätere Applikation an faseroptischen Sonden insbesondere der UV- und der sichtbare Spektralbereich von Interesse waren. Die unmodifizierten Tetraetherlipidproben auf Objektträgern aus Quarzglas wurden mit einem Zweistrahl-Spektralphotometer (uv-2102 PC, Shimadzu, Japan) vermessen. Der untersuchte Spektralbereich lag zwischen 300 und 800 nm. Im Referenzstrahlengang des Spektrometers befand sich jeweils ein unbeschichteter Referenzobjektträger. Da die durchstrahlte Probenfläche einen Querschnitt von ca.  $5 \times 2 \text{ mm}^2$  aufweist, entspricht das Messergebnis einem Mittelwert bezogen auf diese Fläche.

Eine zweite optische Charakterisierung bestand in der visuellen Bewertung der Fluoreszenzeigenschaften der Beschichtungen, welche mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert S100, mit AxioCam Farb-CCD-Kamera, Zeiss) durchgeführt wurden. Die Anregungswellenlänge betrug 365 nm. Die Fluoreszenz wurde nach einem Blockungsfiler (GG 450, Schott) breitbandig detektiert.

### 3.5.2 Elektrochemische Funktionalität

Die Untersuchung der elektrochemischen Funktionalität erfolgte bei der Fa. Sensortechnik Meinsberg GmbH. Im Mittelpunkt dessen stand eine pH-Messelektrode.

Zur Charakterisierung der Schichten wurden die funktionsbestimmende Parameter definiert: Betriebswiderstand, pH-Sensitivität, Asymmetriepotenzial. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde beurteilt, ob und wie die Modifizierungen die Eigenschaften der sensitiven Substratmaterialien beeinflussen. Ein möglichst geringer, unbedingt aber kalibrierbarer Einfluss stellte dabei die Zielfunktion dar. Es standen Musterelektroden für die Messung zur Verfügung. Die Messungen an lipidierten pH-Messelektroden und unbeschichteten Vergleichselektroden beinhalteten die Bestimmung der Elektrodenparameter: Potenzial bei pH 4 und pH 7, Membranwiderstand, Steilheit und dem pH-Wert des Kettennullpunktes nach 24 h im Messelektrolyten.

### 3.5.3 Biokompatibilitätsprüfung

Das Labor für Medizinprodukteprüfung (BMP Aachen GmbH) führte Biokompatibilitätsuntersuchungen durch. Diese beinhalteten sowohl die Zytotoxizitätsprüfung als auch einen Hämokompatibilitätstest und entsprachen bzw. orientierten sich an der DIN EN ISO 10993.

Zytotoxizität ist die Eigenschaft von Stoffen, Gewebezellen zu schädigen. Die Zytotoxizitätsprüfung umfasste in dieser Arbeit einen Test im direkten Kontakt des zu testenden Materials mit Fibroblasten sowie einen Test im indirekten Kontakt mit diesen Gewebezellen. Für die Prüfung im indirekten Kontakt mit dem Material wurden die Proben im Zellenkulturmedium über 72 Stunden in 37°C extrahiert. Anschließend wurde der Extrakt mit Fibroblasten über 24 Stunden inkubiert. Zur Bewertung konnte der Einfluss auf die mitochondriale Aktivität der Zellen bestimmt werden. Die negative Kontrolle war das Medium ohne Kontakt mit der Probe. Eine Verdünnung des Vinylalkohols (20 % (96 %) v/v) wurde als die positive Kontrolle verwendet. Für die direkten Untersuchungen wurden auf den Proben über 24 Stunden inkubiert, um den Einfluss auf die Membranintegrität zu bestimmen. Die negative Kontrolle war hier ein PTFE-Film, als positive Kontrolle diente eine PVC-Probe.

Die Hämokompatibilitätsprüfung erlaubt eine Aussage über die Blutverträglichkeit des Materials. Um die Hämokompatibilität zu untersuchen, wurden die Proben mit dem menschlichen Vollblut und Blutbestandteilen unter statischen Bedingungen (ohne Medienbewegung) bei 37°C inkubiert. Die Bestimmung der Hämokompatibilität basierte auf (i) der quantitativen Einschätzung der geänderten Zellzahlen, (ii) der Gerinnungs- oder Koagulationsaktivierung und (iii) der Hämolyse (Zerstörung roter Blutkörperchen). Es diente Glas als positive Kontrolle und PTFE als negative Kontrolle.

Die Untersuchung der Genotoxizität stellt die dritte *in vitro*-Biokompatibilitätsprüfung an den modifizierten Silikonproben dar. Dieses Prüfverfahren erkennt in einem ersten Schritt Genmutationen bakterieller Keime, d.h. Veränderungen der Chromosomenstruktur, hervorgerufen durch die zu testenden modifizierten Silikonoberflächen. Als Testorganismus diente hier *S. typhimurium*.

Die Biokompatibilitätsprüfung wurde zusätzlich durch die Realisierung eines Implantationsrestes als *in vivo*-Testverfahren ergänzt. Die modifizierten Silikonproben wurden dazu extrahiert und das Extrakt in das Muskelgewebe von Kaninchen implantiert. Nach dem Ablauf von 7 und 28 Tagen erfolgte die Beurteilung lokaler toxischer Effekte unter Anwendung der Histopathologie.

## 3.6 Statistik

Die Messwerte wurden sowohl mit deskriptiver Statistik als auch über Varianzanalyse bewertet. Dabei kamen neben dem Box-Whisker-Plot der Student-t-Test und die ANOVA-Analyse zur Anwendung.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Nachweis der Beschichtung

Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis der erfolgreichen Immobilisierung des Tetraetherlipids wird am Beispiel des unmodifizierten Tetraetherlipids verdeutlicht. Die Abbildung 28 zeigt im Vergleich die Aufnahme des unbeschichteten fluoreszenzmarkierten Glases und der Probe B33 TL.

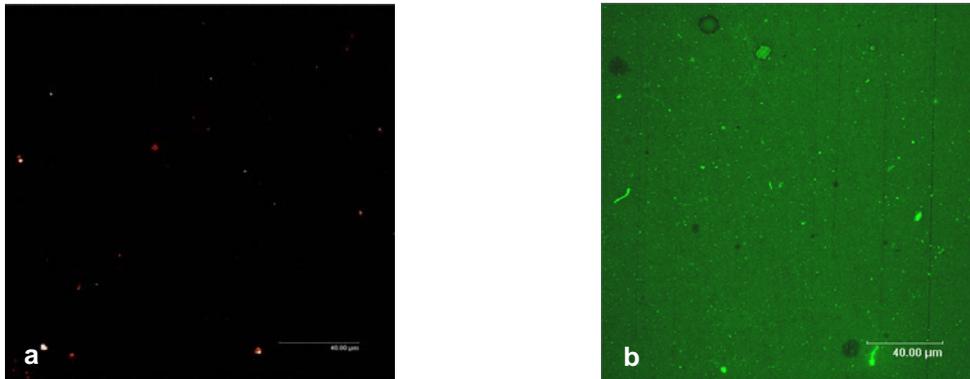


Abb. 28: CLSM-Aufnahme (Fluoreszenzmarker: DiO<sub>18</sub>)

a) Borofloat B33 (helle Punkte → Staubpartikel), b) B33 TL (Adsorbate und Verunreinigungen sichtbar)

Die Darstellung demonstriert die erreichte Homogenität der Tetraetherlipidbeschichtung. Anhand der nachfolgenden Abbildung 29 ist zusätzlich festzustellen, dass die nachträgliche Modifizierung der Kopfgruppen des Lipids diese Qualität nicht wesentlich negativ beeinflusst. Eine vollständige Beschichtung der Glasoberfläche mit Strukturierungen konnte nachgewiesen werden.

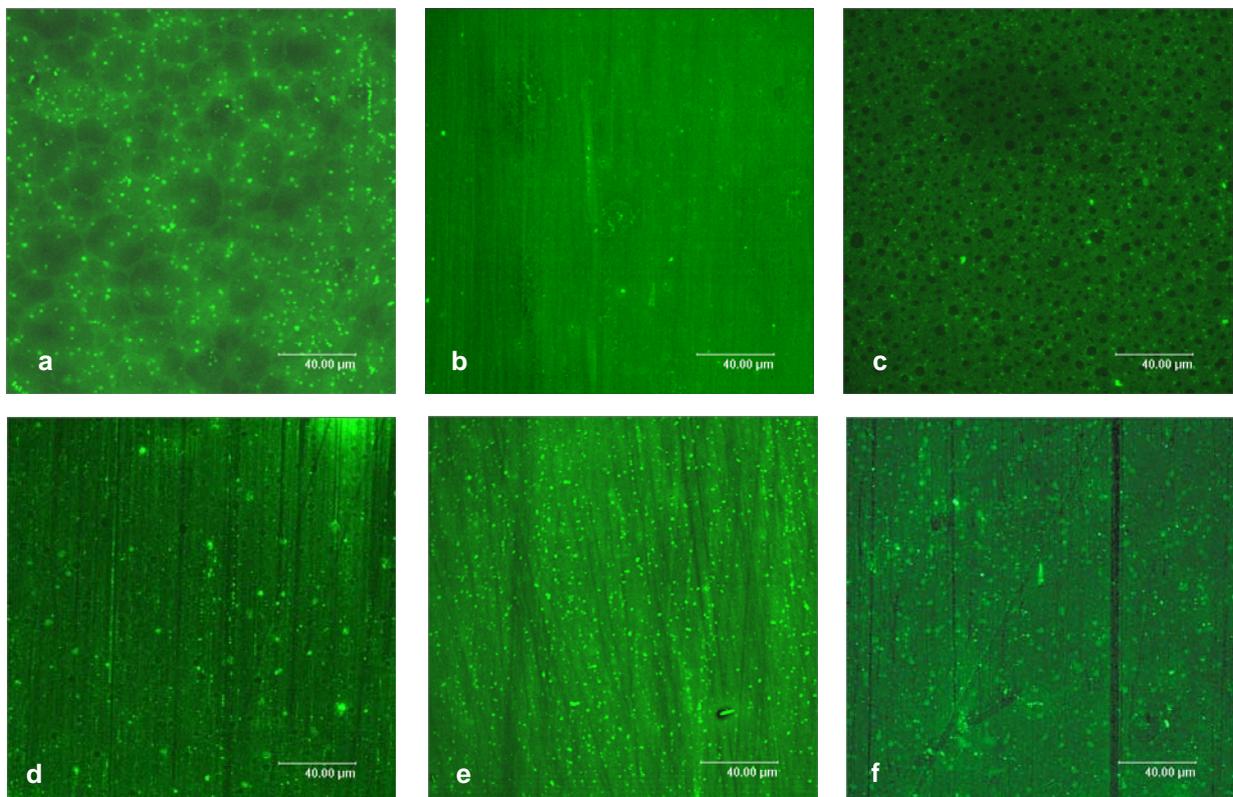


Abb. 29: CLSM-Aufnahmen modifizierter Proben (Bezeichnung aus Tab. 4)

a) TL negativ, b) TL PEG, c) TL PC, d) TL positiv, e) TL CF, f) TL Kombi

Die Abbildung verdeutlicht zudem, dass die Modifizierung des Tetraetherlipids mit unterschiedlichen Funktionsmolekülen zu regelmäßigen aber verschiedenartigen Schichtstrukturen führte. Dabei offenbart die Probe TL PEG eine homogene Schichtqualität, welche mit der unmodifizierten Lipidschicht vergleichbar ist. Die Aufnahme der Probe TL negativ zeigt wolkenartige Schichtstrukturen mit punktförmigen Lipidclustern, deren Durchmesser bei einigen Mikrometern liegt. Derartige punktförmige Agglomerate werden ebenfalls auf den Proben TL CF und TL Kombi sichtbar. Auf der Probe TL PC erkennt man regelmäßig angeordnete „Löcher“ in der Lipidschicht mit einem Durchmesser von 2 – 5  $\mu\text{m}$ . Diese Defekte tauchen vereinzelt auch bei der Probe TL positiv auf, jedoch parallel zu runden Lipidclustern in analoger Größenordnung. Zusätzlich werden z.T. durch das Probenhandling entstandene Schichtdefekte z.B. Kratzer sowie adsorbierte Verunreinigungen sichtbar.

Die AFM-Analyse unterstreicht die homogene Beschichtung der Glasoberfläche mit einem monomolekularen Tetraetherlipidfilm (Abbildung 30). Speziell die topografische Aufnahme eines Bereiches von 4 x 4  $\mu\text{m}$  zeigt eine gleichförmige Beschichtung mit einer Höhe von einigen Nanometern.

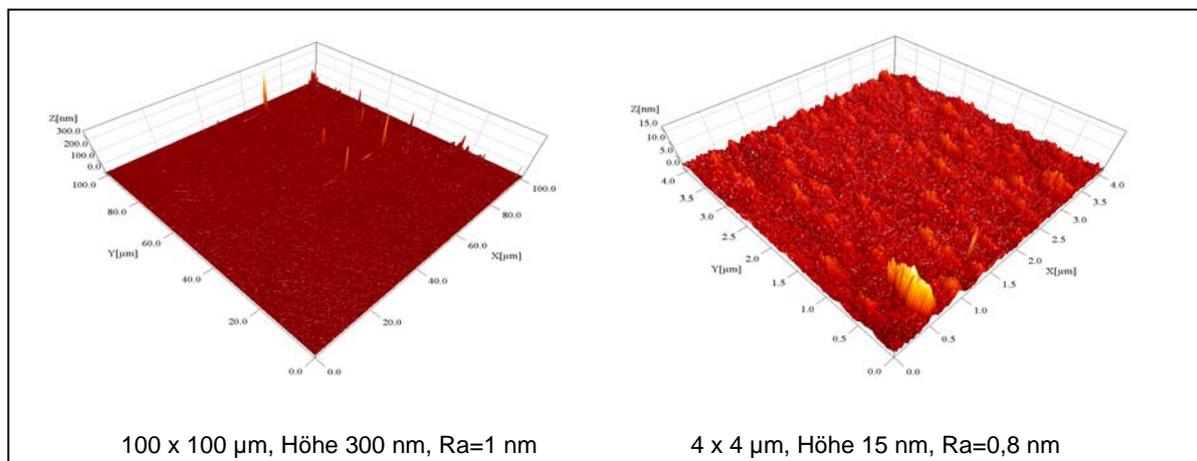


Abb. 30: AFM-Aufnahmen der Tetraetherlipidschicht, Substrat B33,

Unter Beachtung des Quellverhaltens von Silikon in organischen Lösungsmitteln wurde die Beschichtung in den Lösungsmitteln (Chloroform, Aceton, Methanol) getestet. Die erfolgreichste Beschichtung, verbunden mit einem geringen Angriff der Silikonoberfläche, konnte mit Aceton erreicht werden. Infolge der Präaktivierung in aggressiven Lösungsmitteln wird die Oberfläche des Silikons zusätzlich aufgeraut, wie die erweiterte Höhenscala der AFM-Aufnahme von 100 x 100  $\mu\text{m}$  im Vergleich zum unmodifiziertem Silikon zeigt (Abbildungen 31 und 32). Im nanoskaligen Bereich, welchen die Lipidschicht abdecken sollte, werden keine wesentlichen Unterschiede durch die Beschichtung sichtbar.

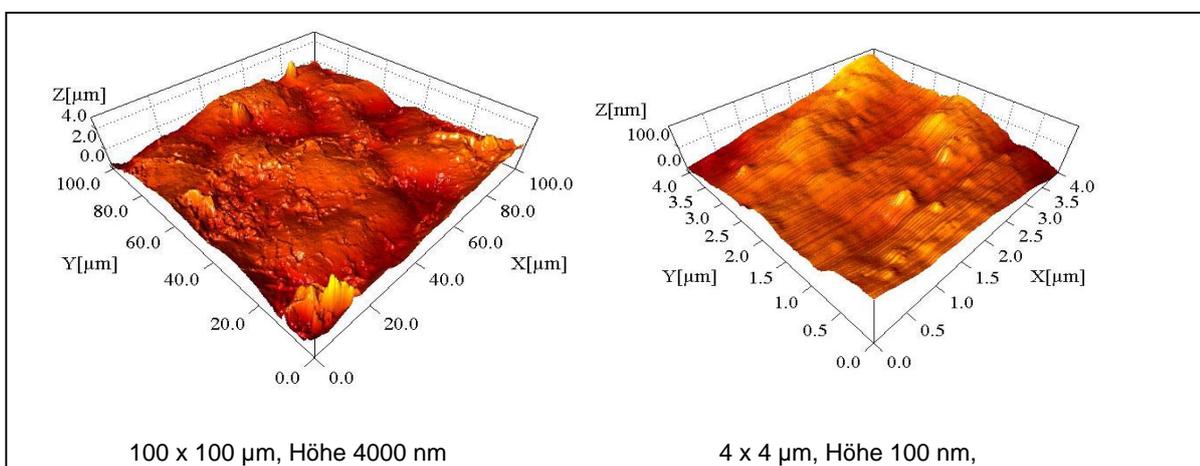


Abb. 31: AFM-Aufnahmen des unbeschichteten Silikon

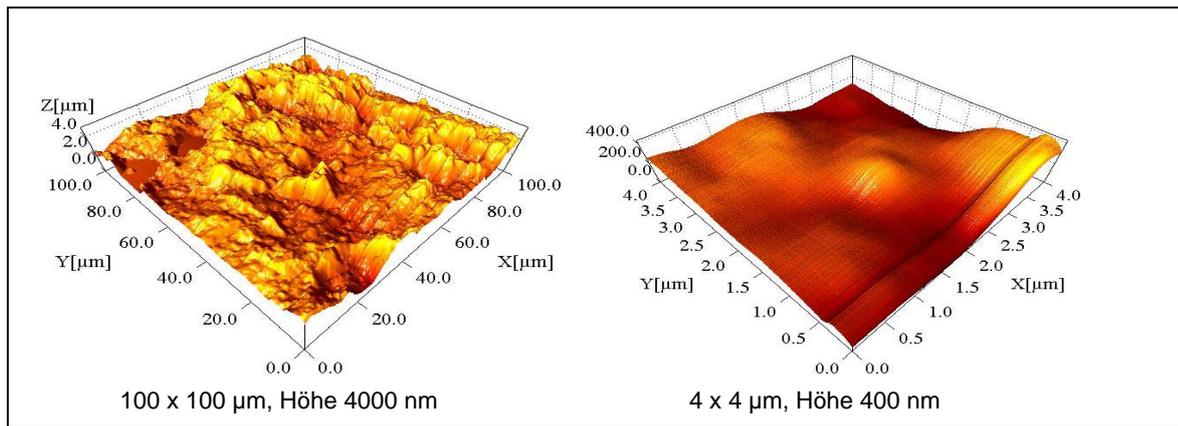


Abb. 32: AFM-Aufnahmen der Tetraetherlipidschicht, Substrat Silikon

Im Vergleich mit der beschichteten Glasoberfläche wird deutlich, dass auf dem Silikon aufgrund der hohen Rauigkeit des Materials eine Beschichtung mit mehreren Lipid-„Inseln“ erreicht wurde. Dies unterstreichen die CLSM-Aufnahmen in Abbildung 33. Infolgedessen steht für die nachfolgende Funktionalisierung eine geringere aber ausreichende Anzahl aktivierter Kopfgruppen zur Verfügung.

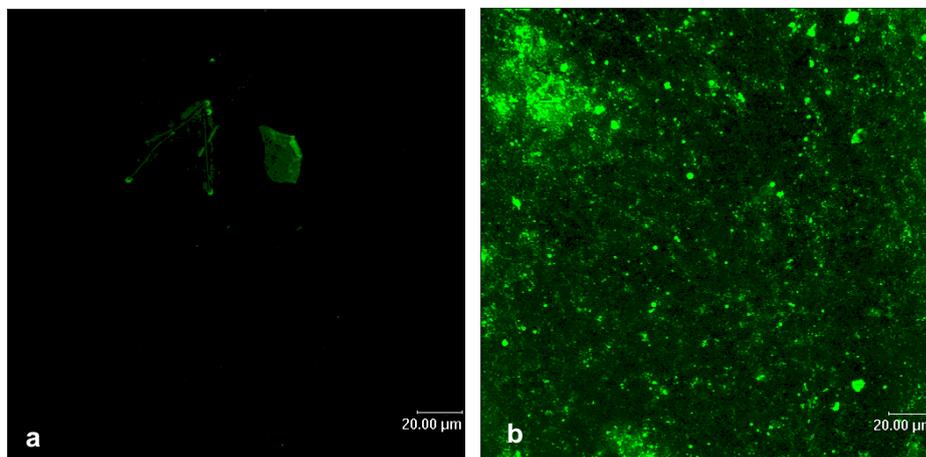


Abb. 33: CLSM-Aufnahmen der Tetraetherlipidschicht, Substrat: Silikon, Fluoreszenzmarker: DiO<sub>18</sub>  
a) Raumedic SIK, b) SIK TL

## 4.2 Energetische, elektrokinetische und mikroskopische Charakterisierung

### 4.2.1 Charakterisierung der Tetraetherlipidschichten

Es werden die Ergebnisse der physikochemischen Oberflächencharakterisierung der Tetraetherlipidschichten zusammengefasst. Die Parameter werden generell zusammen mit den Ergebnissen der Signifikanzprüfung in Bezug auf die unbeschichtete Probe B33 bzw. SIK oder die unmodifizierte Tetraetherlipidschicht TL präsentiert. Dabei verweist das Pluszeichen auf einen signifikanten Unterschied. Die Bezeichnung entspricht der in der Tabelle 4 vorgestellten Modifikation.

Die Tabelle 8 beinhaltet die Wasserkontaktwinkel, gemessen an lipidbeschichteten Referenzgläsern, und die darauffolgende Tabelle 9 die Ergebnisse der lipidierten Silikonproben.

Tab. 8: Wasserkontaktwinkel, Substrat: B33  
(Standardabweichung SA) (Signifikanzintervall  $p=0,05$ )

	<i>KW Wasser</i> [°]	<i>SA</i> [°]	<i>Signifikanz</i> <i>zu B33</i>	<i>Signifikanz</i> <i>zu TL</i>
<b>B33</b>	14,3	2,2		+
<b>TL</b>	77,8	0,5	+	
<b>TL PEG</b>	73,1	2,4	+	+
<b>TL CF</b>	77,7	1,9	+	-
<b>TL negativ</b>	68,1	1,5	+	+
<b>TL positiv</b>	74,6	1	+	+
<b>TL PC</b>	60,6	1,1	+	+
<b>TL Kombi</b>	54	2	+	+

Tab. 9: Wasserkontaktwinkel, Substrat: SIK  
(Standardabweichung SA) (Signifikanzintervall  $p=0,05$ )

	<i>KW Wasser</i> [°]	<i>SA</i> [°]	<i>Signifikanz</i> <i>zu SIK</i>	<i>Signifikanz</i> <i>zu SIK TL</i>
<b>SIK</b>	120,8	1,5		+
<b>SIK TL</b>	103,5	3,7	+	
<b>SIK TL PEG</b>	107	6,5	+	-
<b>SIK TL CF</b>	118,5	0,7	-	+
<b>SIK TL negativ</b>	107,9	4,4	+	-
<b>SIK TL positiv</b>	101,5	3,1	+	-
<b>SIK TL Kombi</b>	103,6	7	+	-

Die raue Oberfläche des kommerziellen Silikons führte zu höheren Standardabweichungen in der Messung der Wasserkontaktwinkel. Aufgrund der Lipidierung der Oberfläche wurde die hochenergetische Oberfläche des Borosilikatglases stärker hydrophob. Demgegenüber führte die Beschichtung des Silikons zu einer Verringerung des Kontaktwinkels um bis zu 19°, wobei die absoluten Werte der dichten Lipidschichten auf Glas von 54°–78° nicht erreicht wurden.

Die Oberflächenspannungen, kalkuliert mit der Methode nach Owens/Wendt, werden in den nachfolgenden Tabellen gemeinsam mit der Polarität für die lipiderten Glas- und die beschichteten Silikonproben zusammengefasst. Aufgrund der graphischen Ermittlung der energetischen Oberflächenparameter (Darstellung über 4 Messlösungen mit unterschiedlichen Standardabweichungen) wurde die Standardabweichung anhand der höchstmöglichen Abweichung der Regressionsgeraden ermittelt.

Für alle dargestellten Oberflächenspannungen sowie ihre polaren und dispersen Komponenten liegt die höchstmögliche Abweichung bei < 2mN/m. Zur Kalkulation der Signifikanzintervalle wurde die Gauß'sche Verteilungsregel zugrunde gelegt.

Tab. 10: Oberflächenspannung (OS) und Polarität , Substrat: B33  
(Signifikanzintervall  $p=0,05$ )

	OS [mN/m]	Signifikanz zu B33	Signifikanz zu TL	Polarität [%]	Signifikanz zu B33	Signifikanz zu TL
<b>B33</b>	61,5		+	44,1		+
<b>TL</b>	40,3	+		4,22	+	
<b>TL PEG</b>	43,3	+	-	9,7	+	-
<b>TL CF</b>	43,5	+	-	8	+	-
<b>TL negativ</b>	43,2	+	-	9,3	+	-
<b>TL positiv</b>	45,2	+	+	13	+	+
<b>TL PC</b>	49,5	+	+	21,6	+	+
<b>TL Kombi</b>	48,7	+	+	15,2	+	+

Tab. 11: Oberflächenspannung (OS) und Polarität , Substrat: SIK  
(Signifikanzintervall  $p=0,05$ )

	OS [mN/m]	Signifikanz zu SIK	Signifikanz zu SIK TL	Polarität [%]	Signifikanz zu SIK	Signifikanz zu SIK TL
<b>SIK</b>	9,4		-	4,7		-
<b>SIK TL</b>	7,6	-		3,8	-	
<b>SIK TL PEG</b>	8,3	-	-	1,9	-	-
<b>SIK TL CF</b>	7,5	-	-	6,8	-	-
<b>SIK TL negativ</b>	7,6	-	-	2,3	-	-
<b>SIK TL positiv</b>	7,5	-	-	7	-	-
<b>SIK TL Kombi</b>	8,6	-	-	8,6	-	-

Insgesamt liegen die Oberflächenspannungswerte in den erwarteten Bereichen der hochenergetischen Oberflächen des Glases sowie der stark niederenergetischen Ergebnisse für das Silikon. Die Funktionalisierung der zweiten Kopfgruppe des Lipids führte jedoch nur zu einer geringen Parametervariation. Dennoch wurden für die Modifikationen auf Glas: TL positiv, TL PC und TL Kombi signifikante Differenzen zur unmodifizierten Lipidbeschichtung sowohl bezüglich der Oberflächenspannung als auch im Hinblick auf die Polarität der Oberfläche ermittelt.

Kritisch zu bewerten ist, dass die Beschichtung und die Funktionalisierung des polymeren Substratwerkstoffes zu keinen signifikanten Unterschieden in der Oberflächenspannung und Polarität führen. Die dargestellten Differenzen im Wasserkontaktwinkel (Tabelle 9) schlagen sich nicht nieder.

Die Ergebnisse der elektrokinetischen Oberflächenanalyse an den lipidierten Probenoberflächen werden zum einen in Form des Zetapotenzial/pH-Wert-Verlaufes dargestellt (Abbildung 34, 35). Die Tabellen enthalten die Zetapotenziale am physiologischen pH-Wert 7 und den graphisch ermittelten IEP.

Die Standardabweichung (SA) der einzelnen Messpunkte liegt in einer dem Zetapotenzial bei pH 7 entsprechenden Größenordnung von 1 – 4 mV. Zur Kalkulation der Signifikanzintervalle des IEP wurde die Gauß'sche Verteilungsregel zugrunde gelegt.

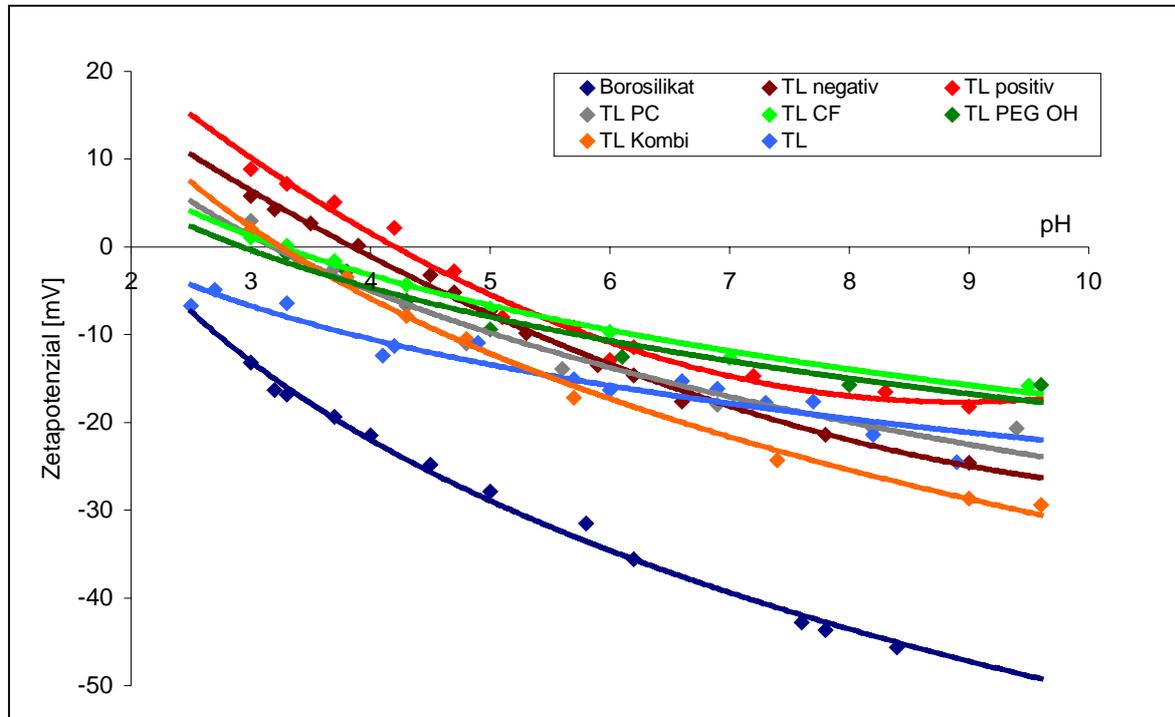


Abb. 34 : Zetapotenzial / pH-Wert-Verlauf, Substrat: B33

Tab. 12: Zetapotenzial (ZP) bei pH 7 und IEP, Substrat: B33  
(Signifikanzintervall  $p = 0,05$ )

	ZP [mV]	SA [mV]	Signifikanz zu B33	Signifikanz zu TL	IEP	Signifikanz zu B33	Signifikanz zu TL
<b>B33</b>	-39,2	2,5			1,7		-
<b>TL</b>	-16,2	1,1	+		2	-	
<b>TL PEG</b>	-13,1	3	+	-	3	+	+
<b>TL CF</b>	-12,7	1,2	+	+	3,3	+	+
<b>TL negativ</b>	-18,1	1,2	+	-	3,8	+	+
<b>TL positiv</b>	-14,7	2,1	+	-	4,3	+	+
<b>TL PC</b>	-18	2,9	+	-	3,2	+	+
<b>TL Kombi</b>	-28,7	2,6	+	+	3,3	+	+

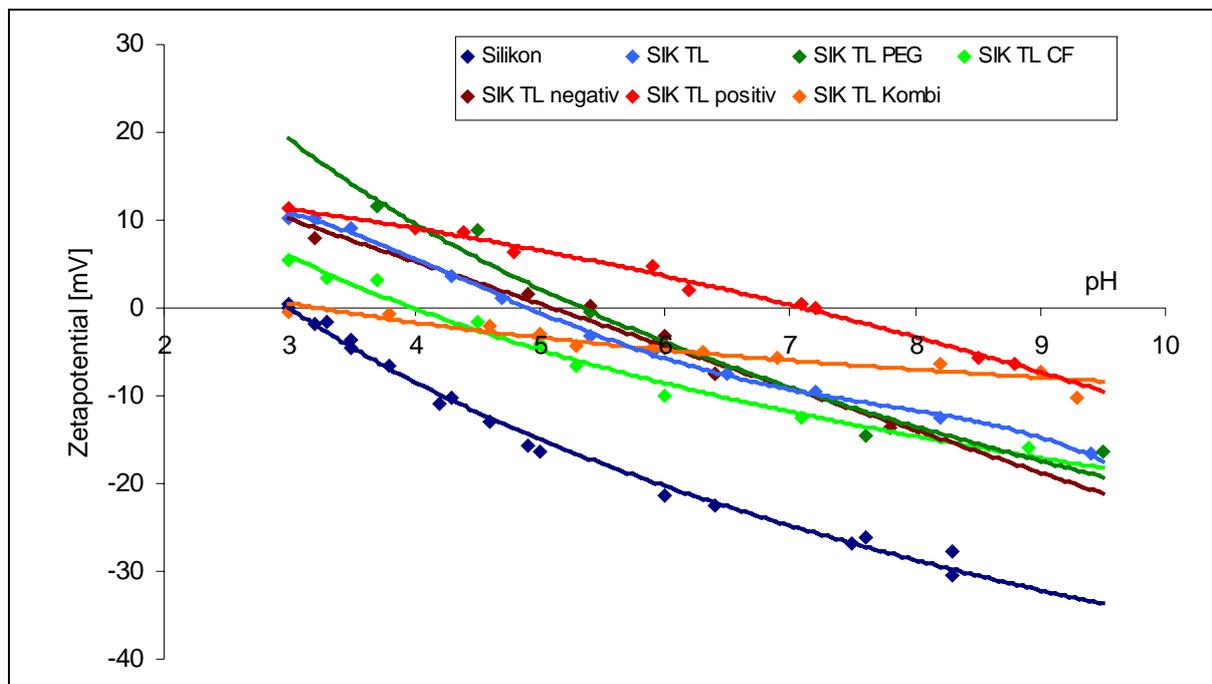


Abb. 35: Zetapotenzial / pH-Wert-Verlauf, Substrat: SIK

Tab. 13: Zetapotenzial (ZP) bei pH 7 und IEP, Substrat: SIK  
(Signifikanzintervall  $p=0,05$ )

	ZP [mV]	SA [mV]	Signifikanz zu SIK	Signifikanz zu SIK TL	IEP	Signifikanz zu SIK	Signifikanz zu SIK TL
<b>SIK</b>	-25	4		+	3		+
<b>SIK TL</b>	-8,5	1,3	+		4,8	+	
<b>SIK TL PEG</b>	-11,1	2,9	+	-	5,4	+	-
<b>SIK TL CF</b>	-12,1	3,1	+	-	4	+	-
<b>SIK TL negativ</b>	-10,3	2,4	+	-	4,8	+	-
<b>SIK TL positiv</b>	0,2	1,2	+	+	7,2	+	+
<b>SIK TL Kombi</b>	-5,7	2,2	+	-	3	+	+

Beide unmodifizierten Materialien zeigen stärker negativ geladene Oberflächen im Vergleich zu den lipidieren und funktionalisierten Oberflächen. Die Lipidierung der unbeschichteten Substrate führte immer zu einer signifikanten Nivellierung der elektrokinetischen Potentiale. Es werden Zetapotenziale im negativen Bereich von wenigen Millivolt, aber auch gering positive Werte um 0 mV erreicht. Die anschließende Kopplung von Funktionsmolekülen führte vor allem bezüglich des IEP zu signifikanten Differenzen, was der geänderte Verlauf der Zetapotenzial/pH-Kurven zum Ausdruck bringt.

#### 4.2.2 Charakterisierung der biologischen Systeme

Die Ergebnisse der physikochemischen Charakterisierung der biologischen Systeme fasst neben den Werten des Oberflächenpotentials und IEP, des Wasserkontaktwinkels, der Oberflächenspannung und Polarität zusätzlich die Größen der Mikroorganismen allein und mit ihrer Schleimhülle zusammen.

Der Messwertbereich überstreicht einen ausgedehnteren Bereich im Vergleich zu den Messreihen an der Festkörperoberfläche, was auf die komplexere Präparation der nativen biologischen Substrate für die jeweilige Messung zurückgeführt wird.

Zunächst werden in der Tabelle 14 die Ergebnisse der Charakterisierung der Primärbesiedler aus den definierten Applikationswässern zusammengefasst. Grundsätzlich liegen die ermittelten Ergebnisse für alle Parameter in einer Größenordnung, wie sie in der Literatur angegeben wird. Es werden deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Mikroorganismen in jedem der Wässer erkennbar. Die größte Zahl der Stämme (FW 2.5, FW 5.7, FW 8.5, TW 9.2, TW 9.5, TW 9.12, AW 7.12 und AW 7.25) zeigt beispielsweise einen hydrophilen Charakter. Weitere fünf Stämme (FW 3.5, FW 4.1, TW 9.7 und TW 9.12) sind moderat hydrophil. Zwei Abwasserorganismen (AW 6.2 und AW 6.7) zeigen hydrophobe Eigenschaften. Die Tabelle 15 beinhaltet die Ergebnisse der Messreihen an den beiden Infektionskeimen. Auch die Staphylokokken zeigen insbesondere in ihrem Zetapotenzial einen signifikanten Unterschied untereinander. Bezüglich der energetischen Parameter wie Oberflächenspannung und Polarität sind nur geringe Differenzen erkennbar.

Tab. 14: Charakterisierung der Primärbesiedler

Zetapotenzial (ZP) bei pH 7 (SA ca. 5 mV) und IEP (SA ca. 0,5)

Wasserkontaktwinkel (SA ca. 2°)

Oberflächenspannung (SA ca. 2 mN/m) und Polarität (SA ca. 5%)

mittlerer Durchmesser der Bakterien mit und ohne EPS (SA ca. 5%)

	<b>Stamm</b>	<b>ZP [mV]</b>	<b>IEP</b>	<b>KW Wasser [°]</b>	<b>OS [mN/m]</b>	<b>Polarität [%]</b>	<b>Bakterium [µm]</b>	<b>EPS [µm]</b>
<b>Flusswasser</b>	<b>2.5</b>	-14	3	7,8	66,9	82,4	2,1	9,8
	<b>3.5</b>	-23,8	2,5	20,4	62,4	82,7	1,5	10,5
	<b>4.1</b>	-41,1	2	18,1	59,6	71,5	0,5	5,7
	<b>5.7</b>	-35,5	3,7	11	59,7	56,7	1,7	5,6
	<b>8.5</b>	-33,4	2	21,2	63,4	85,4	0,4	9,2
<b>Trinkwasser</b>	<b>9.2</b>	-14,5	4,8	10,5	69,6	87,9	3	11,4
	<b>9.5</b>	-12,4	4,6	5,5	62,2	61,3	1,2	17,6
	<b>9.7</b>	-59,1	3,5	36,2	48,1	40,2	0,8	9,6
	<b>9.10</b>	-47,5	2	18,7	59,1	53,5	2,1	7,8
	<b>9.12</b>	-32,5	2,1	12,7	62,1	72,9	0,4	7,0
<b>Abwasser</b>	<b>6.2</b>	-26,8	4,2	81,4	36,1	15,6	4	18,8
	<b>6.7</b>	-24,7	4	72,2	24,2	16,2	3	16,5
	<b>6.11</b>	-31,5	3	45,8	43,9	67,4	3,5	32,1
	<b>7.12</b>	-5,1	3,8	6,4	60,8	63,2	0,4	11,3
	<b>7.25</b>	-33,4	2,9	12,2	60,8	67,4	0,4	16,6

Tab.15 : Charakterisierung der Infektionskeime

Zetapotenzial (ZP) bei pH 7 (SA ca. 5 mV) und IEP (SA ca. 0,5)  
 Wasserkontaktwinkel (SA ca. 2°)  
 Oberflächenspannung (SA ca. 2 mN/m) und Polarität (SA ca. 5%)  
 mittlerer Durchmesser der Bakterien mit und ohne EPS (SA ca. 5%)

	<b>Stamm</b>	<b>ZP [mV]</b>	<b>IEP</b>	<b>KW Wasser [°]</b>	<b>OS [mN/m]</b>	<b>Polarität [%]</b>	<b>Bakterium [µm]</b>	<b>EPS [µm]</b>
<b>Staphylococcus</b>	<b>epid.</b>	-46,3	2,5	8	63,3	70,5	0,4	9,4
	<b>aureus</b>	-12	3,5	18,5	60,9	73,8	0,5	5,4

### 4.2.3 Charakterisierung der Medien

Die Parameter der untersuchten Medien werden ebenfalls tabellarisch zusammengefasst präsentiert. Die Tabelle 16 beinhaltet neben der Oberflächenspannung der Lösungen und ihrer Polarität ebenfalls die berechnete Ionenstärke.

Tab. 16: Charakterisierung der Medien

Oberflächenspannung (OS), Polarität, Ionenstärke und Debyelänge

	<b>OS [mN/m]</b>	<b>Polarität [%]</b>	<b>Ionenstärke [mol/l]</b>	<b>Debye-Länge [nm]</b>
<b>0,001 M NaCl</b>	72,7	63,3	0,001	9,51
<b>Flusswasser</b>	71,1	62,9	0,0048	4,34
<b>Trinkwasser</b>	68,2	69,4	0,00104	2,94
<b>Abwasser</b>	62,8	52,9	0,007	3,59
<b>PDFL</b>	56,1	58,6	0,144	0,79

## 4.3 Ergebnisse der Bioadhäsionsprüfung

### 4.3.1 Bioadhäsionsprüfung für das Gewässermonitoring

Zu Beginn stellt die nachfolgende Tabelle die Ergebnisse der statischen *in vitro*-Bioadhäsionsprüfung dar. Im statischen Messmodus ohne Strömung des Mediums wurden nach 24 h Inkubationszeit nur marginale Reduzierungen der Bioadhäsion der Flusswasserorganismen ermittelt. Allein die Modifikationen TL PC und TL Kombi führen zu einer drastischeren signifikanten Einschränkung der Bioadhäsion.

Die nachfolgenden Tabellen beinhalten die Ergebnisse der dynamischen *in vitro*-Bioadhäsionsprüfung in den Applikationswässern: Flusswasser, Abwasser und Trinkwasser. Zunächst beginnt die Darstellung der Ergebnisse in Flusswasser, wobei neben der Zellzahl je Fläche nach 5 bzw. 24 h die Signifikanzbetrachtung einbezogen wird. In analoger Form werden die Ergebnisse der dynamischen Messung in Trinkwasser und Abwasser angefügt.

Tab. 17: Zellzahl nach 24 h im statischen Modus in Flusswasser, Substrat: B33

(Standardabweichung SA) (Signifikanzintervall  $p=0,05$ )

	<b>24 h</b> [x/cm <sup>2</sup> ]	<b>SA</b> [x/cm <sup>2</sup> ]	<b>Signifikanz</b> <b>zu B33</b>	<b>Signifikanz</b> <b>zu TL</b>
<b>B33</b>	7.562.201	1.417.031		-
<b>TL</b>	5.604.702	1.050.228	-	
<b>TL PEG</b>	7.572.345	1.418.932	-	-
<b>TL CF</b>	7.191.472	1.276.043	-	-
<b>TL negativ</b>	7.160.850	1.341.825	-	-
<b>TL positiv</b>	6.453.973	1.209.368	-	-
<b>TL PC</b>	4.086.988	765.834	+	-
<b>TL Kombi</b>	4.804.293	900.245	+	-

Tab. 18: Zellzahl nach 5h und 24 h im dynamischen Modus in Flusswasser, Substrat: B33  
(Standardabweichung SA) (Signifikanzintervall  $p=0,05$ )

	<b>5 h</b> [x/cm <sup>2</sup> ]	<b>SA</b> [x/cm <sup>2</sup> ]	<b>Signifikanz</b> <b>zu B33</b>	<b>Signifikanz</b> <b>zu TL</b>	<b>24 h</b> [x/cm <sup>2</sup> ]	<b>SA</b> [x/cm <sup>2</sup> ]	<b>Signifikanz</b> <b>zu B33</b>	<b>Signifikanz</b> <b>zu TL</b>
<b>B33</b>	602.308	30.769		-	3.185.641	200.000		+
<b>TL</b>	616.795	93.590	-		2.269.359	280.769	+	
<b>TL PEG</b>	336.538	173.077	+	+	2.015.256	393.590	+	-
<b>TL CF</b>	480.128	114.103	+	+	2.944.744	375.641	-	+
<b>TL negativ</b>	384.744	200.000	+	+	2.057.051	970.5123	+	-
<b>TL positiv</b>	425.769	180.769	+	+	1.997.564	375.641	+	-
<b>TL PC</b>	504.231	79.487	+	+	2.706.154	396.154	-	+
<b>TL Kombi</b>	518.205	114.103	+	+	2.623.205	266.667	-	-

Tab. 19: Zellzahl nach 5h und 24 h im dynamischen Modus in Trinkwasser, Substrat: B33  
(Standardabweichung SA) (Signifikanzintervall  $p=0,05$ )

	<b>5 h</b> [x/cm <sup>2</sup> ]	<b>SA</b> [x/cm <sup>2</sup> ]	<b>Signifikanz</b> <b>zu B33</b>	<b>Signifikanz</b> <b>zu TL</b>	<b>24 h</b> [x/cm <sup>2</sup> ]	<b>SA</b> [x/cm <sup>2</sup> ]	<b>Signifikanz</b> <b>zu B33</b>	<b>Signifikanz</b> <b>zu TL</b>
<b>B33</b>	1.004.606	698.718		-	2.811.374	1.789.744		+
<b>TL</b>	860.525	244.067	-		1.706.452	347.336	+	
<b>TL PEG</b>	895.617	237.486	-	-	2.306.475	779.941	+	+
<b>TL CF</b>	844.276	199.570	-	-	2.874.512	572.276	-	+
<b>TL negativ</b>	578.587	222.826	+	+	2.302.767	351.858	+	+
<b>TL positiv</b>	650.457	221.452	+	-	1.726.049	369.748	+	-
<b>TL PC</b>	896.248	179.155	-	-	2.375.033	189.151	+	+
<b>TL Kombi</b>	953.491	177.362	-	-	2.314.084	235.136	+	+

Tab. 20: Zellzahl nach 5h und 24 h im dynamischen Modus in Abwasser, Substrat: B33

(Standardabweichung SA) (Signifikanzintervall  $p=0,05$ )

	5 h [x/cm <sup>2</sup> ]	SA [x/cm <sup>2</sup> ]	Signifikanz zu B33	Signifikanz zu TL	24 h [x/cm <sup>2</sup> ]	SA [x/cm <sup>2</sup> ]	Signifikanz zu B33	Signifikanz zu TL
<b>B33</b>	876.410	534.615		-	6.150.128	1.769.487		+
<b>TL</b>	761.410	236.282	-		4.456.410	845.513	+	
<b>TL PEG</b>	1.164.615	317.308	+	+	5.198.974	1.042.692	+	+
<b>TL CF</b>	641.154	372.436	-	-	5.490.000	749.487	+	+
<b>TL negativ</b>	574.872	370.897	+	-	5.080.000	933.461	+	+
<b>TL positiv</b>	863.077	254.231	-	-	4.989.872	493.590	+	-
<b>TL PC</b>	1.035.384	833.974	-	+	5.075.897	539.103	+	+
<b>TL Kombi</b>	681.282	389.744	-	-	5.080.000	1.051.795	+	+

Zusammenfassend zeigt sich tendenziell in allen Applikationswässern die Abnahme der Zellzahlen in Kontakt mit den modifizierten Lipidschichten im Vergleich zum unbeschichteten Glas. Ferner werden Unterschiede zwischen den einzelnen Modifikationen und den drei Wässern deutlich.

Die nachfolgende Abbildung 36 präsentiert beispielhaft Aufnahmen nach 1, 5, 24 h Inkubation. Es sind deutlich mehr adhärenzte Mikroorganismen auf Glas im Abwasser gegenüber dem Flusswasser festzustellen. Dies wird auf den höheren Nährstoffgehalt des synthetischen Abwassers und die damit verbundene zunehmende Proliferation zurückgeführt.

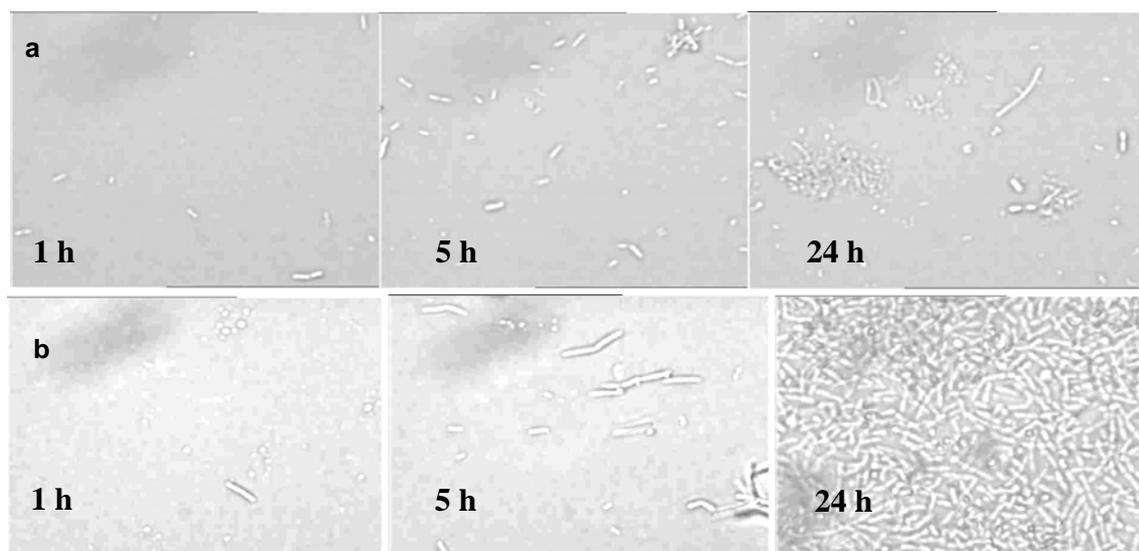


Abb. 36: Adhäsion von Abwasser- und Flusswasserisolaten, Substrat: B33, Bildausschnitt: 102 x 80  $\mu\text{m}$ .  
a) Flusswasser, b) Abwasser

Die Formfaktoranalyse an adhärenzten Mikroorganismen zeigt ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen der Bioadhäsion in den beiden Applikationswässern. Der Anteil an Kokken (FW 4.1 und FW 8.5) beispielsweise nimmt im Flusswasser auf Glas stetig zu, während der Anteil an fädigen Bakterien (FW 5.7) über 24h gleich blieb. Im Abwasser zeigte sich nach 24h ein deutlich höherer Anteil an stäbchenförmigen Bakterien (AW 6.2 und AW 6.7) im Vergleich zu den kokkenartigen Mikroorganismen (AW 7.12 und AW 7.25). Im Trinkwasser wurden ein dem Flusswasser entsprechendes Ergebnis detektiert.

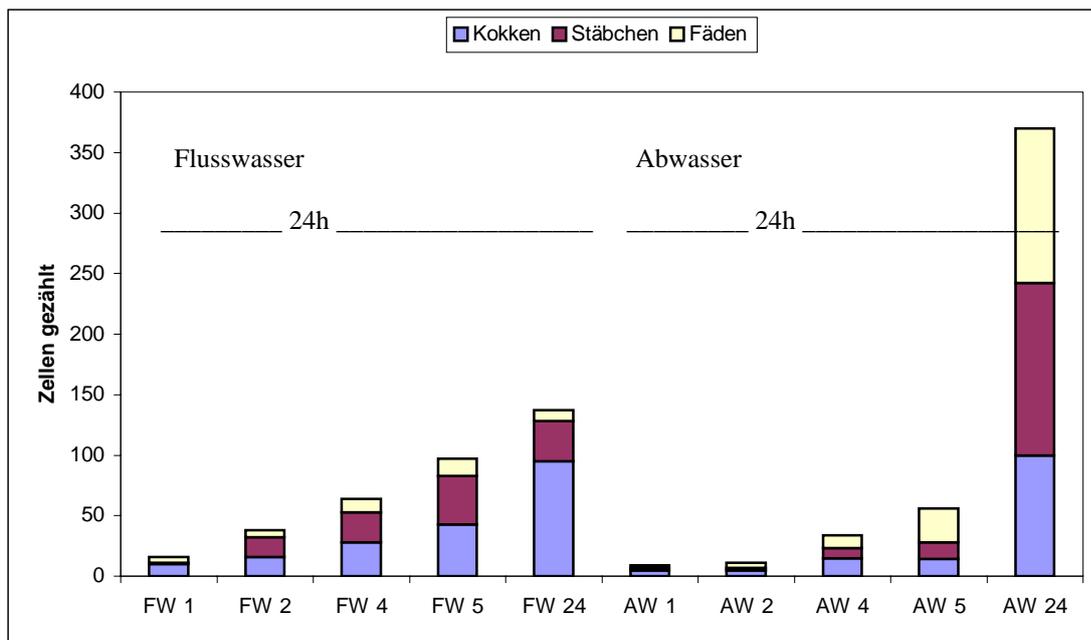


Abb. 37: Formfaktoranalyse nach Bioadhäsionsprüfung im Fluss- und Abwasser auf B33

#### 4.3.2. Bioadhäsionsprüfung für medizinische Applikationen

In vergleichbarer Form werden die Ergebnisse der Adhäsionsprüfung der Staphylokokkenmischkultur präsentiert. Die Darstellung beginnt mit der Messreihe im statischen Modus in der Multiwellplatte, welcher eine Reduzierung der Bakterienadhäsion für alle modifizierten Tetraetherlipidschichten auf Glas aufweist.

Tab. 21: Zellzahl nach 24 h im statischen Modus mit Staphylokokken, Substrat: B33  
(Signifikanzintervall  $p = 0,05$ )

	24h [x/cm <sup>2</sup> ]	SA [x/cm <sup>2</sup> ]	Signifikanz zu B33	Signifikanz zu TL
<b>B33</b>	9694.532	3.108.834		+
<b>TL</b>	3.804.143	1.359.936	+	
<b>TL PEG</b>	3.999.574	1.407.254	+	-
<b>TL CF</b>	5.211.034	1.508.967	+	+
<b>TL negativ</b>	4.515.510	1.260.540	+	+
<b>TL positiv</b>	3.030.907	972.968	+	-
<b>TL PC</b>	7.040.123	2.983.553	+	+
<b>TL Kombi</b>	2.730.697	1.115.570	+	-

Die Ergebnisse der dynamischen Bioadhäsionsmessung werden als Zellzahlen je Fläche für die Auswertung nach der Seedphase (2h) und der Feedphase (22h) in den nachfolgenden Tabellen präsentiert. Insgesamt zeigt sich eine signifikantere Reduzierung der Zellzahl im Vergleich zur Adhäsionsprüfung in den drei Applikationswässern. Erneut konnte für alle Modifikationen eine reduzierte Adhäsion ermittelt werden.

Tab. 22: Zellzahl nach 2 h und 22 h im dynamischen Modus mit Staphylokokken, Substrat: B33  
(Signifikanzintervall  $p=0,05$ )

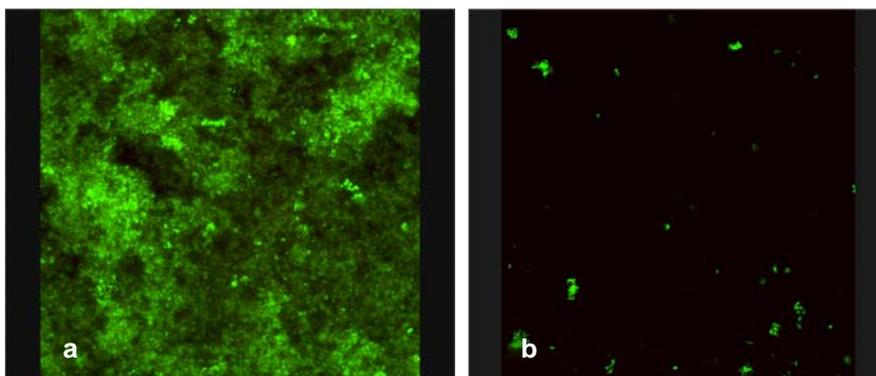
	2h [x/cm <sup>2</sup> ]	SA [x/cm <sup>2</sup> ]	Signif. zu B33	Signif. zu TL	22h [x/cm <sup>2</sup> ]	SA [x/cm <sup>2</sup> ]	Signif. zu B33	Signif. zu TL
<b>B33</b>	1.757.812	521.808		+	11.730.468	1.796.124		+
<b>TL</b>	303.906	82.819	+		3.605.468	1.150.860	+	
<b>TL PEG</b>	129.687	41.821	+	-	1.066.406	528.016	+	+
<b>TL CF</b>	789.062	319.368	+	+	2.242.187	550.336	+	+
<b>TL negativ</b>	789.062	191.189	+	+	3.839.843	1.505.024	+	-
<b>TL positiv</b>	906.250	258.324	+	+	7.039.062	2.525.894	+	+
<b>TL PC</b>	1.742.187	348.997	-	+	2.339.843	919.505	+	+
<b>TL Kombi</b>	1.820.321	663.219	-	+	6.386.719	2.084.899	+	+

Die nachfolgende Tabelle 23 beinhaltet die Ergebnisse der dynamischen Bioadhäsionsprüfung mit Staphylokokken an lipidmodifizierten Silikonoberflächen. Es wird erneut der adhäsionsmindernde Effekt nach 22h Besiedelungs- und Inkubationszeit dargestellt.

Tab. 23: Zellzahl nach 2 h und 22 h im dynamischen Modus mit Staphylokokken, Substrat: Silikon  
(Signifikanzintervall  $p=0,05$ )

	2h [x/cm <sup>2</sup> ]	SA [x/cm <sup>2</sup> ]	Signif. zu B33	Signif. zu TL	22h [x/cm <sup>2</sup> ]	SA [x/cm <sup>2</sup> ]	Signif. zu B33	Signif. zu TL
<b>SIK</b>	2.414.062	679.532		+	8.945.312	1.841.423		+
<b>SIK TL</b>	1.019.531	249.409	+		5.273.437	1.730.546	+	
<b>SIK TL PEG</b>	1.304.687	858.822	+	-	5.539.062	1.578.133	+	-
<b>SIK TL CF</b>	1.464.843	631.275	+	+	5.156.250	1.410.102	+	-
<b>SIK TL negativ</b>	1.648.437	361.688	+	+	7.664.062	1.808.799	-	+
<b>SIK TL positiv</b>	1.000.000	225.677	+	-	5.937.500	549.349	+	-
<b>SIK TL Kombi</b>	640.625	126.509	+	-	2.320.312	479.194	+	+

Die nachfolgenden CLSM-Aufnahmen in Abbildung 38 entstanden unter Anwendung eines Vitalitätsfarbstoffes für die Fluoreszenzmikroskopie. Sie unterstreichen die aufgeführten Ergebniswerte auf den unbeschichteten Substraten und der pegylierten Tetraetherlipidschicht.



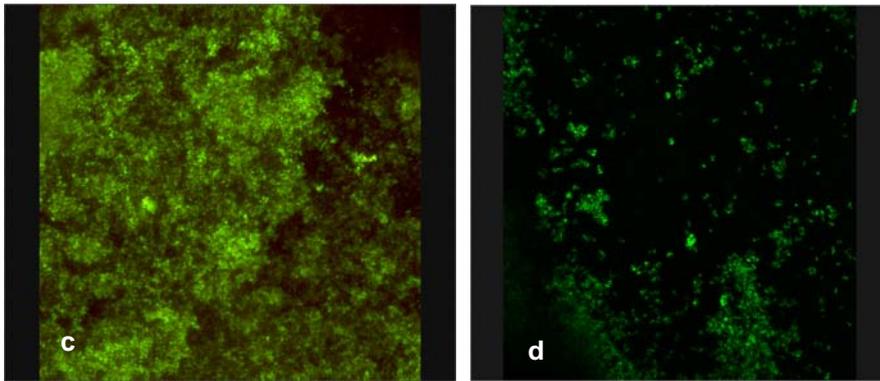


Abb. 38: CLSM-Aufnahmen der Mikroorganismen nach 22 h Bioadhäsionsprüfung  
a) B33, b) B33 TL PEG, c) Silikon, d) SIK TL PEG

### 4.3.3. Ergebnisse der Feldtests

#### Talsperre Neustadt

Die Abbildungen 39 bis 41 verdeutlichen die Ergebnisse des Feldtests, durchgeführt über 7 Wochen in der Talsperre Neustadt. Sie zeigen mikroskopische Aufnahmen der besiedelten Oberflächen. Es wird wiederum ein Antifoulingeffekt für die Tetraetherlipidschicht und deren Funktionalisierungen erkennbar. Die Reduktion der Anzahl adhärenter Zellen ist signifikant. Der Aufwuchs auf den Proben bildet einen dünnen Film einzelner Zellen aus, während die Zellen auf der Referenzprobe zur Clusterbildung neigen.

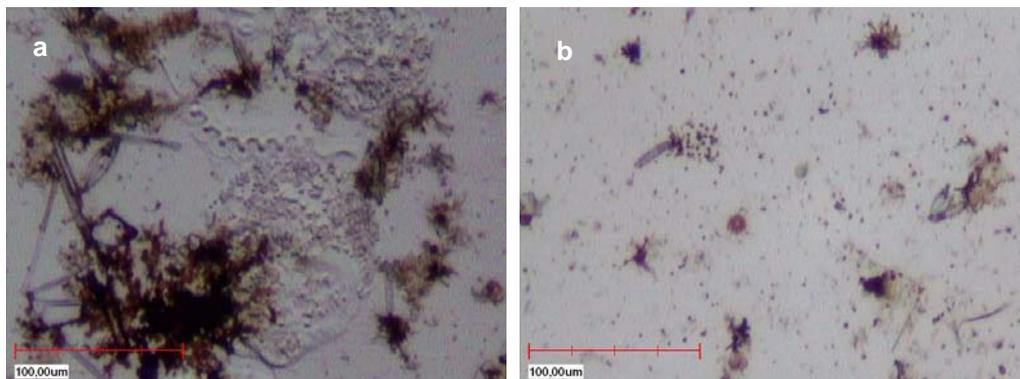


Abb. 39: Mikroskopische Aufnahmen nach dem Feldtest (B33, TL)  
a) B33, b) TL

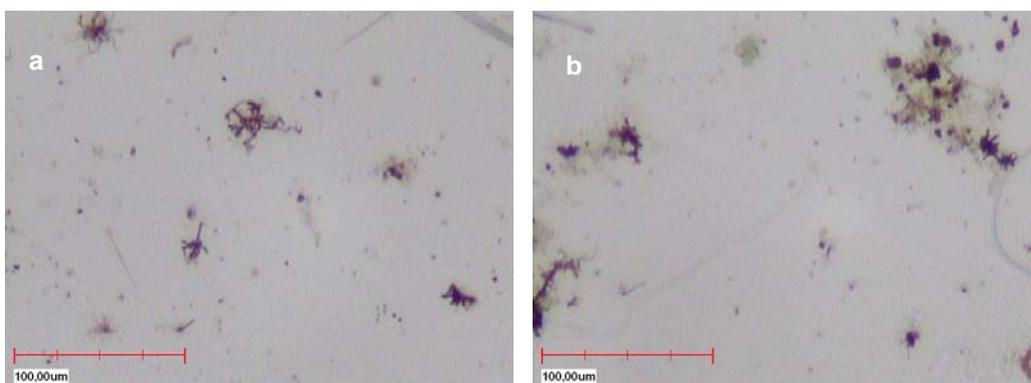


Abb. 40: Mikroskopische Aufnahmen nach dem Feldtest (TL PEG, TL negativ)  
a) TL PEG, b) TL negativ

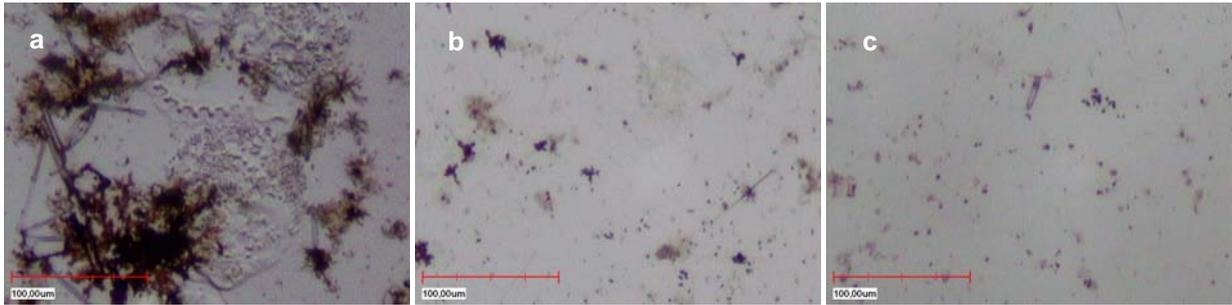


Abb. 41: Mikroskopische Aufnahmen nach dem Feldtest (B33, TL PC, TL Kombi)  
a) B33, b) TL PC, c) TL Kombi

### Kommunale Kläranlage

Neben herkömmlichen, unbeschichteten Sensoren kamen in dem in der Kläranlage Döbeln durchgeführten Feldtest pH-Messelektroden und Sauerstoffsensoren mit Tetraetherlipidschichten in Eintaucharmaturen integriert zum Einsatz. Die nachfolgenden Abbildungen 42 und 43 präsentieren Eintaucharmaturen mit lipidierten (roter Pfeil) und unbeschichteten (blauer Pfeil) Sauerstoff- bzw. pH-Sensoren nach dem mehrmonatigen Einsatz im Belebtsbecken der kommunalen Kläranlage jeweils unmittelbar nach dem Einsatz und nach einer Reinigung der Sensoroberflächen.

Zur sinnvollen Interpretation des Biofoulings wurden alle Sensoren einer Sichtkontrolle unterzogen. War eine starke Verschmutzung sichtbar, erfolgte im Anschluss eine vorsichtige „Reinigung“ mit einem schwachen Wasserstrahl, so dass sich zwischen mechanisch schwach anhaftenden Verunreinigungen und biochemisch relativ fest gebundenen Belägen unterscheiden ließ. Bei den eingesetzten pH-Messelektroden war auf der sensitiven Glasmembran generell kein bzw. nur ein leicht abspülbarer Belag nachweisbar, unabhängig vom Beschichtungszustand.

Bei Sauerstoffsensoren war im allgemeinen eine im Vergleich zu pH-Messelektroden wesentlich stärkere Belagbildung zu verzeichnen. Tetraetherlipidbeschichtete Exemplare waren in der Regel schwächer bewachsen als unbeschichtete und ließen sich durch „Reinigung“ mit einem schwachen Wasserstrahl weitgehend säubern. Bei unbeschichteten Exemplaren blieb auch nach der „Reinigung“ per Wasserstrahl ein gelartiger, dunkel gefärbter Belag zurück.

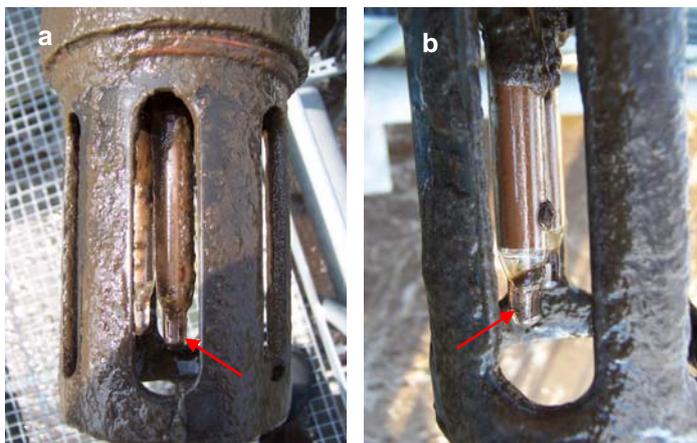


Abb. 42: pH-Sensoren nach mehrmonatigem Einsatz im Belebtsbecken einer kommunalen Kläranlage  
lipidiert (roter Pfeil) und unbeschichtet  
a) unmittelbar nach dem Einsatz, b) nach zusätzlichem Abspülen

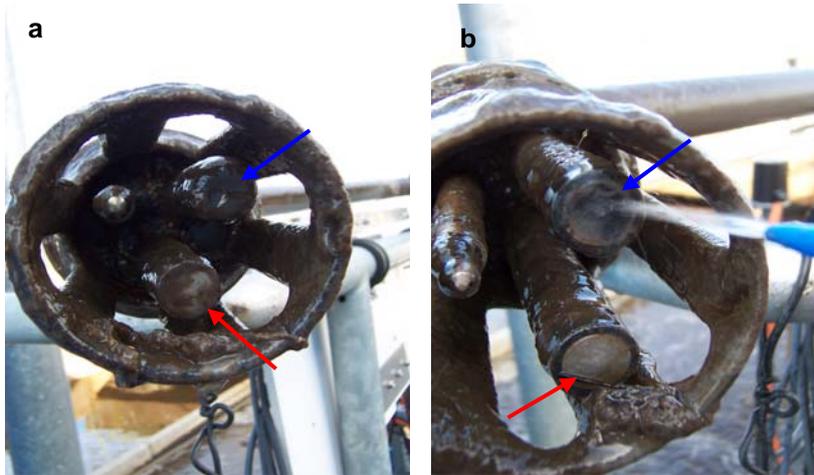


Abb. 43: Sauerstoffsensoren nach mehrmonatigem Einsatz im Belebtecken einer kommunalen Kläranlage lipidiert (roter Pfeil) und unbeschichtet (blauer Pfeil)  
 a) unmittelbar nach dem Einsatz, b) nach zusätzlichem Abspülen

## 4.4 Ergebnisse der Funktionalitätstests

### 4.4.1 Optische Funktionalität

#### Transmissionsmessung

Das Ziel dieser Messungen bestand in der Klärung der Transmissionseigenschaften der Schichten. Dies ist entscheidend, da im Rahmen der Applikation des Antifoulingkonzeptes auf optischen Sensoren im Gewässermonitoring die Anregung intrinsischer Fluoreszenzen mit ultravioletter Laserstrahlung erfolgt.

Die in der nachfolgenden Abbildung 44 dargestellten, hochauflösenden Transmissionsmessungen an unbeschichteten Glasoberflächen und dem lipidierterm Sensor lassen keine signifikante Absorption bzw. Lichtstreuung erkennen. Dies gilt insbesondere bei der wichtigen Wellenlänge 337 nm, der Laserwellenlänge des Stickstofflasers und unterstreicht die optische Funktionalität.

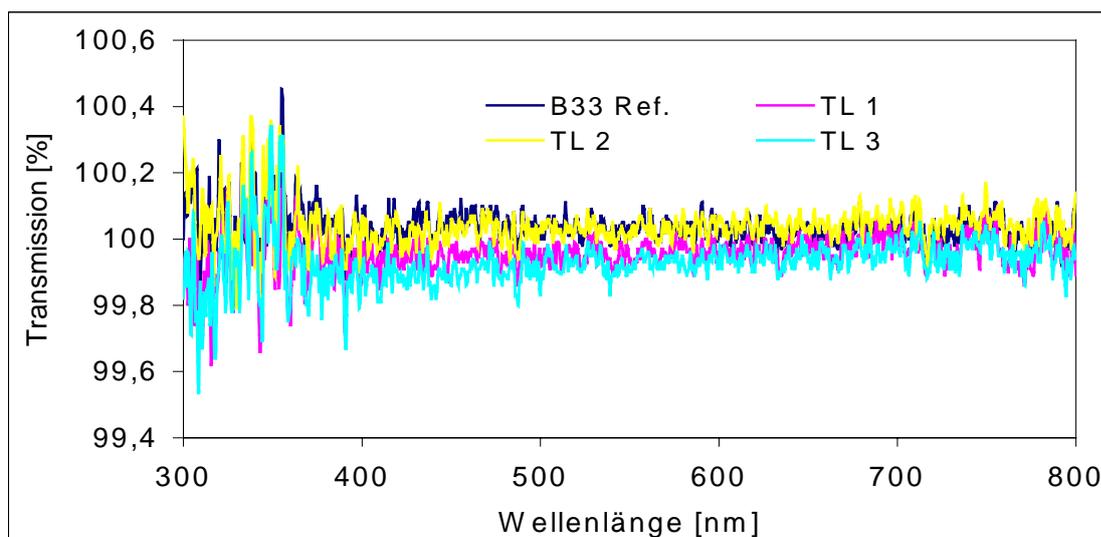


Abb. 44: Transmission/Wellenlängen-Messung an B33 und 3 TL-Proben

### Fluoreszenzmessung

Im Zusammenhang mit der Prüfung der optischen Eigenschaften der Tetraetherlipidschicht erhebt sich zusätzlich die Frage nach einer eventuellen Eigenfluoreszenz der Schichten, die als konstantes Hintergrundsignal die Sensorfunktionen verändern würden. Die Abbildung 45 beinhaltet die Fluoreszenzbilder der unbeschichteten Referenz sowie eine beispielhafte Darstellung der Fluoreszenzanalyse an der unmodifizierten Tetraetherlipidschicht (TL). Als positive Kontrolle diente eine inhomogene oder kontaminierte Lipidschicht des Mainphospholipids (MPL).



Abb. 45: Fluoreszenzmessungen

a) Referenz, b) MPL (positive Kontrolle), c) TL

Im Vergleich zur unbeschichteten Referenz, dem Borosilikatglas, zeigt die positive Kontrolle eine starke, unspezifische und inhomogene Fluoreszenz. Demgegenüber ist auf der Probe TL eine deutliche Reduktion der Eigenfluoreszenz festzustellen. Die leuchtenden Zentren sind auf Staubpartikel zurückzuführen, welche entweder während des Schichtwachstums fest eingebunden wurden oder nachträglich auf der Schicht adsorbiert sind. Mit Ausnahme der Leuchtzentren ist die Eigenfluoreszenz sehr homogen und optische funktionsfähig.

#### 4.4.2 Elektrochemische Funktionalität

Für die elektrochemischen Prüfungen wurden pH-Messelektroden als sogenannte „Kölbchenelektroden“ mit Tetraetherlipid beschichtet und dienten einer ersten Erfassung der Veränderung der elektrochemischen Sensoreigenschaften.

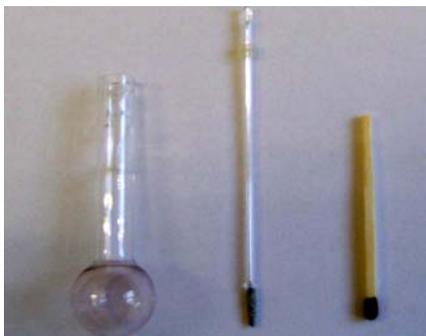


Abb. 46: „Kölbchenelektrode“ und Referenzelektrode

Die nachfolgende Tabelle beinhaltet die Werte der funktionsbestimmenden Parameter beschichteter und unbeschichteter pH-Messelektroden („Kölbchenelektroden“) unmittelbar nach dem Zeitpunkt der Beschichtung. Es zeigte sich, dass die funktionsbestimmenden Parameter (Messkettenspannung, Steilheit, Membranwiderstand und Kettennullpunkt) der auf diese Weise beschichteten Elektroden in keinem dieser Parameter von unbehandelten Vergleichselektroden abweichen.

Tab. 24: Elektrodenparameter 24 h nach der Beschichtung

U = Messkettenspannung, \* nach Zuschaltung eines Parallelwiderstandes von 1 G $\Omega$ 

	<i>U bei pH = 6,86 in mV</i>	<i>U bei pH = 4,01 in mV</i>	<i>U bei pH = 4,01 in mV*</i>	<i>Steilheit in mV/pH</i>	<i>Membran- widerstand in M<math>\Omega</math></i>	<i>Kettennull- punkt</i>
<b>TL</b>	17,5	185,3	182,7	-58,9	14,2	7,16
<b>Referenz</b>	18,4	186,4	183,6	-58,9	15,3	7,17

Die Versuche wurden nach 3 Wochen wiederholt, um die Langzeitstabilität der Ergebnisse sicher zu stellen. Eine Veränderung der Sensorparameter konnte nach drei Wochen nicht nachgewiesen werden, wie die nachfolgende Tabelle verdeutlicht.

Tab. 25: Elektrodenparameter nach 3 Wochen

U = Messkettenspannung, \* nach Zuschaltung eines Parallelwiderstandes von 1 G $\Omega$ 

	<i>U bei pH = 6,86 in mV</i>	<i>U bei pH = 4,01 in mV</i>	<i>U bei pH = 4,01 in mV*</i>	<i>Steilheit in mV/pH</i>	<i>Membran- widerstand in M<math>\Omega</math></i>	<i>Kettennull- punkt</i>
<b>TL</b>	19,5	188,1	185,0	-59,2	16,8	7,19
<b>Referenz</b>	17,4	185,7	181,8	-59,1	21,5	7,16

#### 4.4.3 Biokompatibilitätsprüfung

Im Mittelpunkt der Biokompatibilitätsprüfungen standen aufgrund der medizinischen Applikation (peritoneale Dialysekatheter) die beschichteten und funktionalisierten Silikonoberflächen.

Die nachfolgende Tabelle 26 stellt die Ergebnisse der unterschiedlichen *in vitro*-Prüfungen dar: der Zytotoxizität, der Hämokompatibilität und der Gentoxizität. Das Ergebnis der Zytotoxizitätsmessung vermittelt dabei die Zusammenfassung der *in vitro*-Prüfung im indirekten und direkten Kontakt der Gewebszellen mit den modifizierten Silikonproben. Die Zelladhäsion wurde allein im direkten Kontakt der Testzellen mit der modifizierten Oberfläche bewertet.

Tab. 26: Ergebnisse der *in vitro*-Biokompatibilitätsprüfung, Substrat: Silikon

<b>Test</b>	<b>Zytotoxizität</b>	<b>Zelladhäsion</b>	<b>Hämokompatibilität</b>	<b>Gentoxizität</b>
<b>SIK</b>	mild toxisch	normal	hämokompatibel	nicht mutagen
<b>SIK TL</b>	mild toxisch	anti-adhäsiv	hämokompatibel	nicht mutagen
<b>SIK TL PEG</b>	nicht toxisch	anti-adhäsiv	hämokompatibel	nicht mutagen
<b>SIK TL CF</b>	nicht toxisch	normal	hämokompatibel	nicht mutagen
<b>SIK TL negativ</b>	nicht toxisch	normal	hämokompatibel	nicht mutagen
<b>SIK TL positiv</b>	nicht toxisch	anti-adhäsiv	hämokompatibel	nicht mutagen
<b>SIK TL Kombi</b>	nicht toxisch	normal	hämokompatibel	nicht mutagen

Im *in vivo*-Test zur Implantation wurden für keine der Silikonproben irritierende Reaktionen im Tier festgestellt. Ebenfalls zeigten die Kontaktgewebe nach 7 bzw. 28-tägiger Implantation der Probekörper keine toxische Reaktion. In histopathologischen Schnitten wurden weder Entzündungs-, Nekrose- oder Degenerationserscheinungen detektiert, was z.T. auch auf die kurze Kontaktzeit zurückgeführt wird.

## 5 Diskussion

Derzeit werden verschiedene alternative Antifoulingtechniken diskutiert, die über lange Zeiträume wirksam sind und nach Möglichkeit nicht auf toxischen Komponenten basieren. Dabei stellt die gezielte Modifikation physikochemischer Materialparameter ein aus heutiger Sicht erfolgversprechendes Antifoulingkonzept dar. Demgemäss zielte die Themenbearbeitung dieser Arbeit auf die Bewertung der Bioadhäsion an neuen applikationsspezifischen Beschichtungen und die gleichzeitige Wichtung physikochemischer Einflüsse auf die initiale Adhäsion.

Den Ansatzpunkt der Konzeptfindung (Kap. 2) bilden thermodynamisch kolloidchemische Modellansätze und die Beschreibung der Wechselwirkungen, welche direkten Einfluss auf das Grenzflächengeschehen zwischen Biosystem/Substratmaterial/Medium haben. Die Ausbildung der Kontaktsituation zwischen einem Mikroorganismus und der Substratoberfläche ist dabei ein sich in Veränderung befindliches System, in dem sich der Mikroorganismus aufgrund der Umgebungsbedingungen und den sich daraus ausbildenden Wechselwirkungen an die Oberfläche annähert. Die ferner eine wesentliche Rolle spielenden biomolekularen oder biochemischen Interaktionen der Bioadhäsion werden vernachlässigt. Adhäsionsmechanismen, welche durch den spezifischen Aufbau der Bakterienwand z.B. durch wandständige Proteine, Polymere, Fimbrien oder auch deren Funktion z.B. Metabolismus, enzymatische Reaktionen hervorgerufen werden, gehen nicht in die Diskussion ein. Letztendlich kann und soll der Rückzug auf unspezifische Wechselwirkungen zur Interpretation der initialen Phase der Biofilmbildung, basierend auf einem theoretischen Konzept nur einen weiteren Schritt zur Aufklärung des komplexen Systems darstellen.

Die sich in der Betrachtung bestehender Antifoulingkonzepte darstellenden existierenden Befunde verlangen zum Einen innovative antiadhäsive Oberflächen mit einer hohen Effizienz bezüglich des Antifoulingpotenzials bei entsprechender Qualität und technischen Einsatzfähigkeit. Die biomimetische Antifoulingbeschichtung auf der Basis funktionalisierbarer Tetraetherlipidmonolayer kennzeichnet hierzu einen geeigneten Approach. Andererseits werden an die erforderliche Testmethodik bezüglich ihrer Praxisrelevanz steigende Ansprüche gestellt, deren erfolgreiche Umsetzung ebenfalls im Rahmen der Interpretation der hier vorliegenden Ergebnisse besprochen wird.

Die Diskussion der Ergebnisse gliedert sich systematisch und inhaltlich in folgende Abschnitte:

- die technische Umsetzung des biomimetischen Konzeptes (Kap. 5.1)
- der Nachweis des erreichten Antifoulings (Kap. 5.2)
- die Interpretation des Antifoulingkonzeptes aus der Basis der Wechselwirkungsenergien in Form von Korrelationsbetrachtungen sowie der Applikation des theoretischen Modells (Kap. 5.3)
- die Produktvalidierung (Kap. 5.4).

### **5.1 Analyse der erreichten Beschichtungsqualität**

Für die Mehrzahl der Anwendungen sind alle bisher beschriebenen Oberflächenbeschichtungen mit Lipiden, Phospholipiden und Tetraetherlipiden von nicht ausreichender mechanischer und chemischer Beständigkeit. Beispielsweise ist bei Phospholipidbilayern nur die innere Monoschicht direkt an der Materialoberfläche verankert und verursacht damit eine laterale Instabilität der Doppelschicht. Mit Hilfe des Langmuir-Blodgett-Verfahrens erzeugte Lipidfilme wiederum erweisen sich instabil gegen Abrasion. Ebenso eigneten sich bei den bisher eingesetzten membrandurchspannenden Tetraetherlipiden die nativen Kopfgruppen nicht zur kovalenten Fixierung.

Unter diesem Aspekt erreichten die auf dem Borosilikatglas aufgetragenen monomolekularen Tetraetherlipidschichten bezüglich ihrer Beschichtungsqualität folgende Ergebnisse:

- (1) Das aus der Membran des *Thermoplasma acidophilum* erhaltene archaebakterielle Tetraetherlipid ist auf einer Glasoberfläche kovalent fixierbar. Es wurde gezeigt, dass ein fest haftender, monomolekularer Film durch Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen dem Cyanurchlorid-aktivierten Caldarchaeolmolekül und dem mittels harter UV-Strahlung voraktivierten Glas erzeugt werden kann. (Kap. 4.1.)
- (2) Es steht ein archaealer Tetraetherlipidfilm zur Verfügung, welcher als Spacer für die Anbindung von Funktionsmolekülen dient. Die gezielte Oberflächenmodifizierung der erreichten Lipidfilme basiert auf der Funktionalisierung der äußeren Kopfgruppen des Tetraetherlipidmoleküls. Die auf derartigen Tetraetherlipidfilmen aufbauenden Schichtsysteme behalten auch nach ihrer Funktionalisierung eine physikalische Langzeitstabilität und chemische Resistenz. Es werden kovalent fixierte, homogene und selektiv modifizierbare Beschichtungen erreicht. (Kap.4.2.1.)
- (3) Die Tetraetherlipidschichten präsentierten auf dem Referenzglas den Erhalt sowohl der optischen als auch der elektrochemischen Sensorfunktionalität. (Kap. 4.2.1.-2.)

Sowohl die atomkraftmikroskopischen Aufnahmen (AFM) als auch die Analysen mittels Fluoreszenzmikroskopie unterstreichen die Homogenität des erzeugten Lipidfilms. Auf dem Borosilikatglas wurde mittels Ellipsometrie und AFM eine Schichtdicke des unmodifizierten Tetraetherlipidfilms von ca. 2,5 bis 3 nm detektiert. Bakowsky *et al.* [181] definierten an Langmuir-Blodgett-Filmen des Mainphospholipids des *Thermoplasma acidophilum* eine Schichtdicke von 2,98 nm für aufrecht stehende Moleküle. Für das Caldarchaeolmolekül als Grundgerüst des Phospholipids definierten Fittabile *et al.*[226] dagegen eine Länge im gestreckten Zustand von 3,7 nm. Die in der vorliegenden Arbeit erreichten Schichtdicken liegen im erwarteten Bereich unter Beachtung der messtechnischen Probleme, welche die Analyse nanoskaliger dünner Filme bedingt. Es wird davon ausgegangen, dass die kovalente Fixierung mittels Selfassembling aufgrund der energetischen Gleichgewichte zu monomolekularen Schichten mit einer dicht gepackten Leiterstruktur führen.

Für die nachfolgende Kopfgruppenmodifizierung der Lipide ist eine ausreichende Anzahl nach außen stehender Kopfgruppen und der Ausschluss sogenannter Hufeisenstrukturen von Bedeutung. Gegen die hufeisenförmige Fixierung des Moleküls spricht zudem die Messung eines Wasserkontaktwinkels von weniger als 90° entgegen, welcher nicht auf polymere, stark hydrophobe Eigenschaften deutet. Zum Zweiten bezweifeln Fittabile *et al.*[226] die Ausbildung derartigen Strukturen aufgrund der geringen Länge der Kohlenwasserstoffkette des Caldarchaeolmoleküls.

Ein Qualitätsmerkmal des erzeugten Lipidfilms gegenüber bestehenden funktionalisierbaren Antifoulingsschichten besteht in der Beständigkeit gegen abrasiv wirkende Partikel in Medien. So können Flüsse z.B. im gezeitenbeeinflussten Bereich Sedimentfrachten bis 500 mg/l mit Partikelgrößen < 20 µm bis > 600 µm mitführen, die auf die dünnen Filme der sensorischen Flächen einwirken.

In einem durch die Fa. 4H Jena Engineering GmbH durchgeführten Abrasionstest mit einer partikelhaltigen Testlösung (Aluminiumoxid, Siliziumcarbid in destilliertem Wasser) über 48 h erwiesen sich die mittels Selfassembling auf einer Glasoberfläche erzeugten Schichten als beständig. Zum Teil sind durch die Partikel verursachte Kratzer in den Schichten festzustellen, die allerdings weniger als 5% der Oberfläche der Testobjekte ausmachen.

Von wesentlicher Bedeutung für den Einsatz von Antifoulingsschichten auf optischen Sensoren ist die Reduzierung der Lichtstreuung und Absorption im Transmissionsmodus sowie eine möglichst geringe Eigenfluoreszenz im Bereich typischer Laserwellenlängen. Die Fa. Innovative Optische Messtechnik GmbH wies an in dieser Arbeit eingesetzten unmodifizierten Tetraetherlipidschichten nach, dass keine messbaren Absorptions- und Streueinflüsse sowie Eigenfluoreszenzen auftraten. Zusammenfassend ergab die optische Charakterisierung allein ein Empfindlichkeitsproblem für Anregungen mit ultravioletten Wellenlängen kleiner 400 nm. Das bedeutet aber auch, eine derart beschichtete Sonde könnte aufgrund ihrer optischen Funktionalität in Wasser mit hoher organischer Belastung eingesetzt werden.

Das Anforderungsprofil an eine zu entwickelnde Antifoulingbeschichtung für den Einsatz auf elektrochemischen Sensoren verlangt, dass die Sensoren hinsichtlich ihrer funktionsbestimmenden Materialien und Prüfparameter keine Abweichungen zulassen. Die Fa. Sensortechnik Meinsberg GmbH kam am Beispiel der pH-Messung an Versuchselektroden zu einer positiven Analyse. Die Detektion der Sensorparameter Ansprechzeit, Membranwiderstand und Kettennullpunkt in pH-Pufferlösungen (pH 4 und 7) unterstrich, dass ungeachtet geringfügiger Variation der prinzipielle Nachweis erbracht wurde, dass pH-Sensoren mit Tetraetherlipidschichten ihre Messfunktion behalten.

In einem zweiten Applikationsfeld erfolgte die Analyse der Beschichtung eines polymeren Materials mit dem Tetraetherlipid. Die ursprüngliche Oberfläche des Silikons besaß eine höhere Rauigkeit und Heterogenität als Glas sowie chemisch sensiblere Eigenschaften, welche eine Anpassung des Beschichtungsprozesses im Vergleich zu dem Referenzglas erforderten. Das Silikon wurde zunächst in einer NaOH-Lösung präaktiviert. Anschließend erfolgte die weitere Aktivierung der Oberfläche durch das Aufbringen einer Aminosilanschicht (APTMS), gefolgt von der kovalenten Anbindung des Cyanurchlorid-modifizierten Caldarchaeols gelöst in Aceton. Die hohe Rauigkeit des Ausgangsmaterials blieb über alle Reaktionsstufen erhalten, was die AFM-Aufnahmen unterstreichen. [227]

Eine Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie (CLSM) unter Anwendung eines lipophilen Farbstoffs verwies in der Gegenüberstellung zur unmodifizierten Silikonfolie auf eine wirksame Lipidbeschichtung. Es werden regelmäßig über die gesamte Oberfläche verteilte Lipidcluster sichtbar. Erwartungsgemäß erreicht die nanoskalige Lipidschicht jedoch keine mit Schichten auf dem Glassubstrat vergleichbare Homogenität, da die Rautiefen der Silikonoberfläche durch den dünnen Film nicht überspannt bzw. nivelliert werden können. Zusätzlich kommt es aufgrund der Quellung des Materials durch die organischen Lösungsmittel zu einem Aufräumen der Oberfläche und Rissbildung in der obersten Materialschicht. Es wird nun eine geringere Anzahl reaktiver Gruppen erreicht. Dennoch ist davon auszugehen, dass entsprechend dem nachfolgenden Schema nahezu die gesamte Polymeroberfläche beschichtet wurde unter Einbeziehung einer akzeptablen Anzahl von Defekten, Löchern bzw. unzugänglichen Kopfgruppen.

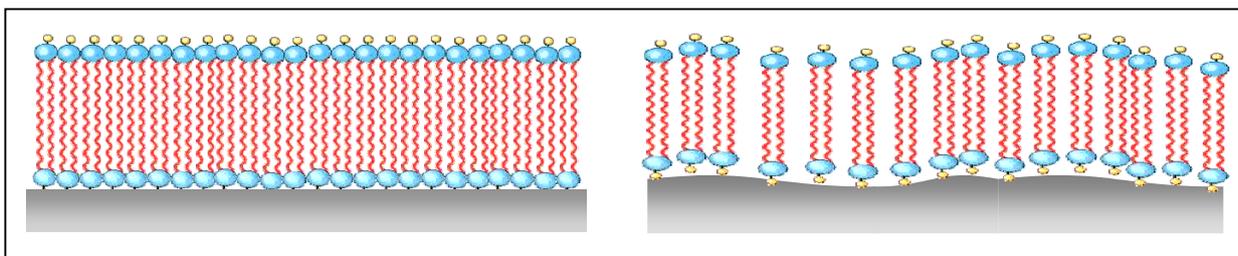


Abb. 47: Schema der TL-Schicht auf glattem Glas (links) und rauem Polymer (rechts)

Verschiedene Arbeitsgruppen behandeln die Erzeugung monomolekularer Tetraetherlipidfilme auf Festkörperoberflächen, wobei vor allem die Langmuir-Blodgett-Technik [176, 178, 228] und die Liposomenfusion [229-231] im Mittelpunkt stehen. Auch das Selfassembling wurde für die Lipidfilmbeschichtung eingesetzt und bereits mittels molekulardynamischer Simulation analysiert [232-234]. Zusätzlich präsentieren mehrere Arbeitsgruppen monomolekulare Lipidfilme, speziell Phospholipidbilayer, als wirksame Antifoulingsschicht [131, 132, 235-237].

Da bei derartigen Biomembran-analoga jedoch allein die innere Monoschicht direkt an der Materialoberfläche verankert werden kann, sind die darauf aufbauenden Bilayer von geringer Stabilität, so dass der Einsatz auf technischen Funktionsflächen bedingt möglich ist [238]. Die adsorbierten Phospholipidschichten wiesen schon gegenüber dem Spülen mit Pufferlösungen oder der Sterilisationsprozedur eine gewisse Instabilität auf [239]. Membrandurchspannende Tetraetherlipide, die sich durch gezielte Aktivierung an nahezu alle Materialoberflächen kovalent fixieren lassen, bieten hier entscheidende Vorteile. Insbesondere lässt das Selfassembling im Ergebnis technisch umsetzbare Beschichtungen zu.

Nach wie vor gestaltet sich die Darstellung und die Quantifizierung von dünnen Filmen auf technischen Oberflächen mit einer Schichtdicke im einstelligen Nanometerbereich als messtechnisches Problem. Gleiches gilt für die Betrachtung von modifizierten Kopfgruppen und den Nachweis der erfolgreichen Funktionalisierung auf nanoskaliger Ebene. Die Bewertung der elektrischen Oberflächeneigenschaften sowie die Kontaktwinkelmessung ermöglichen dennoch eine makroskopische Bewertung. Zudem unterstreicht die visuelle morphologische Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie die erreichte Variation zwischen den in der vorliegenden Arbeit gewählten Modifizierungen.

**Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Tetraetherlipide kovalent auf den unterschiedlichen Materialoberflächen fixiert werden können und eine ideale chemische Plattform bieten, basierend auf einem Spacermolekül mit einem hohen Maß an Modifizierbarkeit. Die dargestellte Tetraetherlipidschicht erfüllt in ausreichender Qualität die aus der Applikation als biomimetische Antifoulingbeschichtung resultierenden Anforderungen bezüglich der Schichtstabilität, optischen und elektrochemischen Funktionalität und Sterilisierbarkeit.**

Die existierenden Antifoulingkonzepte unterstrichen, dass die Unterdrückung der Bioadhäsion als initiale Phase der Biofilmbildung unabhängig von der jeweiligen Applikation über die Kontrolle der zu diesem Zeitpunkt dominanten, unspezifischen Wechselwirkungen gelingen kann. Als entscheidend erwies sich, dass diese Phase des Biofouling weitestgehend substratgesteuert verläuft. Die Funktionalisierung der Tetraetherlipidschicht zielte daher auf eine breite Variation physikochemischer Oberflächenparameter. Zusätzlich erfolgte ein Optimierungsschritt, der eine Kopplung funktioneller Gruppen beinhaltete.

Im Rahmen der physikochemischen Charakterisierung zeigten die Ergebnisse zunächst eine geringe Bandbreite der einzelnen Oberflächenparameter. Im unmittelbaren Vergleich der Funktionalisierungen beispielsweise präsentierten alle lipidierten Proben in ihrer Oberflächenspannung und deren polaren Anteil einen signifikanten Unterschied zur unbeschichteten Referenz von mindestens 20%. Dagegen wurden Differenzen zwischen den einzelnen Funktionalisierungen auf Glas mit höchstens 15% erreicht (Abbildung 48).

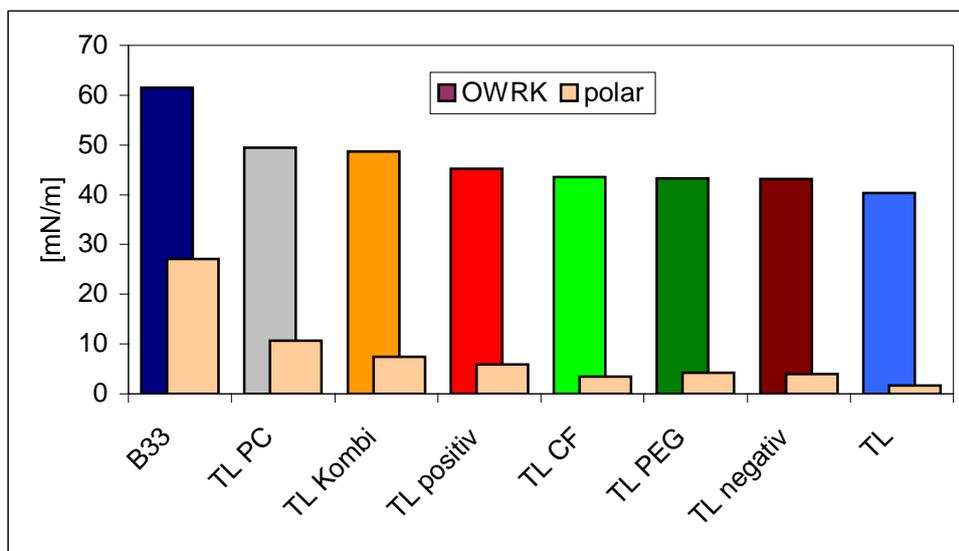


Abb. 48: Oberflächenspannung, polarer Anteil, Substrat B33

Ebenfalls signifikante Unterschiede zum unbeschichteten Substrat wurden für das Zetapotenzial resultierend aus der Lipidierung nachgewiesen. Der Vergleich der Funktionalisierungen untereinander weist jedoch mit Ausnahme der Probe TL Kombi wiederum auf eine geringe Variation.

Die Aufnahme der Titrationskurven zur Bestimmung des Isoelektrischen Punktes (IEP) bestätigt den vergleichbaren Verlauf der Zetapotenzial/pH-Wert-Kurve für alle Modifizierungen auf Glas. Eine Ausnahme bilden hier die unmodifizierte Lipidschicht mit nahezu keinem pH-Wert-Effekt und die Probe TL positiv, welche erwartungsgemäß den höchsten IEP aufweist.

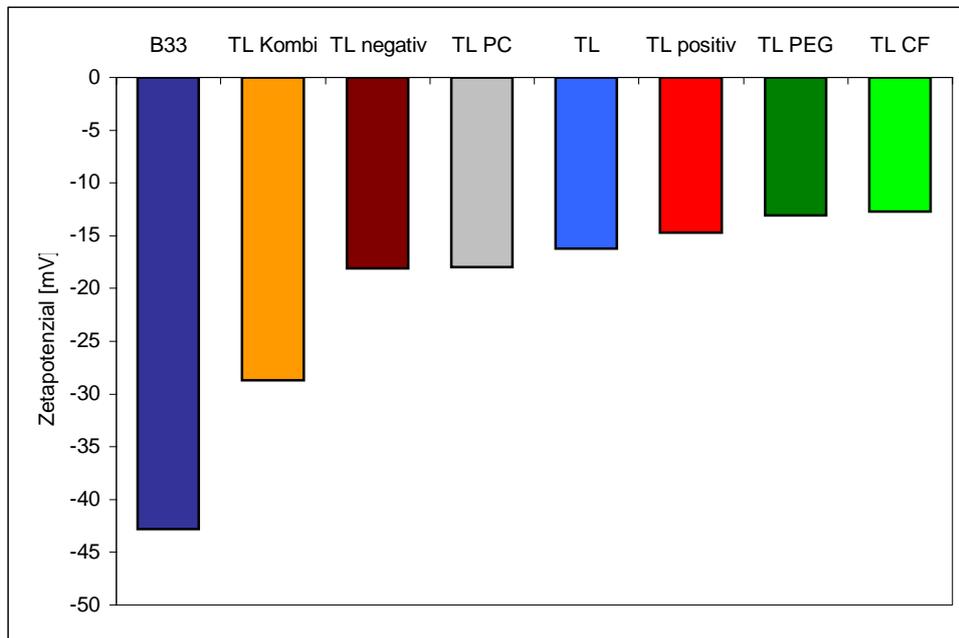


Abb. 49: Zetapotenzial bei pH 7, Substrat B33

Die Auswertung der erreichten Parameter der einzelnen ausgewählten Modifikationen führt zu folgenden möglichen Interpretationen: Die Kopplung der Funktionsmoleküle ist unzureichend hinsichtlich ihrer Zahl oder ihrer Funktionalität. Da die Charakterisierung in der vorliegenden Arbeit jedoch auf integralen Messverfahren beruht, ist die Quantifizierung der erreichten Kopplung der Funktionsmoleküle je Oberfläche nicht möglich. Demzufolge bleibt die eventuell unzureichende Aktivität der außenstehenden Kopfgruppe des Lipids, welche für die nachträgliche Modifizierung notwendig ist, zu hinterfragen.

Eine zweite mögliche Ursache für die ungenügenden Präsenz der physikochemischen Bandbreite ist insbesondere am Beispiel der Modifizierung mit kleinen Molekülen in der molekularen Betrachtung der Grenzfläche zum umgebenden Medium zu suchen. Die Nutzung wässriger Medien führt in jedem Fall zur Ausbildung einer Hydratationsschicht, hervorgerufen durch das Lipid selbst. Die anschließend im wässrigen Milieu gekoppelten Funktionsmoleküle wirken in genau dieser Ebene und sind möglicherweise sterisch in ihrer Wirksamkeit eingeschränkt.

Die Betrachtung der energetischen Parameter Oberflächenspannung und Polarität auf dem Substrat Silikon zeigt ebenfalls eine nicht signifikante Variation. Demgegenüber demonstriert die Abbildung 50 bezüglich der ermittelten Zetapotenziale einen deutlicheren Einfluss der jeweiligen Modifizierungen. Hervorzuheben ist, dass die Probe SIK TL positiv tatsächlich die Umkehrung des stark negativen Oberflächenpotenzials des unbeschichteten Silikons bewirkte. Des Weiteren unterstreicht die Abbildung 34 in den Zetapotenzial/pH-Wert-Kurven die größere Bandbreite der funktionalisierten Lipidschichten auf Silikon einschließlich der Besonderheit der positiver geladenen Oberfläche der Probe SIK TL positiv.

Unter Beachtung der oben geführten Diskussion ist die Ursache dessen in der denkbaren Inhomogenität der Lipidschicht auf dem polymeren Substrat zu suchen. Einerseits lässt die aktivierte Silikonoberfläche eventuell eine zusätzliche Bindung der Funktionsmoleküle an das Polymer selbst zu. Andererseits wird in wässriger Umgebung nur eine Wasserschicht mit geringerer Dichte und Dicke ausgebildet, so dass die Hydrophobizität, aber auch die Funktionalität der kleinen Molekülgruppen erhalten bleibt.

Unter der Ansicht, dass ein Tetraetherlipidfilm allein einen Wasserkontaktwinkel von ca. 80° (siehe [181]) und eine Reduzierung des Zetapotenzials bewirkt, ordnen sich die erreichten Ergebnisse auf den Substraten wie folgt ein. Die Lipidierung führt auf beiden Substraten zu einer Verringerung des Zetapotenzials auf ca. 35% des Wertes der unbeschichteten Probe. Dies bedeutet eine vergleichbare Eigenschaftsänderung. Der Wasserkontaktwinkel von 77,8° an einer lipidierten Glasprobe steht jedoch einer signifikanten, aber geringen Änderung des Kontaktwinkels auf 103,5° für die lipidierte Silikonprobe gegenüber. Bezieht man die Ausgangswerte der unbeschichteten Substrate ein, zielt die Richtung der Eigenschaftsänderungen auf den erwarteten Wert für das Lipid, dies jedoch in einem unterschiedlichen Ausmaß, der den verbleibenden Substrateinfluss veranschaulicht.

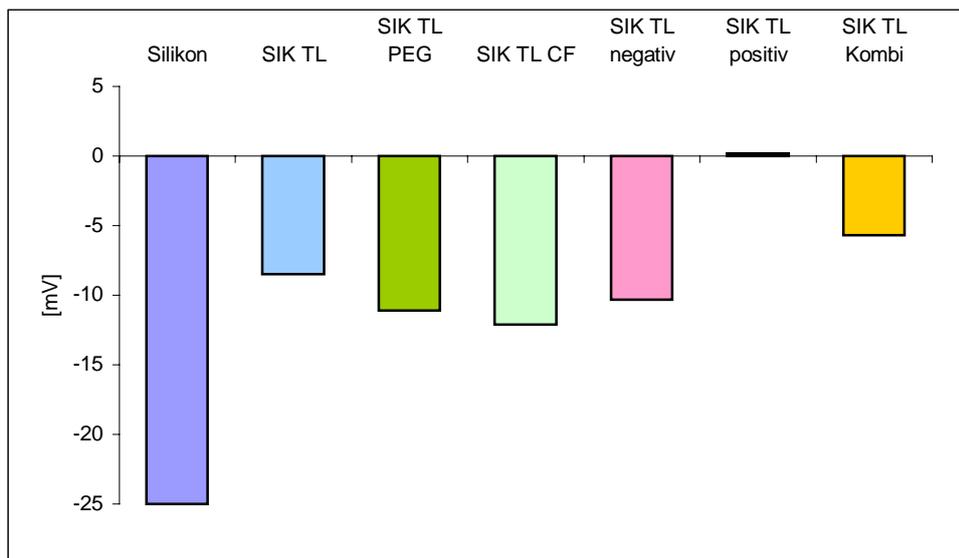


Abb. 50: Zetapotenzial bei pH 7, Substrat Silikon

**Die zusammenfassende Bewertung der energetischen und elektrokinetischen Charakterisierung der funktionalisierten Tetraetherlipidschichten weist insbesondere auf dem Substrat Glas eine geringe Bandbreite auf. Auf dem Substrat Silikon kann allein bezüglich der Oberflächenladung eine deutlichere Variation erreicht werden. Die Funktionalisierung wird insgesamt als unvollkommen eingeschätzt.**

## 5.2 Darstellung des Antifoulingpotenzials

In der vorliegenden Arbeit dienen Tetraetherlipide als Basis der Oberflächenmodifizierung zur Gestaltung eines biomimetischen Antifoulingkonzeptes. Das grundsätzliche Wirkprinzip besteht dabei zunächst in der nanoskaligen Maskierung der Oberfläche durch die Lipidschicht. Schon das Tetraetherlipid allein sollte die Abdeckung an der Oberfläche vorhandener Adhäsionsstellen erreichen und durch die Anregung sterischer Abstoßung zu Antifoulingeffekten führen, wie es beispielsweise an Phospholipidbilayern nachgewiesen werden konnte [235-237, 239]. In dem nachfolgenden Abschnitt soll zunächst das Potenzial der unmodifizierten Tetraetherlipidbeschichtung bezüglich des Antifoulings diskutiert werden.

### 5.2.1 Unmodifiziertes Tetraetherlipid - Gewässermonitoring

Die ersten Analysen galten dem Adhäsionserhalten auf einer unmodifizierten Tetraetherlipidschicht unter statischen Bedingungen, d.h. unter Ausschluss einer Medienbewegung. Wie die Abbildung verdeutlicht, führt die unmodifizierte Beschichtung nach 24 h Inkubation in einer Multiwellplatte zu einer Verringerung der Adhäsion um zirka 25% gegenüber dem unmodifiziertem Glas.

Dieses Resultat ließ sich durch eine Analyse an mit Tetraetherlipid beschichtetem Edelstahl bestätigen. So wird auch an der lipidierten Stahloberfläche eine Reduzierung der Anzahl adhärierter Bakterien ermittelt. [225]

Die statischen Untersuchungen im synthetischen Flusswasser zeigen somit erste vielversprechende Antifoulingeffekte auf.

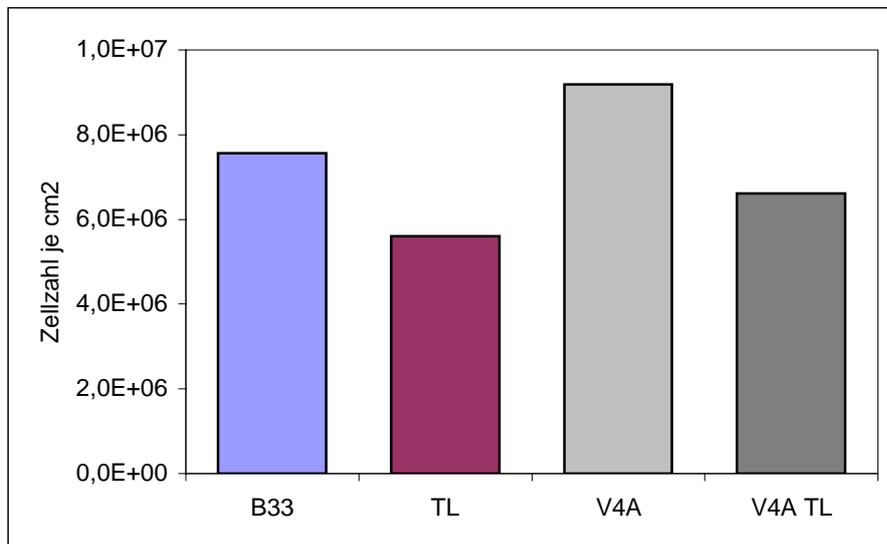


Abb. 51: Zahl adhärierter Mikroorganismen in Flusswasser, statische Messung, Substrat: B33 und V4A

Die Beschichtung der Referenzglasoberfläche mit unmodifiziertem Tetraetherlipid bewirkte im dynamischen Messmodus in den Modellwässern Abwasser und Trinkwasser bereits zu Beginn nach 5 Stunden Inkubationszeit eine erste detektierbare Verringerung der Anzahl anhaftender Mikroorganismen um ca. 15 % (siehe Abbildung 52). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Oberfläche zu diesem Zeitpunkt insgesamt nur gering von Bakterien bedeckt wird. Die Gesamtzahl der Organismen liegt dagegen nach 24 h Versuchsdauer um zirka eine Zehnerpotenz oberhalb der nach 5 h gezählten Zahl.

Für die unmodifizierte Tetraetherlipidbeschichtung wurde nach 24 h Inkubationsdauer folgerichtig ein deutlicherer und statistisch signifikanter Effekt der Tetraetherlipidbeschichtung auf die Bioadhäsion ermittelt. Die Zellzahl wird in jedem der Applikationswässer um 30 – 40 % reduziert, wobei der stärkste Antifoulingeffekt im Trinkwassermilieu zu finden ist.

Erwartungsgemäß führte die Prüfung im Abwasser aufgrund des nährstoffreichen Mediums nach 24 h zu den höchsten Zellzahlen. Dieser Einfluss zeigte sich nach 5h anhand der gezählten Mikroorganismen noch nicht. Der Anstieg wird infolgedessen neben der starken Adhäsionsneigung der Organismen auf den Substraten vor allem der wirksameren Proliferation der Bakterien zugerechnet.

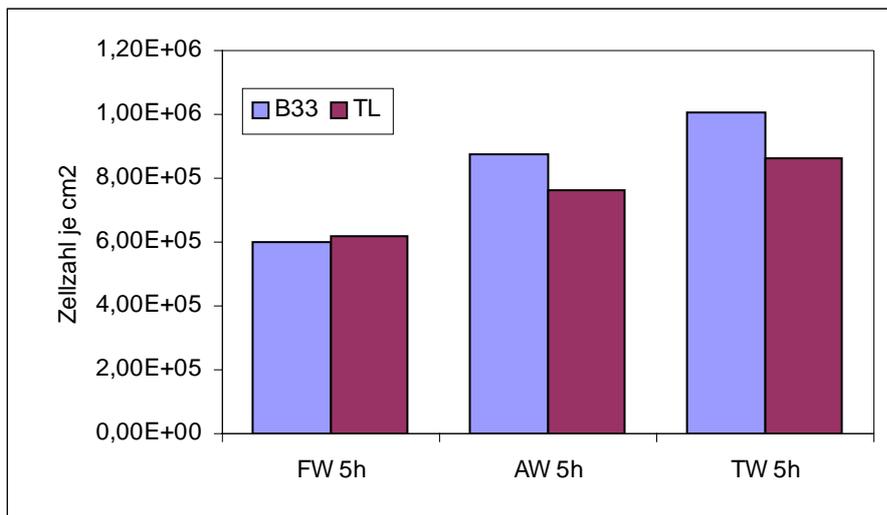


Abb. 52: Zahl adhärerter Mikroorganismen in Modellwässern, dynamische Messung, nach 5 h, Substrat: B33 und B33 TL

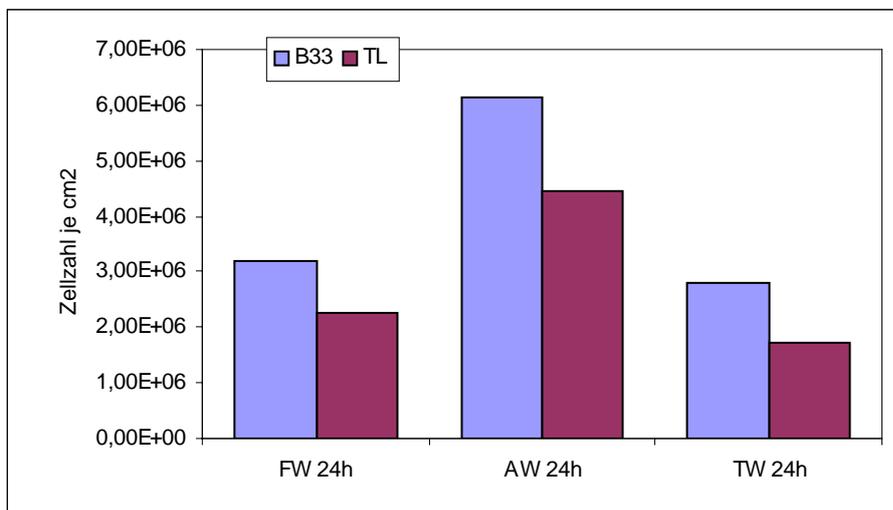


Abb. 53: Zahl adhärerter Mikroorganismen in Modellwässern, dynamische Messung, nach 24 h, Substrat: B33 und B33 TL

## 5.2.2 Unmodifiziertes Tetraetherlipid – medizinische Applikation

Die außerordentlichen antiadhäsiven Eigenschaften der Biomembrananaloga auf Phospholipidbasis finden bisher vor allem in medizinischen Applikationen Anwendung. Nun deutet das vorliegende Antifouling gegenüber den Infektionskeimen *S. aureus* / *S. epidermidis* auf einen vergleichbare Effekt durch die Tetraetherlipide.

Sowohl im statischen Modus als auch unter dynamischen Bedingungen führt der unmodifizierte Tetraetherlipidfilm zu einer Reduzierung der adhärerter Keime nach 24 h um bis zu 70% gegenüber dem jeweiligen unmodifizierten Substrat. Im direkten Vergleich zeigt sich eine weitaus deutlichere Reduzierung auf der Modellglasoberfläche. Hierfür kann die topografisch strukturierte Oberfläche des Polymers als Ursache geltend gemacht werden, da eine inhomogenere Lipidierung erreicht wird.

Dennoch wird das Antifouling durch die Lipidierung des Referenzglases als auch durch die Kopplung der Tetraetherlipide an Silikon erreicht, wie die nachfolgende Abbildung demonstriert. Dies bedeutet auch, dass der antiadhäsive Effekt durch die Lipide unter analogen Testbedingungen wie z.B. Fließkammer, Strömung bei medizinischen Keimen drastischer ausgeprägt ist als in den getesteten wässrigen Medien.

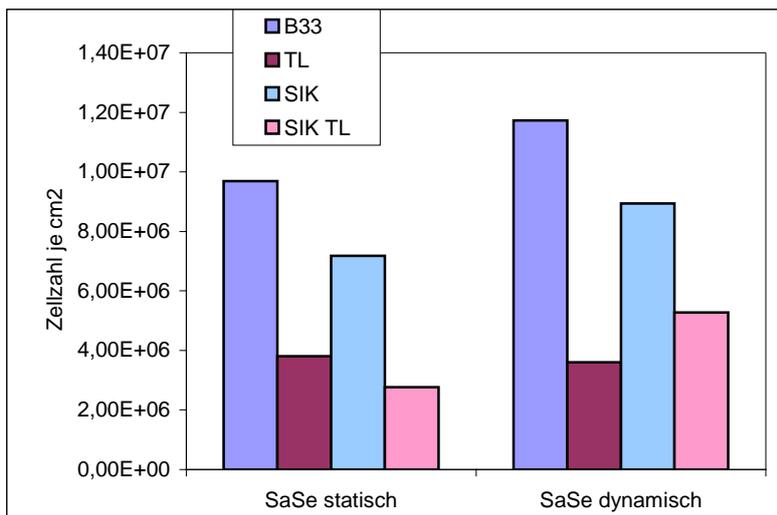


Abb. 54: Zahl adhärierter Mikroorganismen der *Staphylokokken*-Kultur, statische und dynamische Messung, nach 24 h, Substrat: B33 und B33 TL, SIK und SIK TL

Die Entwicklung des biomimetischen Antifoulingkonzeptes auf Tetraetherlipidbasis legt die Nutzung dieses Spacermoleküls als chemische Plattform mit einem hohen Maß an Modifizierbarkeit zu Grunde. Durch die Funktionalisierung sollen thermodynamisch begründete abstoßende Wechselwirkungen zum Tragen kommen. Von Bedeutung ist zunächst die Einschätzung des erreichten Antifoulingverhaltens der Funktionalisierungen im Vergleich zum unbeschichteten Substrat und der unmodifizierten Lipidschicht.

### 5.2.3 Funktionalisiertes Tetraetherlipid - Gewässermonitoring

Einen ersten Überblick über die unterschiedlichen Effekte der jeweiligen Lipidfunktionalisierung gewährt das Ergebnis der statischen Messung der Bioadhäsion über 24 h in Flusswasser. Die Modifizierungen TL PEG und TL negativ führen nicht zu einer Reduzierung der Zellzahl. Die Probe TL Kombi, welche beide Modifizierungen verbindet, zeigt andererseits etwa 30 % weniger Bioadhäsion. Die vielversprechendste Funktionalisierung stellt die zwitterionische Modifizierung der Probe TL PC dar.

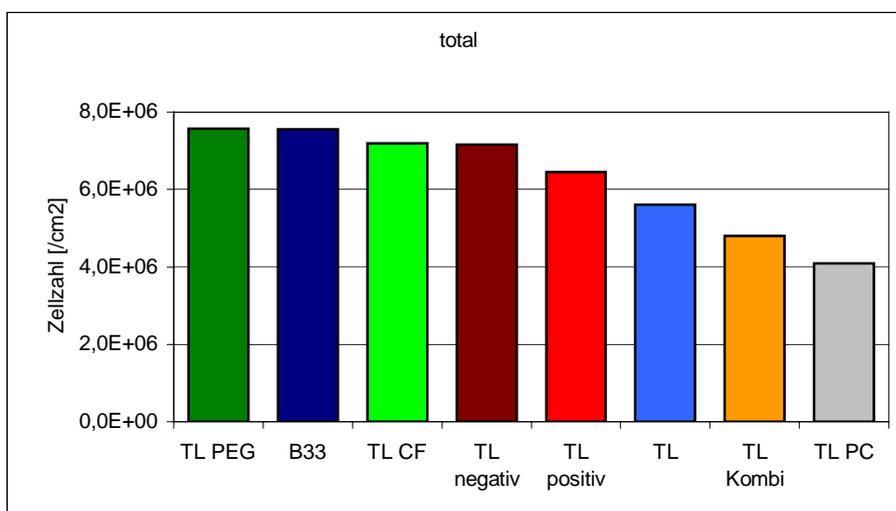


Abb. 55: Zellzahl in Flusswasser, statisch nach 24 h, Substrat: B33

Die Abbildung 56 stellt die Ergebnisse der dynamischen Bioadhäsionsmessungen nach 24 h in den Applikationswässern: Fluss-, Ab- und Trinkwasser gegenüber. Sie erlaubt zunächst den Vergleich der einzelnen Tetraetherlipidmodifizierungen untereinander bezüglich ihres Antifoulingverhaltens, sowie zusätzlich die direkte Gegenüberstellung der unterschiedlichen biologischen Systeme.

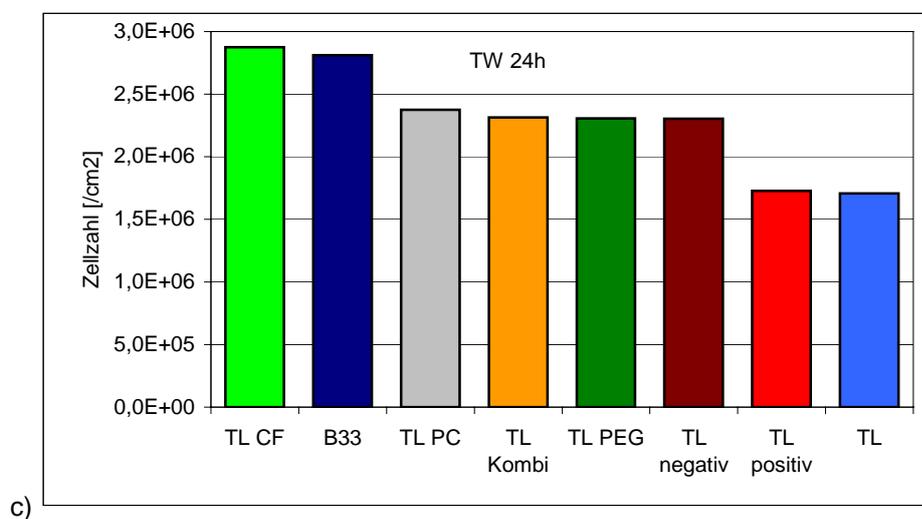
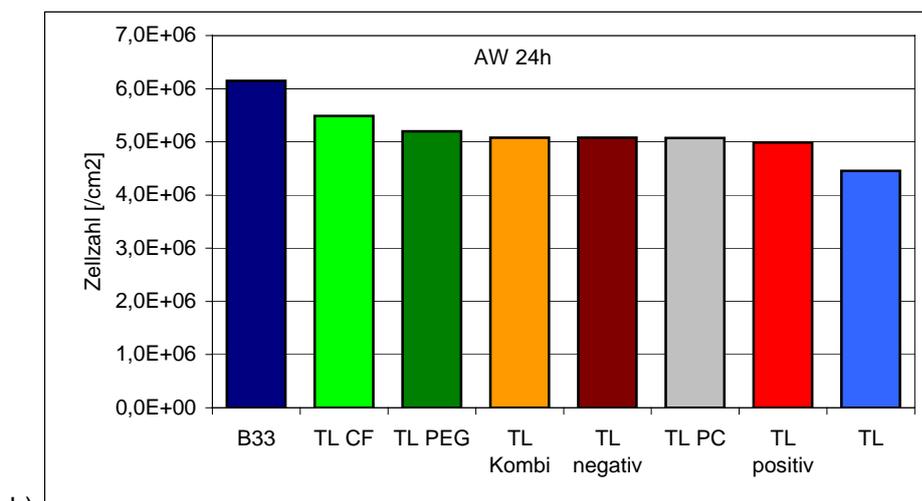
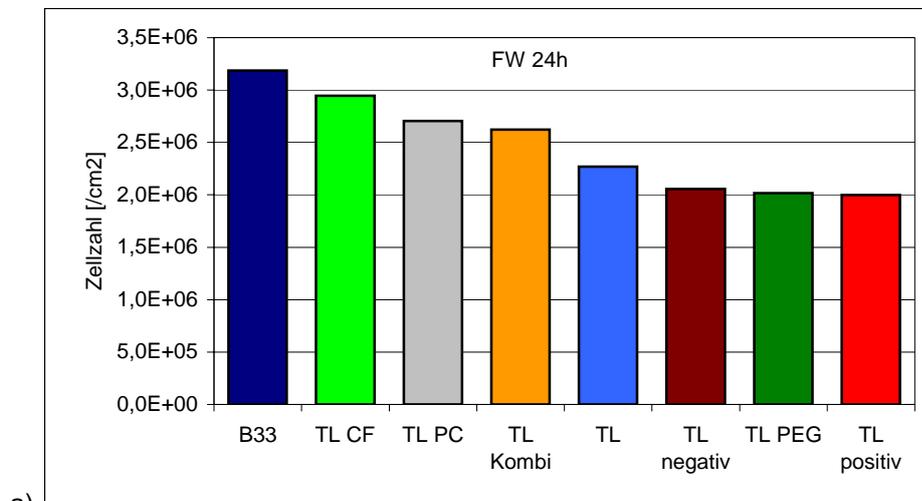


Abb. 56: Zellzahl in Modellwässern, dynamisch nach 24 h, Substrat: B33  
 a) Flusswasser, b) Abwasser, c) Trinkwasser

Der Vergleich der eingesetzten Applikationswässer weist auf signifikante Unterschiede:

- Im Fluss- und Trinkwasser werden drastischere Differenzen zwischen den Modifizierungen ermittelt. Hier führen einzelne Modifizierungen zur Reduzierung der Zellzahl um bis 40%, während im Abwasser nur eine Verringerung der Adhäsion um 20 - 25% erreicht wurde.
- Nach 24 h Inkubation werden im Abwasser für alle Schichten höhere Zellzahlen (bis zu  $6 \times 10^6/\text{cm}^2$ ) ermittelt, in Trink- und Flusswasser dagegen nur Zellzahlen von ca.  $3 \times 10^6/\text{cm}^2$ . Dies wird auf die verstärkte Proliferation der Organismen im Abwasser zurück geführt.
- Die unterschiedlichen Funktionalisierungen führen in den drei Wässern zu einer variierenden Rangfolge in ihrem Antifoulingpotenzial. So nehmen die Proben TL CF, TL Kombi und TL positiv eine stets wiederkehrende Position in der Gegenüberstellung ein, während andere Modifizierungen z.B. TL PC und TL PEG erkennbar medienabhängige Ergebnisse zeigen. Die Diskussion dieses Einflusses der entstehenden Wasserbarriere wird in Kap. 5.3 geführt.

Die Beurteilung des erreichten Antifoulings funktionalisierter Tetraetherlipide in wässrigen Medien zeigt:

- Für die Proben TL PEG, TL negativ, TL positiv sowie das unmodifizierte TL lässt sich insgesamt in allen wässrigen Medien eine positive Bilanz der reduzierten Bioadhäsion ziehen.
- Der Probe TL CF ist kein signifikantes Antifoulingpotenzial zuzuschreiben.
- Für die Proben TL PC und TL Kombi wurde im Durchschnitt nur eine mittelmäßige Reduzierung der bakteriellen Adhäsion ermittelt.

Betrachtet man die Ergebnisse der mikroskopischen Analyse nach 5 h Inkubation, dem frühestem Stadium der Biofilmbildung, so ergibt sich eine leicht geänderte Darstellung:

- Während die Probe TL negativ auch nach kurzer Testdauer in allen Medien ein gutes Antifoulingverhalten zeigt, weichen die Zellzahlen der Proben TL PEG und dem unmodifiziertem TL zu diesem Zeitpunkt teilweise drastisch von dem zuvor beschriebenen Endwert ab. Ein gegensätzliches Verhalten präsentiert die Probe TL CF. Nach kurzer Inkubationszeit ist für diese Modifizierung grundsätzlich eine Reduzierung der Adhäsion dargestellt, während ebenso prinzipiell die Probe TL CF nach 24 h die höchsten Zellzahlen zusammen mit dem unmodifiziertem Glas erreicht.
- Es wird infolgedessen davon ausgegangen, dass diese Funktionalisierungen erst nach mehreren Stunden eine Art Gleichgewichtszustand der Bioadhäsion erreichen. Die Ausbildung einer antiadhäsiv wirkenden Wasserbarriere aufgrund der Hydratation z.B. an Probe TL PEG wird unter Umständen erst nach einiger Zeit wirksam. Andererseits wird am Beispiel der Probe TL CF angedeutet, dass hydrophobe Effekte in fortwährendem Kontakt mit wässrigen Medien unter Strömungsbedingungen nur bedingt über längere Zeiträume stabil sein können.

Im Kapitel 4.3.3 werden die Ergebnisse des Feldversuches in der Talsperre Neustadt präsentiert. Es zeigt sich im Feld ein offensichtliches Antifouling an allen getesteten Tetraetherlipidmodifizierungen. Die nachfolgende Abbildung 57 verdeutlicht dies durch einen Vergleich der im Feld nach mehreren Wochen ermittelten Zellzahlen mit den Ergebnissen der *in vitro*-Labortestungen nach 24 h.

Es wird sowohl im Vergleich zum Trinkwasser als auch zum Flusswasser im Feld ein drastischerer Antifoulingeffekt durch die funktionalisierten Lipide offensichtlich. Diese deutliche Reduktion lässt sich partiell auf die geringere Anzahl von Mikroorganismen im Habitat der Trinkwassertalsperre und die geringere Umgebungstemperatur zurückführen. Dessen ungeachtet wurde der Feldversuch über einen ausreichend langen Zeitraum in einer biologisch aktiven Periode realisiert und präsentiert somit aussagekräftige Resultate für die mögliche Applikation der entwickelten Schichten auf technischen und sensorischen Funktionsflächen.

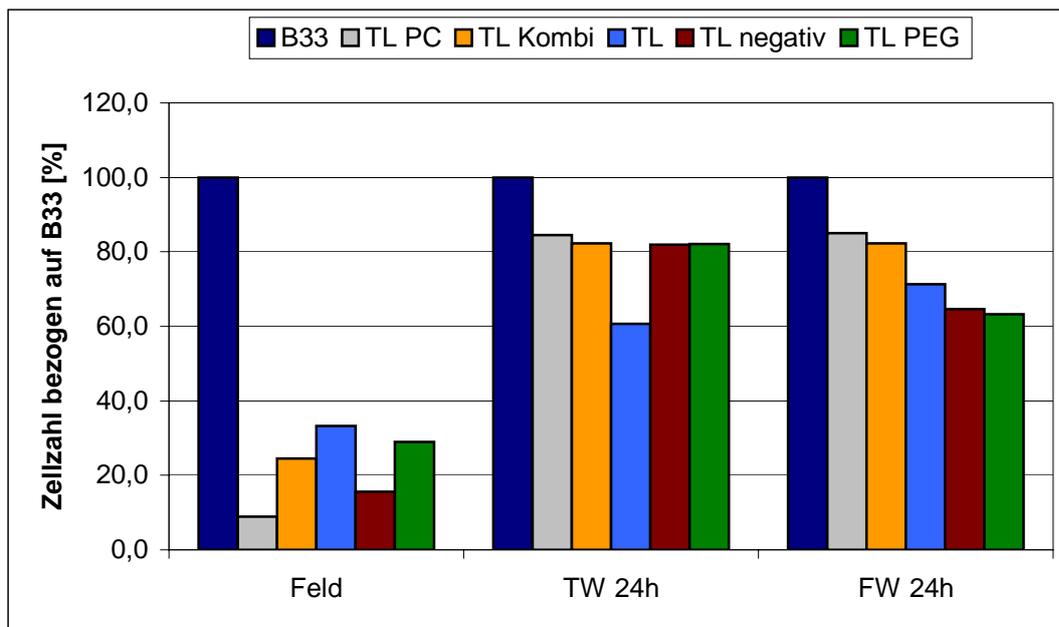


Abb. 57: Zellzahl, bezogen auf Referenzglas B33 im Feld und im *in vitro*-Versuch, Substrat: B33

Haque *et al.* [240] untersuchten in einer aktuellen Studie die Effizienz des zellzerstörenden Moleküls Natriumbenzoat, gebunden an Silikonoberflächen. Sie inkubierten die modifizierten Oberflächen in einer Flusswasserbatchkultur der Isolate des Erie-Sees und erreichten eine Reduzierung der Biofilmbildung um 50% in den ersten 4 Wochen. Wird das Verfahren jedoch direkt im Fluss verwendet, messen die Autoren keine signifikante Reduktion mehr und führen dies auf die härteren realen Umgebungsbedingungen zurück. Das vorliegende Ergebnis des eigenen Feldtests liefert hier dagegen eine verbesserte Situation im Vergleich zu den *in vitro*-Testungen im Labor.

Es ist festzustellen, dass die Größenordnungen (Zahl adhärierter Bakterien je Fläche) den allgemeinen Literaturwerten entsprechen z.B. für eine Adhäsion nach 2 - 5h [241, 242] sowie für eine Adhäsion über 24h [243]. Gleiches gilt für die in Kap. 4 angegebenen Standardabweichungen. In Monokulturen werden Abweichungen bis zu 30 - 40% publiziert, welche zudem von dem untersuchten Mikroorganismus abhängt [91]. Dies vervielfältigt sich teilweise bei Mischkulturen und Feldtests [240, 243-245]. Desgleichen bestätigt sich der Gebrauch von 3 Wiederholungen und 5 – 10 mikroskopischen Aufnahmen zum Erreichen einer statistisch verlässlichen Bewertung [101, 112, 243, 246].

Die vergleichende Betrachtung der Ergebnisse der Laboranalysen und des Feldtests lassen die Annahme zu, dass die gewählte Methodik der *in vitro*-Bioadhäsionsmessungen eine im Feld nicht existente Härteprüfung darstellt.

## 5.2.4 Funktionalisiertes Tetraetherlipid – medizinische Applikation

Das zweite Applikationsfeld bestand in einer medizinischen Anwendung. Hier stehen Ergebnisse der Laboruntersuchungen an funktionalisierten Tetraetherlipidschichten in Kontakt mit den Infektionskeimen *S. aureus* und *S. epidermidis* im Vordergrund.

Bereits die Ergebnisse der Voruntersuchungen im statischen Modus (Abbildung 58) signalisieren einen signifikanteren Einfluss der funktionalisierten Lipidbeschichtung auf die Adhäsion von Infektionskeimen. So zeigten die Proben TL, TL positiv und TL Kombi eine Reduzierung der Zellzahl um bis zu 70%.

Die beiden nachfolgenden Abbildungen präsentieren die Zusammenfassung der Ergebnisse der dynamischen *in vitro*-Adhäsionsprüfung der medizinischen Applikation. Sie beinhalten die Gegenüberstellung der Ergebnisse nach der Seedphase (2 Stunden) und der Feedphase (20 Stunden) des Tests (Abbildung 59-60) und lassen zusätzlich den Vergleich der beiden Substratmaterialien zu.

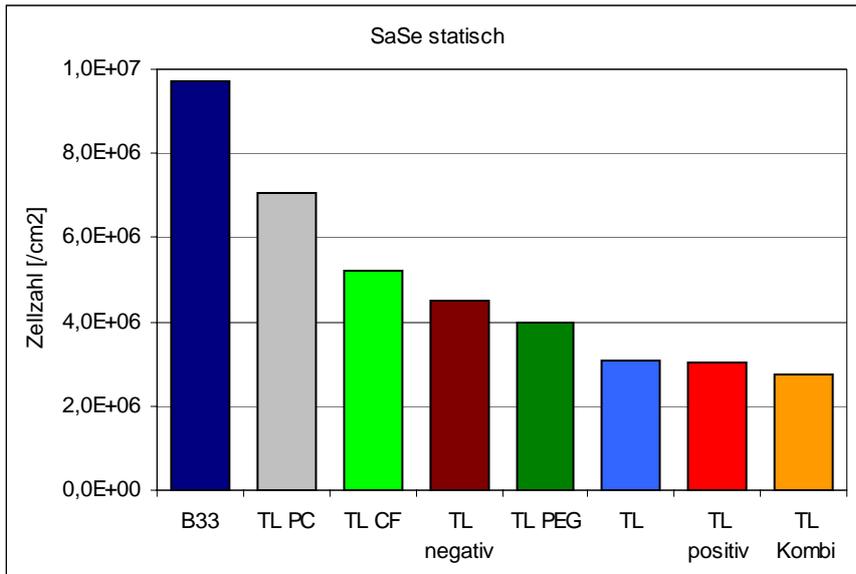


Abb. 58: Zahl adhärerter Mikroorganismen der Staphylokokken-Mischkultur, statische Messung, nach 24 h, Substrat: B33

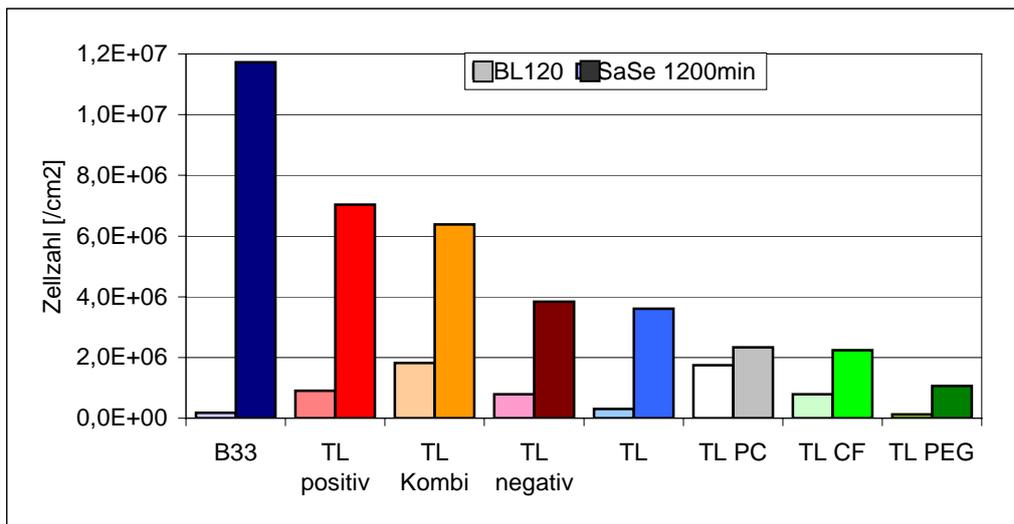


Abb.59: Zellzahl der Staphylokokken-Mischkultur nach 2 und 20 h, Substrat: B33

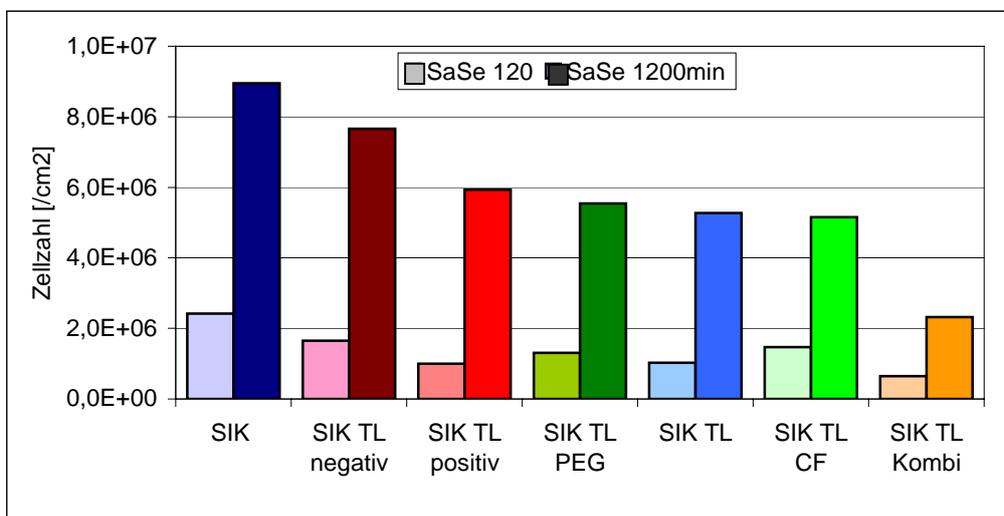


Abb. 60: Zellzahl der Staphylokokken-Mischkultur nach 2 und 20 h, Substrat: Silikon

Die Analyse des Antifoulingverhaltens führt zu folgender Zusammenfassung:

- Auf dem Referenzsubstrat, der unbeschichteten Glasoberfläche B33, werden nach 24 h gegenüber dem unmodifiziertem Polymer geringfügig höhere Zellzahlen erreicht. Zugleich führt die Lipidierung der Glasoberflächen und deren Funktionalisierung zu deutlicheren Effekten hinsichtlich einer reduzierten Zellzahl im Vergleich zu den beschichteten Silikonproben.
- Am Ende der Seedphase zeigt sich auf den beiden Substraten ein abweichendes Resultat. Auf der Glasoberfläche ist nach 120minütiger Inkubation keine Reduzierung der bakteriellen Adhäsion detektierbar. Im Gegenteil, das unbeschichtete Glas weist nach der Probe TL PEG die geringste Zellzahl auf. Die Proben TL PC und TL Kombi zeigen eine mehr als vierfach erhöhte Adhäsion. Die unbeschichtete Silikonoberfläche dagegen weist schon nach der Seedphase die erwartete höchste Zellzahl auf. Parallel dazu wird hier für die Modifizierung TL Kombi das beste antiadhäsive Ergebnis erzielt.
- Demgegenüber führen im Vergleich zu den Ergebnissen in wässriger Umgebung z.B. die Proben TL PC und TL CF nach 24 h zu einem erfolgreichen Antifoulingverhalten, während die Probe TL positiv deutlich schlechter abschneidet. Das unmodifizierte TL und die pegylierte Probe TL PEG weisen erneut vielversprechende Ergebnisse auf.
- Die funktionalisierten Silikonoberflächen bestätigen das Ergebnis weitestgehend. Die Proben SIK TL PEG, SIK TL und SIK TL CF zeigen die stärkste Reduzierung der Zellzahl nach 24 h. Allein die Probe SIK TL Kombi führt im Gegensatz zu den Messungen auf Glas zu dem besten Antifoulingverhalten als Modifizierung des Silikons.

Die ermittelten Zellzahlen auf Glas und Silikon liegen in vergleichbaren Größenordnungen. Ein essentieller Effekt durch die rauere Polymeroberfläche wurde nicht detektiert. Unter Bezugnahme auf die in Kap. 4 präsentierten AFM-Analysen an beiden Substraten kann die Oberfläche als glatt eingeschätzt werden unter Beachtung der durchschnittlichen Bakteriengröße im Mikrometerbereich. Dies entspricht einer Aussage von Bos *et al.*[29] dahingehend, dass die Rauigkeit nur bedingten Einfluss auf die bakterielle Adhäsion zeigt.

Vacheethasane *et al.*[247] verglichen glatte Graphit- und Polyethylenoberflächen, welche sie mit PEG in unterschiedlichen Konzentrationen modifizierten. Die Autoren diskutierten den Einfluss des Substratmaterials, da ein verbessertes Antifouling (*S. epidermidis*) durch die Behandlung des glatten Graphits detektiert werden konnte im Vergleich zum modifiziertem Polymer. Zurückgeführt wurde dies auf die Risse und Oberflächendefekte des Polymers und die damit verbundene geringere Oberflächendichte der Schicht - ein Effekt, der mit der hier vorliegenden Lipidierung des Silikon vergleichbar ist. Dementsprechend ist ein analoges Resultat der eigenen Ergebnisse erkennbar. Die Funktionalisierung der Oberflächen mit Tetraetherlipid in Kopplung mit Polyethylenglykol führte auf der Glasoberfläche zu einer Reduzierung der Bioadhäsion auf ca. 10% (Probe TL PEG) während auf dem Silikon maximal eine Verminderung auf 30% (Probe TL Kombi) abgeleitet werden konnte. Die inhomogene Beschichtung des Silikons aufgrund der Oberflächentopografie (siehe Kap. 5.1) kann die Ursache dessen darstellen.

Harris *et al.*[112] untersuchten auf mit PEG modifiziertem Titan das Adhäsionsverhalten von *S. aureus*. Nach 1h wurde eine Reduzierung der Adhäsion um mehr als 90 % ermittelt. Nach 24 h konnte jedoch nur noch eine Reduzierung von 30 – 50% nachgewiesen werden. Auch dieser Effekt lässt sich in den eigenen Ergebnissen insbesondere auf dem Referenzglas wiederfinden. Des weiteren stellten die Autoren eine zunehmende Clusterbildung der Bakterien auf der pegylierten Oberfläche fest aufgrund stärkerer Wechselwirkungen zwischen den Organismen als zum Material. Die Analyse der eigenen Untersuchungen zeigt nun auf den einzelnen Modifizierungen ebenfalls unterschiedliche Arrangements der adhären Organismen (Abbildung 61 – 62).

Sowohl auf dem unmodifizierten Lipid als auch auf der Probe TL PEG ist eine Agglomeration der Bakterien nach der Feedphase festzustellen, während die Organismen auf den Proben TL negativ und TL Kombi eine homogene Verteilung aus Einzelorganismen oder Gruppen bis zu 5 Zellen aufweisen. Auf der unbeschichteten Glasoberfläche zeigt sich im Vergleich ein dichter bakterieller Rasen. Aufnahmen auf dem beschichteten Silikon bestätigen diese Aussagen: (i) ein geschlossener Rasen auf der unbehandelten Polymeroberfläche, (ii) Clusterbildung nach der Lipidierung und (iii) homogene kleinere Gruppen auf der Probe SIK TL negativ. Umfassendere und vergleichbare Aussagen zur räumlichen Verteilung der adhärenierten Bakterien präsentierte die Arbeitsgruppe um Busscher et al [29, 248] und aktuell bei Allion *et al.*[92]

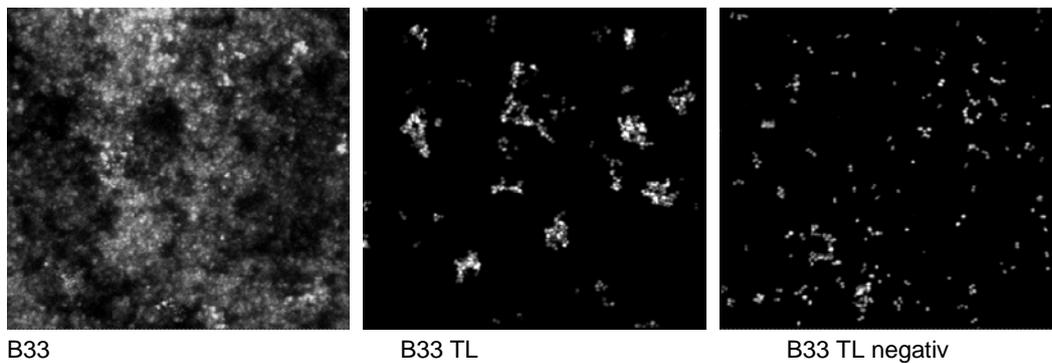


Abb. 61: CLSM-Aufnahmen, Struktur adhärenierte Mikroorganismen, Ausschnitt: 100 x 100 µm

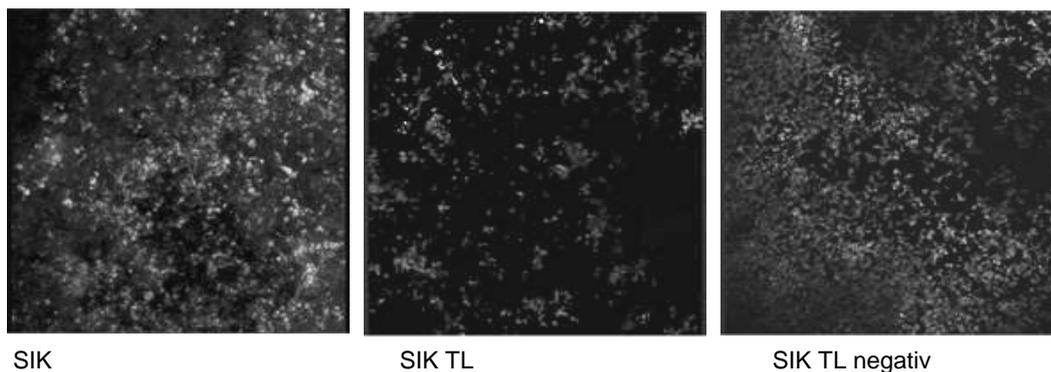


Abb. 62: CLSM-Aufnahmen, Struktur adhärenierte Mikroorganismen, Ausschnitt: 100 x 100 µm

Die Arbeiten an monomolekularen Tetraetherlipidschichten mit dem Ziel des Antifouling sind inhaltlich gut vergleichbar mit der Entwicklung an Phospholipidbilayern, was die nachfolgende Diskussion verdeutlicht. Sie beruhen auf verwandten Wirkprinzipien und bilden analoge Schichtstrukturen aus.

Kim *et al.*[249] untersuchten monomolekulare Phospholipid-Beschichtungen, welche (i) physikalisch adsorbiert und (ii) auf silanisierten Oberflächen kovalent gekoppelt vorlagen. Sie zeigten erwartungsgemäß eine geringe Stabilität der adsorbierten Filme in Waschprozessen und bei der Sterilisation. Die beiden Bindungstypen führten zu unterschiedlichen biologischen Reaktionen.

Park *et al.*[143] modifizierten Polyurethanoberflächen mit PEG unterschiedlicher Kettenlänge sowie durch kurze Moleküle: Hydroxyl-, Amino- und Sulfonatgruppen bzw. Heparin. Sie zeigten in mit *S. epidermidis* und *E. coli* eine starke Abhängigkeit des Antifoulingverhaltens von der zunehmenden Kettenlänge des PEG. Demgegenüber führten die zusätzlich gekoppelten Moleküle zu signifikanten aber geringeren Effekten, wobei die Amino- und die Sulfonatgruppe eine weitere Reduzierung der Adhäsion bewirkten. Im Vergleich zu den eigenen Messungen speziell der medizinischen Applikation, welche ebenfalls die Adhäsion von Infektionskeimen behandelte, erscheint ein vergleichbares Bild: die Modifizierung mit PEG 3000 führte zu einer signifikanten Reduktion der Adhäsion, und es wurde durch die Kopplung von Sulton bei der Probe TL negativ und der Probe TL Kombi ein Antifouling erreicht.

Die dargestellte Analyse des Antifoulingpotenzials der Tetraetherlipidschichten und ihrer Funktionalisierungen lässt sich insgesamt in einer positiven Bilanz zusammenfassen. Die erreichte Reduzierung der bakteriellen Adhäsion im *in vitro*-Laborversuch ist grundsätzlich mit den Darstellungen anderer Arbeitsgruppen vergleichbar. Insbesondere im Feldtest wurde ein deutlich messbares Antifoulingverhalten erreicht.

Die Beschichtung der Materialien mit dem Tetraetherlipid allein zeigt bereits durchgehend einen die Bioadhäsion reduzierenden Effekt.

In den Applikationswässern werden im Labor Adhäsionsminderungen um bis zu 40% in Fluss- und Trinkwasser erreicht, während im Abwasser nur eine Verringerung der Adhäsion um 20 - 25% ermittelt wurde. Die unterschiedlichen Funktionalisierungen führen in den drei Wässern zu einer variierenden Rangfolge in ihrem Antifoulingpotenzial. Für die Proben TL PEG, TL negativ, TL positiv sowie für das unmodifizierte TL lässt sich insgesamt in allen wässrigen Medien eine positive Bilanz ziehen. Demgegenüber führen die Proben TL PC und TL CF nach 24 h zu einem erfolgreichen Antifoulingverhalten im Infektionsmodell. Das unmodifizierte TL und die pegylierte Probe TL PEG weisen erneut vielversprechende Ergebnisse auf. Die funktionalisierten Silikonoberflächen bestätigen das Ergebnis weitestgehend. Allein die Probe SIK TL Kombi führt im Gegensatz zu den Messungen auf Glas zu dem besten Antifoulingverhalten als Modifizierung des Silikons.

Die Analyse der Adhäsionsmessung mit Einzelorganismen an einer lipidierten Glasoberfläche weist auf eine konkurrierende Adhäsion mehrerer Organismen in der Mischkultur hin. Das Adhäsionspotenzial der einzelnen Mikroorganismen variiert drastisch.

Die bildliche Darstellung der adhärierten Staphylokokken deutet zudem auf den Effekt der funktionalisierten Lipidschichten bezüglich der Biofilmstruktur: mit der Beschichtung werden unterschiedliche Clusterbildungen erreicht.

Der Aufbau des Bioadhäsionsmessplatzes auf der Basis von Laborbioreaktoren, gekoppelt an die Anwendung applikationsspezifischer mikrobiologischer Mischkulturen weist die erwarteten Möglichkeiten in der *in vitro*-Laborprüfung auf. Als zentrale Basis des gewählten Methodenspektrums unter Einbeziehung von Modellanalysen mit Einzelorganismen zum Einen und der Realisierung von praxisrelevanten Feldtest zum Zweiten ergibt sich ein umfassendes Bild des erreichten Antifoulingpotenzials. Letztendlich ist auf dieser Grundlage eine Optimierung der Testmethodik bezüglich der labortechnische Umsetzbarkeit einer praxisrelevanter Biofilmprüfung ermöglicht.

### 5.3. Betrachtung der Wechselwirkungen

Maßgeblich für die Biofilmbildung sind die Wechselwirkungen an der Grenzfläche Substrat/biologisches System. Insbesondere die Primärbesiedlung gilt in erster Linie als physikalisch-chemisch kontrollierter Prozess. Das Verständnis der thermodynamischen Mechanismen der bakteriellen Adhäsion bildet nun die Grundlage der Entwicklung neuer Antifoulingstrategien. Die vorliegende Diskussion lässt spezifische Interaktionen zwischen Mikroorganismen und Oberflächenfunktionalisierungen außer Betracht. Des Weiteren liefern die gewählten experimentellen Versuchsbedingungen keine Möglichkeit, die Born'schen Interaktionen zu analysieren. Nachfolgend werden die verbleibenden Wechselwirkungsenergien diskutiert. Dabei steht der essentielle Einfluss aller beteiligten Phasen: Mikroorganismus, Medium und Substrat im Mittelpunkt der Betrachtung.

#### 5.3.1 Korrelationsbetrachtungen

Korrelationsbetrachtungen basierend auf experimentellen Befunden zur Bioadhäsion und der makroskopischen Oberflächencharakteristika stehen seit Jahrzehnten im Fokus zahlreicher Studien und Publikationen. Im Rahmen der Diskussion der eigenen Befunde werden zu den einzelnen Oberflächenparametern vergleichend die Ergebnisse aus der Literatur dargestellt und anschließend eigenen Korrelationsbetrachtungen gegenüber gestellt.

Vorerst wurden Kontaktwinkel als Parameter der Hydrophobizität der beteiligten Komponenten mit der Bioadhäsion und der Biofilmbildung korreliert. Dabei diskutierten die Autoren den Einfluss der Hydrophobizität durchaus kontrovers. Bezüglich der hydrophoben Parameter der Mikroorganismen verweisen Ong *et al.*[250] im Ergebnis ihrer Untersuchungen zur Adhäsion von zwei *E. coli* Stämmen darauf, dass hydrophobe Wechselwirkungen die dominante Rolle dahingehend spielten, dass moderat hydrophobe Mikroorganismen auf hydrophoben Materialien verstärkt angezogen werden, während hydrophile Zellen hydrophile Oberflächen favorisieren. Ein analoges Verhalten zeigten Vacheethasane *et al.* [251] an einem hydrophoben Stamm *S. epidermidis*. und Bruinsma *et al.*[224] durch die stärkere Adhäsion eines hydrophoben Stammes der *P. aeruginosa* auf modifizierten Kontaktlinsen. Strevett *et al.*[252] wiesen nach, dass die hydrophoben Eigenschaften und damit die Adhäsion einer bakteriellen Oberfläche durch die Eigenschaften gram-positiv und gram-negativ gesteuert wird, wobei die Peptoglykane der gram-positiven Mikroorganismen zu einer stabilen Hydrophilie führten. Dagegen lässt der hohe Lipidanteil der Zelloberfläche gram-negativer Mikroorganismen eine starke Variation der Hydrophobizität zu. Der Einfluss der Hydrophobie der Materialien verkomplizierte die Zusammenhänge. Speziell die Adhäsion von Seewasserbakterien (16 Stämme) analysierten Grasland *et al.* [253] und stellten im Ergebnis die mehrheitlich hydrophilen Mikroorganismen als primären Besiedler der hydrophilen Glasoberfläche dar. Hydrophobe Bakterien besiedelten erst nach 6 h die Glasoberfläche. Ista *et al.* [246] untersuchten die Adhäsion des *C. marina*. Sie stellten einen Anstieg in der bakteriellen Adhäsion mit dem Sinken des Wasserkontaktwinkels (stärkere Hydrophilie) fest. In der Bewertung des Ergebnisses wird auf die Arbeiten von Absalom *et al.* [254, 255] verwiesen. Sie korrelierten neben dem Wasserkontaktwinkel verschiedener Kunststoffe deren Oberflächenspannung mit der Bioadhäsion und verwiesen auf den entscheidenden Einfluss der van der Waals'schen Wechselwirkungen, insbesondere bei der Proteinadsorption als ersten Schritt der Biofilmbildung. Sie konnten eine Beziehung zwischen der Hydrophobie und der Zellzahl im Plateaustadium darstellen. Ebenfalls eine eindeutige Korrelation verzeichneten Callow *et al.* [256] zwischen der Hydrophobie der Materialoberfläche und dem Spreiten von Algensporen. Die Hydrophobizität führt zu kleineren mit Adhäsinen gefüllten Polstern unter der Spore.

Die Kontaktwinkelmessungen an den hier untersuchten Mikroorganismen präsentierten nur für 2 Stämme hydrophobe Parameter: AW 6.2 und AW 6.7. Die Bioadhäsionsergebnisse (Kap. 5.2) führten jedoch nicht zu einer gesteigerten Adhäsion dieser Stämme. Die hydrophoben Bakterien besiedelten auch das

hydrophile Substrat gering. Für die stark hydrophilen Stämme FW 2.5, FW 5.7, TW 9.5 und AW 7.12 wurde jedoch in Kontakt mit der unbehandelten Glasoberfläche eine gesteigerte Adhäsion ermittelt. Aber auch die Tetraetherlipid modifizierten Oberflächen stellen hydrophile Schichten dar und führen für diese Mikroorganismen zu einer stärkeren Adhäsion im Vergleich zu den hydrophoberen Stämmen. Dies bestätigen die zuvor beschriebenen Studien [246, 250].

Der Einfluss der Variation des hydrophilen Charakters der Lipide auf die Adhäsion der Bakterien der Applikationswässer ist nur untergeordnet, wie die nachfolgende Abbildung 63 verdeutlicht. Allein die Adhäsion der Staphylokokken in Dialysemedium zeigt eine sichtbare Reduzierung mit dem Anstieg des Kontaktwinkels auf der Substratoberfläche. Der stärkere Einfluss wird hier möglich, da die elektrostatischen Effekte aufgrund der hohen Ionenstärke des Medium unterdrückt werden. Roosjen *et al.* [47] diskutieren eine entsprechende Hypothese und beschreiben den gestärkten Einfluss hydrophober Wechselwirkungen bei hohen Ionenstärken des Mediums. In einer aktuellen Arbeit veranschaulichen Brizzolara *et al.* [93] jedoch, dass ein Einfluss der Oberflächenspannung eines Materials auf die Bioadhäsion allein unter strenger Beachtung der Scherkraft bewertet werden kann. In Übereinstimmung mit den Autoren bewirkt das Spülen der Fließkammer insbesondere bei der Messung mit Staphylokokken die für die Analyse notwendige Scherkraft.

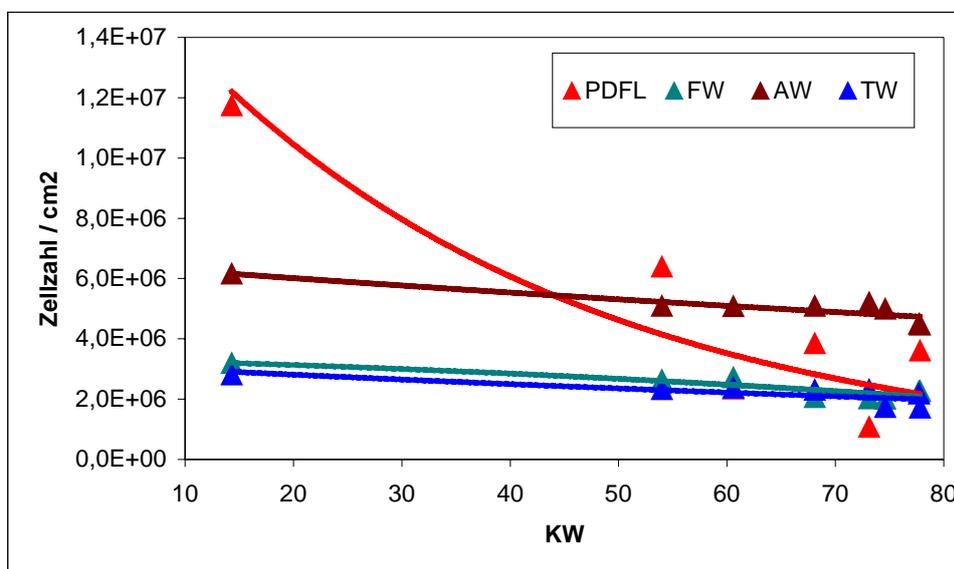


Abb. 63: Beziehung zwischen bakterieller Adhäsion und der Hydrophobizität des Substrates  
Ionenstärken siehe Tabelle 16

Neben der Hydrophobie bildet die Schleimhülle der Bakterien einen zusätzlichen Oberflächenparameter der Mikroorganismen. Zum Einen werden Korrelationsanalysen zwischen der Bioadhäsion und dem Wasserkontaktwinkel gestützt, da die Schleimhülle die Hydrophobie steuert. In den vorliegenden Ergebnissen existiert jedoch kein direkter Zusammenhang zwischen der Hydrophobie der Bakterienoberfläche und der Dicke der Schleimhülle. Andererseits ist neben der eigentlichen Dicke der Schleimhülle die elementare Zusammensetzung des Schleimes von Bedeutung, so dass die EPS sowohl adhäsionsfördernd als auch antiadhäsiv wirken kann. Zudem besitzen vor allem Adhäsine (Polysaccharide der EPS) eine entscheidende Funktion bei der Bioadhäsion [257]. Gesichert scheint dennoch, dass die Schleimbildung ein antiadhäsives Verhalten allein durch die Hemmung der Penetration der Zellwand aber auch aufgrund des verbleibenden größeren Abstandes zwischen den interagierenden Oberflächen und den damit einhergehend geringeren Wechselwirkungen bewirken kann.

Die Betrachtung der hier vorliegenden Ergebnisse zur Bioadhäsion in den Applikationswässern bezogen auf die ermittelte Schleimdicke deutet auf eine derartige Tendenz (Abbildung 64). Mit zunehmender Dicke der Schleimschicht nimmt die Zahl der adhärenierten Zellen ab.

Diese Hypothese wird durch die Arbeiten von Gomez-Suarez *et al.*[64] gestützt: Sie stellten für den schleimbildenden *P. aeruginosa* eine deutlich reduzierte Adhäsion auf Glas fest im Vergleich zu einem nicht schleimbildenden Stamm. Baldassari *et al.*[258] führten dies auf die mit zunehmender Schleimbildung erreichte Abschirmung der Zelloberfläche insbesondere die Maskierung der aktiven Proteine zurück. Im Ergebnis erscheint der Einfluss materialspezifischer Oberflächenparameter auf die Organismen mit dünner Schleimhülle signifikanter, da die Wechselwirkung der Materialoberfläche mit der eigentlichen Zelloberfläche besser möglich ist.

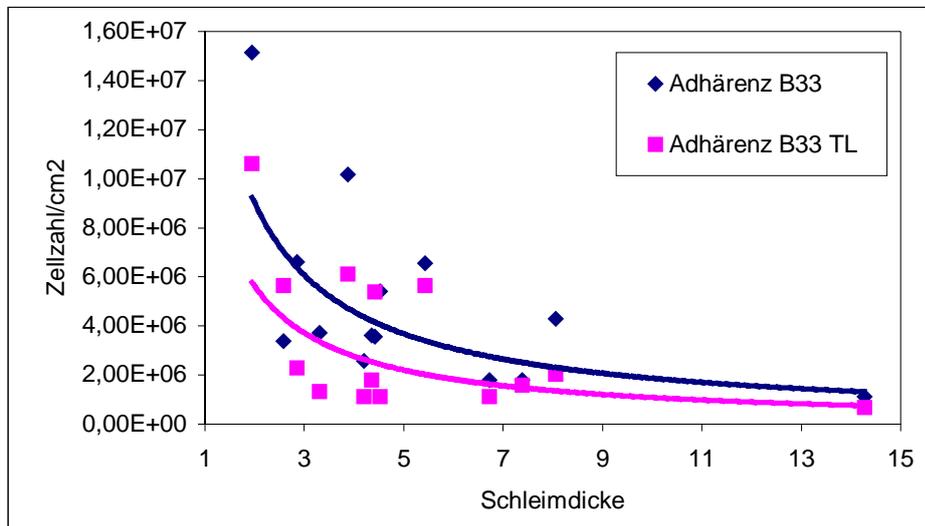


Abb. 64: Beziehung zwischen bakterieller Adhäsion und Dicke der Schleimhülle der Bakterien

Elektrostatische Charakteristika der Substrate und der Mikroorganismen wurden wiederholt in Bezug zu dem erreichten Antifouling gesetzt. Einen besonderen Stellenwert erhalten hierbei jedoch die Parameter des umgebenden Mediums hinsichtlich der Zusammensetzung, der Ionenstärke und des pH-Wertes. Es ist zu erwarten, dass Oberflächenpotenziale der Mikroorganismen und Substrate aufgrund der Ausbildung einer effektiven elektrochemischen Doppelschicht (siehe Kap. 2.1) in wässrigen und niedrig konzentrierten Medien einschneidender wirken. Der Zusammenbruch der elektrostatischen Abstoßung in Medien höherer Ionenstärke lässt dagegen die Zunahme der Adhäsion erwarten. Die elektrostatische Abstoßung der im Allgemein negativ geladenen, synthetischen und bakteriellen Oberflächen wird reduziert, andere gegebenenfalls anziehende Kräfte werden wirksam.

Vigeant *et al.* [153] beschrieben einen signifikanten Effekt der Ionenstärke auf die Bewegung der Mikroorganismen in der Umgebung einer Substratoberfläche. Hohe Ionenstärken bremsen die Bakterienbewegung und können so die Besiedelung der Oberfläche steigern. Abu-Lail *et al.* [110] wiesen an Konformationsänderungen der bakteriellen Oberflächenpolymere mit zunehmender Ionenstärke von 0,01 M bis 0,05 M nach. Die damit zunehmende geordnete Struktur der Polymere beeinflusst das Adhäsionspotenzial und führt bei Werten von mehr als 0,05 M zur Anziehung. L. Lewis [154, 236] entwickelte ein Modell der elektrosterischen Wechselwirkung und kombinierte den Einfluss der Ionenstärke und des pH-Wertes des Mediums. Im Ergebnis wurde deutlich, dass der Einfluss sterischer Strukturen in wässrigen Medien mit geringer Ionenstärke deutlich intensiver zu erwarten ist im Vergleich zu einer hohen Ionenkonzentration. Im Medium mit einer Ionenstärke < 0,001 M werden elektrostatische Energien präsent und es entwickeln sich richtungsabhängige Strukturen im Biofilm. Bos *et al.* [29] bestätigten den Effekt der Ionenstärke auf die Struktur des sich bildenden Biofilms. Der Biofilm bildete sich in einem Medium mit hoher Ionenstärke > 0,01 M gleichmäßig bzw. rotationssymmetrisch aus. Das Gleichgewicht zwischen hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen in unterschiedlich konzentrierten Medien diskutierten Salerno *et al.* [259]. Liegen die Debyelängen, welche direkt von der Ionenstärke abhängig sind, unterhalb der Länge der hydrophoben Kohlenwasserstoffketten einer Beschichtung, so spielt die hydrophobe Anziehung eine wesentliche Rolle.

Zum Beispiel wurde die wirksame Grenze für ein Silan mit einer Kettenlänge von ca. 2,8 nm bei einer Elektrolytkonzentration zwischen 0,1 – 0,01 M gezogen. Letztendlich verglichen Rijnaarts *et al.* [48] den Einfluss sterischer und DLVO-Energien auf die bakterielle Adhäsion in verschiedenen Medien. Es zeigte sich, dass bei einer geringen Ionenstärke ( $I < 0,01$  M) die DLVO-Wechselwirkungen dominieren, während bei höheren Werten ( $I > 0,1$  M) die sterischen Effekte größeren Einfluss haben. Diese können jedoch sowohl anziehend („Polymer Bridging“) als auch abstoßend (osmotischer Druck) wirken. Die Autoren verallgemeinern in der Zusammensetzung des Mediums die wesentliche Unterscheidung, ob allein DLVO-Wechselwirkungen (z.B. Trinkwasser), beide Effekte (z.B. Abwasser, Speichel) oder allein sterische Wechselwirkungen (z.B. Blut, Seewasser, Urin) von Bedeutung sind. Übereinstimmend zeigt die Diskussion des Einflusses der Ionenstärke einen kritischen Wertebereich zwischen 0,01 M und 0,1 M.

Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu entsprechenden Schlussfolgerungen bezüglich des Effekts der Ionenstärke des Mediums auf die Bioadhäsion, wie die Abbildung 65 anhand der Ergebnisse der Prüfung im dynamischen Modus verdeutlichen soll. Der kennzeichnende Parameter ist dabei die Variation der Zellzahl zwischen den funktionalisierten Tetraetherlipidschichten. Niedrige Ionenstärken führten nur zu einer unbedeutenden Streuung in Bezug auf das Substratmaterial, während die Messung bei einer Ionenstärke von mehr als 0,1 M deutlich breiter differierende Zellzahlen innerhalb einer Größenordnung aufwies. Der Zusammenbruch der elektrostatischen Interaktion infolge der hohen Ionenstärke lässt nun den Einfluss sterischer Wechselwirkungen sichtbar werden. Dementsprechend zeigt das sterische wirksame PEG die stärkste Reduzierung der Adhäsion und die physikochemische Funktionalisierung der Lipidschichten wird effektiver. Wendet man das Modell nach Rijnaarts an [48], so wirkt an der Grenzfläche zwischen Sensormaterial und Biosystem in den Applikationswässern ein Mix aus van der Waal's, elektrostatischen und sterischen Kräften. Im Bereich der medizinischen Applikationen, welche zumeist mit Medien höherer Ionenkonzentration in Kontakt treten, sind dagegen die sterischen Wechselwirkungen dominant.

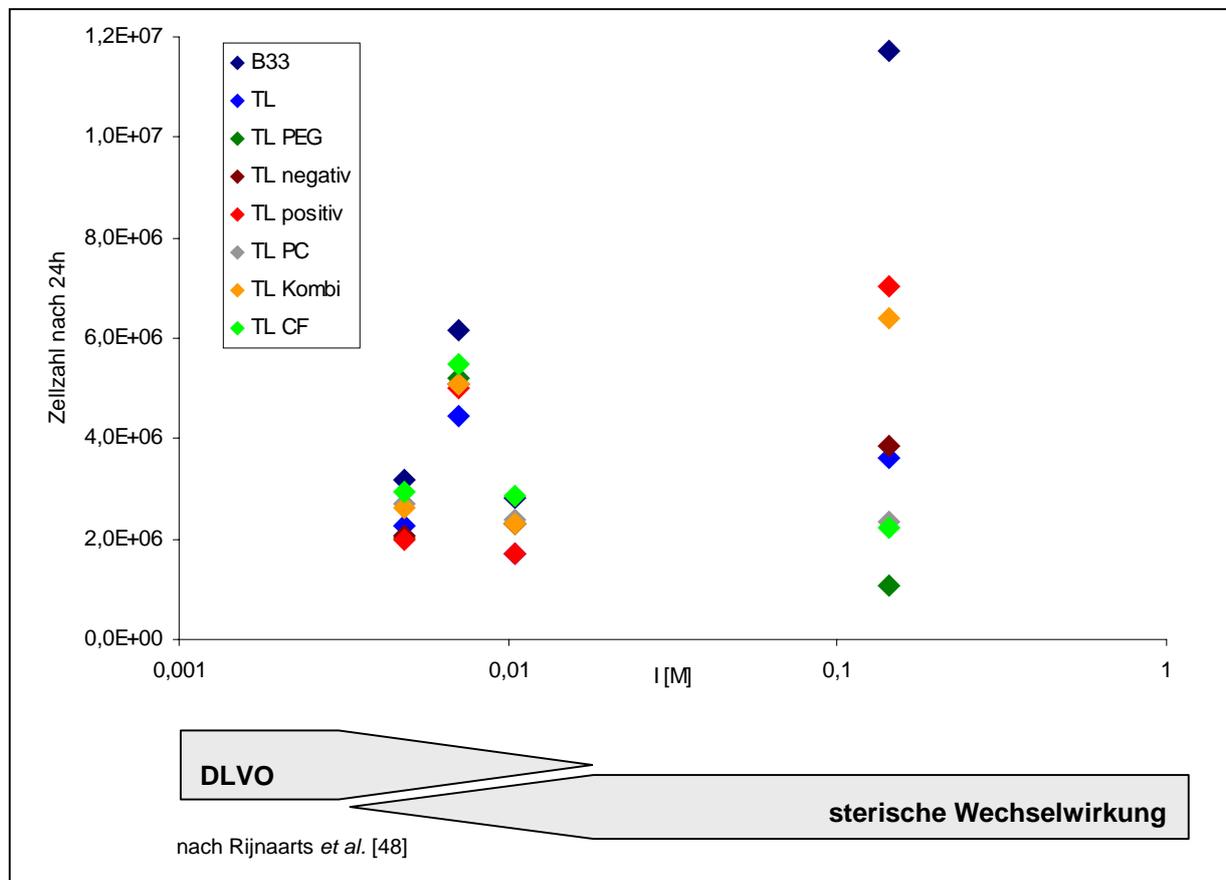
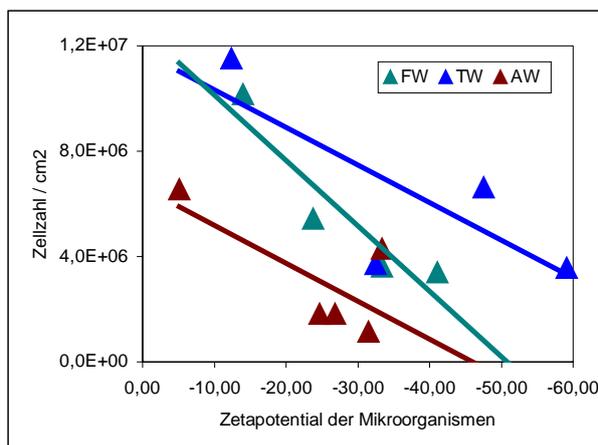


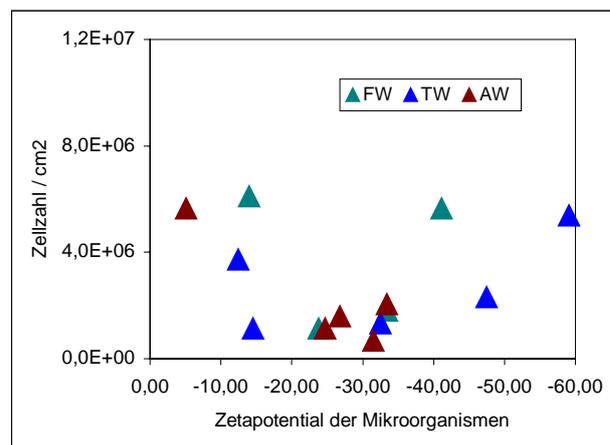
Abb. 65 : Beziehung zwischen der Ionenstärke und der Bioadhäsion nach 24 h in Wässern, Substrat: B33

Emoto *et al.* [123] wiesen anhand der Nivellierung der ursprünglichen Oberflächenladung des Substrates das Entstehen eines dichten Oberflächenfilms nach und sahen in dem reduzierten Oberflächenpotenzial das Wirkprinzip des Antifouling. Am Beispiel ubiquitär vorkommender Proteine z.B. Albumin untersuchten Brandes *et al.* [103] die Korrelation der Proteinadsorption zum pH-Wert des Mediums. Sie legten ein Maximum der Proteinadsorption dar, wenn das Medium den pH-Wert des IEP des Proteins annimmt. Gross *et al.* [260] untersuchten die Rolle geladener Zellwandpolymere (Teichoic acid) von *S. aureus*. Im Vergleich zeigten sie, dass insbesondere die initiale Bioadhäsion elektrostatisch kontrolliert ist: die negative Ladung der Zellwand führt zu einer abstoßenden Reaktion. Eine vergleichbare Hypothese hinsichtlich der initialen bakteriellen Adhäsion präsentieren Gottenbos *et al.* [261]. Die Bioadhäsion von *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *S. epidermidis* an Silikon erfolgt schneller, da keine elektrostatische Abstoßung präsent ist [244]. Jucker *et al.* [102] untersuchten die Adhäsion zweier bakterieller Stämme mit unterschiedlicher Ladung: (i) *S. maltophilia* – positiv, hydrophil und (ii) *P. putida* – negativ, moderat hydrophob. Die Autoren ordnen dem schwach positiv geladenem Mikroorganismus ein stärkeres Adhäsionspotenzial zu, was auf elektrostatische Anziehungen an der Grenzfläche zum Medium zurückgeführt wird. Die dicke diffuse Doppelschicht des *P. putida* behindert dagegen die Adhäsion auf negativ geladenen Oberflächen. Auch van Loosdrecht *et al.* [262] extrapolierten eine Korrelation zwischen der Hydrophobizität der Mikroorganismen, deren Oberflächenpotenzial und der Adhäsion auf Polystyrol. Ist das Substrat negativ geladen, so werden bei hoher Ladung die geringsten Adhäsionsraten erzielt.

Zusammenfassend spiegelt sich der dargestellte Trend der Verminderung der initialen Adhäsion im Zusammenhang mit einer elektrostatisch wirksamen Abstoßung auch in den Ergebnissen dieser Arbeit wieder. Setzt man die bakterielle Adhäsion der Einzelorganismen der Applikationswässer (nach 24 h, dynamischer Modus) in Bezug zu dem Zetapotenzial der Mikroorganismen, so ergeben sich für die Wechselwirkung mit dem äußerst negativ geladenen Glassubstrat erkennbare abstoßende Eigenschaften bei stärker negativ geladenen Bakterien (Abbildung 66 links). Diese Verknüpfung lässt sich auf mit Tetraetherlipid beschichteten Oberflächen nicht reproduzieren (Abbildung 66 rechts). Die Begründung liegt zum Einen in dem um mehr als 60% reduzierten Zetapotenzial der lipidierten Oberfläche sowie in dem Hervorrufen zusätzlicher z.B. nitelektrostatischer Interaktionen an der Grenzfläche zum Lipid.



B33



B33 TL

Abb. 66: Beziehung zwischen der Bioadhäsion in Wässern und dem Zetapotenzial der Mikroorganismen

**Die diskutierten Korrelationsbetrachtungen lassen sich nun wie folgt zusammenfassen:**

**Die Hydrophobie des Substratmaterials beeinflusst im vorgestellten Ergebnis die bakterielle Adhäsion nur unwesentlich. Allein bei herabgesetzten elektrostatischen Effekten spielen hydrophobe Interaktionen zwischen den Mikroorganismen und der Materialoberfläche eine zunehmendere Rolle.**

Mit zunehmender Dicke der den Mikroorganismus umgebenden Schleimschicht nimmt die Zahl der adhärenierten Bakterien ab. Dies wird auf die Verminderung anziehend wirksamer Wechselwirkungen durch die Schleimschicht selbst bzw. auf den vergrößerten Abstand zwischen den beteiligten Oberflächen zurück geführt. Parallel dazu werden Proteinfunktionen maskiert.

Eine elektrostatisch wirksame Abstoßung kommt auf der negativ geladenen Glasoberfläche zum Tragen. Die Lipidierung des Substrates lässt dagegen keine vergleichbaren elektrostatischen Effekte erkennen. Dieser Sachverhalt wird gestützt durch die Reduzierung der Bioadhäsion im Kontext zur Nivellierung der Oberflächenpotenziale der lipidierten Substrate.

Die Ionenstärke des umgebenden Mediums kennzeichnet die Variation der Zellzahl zwischen den funktionalisierten Tetraetherlipidschichten untereinander. Niedrige Ionenstärken von  $< 0,01 \text{ M}$  führten nur zu einer unbeträchtlichen Streuung in Bezug auf das Substratmaterial, während die Messung bei einer Ionenstärke von mehr als  $0,1 \text{ M}$  deutlich breiter differierende Zellzahlen innerhalb einer Größenordnung aufwiesen. Wendet man das Konzept nach Rijnaarts an [26], so wirkt an der Grenzfläche zwischen Sensormaterial und Biosystem in den Applikationswässern ein Mix aus van der Waals, elektrostatischen und sterischen Wechselwirkungskräften. Im Bereich der medizinischen Applikationen, welche zumeist mit Medien höherer Ionenkonzentration in Kontakt treten, sind dagegen die sterischen Wechselwirkungen dominant.

### 5.3.2 Applikation des theoretischen Modells

Mit der Zeit ergänzten die vornehmlich experimentell begründeten Korrelationsbetrachtungen das Einbringen experimenteller Befunde in theoretische Modellvorstellungen. Mit dem Ziel der Interpretation der adhäsionsbestimmenden Kräfte bevorzugen die Autoren in den existierenden Arbeiten drei Modelle: (i) das Grenzflächenenergiekonzept als thermodynamisches Modell, (ii) die klassische DLVO-Theorie und (iii) die erweiterte DLVO-Theorie, welche einen kolloidchemischen Hintergrund haben.

In der freien Adhäsionsenergie fasst das **Grenzflächenenergiekonzept** verschiedene Terme als Ausdruck von Wechselwirkungsenergien zusammen. Grundsätzlich gilt mit der Gleichung nach Dupré:

$$\Delta G_{adh} = \gamma_{sm} - \gamma_{sl} - \gamma_{ml} \quad (51)$$

eine Begünstigung der Adhäsion bei  $\Delta G_{adh} < 0$ . Zur Umsetzung dieses thermodynamischen Ansatzes existieren unterschiedliche Modelle, welche allerdings untereinander inkompatibel sind. Die Theorie nach Neumann [263] beispielsweise basiert auf der Bestimmung eines einzelnen Kontaktwinkels an der Dreiphasengrenze. Nach Neumann ist die Bemessung rein mathematischen Ursprungs und lässt daher experimentelle Bewertungen und molekulare Details unbeachtet. In einem zweiten Modell werden disperse Energieanteile und polare Komponenten separiert [29, 242, 264]. Dieser Polar/dispers-Ansatz wird erfolgversprechend zur Bestimmung des Adhäsionspotenzials von Bakterien angewendet, wenn keine spezifische Interaktionen auftreten. Kritisch zu bewerten ist die gebrauchte Voraussetzung, dass die Wechselwirkungen ihren Ursprung allein in permanenten Dipolen begründen und diese stets symmetrisch auftreten. Im dritten Ansatz - dem Elektronendonator/Elektronenakzeptor-Modell - wird die polare Komponente der freien Adhäsionsenergie zusätzlich aufgegliedert. Permanente Dipole tragen zu intermolekularen Effekten bei und sind vernachlässigbar gegenüber Säure-Base-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen. Aktuelle Analysen unterstrichen zum Teil, dass bezüglich einer vergleichenden Kalkulation der Oberflächenspannung und ihrer dispersen und polaren Anteile beide letztgenannten Ansätze im Verlauf analog sind, allein die Absolutwerte differieren nachdrücklich [265].

Die Grundprobleme des Grenzflächenenergiekonzeptes liegen dennoch weiterhin in der exakten Kalkulation der energetischen Grenzflächenparameter und dem Aspekt, dass der thermodynamische Ansatz streng genommen für ein geschlossenes System gilt. Es wird allein die Energiedifferenz zwischen dem Zustand eines adhären und eines nichtadhären Mikroorganismus kalkuliert. Als Gleichgewichtsmodell erlaubt es keine kinetischen bzw. distanzabhängigen Interpretationen. Das Problem der eindeutigen messtechnischen Erfassung der einzelnen Grenzflächenspannungen bleibt ebenfalls ungelöst.

Die **klassische DLVO-Theorie** wurde unter Kapitel 2.1.2.3 dargestellt. Deren Applikation auf bioadhäsive Phänomene fand vorrangig in den 80-iger Jahren Verbreitung [67, 81, 262, 266-269]. Es zeigte sich sehr schnell, dass die klassische DLVO-Theorie unter Bezugnahme allein auf die van der Waals- und elektrostatischen Interaktionen die Komplexität des Grenzflächengeschehens nicht umfassend beschreiben kann. Hohe Ionenstärken des Mediums, der Einfluss von Makromolekülen und wandständigen Polymeren sowie insbesondere hydrophobe und hydrophile Interaktionen führten zu Einschränkungen.

Es wird deutlich, dass weder der thermodynamische Ansatz des Grenzflächenenergiekonzeptes noch die klassische DLVO-Theorie die Möglichkeiten bieten, die Bioadhäsion hinlänglich zu modellieren. Unter Einbeziehung hydrophober und hydrophiler Wechselwirkungen in das theoretische Modell der Bioadhäsion bildete van Oss [37, 270] die **erweiterte DLVO-Theorie**, welche von zahlreichen Arbeitsgruppen übernommen und weiterentwickelt wurde [27, 29, 48, 102, 107]. Bisher beziehen die Autoren als grundlegende Komponenten neben der van der Waals- und der elektrostatischen Energie die Säure-Base-Wechselwirkung und die Brownsche Bewegung ein, wobei die Säure-Base-Energie auf den Beitrag der Elektronendonatoren und -akzeptoren zwischen polaren Komponenten beruht. Zusätzlich bezieht van Oss [18] hydrophobe und hydrophile Kräfte als Säure-Base-Wechselwirkung sowie sterische Wechselwirkungen ein. Entsprechend des klassischen DLVO-Modells werden alle Terme als abfallende Energie-Distanz-Funktionen dargestellt und summarisch zusammengefasst.

An aktuellen Beispielen soll nun die Vielseitigkeit der unterschiedlichen Ansätze kurz andiskutiert werden, da sie z.T. ineinander greifende Interpretationsplattformen bieten.

So diskutierten van Loosdrecht und Zehnder [264] Anfang der 90er Jahre grenzflächenenergetische Einflüsse auf die bakterielle Adhäsion. Sie unterstrichen, dass die initiale Adhäsion durch unspezifische Wechselwirkungen mit langer Reichweite gesteuert wird, welche durch den DLVO-Ansatz ausreichend beschrieben werden. Die irreversible Adhäsion wird jedoch nach dem Übergang zum primären Minimum erheblich durch Non-DLVO-Wechselwirkungen, spezifische Adhäsine und Bridging-Effekte beeinflusst. Die Autoren sehen den Effekt eines dünnen Wasserfilms, welcher im DLVO-Ansatz verantwortlich ist für die Ausbildung eines sekundären Minimums. Adsorbiert eine hydratisierende Polymerschicht auf dem Material, werden sterische Wechselwirkungen angesprochen. In ausreichender Menge beeinflussen diese die hydrophoben und elektrostatischen Oberflächeneigenschaften derart, dass sie in die klassische DLVO-Theorie einbezogen werden können.

Erst in Arbeiten am Ende der 90er Jahre wurde das Modell der erweiterten DLVO-Theorie in die Diskussion einbezogen [48, 102, 107]. Die Arbeitsgruppe um H.J. Busscher stellte, dem Modell nach van Oss [18] folgend, die erweiterte DLVO-Theorie anhand der folgenden Summe der DLVO-Terme und des Säure-Base-Anteils dar [29, 47]. Dieser fasst dabei unter dem Term  $G^{AB}$  alle hydrophilen, hydrophoben bzw. sterischen Wechselwirkungen zusammengefasst. Der Einfluss der Säure-Base-Wechselwirkung gilt im Vergleich zur van der Waals- und elektrostatischen Energie als überlegen und mit kurzer Reichweite. Die Integration dessen in die DLVO-Theorie setzt nach Meinung der Autoren die Kenntnis des Grenzschichtaufbaus einschließlich der Moleküllängen, des exakten Abstandes u.v.a. voraus.

Für die Validierung der theoretischen Simulation von Adhäsionskräften zwischen zwei *E. coli* und mehreren Substraten nutzten Ong *et al.* [250] die Summe aus den klassischen DLVO-Theorie und die Berechnung sterischer Interaktionen nach de Gennes [49]. Die Autoren bewerteten die Integration der

sterischen Wechselwirkungen inklusive des Bridgingeffekts als entscheidend für die theoretische Modellierung des Gesamtinteraktion.

Azeredo *et al.* [107] untersuchten die Adhäsion des *Sp. pauc.* Parallel dazu simulierten sie sowohl nach dem klassischen als auch dem erweiterten DLVO-Ansatz die Energie-Abstands-Funktionen. Im Ergebnis zeigt sich die Gültigkeit des klassischen DLVO-Modells in einfachen Medien. Spielen zusätzlich hydrophobe Wechselwirkungen oder sterische Brücken eine Rolle, müssen neuartige Modelle gebildet werden, um das Verhalten der Mikroorganismen in Kontakt mit Materialoberflächen zuverlässig zu prognostizieren. Basierend auf dem Grenzflächenenergiekonzept beurteilten Lupu *et al.* [271] die Bioadhäsion von Thrombozyten auf Polymeroberflächen. Die Anhaftung der Blutzellen wird demzufolge entscheidend durch die Oberflächenpolarität gesteuert.

Das Grenzflächenenergiekonzept ist mit beiden Ansätzen eindeutig aussagefähig: (i) polar/dispers nach Owens/Wendt und (ii) Säure-Base nach van Oss.

Mit dem Ziel die Wechselwirkungen modellseitig zu erfassen, erfolgte in Kap. 2.1 die Einteilung der in dieser vorliegenden Arbeit zur Beschreibung der Bioadhäsion dienenden Wechselwirkungsenergien in Form der Gleichung 40. Es werden neben den klassischen DLVO-Interaktionen (van der Waals-Energie, elektrostatische Wechselwirkung), die Hydratationseffekte und die hydrophoben Energien im Säure-Base-Term zusammengefasst. Sterische Interaktionen ergänzen das Modell separat.

**Zusammenfassend und grundsätzlich wird die Aussage von Vitte *et al.* [56] bezüglich der theoretischen Beschreibung der Bioadhäsion bestätigt, nach der es letztendlich aufschlussreicher sein wird, zu entscheiden, welcher der Modellansätze effektiver für die Interpretation der jeweiligen Situation ist und welcher nicht, als zu prüfen, welcher der einzig Wahre sein wird. Dem untersteht zudem, dass die Modelle fast immer komplementär sind.**

Es sollen nun entsprechend des theoretischen Anspruches der vorliegenden Arbeit die verschiedenen Wechselwirkungen im Einzelnen mit der Literatur verglichen und bezüglich der eigenen Ergebnisse interpretiert und gewichtet werden.

### Van der Waals-Wechselwirkung

Ogleich die Darstellung der Gibbs'schen Energie aus den Parametern Grenz- und Oberflächenflächen-spannung aufgrund der Vernachlässigung der elektrostatischen, der Säure-Base- oder der sterischen Wechselwirkungen unzulässig ist, werden in zahlreichen Publikationen Modelle der Bioadhäsion basierend auf der van der Waals-Wechselwirkung bzw. dem dispersen Anteil der Grenzflächenspannung allein diskutiert [29, 266, 270, 272].

Die Berechnung der van der Waals-Wechselwirkungsenergie erfordert die Kalkulation der Hamakerkonstanten und infolgedessen der Adhäsionsenergie. Hier findet Gleichung 13 Anwendung. Unter Anwendung des Owens/Wendt-Ansatzes gilt für die Berechnung der auf dispersen Anteilen beruhenden Adhäsionsenergie aus den Oberflächenspannungen der beteiligten Phasen:

$$\Delta G_{adh} = -2\left(\sqrt{\gamma_b^d} - \sqrt{\gamma_l^d}\right)\left(\sqrt{\gamma_s^d} - \sqrt{\gamma_l^d}\right) \quad (52)$$

In Auswertung der energetischen Charakterisierung der Substrate, Medien und Mikroorganismen erfolgte für jede Lipidfunktionalisierung im entsprechenden Medium die Kalkulation der Hamakerkonstante. Zusammenfassend beinhaltet die nachfolgende Tabelle 27 die materialspezifischen Hamakerkonstanten als Mittelwert des Ergebnisses aller Mikroorganismen (Substrat B33 = 17 Stämme, Silikon = 2 Stämme). Alle berechneten Hamakerkonstanten liegen in der aus Literaturwerten erwarteten Größenordnung [48, 110, 154]. Ong *et al.* [250] z.B. ermittelten für die Hamakerkonstante zwischen *E. coli*, Glimmer, Glas und

Polystyrol in Wasser Werte von  $1 - 2 \times 10^{-21}$  J. Für das Substrat Teflon wurde eine Hamakerkonstante von  $-0,2 \times 10^{-21}$  J ermittelt, welche mit den dargestellten Ergebnissen für die Silikone übereinstimmt.

Tab. 27: Hamakerkonstanten, kalkuliert aus Oberflächenspannungsergebnissen

	A [J]		A [J]
<b>B33</b>	$8,81 \times 10^{-22}$	<b>SIK</b>	$-2,24 \times 10^{-21}$
<b>TL</b>	$1,42 \times 10^{-21}$	<b>SIK TL</b>	$-2,61 \times 10^{-21}$
<b>TL PEG</b>	$1,37 \times 10^{-21}$	<b>SIK TL PEG</b>	$-2,43 \times 10^{-21}$
<b>TL CF</b>	$1,52 \times 10^{-21}$	<b>SIK TL negativ</b>	$-2,59 \times 10^{-21}$
<b>TL negativ</b>	$1,43 \times 10^{-21}$	<b>SIK TL positiv</b>	$-2,68 \times 10^{-21}$
<b>TL positiv</b>	$1,44 \times 10^{-21}$	<b>SIK TL Kombi</b>	$-2,92 \times 10^{-21}$
<b>TL PC</b>	$1,39 \times 10^{-21}$		
<b>TL Kombi</b>	$1,66 \times 10^{-21}$		

Wie bereits in Kapitel 2.2 präsentiert, lässt sich zur Illustration der Wechselwirkungen an der Grenzfläche zwischen Mikroorganismus und Materialoberfläche die Energie-Distanz-Funktion verwenden.

Die Darstellung der Energie-Distanz-Kurven (Abbildung 67) für die van der Waals-Wechselwirkung verdeutlicht den geringen Einfluss der dispersen Grenzflächenenergiebeiträge. Auf beiden Substraten werden Anziehungs- bzw. Abstoßungsreaktionen erst ab einer Distanz von 5 nm und in einem Betrag von ca.  $10^{-19}$  J wirksam. Ferner ist aus der Abbildung ableitbar, dass die Funktionalisierung der Lipidoberflächen keinen Einfluss auf die Wechselwirkungsenergien hat.

Boulangue-Petermann *et al.*[95] kalkulierten ebenfalls den Beitrag der van der Waals-Wechselwirkung auf die Adhäsion des *B. cereus* an 14 Edelstahlmodifikationen mit der Owens/Wendt-Methode. Sie zeigten eine Wechselwirkungsenergie, welche unbeeinflussbar durch die Materialmodifikation erscheint. Die Richtigkeit abstoßender van der Waals-Reaktionen wird u.a. von van Oss *et al.*[266, 273] bestätigt. Ihr Effekt wird aufgrund der geringen Beiträge in der vorliegenden Arbeit nicht weiter im Detail diskutiert.

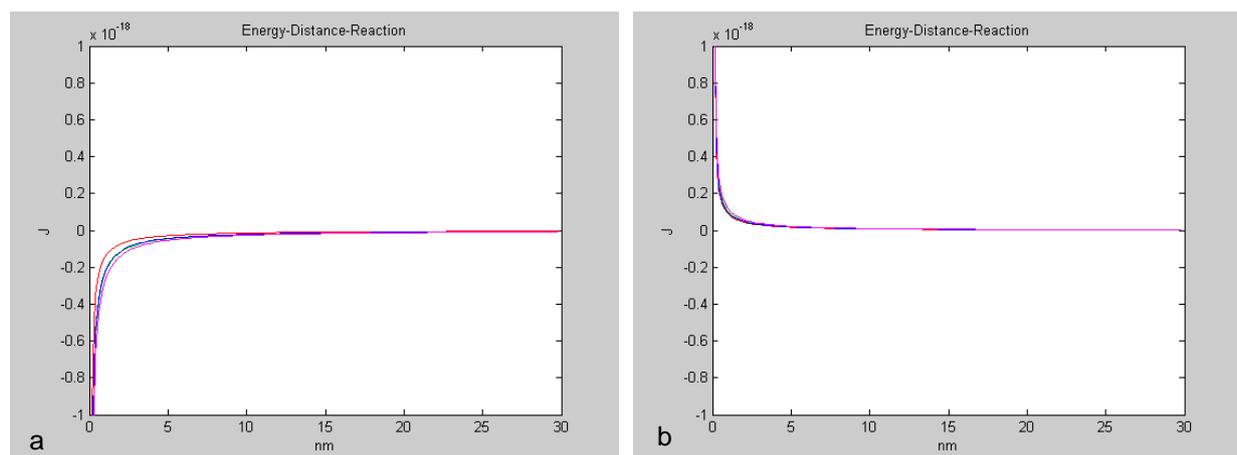


Abb. 67: Simulation der van der Waals-Wechselwirkungsenergie

a) rot – B33, grün – B33 TL  
blau – B33 TL PEG,  
magenta – B33 TL Kombi  
R = 1 µm

b) rot – SIK, grün – SIK TL  
blau – SIK TL PEG,  
magenta – SIK TL Kombi  
R = 0,25 µm

**Zusammengefasst ist der Beitrag der van der Waals-Wechselwirkungsenergie vergleichsweise gering und unabhängig von der Funktionalisierung der Tetraetherlipidschicht.**

### Elektrostatische Wechselwirkung

Elektrostatische Wechselwirkungen standen mit dem Bezug auf die bakterielle Adhäsion zumeist unter dem Stichwort der Abstoßung durch die elektrochemische Doppelschicht im Fokus [48, 262, 274]. Eine Begründung hierfür liegt in der allgemein negativen Ladung von Oberflächen unter realen Umgebungsbedingungen. Rasch wurde auch deutlich, dass die Interpretation der DLVO-Interaktionen zwingend die Einbeziehung der elektrostatischen Oberflächeneigenschaften der bakteriellen Zellwand erfordert [29, 48, 250, 269]. Bereits aus einfachen Korrelationsanalysen wurde zudem der Effekt der Ionenstärke sichtbar. Unter Einsetzen der im Rahmen der materialwissenschaftlichen Charakterisierung gemessenen Oberflächenpotenziale ergeben sich aus der Gleichung 24 beispielhaft die nachfolgend abgebildeten Energie-Distanz-Verläufe (Abbildung 68).

Das Beispiel zeigt in der linken Abbildung den Einfluss der unterschiedlichen Ionenstärken der Applikationswässer und des Dialysemediums in Kontakt eines Mikroorganismus mit einem Zetapotenzial von  $-25$  mV, dem Durchschnittswert der Messungen an Bakterien, und der Probe B33 TL mit einem Zetapotenzial von  $-16,2$  mV. Da beide Oberflächen negativ geladen sind, werden erwartungsgemäß abstoßende Kräfte sichtbar. Die Energiebarriere beträgt bis zu ca.  $2 \times 10^{-18}$  J. Deutlich zeichnet sich der Beitrag der Ionenstärke ab: Mit deren Zunahme im Vergleich der drei Wässer (rot, grün, blau) beginnen die Interaktionen jeweils in geringeren Distanzen, die Höhe der Energiebarriere bleibt jedoch unverändert. Für die Dialyseflüssigkeit zeigt sich jedoch, dass elektrostatische Abstoßungsreaktionen erst ab wenigen Nanometern und mit einem deutlich geringeren Betrag wirksam werden.

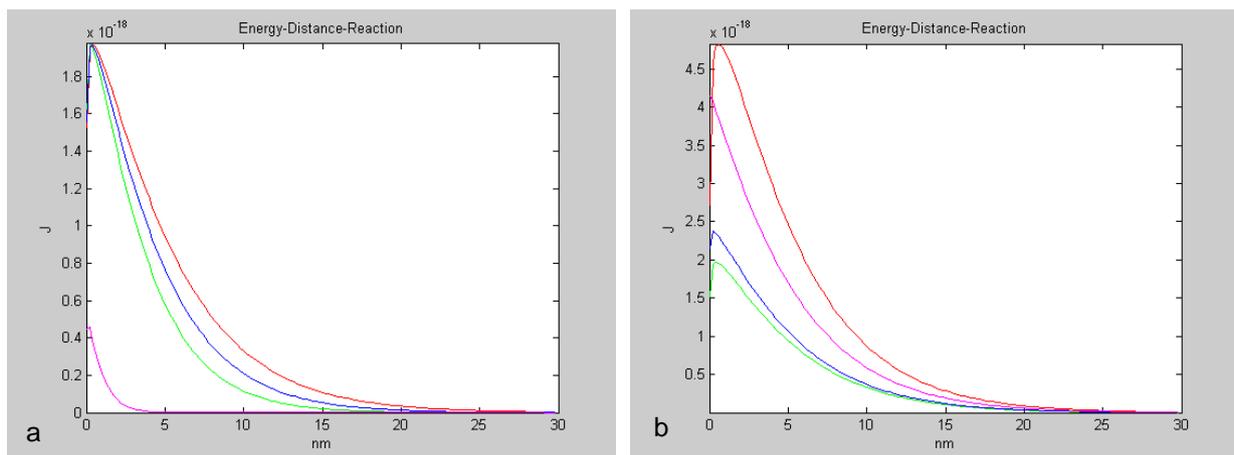


Abb. 68: Simulation der elektrostatischen Wechselwirkungsenergie

- |    |  |    |                                       |
|----|--|----|---------------------------------------|
| a) | Variation des Mediums                          | b) | Variation des Substrates              |
|    | rot – FW                                       |    | rot – B33                             |
|    | grün – TW                                      |    | grün – B33 TL                         |
|    | blau – AW                                      |    | blau – B33 TL negativ                 |
|    | magenta – PDFL                                 |    | magenta – B33 TL Kombi                |
|    | R = 1 $\mu$ m bzw. 0,25 $\mu$ m (PDFL), B33 TL |    | Medium - FW, R = 1 $\mu$ m            |
|    | Zetapotenzial der Organismen = -25 mV          |    | Zetapotenzial der Organismen = -25 mV |

Die im rechten Teil der Abbildung 68 dargestellten höheren Beträge der Wechselwirkungsenergie (bis  $5 \times 10^{-18}$  J) stützen sich auf die stärker negativ geladenen Oberflächen der betrachteten Proben. Der hier vollzogene Vergleich zwischen dem unbehandeltem Glas und den Funktionalisierungen des Tetraetherlipids mit gezielter Ladungsvariation (TL negativ, TL Kombi) weist für alle Substrate den Beginn der effektiven Interaktion in einer Distanz von ca. 20 nm auf. Differenzen treten dann vor allem in der Höhe der Energiebarriere auf. Ein analoges Bild ergibt die Kalkulation der Energie-Distanz-Kurven unter der Variation der Zetapotenziale der Mikroorganismen und einem konstanten Oberflächenpotenzial des Substrates, da für beide beteiligten Phasen – Substrat und Mikroorganismus - Zetapotenziale in vergleichbaren Größenordnungen gemessen wurden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Triandafillu *et al.*[108] berechneten im Vergleich zu den dargestellten Ergebnissen Wechselwirkungen mit den Energiebeiträgen aus van der Waals-, elektrostatischen- und Säure-Base-Energien. Die Autoren stellen allein durch die Variation der Oberflächeneigenschaften der Bakterien erhebliche Differenzen in Anziehungs- und Abstoßungsreaktionen heraus. Der Effekt beginnt ebenfalls bei einer Distanz von ca. 6 nm. Die Größenordnung der erreichten Energiebarrieren liegt etwas niedriger bei ca.  $4 \times 10^{-20}$  J. Dagegen kann nach ihrer Auffassung in einem Medium mit einer Ionenstärke von 0,1 M der elektrostatische Betrag vernachlässigt werden. Auch Bos *et al.*[29] kalkulierten mit nur ca.  $4 \times 10^{-19}$  J niedrigere Absolutwerte im Vergleich zu den hier erhaltenen Ergebnissen. Azeredo *et al.* [107] dagegen berechneten nach van Oss die elektrostatische Wechselwirkungsenergie von  $10^{-17}$  bis  $10^{-18}$  J zwischen *S. paucimobilis* und Glas. Diese Größenordnung entspricht den oben dargestellten Werten. Im Rahmen der Diskussion von Absolutwerten der Energiebeiträge ist dennoch zu beachten, dass die jeweiligen Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Radien der Bakterien, verschiedenen Zetapotenzialen und Ionenstärken rechnen und somit tatsächlich allein Verhältnisse innerhalb der einzelnen Arbeiten vergleichbar bleiben.

Betrachtet man nun die dargestellten van der Waals-Energien und die elektrostatischen Interaktionen unter dem Aspekt der klassischen DLVO-Theorie (siehe Kapitel 2.1.2.3), so ergibt sich exemplarisch die in Abbildung 69 folgende Darstellung für das lipidbeschichteten Substrat Glas im Applikationswasser Flusswasser und für das lipidierte Silikon im Modell der Dialyse. Das Ergebnis der mit unmodifiziertem Tetraetherlipid beschichteten Glasoberfläche verdeutlicht die dominante Rolle der elektrostatischen Wechselwirkung. Die Gesamtenergiekurve folgt bereits ab einer Distanz von ca. 20 nm dem Verlauf der elektrostatischen Energie-Distanz-Funktion. Der Beitrag der van der Waals-Energie senkt allein die Höhe der entstehenden Energiebarriere. Im Gegensatz dazu spielt für das mit Tetraetherlipid beschichtete Silikon der elektrostatische Beitrag eine untergeordnete Rolle. Die Ursache hierfür liegt in der hohen Ionenstärke des Mediums Dialyseflüssigkeit. Die van der Waals-Abstoßung wird vernachlässigbar.

Zusammenfassend leisten die DLVO-Interaktionen nur einen geringen Energiebeitrag zur Gesamtwechselwirkung zwischen Materialoberfläche und Mikroorganismus. Die Applikationen dieser Wechselwirkungsenergien zur Interpretation bzw. Prognose bioadhäsiver Phänomene ist nur unter definierten Randbedingungen gültig. Dieser Tatbestand wird durch zahlreiche experimentelle Erfahrungen anderer Autoren gestützt [47, 48, 102, 107, 110].

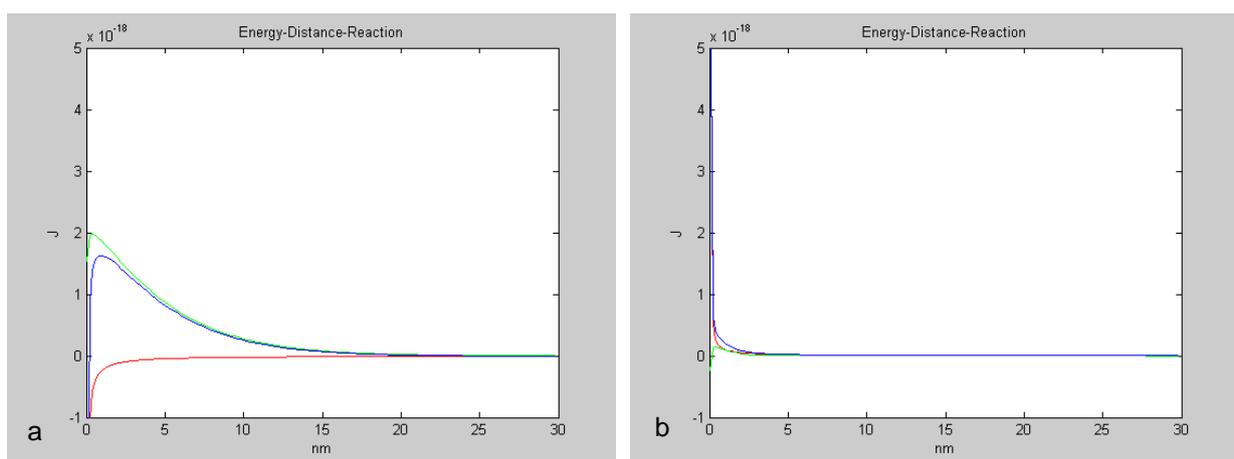


Abb. 69: Simulation der DLVO-Wechselwirkung

rot – van der Waals	grün – elektrostatisch	blau – DLVO
a) B33 TL	b) SIK TL	
R = 1 $\mu$ m, Medium - FW	R = 0,25 $\mu$ m, Medium - PDFL	
Zetapotenzial der Organismen = -25 mV	Zetapotenzial der Organismen = -25 mV	

In der Zusammenfassung ist der Beitrag elektrostatischer Wechselwirkungsenergien im Vergleich zur van der Waals Wechselwirkungen etwas größer, von höherer Reichweite und in der Regel abstoßend. Während die eingesetzten Medien die Höhe der entstehenden Energiebarriere beeinflussen, bestimmt die Funktionalisierung des Tetraetherlipids die Reichweite der abstoßenden elektrostatischen Wechselwirkung.

Zusammenfassend zeigen beide DLVO-Interaktionen nur geringe Energiebeiträge für die Gesamtwechselwirkung zwischen Materialoberfläche und Mikroorganismus. In wässriger Umgebung werden abstoßende elektrostatische Wechselwirkungen bereits ab einer Distanz von 20 nm wirksam. Van der Waals'sche Reaktionen treten dagegen erst ab einer Distanz von 5 nm auf und sind in ihrem Betrag vernachlässigbar. Antifoulingeneigenschaften, basierend auf einer Beeinflussung der Adhäsionsenergie aufgrund der Funktionalisierung von Tetraetherlipid-schichten sind aus dem DLVO-Konzept nicht eindeutig ableitbar.

### Säure-Base-Wechselwirkungen, polare, Hydrophob / hydrophile Wechselwirkungen

Im Kapitel 2.1.2.4 werden verschiedene Non-DLVO-Wechselwirkungen dargestellt, welche auf der Basis des kolloidchemischen Ansatzes in Form von Energie-Distanz-Funktionen diskutiert werden. Zuvor erfolgt die Betrachtung dieser Wechselwirkungen in ihrer Gesamtheit. Ein gebräuchlicher Ansatz zur Diskussion dieser stellt die einfache Einteilung in disperse und polare Energien dar. Den polaren Energiebeiträgen werden dabei im Allgemeinen die hydrophil/hydrophoben Interaktionen, die Säure-Base-Wechselwirkung sowie partiell ionische und sterische Wechselwirkungen zugeordnet. Boulange-Petermann *et al.* [95] bezogen beispielsweise in die als polar bezeichneten Energiebeiträge ihres Ansatzes ionischen, Säure-Base-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen ein. Sie schilderten im Ergebnis der Kalkulation der Wechselwirkung zwischen Mikroorganismus und Edelstahl eine signifikante Verknüpfung zwischen der Polarität der Substratoberfläche und dem Biofouling.

Die Analyse der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Oberflächenpolaritäten (Verhältnis des polaren Anteils zur Gesamtoberflächenspannung) in Beziehung zur bakteriellen Adhäsion führte insbesondere in den stärker proteinhaltigen Medien PDFL und Abwasser zu einem Zusammenhang. So wurden zwischen der Polarität der funktionalisierten Gläser und der Adhäsion von Staphylokokken zum Einen aber auch zwischender Polarität und der Adhäsion von Abwasserbakterien Korrelationskoeffizienten in einem Bereich von 77 und 84 % gefunden. Dies lässt die Vermutung zu, dass offenbar die Proteinadsorption insbesondere auf polare Wechselwirkungen an der Grenzfläche reagiert. Diese beeinflusst wiederum als initialer Schritt der Bioadhäsion die Biofilmbildung insgesamt.

Bos *et al.*[29] erläuterten, dass die Anwendung der Owens/Wendt-Methode (Kap. 3.3.1) auch für polare Wechselwirkungen möglich ist, so dass für die Berechnung der auf polaren Anteilen beruhenden Adhäsionsenergie aus den Oberflächenspannungen der beteiligten Phasen folgt:

$$\Delta G_{adh} = -2\left(\sqrt{\gamma_b^p} - \sqrt{\gamma_l^p}\right)\left(\sqrt{\gamma_s^p} - \sqrt{\gamma_l^p}\right) \quad (53)$$

Dieser Ansatz soll exemplarisch für das Beispiel der Staphylokokkenadhäsion in dieser Arbeit angewendet werden. Die Tabelle 28 präsentiert die Ergebnisse der separaten Kalkulation des Beitrags der van der Waals-Energie (Gleichungen 52) und der polaren Energie (Gleichung 53) als Mittelwert aus den beiden eingesetzten Staphylokokkenstämmen.

Die in der Tabelle präsentierten Adhäsionsenergien zeigen für alle Oberflächen eine abstoßende Gesamtenergie ( $\Delta G_{adh} > 0$ ). Feststellen lässt sich zudem, dass für alle Gläser nach der Lipidierung höhere abstoßende Werte im Vergleich zum unbeschichteten Glas kalkuliert wurden. Auf dem polymeren Substrat zeigte die Lipidierung demgegenüber keinen Einfluss auf die hier berechneten Energietermine. In der Regel ist der polare Anteil der Gesamtwechselwirkung höher.

Tab. 28: Adhäsionsenergien nach Bos *et al.* [29] für Staphylokokken in PDFL

$mJ/m^2$	<i>dispers</i>	<i>polar</i>	<i>Summe</i>		<i>dispers</i>	<i>polar</i>	<i>Summe</i>
<b>B33</b>	1,39	1,01	2,40	<b>SIK</b>	-2,42	9,80	7,38
<b>TL</b>	1,91	8,51	10,42	<b>SIK TL</b>	-2,81	9,96	7,15
<b>TL PEG</b>	1,85	7,08	8,93	<b>SIK TL PEG</b>	-2,62	10,16	7,54
<b>TL CF</b>	2,00	7,42	9,42	<b>SIK TL negativ</b>	-2,79	10,16	7,37
<b>TL negativ</b>	1,92	7,17	9,09	<b>SIK TL positiv</b>	-2,89	9,66	6,77
<b>TL positiv</b>	1,93	6,35	8,28	<b>SIK TL Kombi</b>	-3,15	9,53	6,38
<b>TL PC</b>	1,87	4,73	6,60				
<b>TL Kombi</b>	2,14	5,79	7,93				

Gallardo-Moreno *et al.*[275] berechneten für die Adhäsion von *E. faecalis* auf den Substraten Glas und Silikon Gesamtwechselwirkungsenergien in vergleichbaren Größenordnungen von  $-7,8$  bis  $14,6$   $mJ/m^2$ . Pedri L. [84] publizierte eine Adhäsionsenergie zwischen einer Mercaptoundecanol-schicht und *P. putida* in Wasser in Höhe von  $7,66$   $mJ/m^2$ , die ebenfalls den oben dargestellten Resultaten für die Tetraetherlipidschichten entspricht. Busscher *et al.*[67] berechneten die Adhäsionsenergie von oralen Streptokokken auf Glas, PTFE und PMMA. Die Ergebnisse wiesen im Gegensatz zu den eigenen Resultaten eine höhere Variation der Gesamtenergie von  $-79,1$  bis  $29,7$   $mJ/m^2$  auf, wobei insbesondere die unterschiedlichen polaren Anteile der Oberflächenspannung der Mikroorganismen die Werte beeinflussten. Die Bedeutung des polaren Energiebeitrages bestätigte A. Roosjen [91] in der Kalkulation der Adhäsionsenergie auf der Basis von Kontaktwinkeldaten. Während die rein dispersen Anteile extrem niedrige Ergebnisse erreichten, stellte die Autorin für die polaren Anteile nach dem Säure-Base-Modell bis zu zehnfach höhere Werte vor. In diesem Fall ist jedoch der Einfluss infolge der Anwendung eines geänderten Auswerteverfahrens für Kontaktwinkeldaten zu beachten.

Meyer *et al.*[276] analysierten exponentiell abfallende, nichtelektrostatische polare Wechselwirkungen hydrophoben Ursprungs zwischen mit Bilayern beschichteten Oberflächen. Beispielhaft wurde dargestellt, dass zwischen einem Bilayer und einer Substratoberfläche stärkere und weiter reichende Anziehungskräfte wirken im Vergleich zu dem Kontakt von zwei Bilayern. Überträgt man dieses Modell auf die Oberflächen Membran des Mikroorganismus und der Tetraetherlipidschicht, wird eine erste Begründung der geschwächten Anziehung in den vorliegenden Messungen sichtbar, da die Eigenschaften des Tetraetherlipids hinsichtlich der Struktur gut mit dem Bilayer vergleichbar sind.

**Die Kalkulation der Wechselwirkungsenergie basierend auf der Oberflächenspannung, gegliedert in einen dispersen und polaren Anteil, führt zu niedrigen Werten, aber dennoch zu Ergebnissen in der erwarteten Größenordnung. Der polare Anteil ist für das Ergebnis entscheidend. Die dargestellte Abstoßung lässt sich mit der Lipidierung der Glasoberfläche verbinden. Demgegenüber besitzt die Funktionalisierung keinen weiteren zählbaren Einfluss.**

Die gesonderte Betrachtung der nichtdispersen sowie nichtelektrostatischen Wechselwirkungen beginnt nachfolgend mit der Interpretation der hydrophil/hydrophoben Energiebeiträge gefolgt von der Diskussion der sterischen Effekte oberflächenadsorbierter Polymere und Lipide.

Zu den entscheidenden Wechselwirkungsenergien in wässrigen Medien zählen die hydrophile Abstoßung und die hydrophobe Anziehung, wonach beide Kräfte auf dem Einfluss der Wassermoleküle und ihrer Orientierung in der Grenzfläche beruhen. In allen Interpretationen gilt: die Ursache der hydrophoben Anziehung zwischen zwei unpolaren Molekülen (hydrophober Effekt) ist relativ leicht verständlich. Über die Anziehung zwischen zwei hydrophoben Oberflächen insbesondere im Wechselspiel mit Biosystemen

gibt es dagegen keine einheitliche Theorie [277]. Dabei ist Wasser als strukturbildendes Element nach E. Vogler [278] von essentieller Bedeutung, was er in einem Review anhand der Korrelation zwischen dem Wasserkontaktwinkel und der Proteinadsorption darstellt. Er diskutiert zwei Grundzustände:

- relativ lose Wasserstrukturen mit einem offenen Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk bei hydrophoben Oberflächen, welche zu einer Umordnung und gegenseitigen Integration der beiden Wasserschichten bei Kontakt führte und
- eine dichte Wasserregion mit einem kollabierten Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk bei hydrophilen Oberflächen.

Diese Netzwerke bzw. Wasserschichten können bis zu mehrere 10 nm dick werden. J.P. Nicolas [238] berechnete mit Hilfe der Molekularsimulation für die dicht gepackte Schicht des Tetraetherlipids des *Thermoplasma Acidophilum* eine umgebende strukturierte Wasserschicht von weniger als 1 nm Dicke. Die Reichweite der daraus entstehenden Interaktionen ist jedoch deutlich höher.

Der hydrophobe Einfluss, verbunden mit der losen Anlagerung von Wassermolekülen, fördert offensichtlich vornehmlich die Adsorption von Proteinen [103, 267, 270, 279]. Vergleichbare Phänomene der Anziehung zeigten auch zelluläre Systeme, hervorgerufen durch hydrophobe Domänen an der Membranoberfläche [280]. Die hydrophobe Anziehung wird durch einem Anstieg der Zahl an Wasserstoffbrückenbindungen und damit durch die Verdrängung der weniger favorisierten Protein/Wasser-Verbindungen begründet. „Vertriebene“ Proteine lagern sich dann an freien hydrophoben Oberflächen bereitwillig und fest an. Krishnan bestätigte [279] in Proteinlösungen mit globulären Blutproteinen die fördernde Rolle des Wassers bei der Adsorption an einer hydrophoben Oberfläche.

Hydrophobe Wechselwirkungen treten vorherrschend an polymeren Oberflächen verbunden mit hohen Kontaktwinkeln auf, wie sie zum Teil auch an dem hier verwendeten Silikonsubstrat gemessen werden [3]. Die Lipidierung der Silikonoberflächen führte anschließend zu einer signifikanten Reduzierung der biologischen Adhäsion, jedoch nicht zu drastischen Änderungen in der Hydrophobie. Dies bedeutet, allein die Unterbindung der hydrophoben Anziehung reicht demnach nicht als Ursache des gefundenen Antifouling aus, zusätzliche Einflussgrößen verursacht durch die Lipidierung spielen eine Rolle.

Hydrophile Parameter von Lipidschichten oder Lipidanaloga z.B. von Bilayern aus Phospholipiden, Dextran- oder PEG-Schichten ziehen den Aufbau einer Wasserbarriere an der Grenzfläche zum Medium nach sich und begründen somit die Behinderung der Adhäsion. Zwitterionische Kopfgruppen können dem Aufbau eines kosmotropen Schichtcharakters dienen und sind schon seit Jahren als Phosphorylcholin(PC)-Schichten mit einem effektiven Antifouling im Einsatz [236]. Hydrogele wie PEG wiederum bewirken, dass das umgebende Wasser eine geordnete Orientierung aufweist. Filmen, bestehend aus kurzen PEG-Molekülen, Dextran, Polyethylenimin oder auch Tetraetherlipiden, werden demzufolge abstoßende Eigenschaften an der Grenzfläche zum Medium aufgrund Hydratationswechselwirkungen zugeschrieben [281-284]. Baba *et al.* [284] stellten zwar am Beispiel des Phospholipids des *T. acidophilum* heraus, dass die Einschränkung der Kettenflexibilität zu einer Abnahme der hydrophilen Wechselwirkungen führen können. Trotz allem sind in Distanzen weniger Nanometer hydrophile Abstoßungskräfte wirksam. Dementsprechend kalkulierten McIntosh *et al.* [285] in Übereinstimmung mit weiteren Studien für die Interaktion zwischen zwei Lipidbilayern den Effekt der Hydratation eine Abklinglänge von 0,3 - 0,8 nm. Die Höhe der absoluten Hydratationsenergie (bei einer Distanz von Null) zwischen Bilayern variiert jedoch in den Literaturangaben sehr stark.

Die nachfolgenden Grafiken in Abbildung 70 beinhalten beispielhaft die Energie-Distanz-Funktionen der DLVO-Wechselwirkungen im Vergleich der Hydratationsenergie für eine lipidierte Glas- und eine lipidierte Polymerprobe unter Einsatz der Gleichung 30. Zusätzlich ist die Summe der Energien dargestellt. Offenkundig ist, der Energiebeitrag der hydrophilen Abstoßung übersteigt in Distanzen weniger Nanometer prinzipiell die Summe der van der Waals-Anziehung und der elektrostatischen Abstoßung, bei der lipidierten Glasprobe sogar um ein Vielfaches.

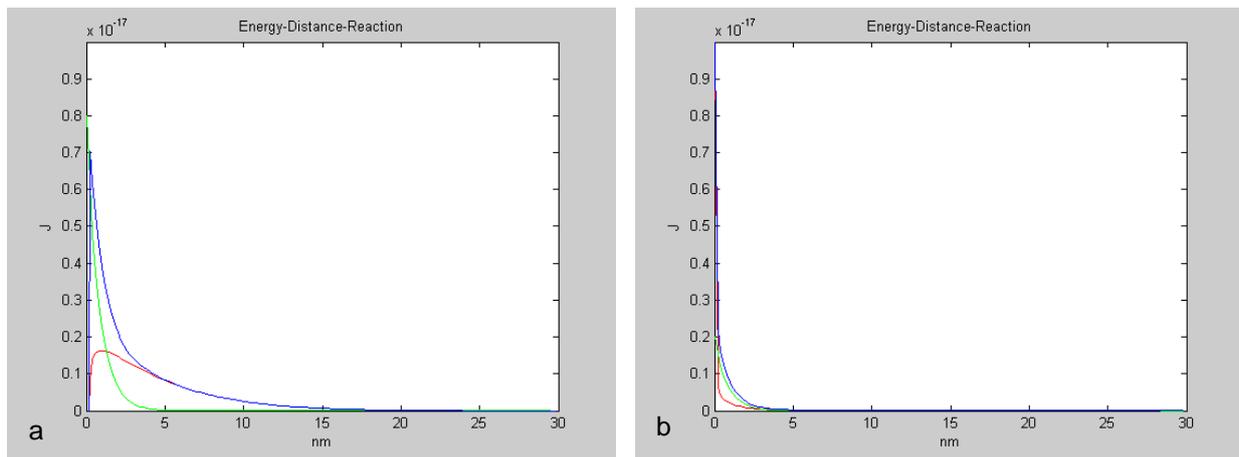


Abb. 70: Simulation der hydrophilen Wechselwirkung

rot – DLVO, grün – hydrophile Abstoßung, blau – Summe

$E_0 = 20 \text{ mJ/m}^2$ ,  $\lambda_0 = 0,8 \text{ nm}$ ,

a) B33 TL,  $R = 1 \text{ }\mu\text{m}$ , Medium - FW

b) SIK TL,  $R = 0,25 \text{ }\mu\text{m}$ , Medium - PDFL

Zetapotenzial der Organismen =  $-25 \text{ mV}$

Zetapotenzial der Organismen =  $-25 \text{ mV}$

Für die Probe B33 TL zeigt sich in der Summe aller Energiebeiträge (van der Waals-, elektrostatisch und hydrophile Wechselwirkung) ein erkennbarer Einfluss der DLVO-Beiträge ab einer Distanz von ca. 15 nm und infolge der hydrophilen Abstoßung eine zusätzliche signifikante Steigerung ab ca. 5 nm. Im Gegensatz dazu bewirken die hydrophilen Interaktionen im Zusammenhang mit der hydrophoben Oberfläche der Probe SIK TL nur eine geringe Zunahme der Abstoßung ab ca. 3 nm. Dies bedeutet, die Parameter der DLVO-Energien sind weiter ausschlaggebend.

Entscheidend für eine explizite parallele Kalkulation der Säure-Base-Wechselwirkungsenergie unter Anwendung der Gleichung 32 ist die Bestimmung der Adhäsionsenergie  $\Delta G_{AB}^{lo}(0)$ . Die dazu notwendige Ermittlung der Säure-Base-Anteile der Oberflächenspannungen für die Materialien ( $\gamma_S^+/\gamma_S^-$ ) und Mikroorganismen ( $\gamma_b^+/\gamma_b^-$ ) nach dem van Oss-Modell liefert mit dem hier gewählten Spektrum der Messflüssigkeiten keine eindeutigen Ergebnisse. Zu vergleichbaren Befunden kommen verschiedene Autoren bei Anwendung des Verfahrens nach van Oss zur Auswertung von Kontaktwinkeldaten unterschiedlicher Messflüssigkeiten bzw. im Vergleich zu den Verfahren nach Owens/Wendt oder anderen [286-288]. Werden quantifizierbare Daten der Oberflächenspannung einschließlich der Adhäsionsenergie erreicht, liegen die absoluten Werte im positiven Bereich und stützen somit die hydrophilen Abstoßungsenergien. Gleichzeitig liegen die berechneten Werte in einer Größenordnung, welche mit den Eingangsparametern für die oben aufgeführte Kalkulation der hydrophilen Wechselwirkung übereinstimmen. Des Weiteren entspricht auch der Wert für  $\lambda_0$  nach van Oss den angewendeten Daten [18]. Es wird daher davon ausgegangen, dass die erhaltenen Ergebnisse der Säure-Base-Interaktionen im Falle einer Lösung den eigenen Ergebnissen entsprechen und in ihrem abstoßenden Effekt gleicher Weise Einfluss nehmen.

**Die zusammenfassende Betrachtung der hydrophoben Anziehung und der hydrophilen Abstoßung lässt zum Einen die Aussage zu, dass allein die Unterbindung der hydrophoben Anziehung z.B. durch die Lipidierung der Silikonoberfläche nicht als Wirkprinzip des Antifouling interpretiert werden kann. Demgegenüber spielen hydrophile Effekte verursacht durch die Lipidierung und ihre Funktionalisierung eine Rolle. Die ermittelte Abstoßung wirkt jedoch nur in geringen Distanzen. Sie führen jedoch zu einer zunehmenden Abstoßung aufgrund der hydrophilen bzw. Säure-Base-Wechselwirkungen.**

### Sterische Wechsewirkungen

An die Oberfläche gekoppelte langkettige Polymere können aufgrund ihrer Konformation sterische Abstoßungen bewirken. In diesem Zusammenhang beschrieben Ksrko *et al.* [134] die Kopplung von Polyethylenglykol (PEG) als antiadsorptives Antifoulingmolekül und diskutieren diese Eigenschaft mit Bezug auf verschiedene theoretische Vorstellungen:

- Anstieg des Volumens durch Quellen,
- abstoßender osmotischer Druck,
- hohe molekulare Mobilität sowie
- die Bereitstellung nur weniger Bindungsstellen.

Dass Interpretationen sterischer Kräfte gegenwärtig in Bezug auf unterschiedliche Einflussgrößen der Polymere (Kettenlänge, Kopplungsdichte, Kopplungsart) kontrovers diskutiert werden, kommentierte J. Israelachvili [289] am Beispiel des PEG. Die nachfolgenden Erläuterungen mit Bezug zur Bioadhäsion unterstreichen diese Problemstellung.

Kenworthy *et al.* [290] veranschaulichen die untergeordnete Rolle der hydrophilen Interaktionen im Vergleich zur entstehenden sterischen Abstoßung mit Hilfe kovalent gebundener Polymere. Die Begründung liegt in einer wesentlich größeren Kettenlänge der PEG-Polymere. Spielen bei PEG 350 ( $n = 350$ ,  $C_{2n}H_{4n+2}O_{n+1}$ ) noch elektrostatische Wechselwirkungen eine signifikante Rolle, so sind bei PEG 2000 und PEG 5000 allein sterische Kräfte wirkungsvoll. Auch Klee *et al.* [291] zeigen die Abhängigkeit der Bioadhäsion von der Kettenlänge des PEG. Während für PEG 5000 eine Reduzierung der Proteinadsorption und Adhäsion detektiert wurde, führte PEG 30000 zum gegenteiligen Resultat. Dies deutet auf ein Optimum hinsichtlich der Kettenlänge. Vacheethasane *et al.* [247] koppelten für ein Antifouling PEG 2000 in unterschiedlicher Konzentrationen die Materialoberfläche während Tiller *et al.* [146] eine antibakterielle Beschichtung mit PEG 5000 vorstellen. Nach Aussage der Autoren führte die Variation der PEG-Konzentration zwar zur Verstärkung der sterischen Abstoßung von Bakterien, beeinflusst die Wechselwirkungen mit Zellen nur unerheblich. Feng *et al.* [292] analysierten Kopplungsdichten des PEG zwischen 0,06 – 0,39 Molekülen/nm<sup>2</sup> mit Kettenlängen von 5 - 200 Monomeren in Beziehung zur Adsorption von Fibrinogen. Im Ergebnis wurde ein deutlicherer Effekt durch die Kopplungsdichte des Polymers im Vergleich zur Kettenlänge ermittelt. Bryers *et al.* [46] verwiesen zusätzlich auf den Einfluss der Kopplungsvariante der Polymere. Die Autoren zeigten den größten Effekt hinsichtlich einer reduzierten Proteinadsorption an einer mit PEG-Tetraethern modifizierten Oberfläche. Die Adsorption wurde nachweislich durch die Kopplungsvariante gesteuert. Die Zusammenfassung in der nachfolgenden Tabelle zeigt, dass neben der Art der Fixierung des PEG und dessen Kopplungsdichte je Fläche vor allem die Molekülkettenlänge einen kritischen Faktor für die Ausbildung des sterischen Antifouling darstellt. Für die Präparation der Proben TL PEG und TL Kombi in der vorliegenden Arbeit wurde ein PEG 3500 angewendet.

Tab. 29: Sterisch wirksame Kettenlängen des PEG

	<b>abstoßend</b>	<b>uneffektiv</b>	<b>anziehend</b>
<b>Kenworthy et al [290]</b>	PEG 5000	PEG 350	PEG 30000
<b>Kaper et al. [241]</b>	PEG 10000		
<b>Tiller et al. [146]</b>	PEG 5000		
<b>Kuhl et al. [293]</b>	PEG 8000	PEG 1000 PEG 18500	
<b>Park et al. [143]</b>	PEG 3400	PEG 1000	
<b>Roosjen et al. [47]</b>	PEG 9800	PEG 526	
<b>vorliegende Arbeit</b>	PEG 3500		

Die Entwicklung von Antifoulingkonzepten, basierend auf sterischen Effekten, brachte neben der Anwendung des Polymers PEG für sich ebenso kombinierte Ansätze hervor, z.B. durch Aufpfropfen zusätzlicher Funktionsmoleküle oder durch Copolymerisation mit anderen Monomeren. Gusipati *et al.* [294] verglichen z.B. in einer aktuellen Arbeit den Effekt eines hydrophoben Fluorpolymers und des PEG. Beide Schichten pur wirkten auf unterschiedliche Proteine abstoßend: das Fluorpolymer gegenüber Albumin und Lektin; das PEG bei Liopolysacchariden. Erst in Kombination der beiden Polymere konnte ein Effekt auf alle Proteine nachgewiesen werden. Bryers *et al.* [46] gelang mit dem Copolymer Polyethylenglykol-Poly(acrylic-acid) die Bereitstellung neuer Oberflächen mit minimierter Bioadhäsion aufgrund der zusätzlichen Fixierung von Adhäsionspeptiden.

Zur Evaluierung der eigenen Ergebnisse wird auf zwei weitere Arbeiten verwiesen: Marchant *et al.* [43] beschrieben die antiadhäsive Wirkung einer glykokalixartigen Oberfläche am Infektionskeim *S. epidermidis*. Das Antifouling beruht dabei auf kurzen Dextranmolekülen, welche sterische Abstoßungseffekte entstehen lassen. Hier ist ein Vergleich mit der eingesetzten unmodifizierten Tetraetherlipidschicht möglich, welche, wie die nachfolgende Abbildung unterstreicht, auf beiden Substraten zur Reduzierung der Bioadhäsion führte.

Zheng *et al.* [295] zeigten in ihrer aktuellen Arbeit zwei Wirkmechanismen: (i) sterische Abstoßung durch das PEG (lange Polymerkette) und (ii) die Ausbildung einer Wasserbarriere durch ein Oligoethylenglykol (kurze Ketten) und  $\text{CH}_3$ -Endgruppen. Dieser Schichtaufbau ist mit den Proben TL PEG (lange Ketten) aber auch TL positiv (kurze Kette und  $\text{CH}_3$ -Gruppe) vergleichbar. Zheng *et al.* [295] stellten für die pegylierte Oberfläche die stärkste Abstoßung vor der Probe mit Methylendgruppen heraus. Ein Effekt, den die eigenen Ergebnisse bestätigen (Abb. 71).

Die Abbildung 71 bestätigt zudem die sterischen Effekte in Medien mit höherer Ionenstärke am Ergebnis der Probe B33 TL PEG bei der Adhäsion in Dialyseflüssigkeit. Die hydratisierende Wirkung der Wasserbarriere an der TL-Schicht wird durch das zusätzlich gekoppelte PEG in geeigneter Moleküllänge mit einem sterischen Effekt ergänzt. Das weniger drastische Ergebnis der Probe TL Kombi wird auf die Einschränkung der Flexibilität der Ethylenglykolketten zurück geführt. Die Betrachtung der Modifikationen des Silikons demonstriert einen weniger drastischen Effekt durch das PEG. Die Ursache liegt in der unzureichenden Ausbildung einer dichten Tetraetherlipidschicht und damit eine geringere Kopplungsdichte des PEG. Es bleibt zu hinterfragen, ob die erreichte Peggylierung zur notwendigen bürstenartigen Konformationen der Polymere geführt hat. Die zusätzliche Bindung sich gegenseitig abstoßender negativer Ladungsgruppen (Probe SIK TL Kombi) könnte im Ergebnis wieder zu einer günstigeren Konformation der Moleküle und abstoßenden Kräften geführt haben.

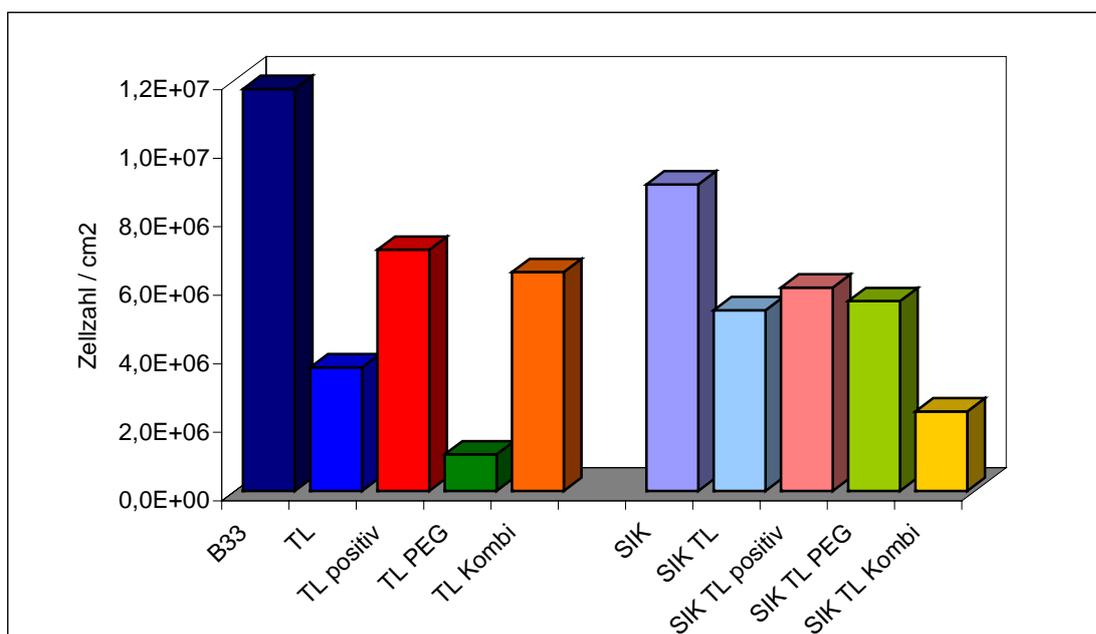


Abb. 71: Zellzahl der *Staphylokokken* nach 24h, Vergleich der sterischen Parameter

Vorzugsweise durch die sprunghafte Entwicklung der Atomkraftmikroskopie wurde die experimentelle Bestimmung und die Modellbildung sterischer Wechselwirkungen in zahlreichen Arbeitsgruppen vorangetrieben. Auch hier steht die Analyse von PEG-Schichten beherrschend im Fokus. Die entscheidenden Kennziffern zur Kalkulation der sterischen Energie sind wie in Kapitel 2.1 vorgestellt:

- die Segmentlänge des Monomers und die Kettenlänge des Polymers
- die Kopplungsdichte des Polymers je Fläche
- die Konformation: als Knäuel (mushroom) oder kammartig (brush)
- die Breite des Knäuel bzw. die effektive Dicke der Schicht.

Mit dem Ziel, die sterischen Wechselwirkungen der in dieser Arbeit verwendeten Tetraetherlipidschichten in einem ersten Schritt quantifizieren zu können, werden zunächst vergleichbare Literaturangaben diskutiert. So beschrieben Kenworthy *et al.* [290] die „mushroom“-Struktur und berechneten Knäuelbreiten von 3,6 nm für PEG 2000 bis 6,4 nm für PEG 5000. Die Segmentlänge des PEG beträgt laut diesen Autoren  $l = 0,35$  nm. Butt *et al.* [19] unterbreiteten dem PEG-Monomer eine Segmentlänge von 0,4 nm. Mit 100 Segmenten (z.B. PEG 4400) und einer hohen Kopplungsdichte von  $\Gamma = 10^{18} \text{ m}^{-2}$  beträgt dann die Dicke der kammartigen Schicht ca. 22 nm. Kuhl *et al.* [293] nutzten Kalkulationen nach dem Alexander de Gennes-Modell und erhielten bei kurzen Kettenlängen eine ineffektive Schichtdicke, während lange Polymere agglomerieren und Bridging hervorrufen. Das PEG mittlerer Kettenlänge dagegen zeigt sterische Barrieren bei einer Distanz zwischen 20 und 10 nm. Mit Proteinen wurden nach Efremova *et al.* [296] durch kammartige Strukturen des PEG Energiebarrieren von bis zu 44 kT nachgewiesen, welche die Proteine kinetisch behindern, da deren eigene Adhäsionsenergie nur in Größenordnungen von 2 kT liegt. Damit das Protein adsorbiert, ist eine Konformationsanpassung sowohl im Proteinmolekül als auch in der PEG-Schicht erforderlich.

Die Anwendung der Gleichung 34 ermöglicht die Abschätzung der effektiven Schichtdicke für die hier untersuchte Probe TL PEG unter der Annahme einer verhältnismäßigen Kopplungsdichte. Die Kalkulation erfolgt für zwei Kopplungsdichten, welche sich an Literaturangaben orientieren, da die exakte Anzahl gekoppelter Moleküle an der Probenoberfläche nicht bestimmbar ist. Vergleichend werden Resultate nach Butt *et al.* [19] und A. Roosjen [91] sowie die Abschätzung der Probe TL als Beispiel eines kurzkettigen Polymers dargestellt.

Tab. 30: Sterisch effektive Schichtdicken, Substrat: Borosilikatglas

	<i>Länge des Segments</i>	<i>Anzahl der Segmente</i>	<i>Radius des Knäuels</i>	<i>Kopplungsdichte</i>	<i>effektive Schichtdicke</i>
<b>Butt <i>et al.</i></b>	0,4 nm	100	1,63 nm	$1 \times 10^{18} / \text{m}^2$	22 nm
<b>A. Roosjen</b>	0,28 nm	220		$5,9 \times 10^{17} / \text{m}^2$	22 nm
<b>TL PEG - 1</b>	0,4 nm	80	1,45 nm	$1 \times 10^{18} / \text{m}^2$	17 nm
<b>TL PEG - 2</b>	0,4 nm	80	1,45 nm	$5 \times 10^{17} / \text{m}^2$	13 nm
<b>TL</b>	4 nm	1	-	$1 \times 10^{18} / \text{m}^2$	2,2 nm

Die anschließende Kalkulation der Energie-Distanz-Kurven (Abb. 72) basiert auf dem AdG-Modell. Im Vergleich wird der Einfluss der effektiven Schichtdicke (Tabelle 26) für die Stärke der abstoßenden Wechselwirkung sichtbar. Die Abschätzung der Variante 1 für die Probe TL PEG in Abbildung 72a führt zu einem mit dem Beispiel nach Butt *et al.* [19] (Abb. 72c) vergleichbaren Verlauf. Die Energie der Variante 2 im Teilbild b verringert sich um ca. 75%. Betrachtet man dagegen eine unmodifizierte Tetraetherlipidschicht als sterische Konformation, liegt die Höhe der Abstoßung um mehrere Größenordnungen niedriger und wirkt nur in einem Bereich weniger Nanometer (Abb. 72d).

Die Gegenüberstellung dieser Ergebnisse mit Resultaten der bakteriellen Adhäsion bestätigt jedoch die zu erwarteten drastischen Differenzen zwischen der unmodifizierten Lipidschicht und der zusätzlich pegylierten Probe nicht. Allein in dem Medium der medizinischen Applikation mit einer hohen Ionenstärke (PDFL), welches nur geringe elektrostatische Wechselwirkungen zulässt, wird eine zusätzliche signifikante Reduzierung durch das PEG detektiert, welche wiederum auf sterische Abstoßungskräfte zurückgeführt werden kann.

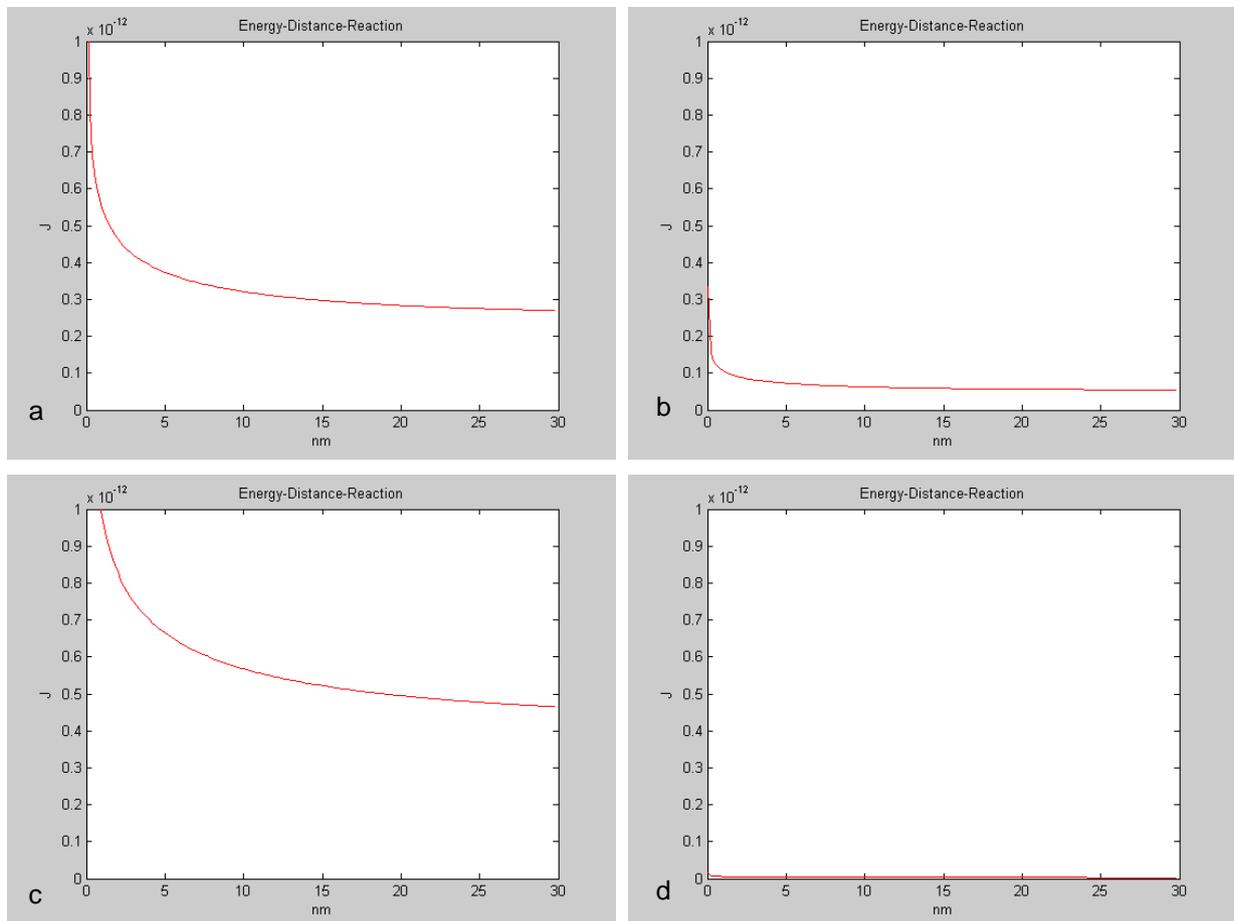


Abb. 72: Simulation der sterischen Wechselwirkung

- |    |   |    |   |
|----|---|----|---|
| a) | TL PEG – 1<br>PEG 3500<br>Kopplungsdichte $1 \times 10^{18}/\text{m}^2$<br>Radius $1 \mu\text{m}$             | b) | TL PEG - 2<br>PEG 3500<br>Kopplungsdichte $5 \times 10^{17}/\text{m}^2$<br>Radius $1 \mu\text{m}$ |
| c) | Butt <i>et al.</i> [3]<br>PEG 5000<br>Kopplungsdichte $1 \times 10^{18}/\text{m}^2$<br>Radius $1 \mu\text{m}$ | d) | TL<br><br>Kopplungsdichte $1 \times 10^{18}/\text{m}^2$<br>Radius $1 \mu\text{m}$                 |

**Zusammenfassend wird die Bedeutung der sterischen Wechselwirkungen für das Antifouling verdeutlicht. Zunächst entspricht die gewählte Funktionalisierung mit Polyethylenglykol einer Kettenlänge von  $n = 3500$  der als optimal definierten Größe für die abstoßende sterische Wirkung.**

**Die Bioadhäsionsprüfung der medizinischen Applikation in einem Medium mit hoher Ionenstärke unterstreicht die effektive sterische Abstoßung am Ergebnis der lipidierten und pegylierten Proben. Die hydratisierende Wirkung der Wasserbarriere an der Lipidschicht wird durch das zusätzlich gekoppelte PEG in geeigneter Moleküllänge mit einem sterischen Effekt ergänzt.**

**Die Modifikationen des Silikons demonstrieren einen weniger drastischen Effekt, wobei die Ursache in der geringeren Kopplungsdichte des PEG zu suchen ist. Es bleibt dabei zu hinterfragen, ob die erreichte Peggylierung zur notwendigen büstenartigen Konformationen der Polymere geführt hat. Die zusätzliche Bindung sich gegenseitig abstoßender negativer Ladungsgruppen (Probe SIK TL Kombi) führte im Ergebnis wieder zu einer günstigeren Konformation der Moleküle.**

**Die Quantifizierung der sterischen Wechselwirkung am Beispiel der lipidierten und pegylierten Proben veranschaulicht den enormen Einfluss dieser Interaktion unter der Voraussetzung einer optimalen Konformation der Polymere und einer entsprechenden effektiven Schichtdicke.**

In der Diskussion des Kapitels 5.3 wurde die Applikation unspezifischer Wechselwirkungen unter Bezug auf das beschriebene theoretische Modell auf thermodynamisch kolloidchemischer Basis auf die zuvor dargestellte Bioadhäsion geprüft und dargestellt. Neben den präsentierten Korrelationen und Zusammenhängen werden folgende Schlussbemerkungen erforderlich:

- Die dargestellten biophysikalischen Modelle stehen aktuell unter fortwährender Optimierung. Hierzu wird der Einsatz nanoskaliger Messmethoden unter biologisch sensitiven Messbedingungen stetig mit neuen Befunden beitragen. Neben der Integration weiterer Wechselwirkungsenergien: z.B. hydrodynamische Kräfte, Diffusionsenergien und die Brownsche Bewegung, gewinnen insbesondere spezifische molekularbiologische Einflüsse und biochemische Wechselwirkungen an Bedeutung.
- Die Betrachtung der thermodynamischen Zusammenhänge an der Grenzfläche zwischen Mikroorganismus, Medium und Substrat ermöglicht im Rahmen der Bioadhäsion als initiale Phase der Biofilmbildung in vielen Fällen direkte Korrelationen. Spätere Phasen der Biofilmbildung erfordern unerlässlich die Integration der Wechselwirkungen zwischen den Mikroorganismen untereinander in das Simulationsmodell. Erst so wird die Prognose der Agglomeration von Bakterien, aber auch der zu erwartenden Biofilmstruktur (Ausbildung von pilzförmigen dreidimensionalen Gebilden) ermöglicht.
- Die Entwicklung realitätsnaher Biofilmmodelle impliziert größtenteils die Anwendung von Mischkulturen in komplexen Medien. Demgegenüber wird die Analyse fundamentaler und spezifischer Zusammenhänge vorherrschend an definierten Einzelorganismen möglich. Dieser Kontrast ist allein durch einen hohen experimentellen Aufwand im direkten Vergleich der Labor- und Feldversuche zu lösen und mit der Modellbetrachtung in Einklang zu bringen.

#### **5.4. Produktentwicklung**

Im Zusammenhang mit der technischen Applikation der monomolekularen Tetraetherlipidschichten steht die Patentanmeldung: „Kompositmaterialien mit Tetraetherlipiden und deren Herstellung“ (WO 00 2006 002616 A1 / DE 10 2004 033 667 9) mit dem Ziel aus Archaea isolierte Tetraetherlipide derart zu modifizieren, dass diese eine höhere Stabilität aufweisen und aufgrund ihrer Reaktionsfähigkeit für Beschichtungen und Kompositmaterialien verwendbar sind. Die Idee beinhaltet Beschichtungen, die gegenüber bekannten Schichtsystemen durch eine kovalente Bindung eine höhere mechanische und chemische Robustheit versprechen. Anwendungsgebiete der erfindungsgemäß modifizierten Oberflächen sind in der Medizintechnik, der Biotechnologie und in neuen Materialien zu finden.

Die Kooperationen mit Industriepartnern ermöglichten die Realisierung erster Applikationstests mit den in der vorliegenden Arbeit entwickelten Lipidschichten. Die Fa. Sensortechnik Meinsberg GmbH beispielsweise setzte über einen Zeitraum von mehreren Monaten erfolgreich beschichtete pH-Elektroden und Sauerstoffsonden im alltäglichen Messbetrieb ein. Die Demonstrationssysteme kamen an den folgenden Stellen zum Einsatz [68]: Fischzuchtanlage Neiden, Kommunale Kläranlage Döbeln-Technitz

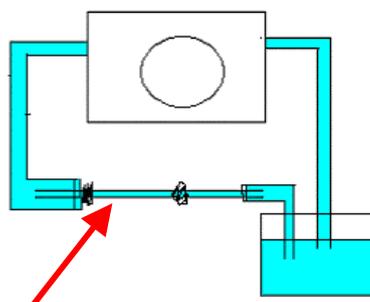
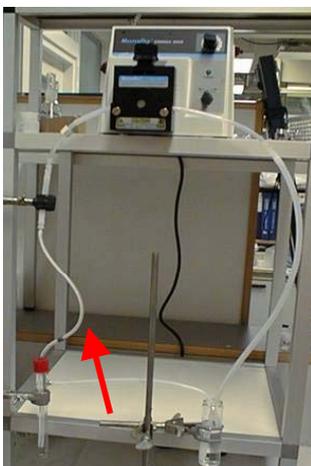
(Belebungsbecken), Trinkwassertalsperre Neustadt und Wassergütemessstation der STM (Zschopau). Während das untersuchte Wasser der Kläranlage stark organisch und chemisch belastet war, enthielt das Fischzuchtgewässer vor allem organische Belastungen in Form von Fischfutter. Das zur Trinkwassergewinnung herangezogene Oberflächenwasser der Talsperre war nur äußerst schwach belastet und bei dem im Bypass durch Durchflussarmaturen geleiteten Wasser einer Wassergütemessstation an der Zschopau handelte es sich um ein Flusswasser mit relativ vielen organischen und anorganischen Schwebstoffpartikel. Wie schon im Rahmen der Funktionalitätsprüfung dargestellt, ließen sich für lipidbeschichtete pH-Einstabmessketten und Sauerstoffsensoren keine Nachteile hinsichtlich der sensorischen Eigenschaften feststellen. Bei den eingesetzten lipidierten Sauerstoffsensoren konnten in verschiedenen Fällen aufgrund des Antifouling Vorteile der lipidbeschichteten Sensoren gegenüber unbeschichteten Exemplaren nachgewiesen werden, insbesondere in biologisch stark belasteten Gewässern. Dies betraf sowohl das Signaleinstellverhalten als auch die verringerte Signaldrift infolge Biofouling. Optimierte Tetraetherlipidschichten in Kombination mit automatisierbaren mechanischen Reinigungsverfahren sollten in Zukunft einen guten Lösungsansatz für das eingangs beschriebene Antifoulingproblem im Gewässermonitoring darstellen.

Die IOM GmbH Berlin erprobte erfolgreich laseroptische Fluoreszenzsonden mit Antifoulingsschichten auf Tetraetherlipidbasis über mehrere Monate hinweg in Flusswasser. Die Ergebnisse lassen neben einer Langzeitstabilisierung der Messsysteme gegen Biofouling ebenfalls keine Beeinträchtigung der sensorischen Messfunktion erwarten. Aus der industriellen Adaption folgt, dass eine Überführung der Schichtsysteme auf ein breiteres Spektrum an Sensorsystemen und Messsonden der Produktentwicklung im biotechnologischen Bereich weiten Raum eröffnet.

Soweit die bisher erzielten positiven Eigenschaften der Antifoulingbeschichtungen für Sensoren weiter praxisgerecht umgesetzt werden, sind die folgende Vorteile zu erwarten:

- Verlängerung der Wartungszyklen und damit Reduzierung von Personalkosten für den Betrieb der Analysenmesstechnik in Kläranlagen und Wassergütemessstationen
- Erhöhung der Zuverlässigkeit und damit der Aussagefähigkeit von Analysenmesstechnik
- Möglichkeit zur Kombination der Antifoulingbeschichtung mit konventionellen Reinigungsverfahren
- Verbesserung der Einsatzmöglichkeiten von Online-Analytik im Gewässermonitoring

In Vorbereitung der technologischen Umsetzung der Beschichtungstechnologie entstand am Beispiel medizinischer Katheter eine Prototypanlage zur Behandlung von Musterschläuchen. Dieses Gebrauchsmuster diente der Aktivierung, der Silanisierung und der Lipidierung des Innenlumens von Silikonschläuchen im Labormaßstab (Abbildung 73). Erste Beschichtungsversuche unterstrichen die Funktionalität des dargestellten Beschichtungsprinzips. Mit Hilfe von Kontaktwinkelmessungen wurde die Lipidierung des Silikonschlauches nachgewiesen.



a) Beschichtungsanlage

b) schematische Darstellung

Abb. 73: Prototyp der Beschichtungsanlage für Schlauchsysteme, Katheter (roter Pfeil)

Antifouling Schichten werden in mehr als einer medizinischen Applikation notwendig. Da sich die mit Tetraetherlipid modifizierten Polymeroberflächen sowohl durch antibakterielle Eigenschaften als auch durch eine gleichbleibende Biokompatibilität auszeichnen und gute Voraussetzungen für die klinische Prüfung besitzen, erscheint der Transfer dieser ersten vielversprechenden Ergebnisse auf z.B. Harnwegskatheter und Herzklappen nur als einen ersten Schritt in der weiteren Entwicklung.

Dass der Bedarf auch aktuell besteht, zeigt Lawrence *et al.* [297] in einer aktuellen Studie (2005), die nach wie vor keine verwendbare Lösung des Infektionsproblems bei einer Langzeitkatheterisierung aufzeigen kann. Neben dem Einsatz unterschiedlicher antibakterieller Beschichtungen beobachten die Autoren auch Entwicklungsansätze im konstruktiven Bereich.

Bezüglich der Verbesserung von Antifoulingkonzepten entwickelte die Arbeitsgruppe von H.C. Flemming [219] eine integrierte Antifoulingstrategie, welche nicht allein auf die Tötung der biofilmbildenden Organismen abzielt, sondern aufbauend auf einer Risikoanalyse eine Akzeptanz des nicht schädigenden Biofilms erlaubt. Ziel ist es, einen gewissen Biofilm zu tolerieren und Maßnahmen zur Beherrschung dieses Levels zu ergreifen. Die praktische Umsetzung eines derartigen Modells der Fehleranalyse als Antifoulingstrategie kann auf der Basis der Tetraetherlipide erfolgen und entspricht zudem der zuvor angesprochenen Kopplung von antiadhäsiven Beschichtungen und Reinigungssystemen.

Für die Verbesserung des Antifoulingverhaltens der Tetraetherlipidschichten finden sich weitere aktuelle vielversprechende Ansätze. Danese *et al.* [298] stellen insbesondere für medizinische Applikationen die Kombination nichtbakteriöser Methoden mit der Anwendung von spezifischen Antibiotika wie z.B. Rifampin in den Vordergrund. Kohnen *et al.* [141] beschichteten Silikonkatheter ebenfalls mit Antibiotika wie Rifampin und Sparfloxacin in Kombination. Problematisch ist die Beschichtungsstabilität bzw. Reproduzierbarkeit. Der Einsatz spezifisch effektiver Antibiotika sollte demzufolge in Verbindung mit der unspezifisch abschirmend und als Spacer wirkenden Tetraetherlipidschicht eine ideale Produktentwicklung für definierte medizinische Applikationen begründen können.

Für die Entstehung neuer Produkte bieten die monomolekularen Lipidschichten neben den Antifouling-eigenschaften als Spacer zusätzlich eine breite Anwendungsvielfalt. Wie bereits von Tamm *et al.* [299] beschrieben, lassen sich derartige Schichtsysteme nanostrukturiert als Biosensoren optimieren, da die Integration aktiver Funktionsmoleküle kovalent möglich ist. Selfassembled Monolayer dienen ebenfalls bei Kirby *et al.* [300] als Basis für die Entwicklung von Biochips in der DNA-Analytik. Die geforderte Variation des Zetapotenzials und der zellulären Adhäsion einschließlich der optischen Funktionalität ließe sich desgleichen mit Tetraetherlipidschichten verwirklichen. Wisniewski *et al.* [301] beschreiben am Beispiel implantierbarer Glukosesensoren einen weiterhin hohen Bedarf in der Reduzierung des Biofouling derartiger Sensoren bei gleichbleibender Funktionalität des Messsystems.

## Zusammenfassung

Seit geraumer Zeit beschäftigt sich die Wissenschaft mit der Bekämpfung unerwünschter Biofilme – dem Antifouling. Die vorliegende Arbeit ordnet sich in diesen Entwicklungsschwerpunkt ein. Es wird versucht, über die Beschichtung mit archaealen Tetraetherlipiden und deren Funktionalisierung antiadhäsive Eigenschaften zu entwickeln, aufgrund derer die Anhaftung von Mikroorganismen und damit die darauffolgende Biofilmbildung verhindert werden kann.

Die Einteilung der Biofilmbildung in die initiale Phase und die Phase des Biofilmwachstums ist von Bedeutung, da sich die Entwicklung des Antifouling ebenfalls an den Prozessen orientiert. Die zugrundeliegende Recherche zeigt, dass sich grundsätzlich Antifoulingkonzepte trotz der unterschiedlichen Applikationen vergleichen lassen und auf analoge Wechselwirkungsprinzipien rückführbar sind. Die gezielte Modifikation physikochemischer Materialparameter stellt neben der Integration spezifisch wirkender Funktionsmoleküle aus heutiger Sicht ein gangbares Antifoulingkonzept dar. Dies gilt in erster Linie, da für die initiale Biofilmbildung die unspezifischen Wechselwirkungen verantwortlich sind. Das Verständnis der thermodynamischen Relationen der Bioadhäsion bildet daher die Grundlage der Entwicklung neuer Antifoulingstrategien. Mit Bezug auf die Gibbs'sche Fundamentalgleichung wurden demgemäß in der Konzeptentwicklung relevante Wechselwirkungen an der zu betrachtenden Grenzfläche zwischen Substrat/Biosystem/Medium verglichen und in einem eigenen Konzept zusammengefasst.

In dieser Arbeit werden archaeale Membranlipide als Basis der Oberflächenmodifizierung genutzt. Wesentliche Vorteile der Membranlipide der Archaea sind ihre Resistenz gegenüber hydrolytischem und enzymatischem Abbau, die Unempfindlichkeit gegen Oxidation sowie die biologische Verträglichkeit. Die verwendeten Tetraetherlipide stammen ausnahmslos vom Mikroorganismus *Thermoplasma acidophilum* und wurden kovalent durch Aktivierung an Materialoberflächen über die Self-Assembling-Methode fixiert.

Entsprechend der beiden betrachteten Applikationen: Sensoren im Gewässermonitoring und Katheter für die peritoneale Dialyse, dienten als Substratwerkstoffe das Borosilikatglas BOROLOAT B33 (Schott Jena AG) und ein kommerzielles Silikon aus dem Medizinproduktebereich (Raumedic SIK 6504, Rehau AG). Nach dem Aufbau der monomolekularen Tetraetherlipidschichten erfolgte die Modifizierung der nicht zur Verankerung benötigten Kopfgruppe. Die Funktionalisierung der Tetraetherlipidschicht wurde dabei mit dem Ziel der Variation physikochemischer Parameter und der Kopplung spezifisch funktioneller Gruppen realisiert. Die Charakterisierung der Lipidschichten umfasste neben der Bewertung der Schichtqualität die Bestimmung energetischer Oberflächenparameter und die Erfassung des Zetapotenzials. Es schloss sich die analoge Charakterisierung der Mikroorganismen und Medien bezüglich ihrer Hydrophobizität, Elektrokinetik und Morphologie an, um die Grundlage für die Quantifizierung der resultierenden Wechselwirkungsenergien an der Grenzfläche zwischen Schicht und Biosystem zu legen.

Mit dem Ziel, sowohl eine applikationsspezifische Aussage zur initialen bakteriellen Adhäsion zu erhalten, aber auch ein möglichst umfassendes Bild der Biofilmbildung zu gewinnen, gliederte sich die Bioadhäsionsprüfung in dieser Arbeit in Stufen. Gemäß der Applikationsbeispiele wurden *in vitro*-Modelle aufgebaut, welche die Anwendung im Gewässermonitoring aber auch medizinische Umgebungsbedingungen simulierten. Die Bioadhäsionsmessung im Labor wurde unter definierten Strömungsbedingungen in Anwendung von Fließkammersystemen durchgeführt. In Kooperation mit Industriepartnern erfolgte die Einbringung der Tetraetherlipidschichten in Funktionalitätstest unter realen Feldbedingungen und in die Biokompatibilitätsprüfung.

Die auf dem Borosilikatglas aufgetragenen monomolekularen Lipidschichten verdeutlichten, dass das aus der Membran des *Thermoplasma acidophilum* erhaltene archaeale Tetraetherlipid auf einer Glasoberfläche kovalent fixierbar ist. Es steht eine neuartige Beschichtung zur Verfügung, welche als Spacer für die Anbindung von Funktionsmolekülen dient.

Die auf den Tetraetherlipidfilmen aufbauenden Schichtsysteme behalten auch nach ihrer Funktionalisierung eine physikalische Langzeitstabilität und chemische Resistenz. Die neuen Lipidschichten präsentierten ebenso den Erhalt sowohl der optischen als auch der elektrochemischen Sensorfunktionalität. Es konnte zudem eine wirksame Lipidbeschichtung auf der Silikonoberfläche mit Hilfe einer neu entwickelten Aktivierungsschemie nachgewiesen werden. Erwartungsgemäß erreicht die nanoskalige Lipidschicht auf Silikon jedoch keine mit Schichten auf dem Glassubstrat vergleichbare Homogenität. Dennoch ist davon auszugehen, dass die gesamte Polymeroberfläche beschichtet wurde unter Einbeziehung einer akzeptablen Anzahl von Defekten.

Die durchgeführte Bewertung der energetischen und elektrokinetischen Charakterisierung der funktionalisierten Tetraetherlipidschichten weist insbesondere auf dem Substrat Glas eine geringe Bandbreite der Parameter auf. Die charakteristischen Eigenschaften superhydrophil/superhydrophob oder negativ/positiv geladen wurden nicht in dem erwarteten Maß erreicht. Auf dem Substrat Silikon kann allein bezüglich der Oberflächenladung eine deutlichere Variation erreicht werden. Diese geringe Variationsbreite wird entweder auf die ungenügende Anzahl oder die eingeschränkte Funktionalität der gekoppelten Funktionsmoleküle zurück geführt.

Dennoch lässt sich die Analyse des Antifoulingpotenzials der Tetraetherlipidschichten und ihrer Funktionalisierungen in einer positiven Bilanz zusammenfassen. Die erreichte Reduzierung der bakteriellen Adhäsion im *in vitro*-Laborversuch ist erfolgversprechend. Insbesondere im Feldtest wurde ein deutlich verbessertes Antifoulingverhalten der neuen Schichten präsentiert. Die Beschichtung der Materialien mit dem Tetraetherlipid allein zeigt bereits durchgehend einen die Bioadhäsion reduzierenden Effekt. Es werden im Labor Adhäsionsminderungen um bis zu 40% in Fluss- und Trinkwasser erreicht, während im Abwasser nur eine Verringerung der Adhäsion um 20-25% ermittelt wurde. Die unterschiedlichen Funktionalisierungen führen in den drei Wässern zu einer variierenden Rangfolge in Antifouling. Für die Proben TL PEG, TL negativ, TL positiv sowie das unmodifizierte TL lässt sich insgesamt in allen wässrigen Medien eine positive Bilanz ziehen. Demgegenüber führen die Proben TL PC und TL CF zu einem erfolgreichen Antifoulingverhalten im Infektionsmodell. Das unmodifizierte TL und die Probe TL PEG weisen erneut vielversprechende Ergebnisse auf. Die funktionalisierten Silikonoberflächen bestätigen das Ergebnis weitestgehend. Die Probe SIK TL Kombi führte auf Silikon zu dem besten Antifoulingverhalten.

Die Analyse der Adhäsionsmessung mit Einzelorganismen diente der Entwicklung eines realitätsnahen biologischen Modells und verdeutlicht eine konkurrierende Adhäsion mehrerer Organismen in der Mischkultur. Das Adhäsionspotenzial der Mikroorganismen variiert drastisch. Diese Differenzen werden durch die starken Unterschiede in den Oberflächeneigenschaften der Bakterien zusätzlich interpretierbar. Es zeigt sich, dass mit zunehmender Dicke der den Mikroorganismus umgebenden Schleimschicht die Zahl der adhärenierten Bakterien abnimmt, d.h. anziehend wirksame physikochemische Wechselwirkungen oder Proteinfunktionen werden maskiert.

Die vergleichende Betrachtung der Ergebnisse der Laboranalysen und des Feldtests lassen die Annahme zu, dass die gewählte Methodik der *in vitro*-Bioadhäsionsmessungen eine im Feld nicht existente Härteprüfung darstellt.

Im Rahmen der Diskussion wurden zu den einzelnen Oberflächenparametern vergleichend die Resultate aus der Literatur und eigene Korrelationsbetrachtungen gegenüber gestellt. Das Ergebnis verdeutlicht, dass die Hydrophobie des Substratmaterials die bakterielle Adhäsion nur unwesentlich beeinflusst. Eine Ausnahme bilden Medien mit hoher Ionenstärke z.B. Dialyseflüssigkeit, in welchen hydrophobe Interaktionen eine zunehmendere Rolle spielen. Die elektrostatisch wirksame Abstoßung kommt deutlicher auf der negativ geladenen Glasoberfläche zum Tragen. Die Lipidierung des Substrates lässt keine Relation gemessen am Antifoulingpotenzial erkennen, was durch die Nivellierung der Zetapotenziale der lipidierten und funktionalisierten Substrate gestützt wird.

Die experimentell begründeten Korrelationsbetrachtungen wurden ergänzt durch die Darstellung der Wechselwirkungen in Form von Energie-Distanz-Funktionen ausgehend von thermodynamisch kolloidchemischen Modellvorstellungen. Mit dem Ziel, neben den Wechselwirkungen der klassischen DLVO-Theorie, Säure-Base-Wechselwirkungen sowie sterische Interaktionen modellseitig zu erfassen, erfolgte in der Konzeptfindung eine eigene Einteilung der in der vorliegenden Arbeit zur Diskussion der Bioadhäsion dienenden Wechselwirkungsenergien. Die Interpretation des erreichten Antifouling demonstrierte, dass zusammengefasst der Beitrag der van der Waals-Wechselwirkung vergleichsweise gering und unabhängig von der Funktionalisierung der Tetraetherlipidschicht ist. Der Effekt elektrostatischer Wechselwirkungsenergien ist im Vergleich zu den van der Waals-Wechselwirkungen etwas größer und von höherer Reichweite. Während die eingesetzten Medien die Höhe der entstehenden Energiebarriere beeinflussen, bestimmt die Funktionalisierung des Tetraetherlipids die Reichweite der elektrostatischen Interaktion.

Zusammenfassend sind die dargestellten Antifoulingseigenschaften allein aus dem DLVO-Konzept nicht eindeutig ableitbar. Die Betrachtung der hydrophoben Anziehung und der hydrophilen Abstoßung lässt ebenfalls die Aussage zu, dass allein die Unterbindung der hydrophoben Anziehung z.B. durch die Lipidierung der Silikonoberfläche nicht als Wirkprinzip des Antifouling interpretiert werden kann. Demgegenüber spielen hydrophile Effekte verursacht durch die Lipidierung und ihre Funktionalisierung eine wesentlichere Rolle. Die ermittelte Abstoßung wirkt jedoch nur in geringen Distanzen. Dagegen verdeutlicht die Interpretation der sterischen Wechselwirkungen einen hohen Stellenwert für das Antifouling am Beispiel der funktionalisierten Tetraetherlipidschichten. Dabei entspricht das gewählte Polyethylenglykol der als optimal definierten Größe für die abstoßende sterische Wirkung. Beide Effekte: die lange sterisch wirkende Polymerkette und die Entstehung einer Wasserbarriere bei mittleren Kettenlängen, kombiniert mit funktionellen Gruppen, konnten effektiv an dem modifizierten Glas und Silikon beschrieben werden. Die Quantifizierung der sterischen Wechselwirkungsenergie veranschaulicht zusätzlich den Einfluss dieser Interaktion unter der Voraussetzung einer optimalen Konformation der Polymere.

Zusammenfassend und grundsätzlich wird bezüglich der theoretischen Erfassung der Bioadhäsion bestätigt, dass keines der thermodynamischen Modelle die komplexe Situation zufriedenstellend und umfassend beschreibt. Letztendlich werden die spezifische Situation begründet und Modellansätze optimiert. Dessen ungeachtet wurde klar aufgezeigt, dass sich die Reduzierung der initialen Bioadhäsion auf Säure-Base-Wechselwirkungen insbesondere ihrer hydrophilen und sterischen Energieanteile zurückführen lässt und somit der Aufbau einer sterisch wirksamen Wasserbarriere ein effektives Antifoulingkonzept darstellt.

Im Zusammenhang mit der technischen Applikation der Tetraetherlipidschichten entstand u.a. eine Patentanmeldung. In Einhaltung der technischen Zielstellung der Arbeit erfolgte zudem die erfolgreiche Prüfung ausgewählter Lipidbeschichtungen in Feldtests unter realen Applikationsumgebungen, z.B. in einer Trinkwassertalsperre und einer kommunalen Kläranlage. Zusätzlich konnte im Rahmen der erforderlichen Funktionalitätsprüfung eine gute Biokompatibilität und Verträglichkeit als Implantatmaterial nachgewiesen werden. In Vorbereitung der technologischen Umsetzung der Beschichtungstechnologie entstand am Beispiel medizinischer Katheter eine Prototypanlage zur Behandlung von Musterschläuchen. Erste Beschichtungsversuche unterstrichen die Funktionalität des Beschichtungsprinzips im Labormaßstab.

*Die Entwicklung eines biomimetischen Oberflächencoatings auf der Basis neuartiger archaealer Tetraetherlipide stellt einen vielversprechenden lipidchemischen Ansatz zur Etablierung eines langzeitstabilen und biomimetischen Antifoulingkonzeptes dar. Die Reduzierung der initialen Bioadhäsion und darauf folgend der eingeschränkten Biofilmbildung wird auf abstoßende hydrophile und sterische NonDLVO-Wechselwirkungen zurück geführt. Aufgrund ihrer einstellbaren spezifischen Wechselwirkung mit dem jeweiligen Medium und der kovalenten Fixierbarkeit auf technischen Funktionsflächen können sie feld- bzw. prozesstauglich eingesetzt werden.*

## Summary

For quite some time science concerns itself with the prevention of biofilms – the antifouling. The present work places itself in this development focus. The study aims on the development of antiadhesive characteristics by means of coating with archaean tetraether lipids and their functionalization in order to prevent adhesion of microorganisms and thus the following biofilm formation.

The division of the biofilm formation into the initial phase and the phase of biofilm growth is of importance, since the development of the antifouling likewise targets these. The basic literature search shows that in principle antifouling concepts can be compared despite the different applications and be attributed to similar interaction principles. In addition to the integration of specific functionally molecules the systematic modification of physico-chemical material parameters represents apart a potential antifouling concept from today's viewpoint. This applies primarily, since for the initial biofilm formation the nonspecific interactions are responsible. The understanding of the thermodynamic relations of the bioadhesion is therefore the basis of the development of new antifouling strategies. During the concept development relevant interactions at the interface between substrate/biosystem/medium were compared according to the Gibbs fundamental equation and summarized in an own concept.

In this work archaean membrane lipids are used as basis of the surface modification. Substantial advantages of the membrane lipids of the Archaea are their resistance to hydrolytic and enzymatic degradation, the unsensitivity against oxidation as well as the biological compatibility. The used tetraether lipids are isolated without exception from the microorganism *Thermoplasma acidophilum* and were fixed covalently by activation at material surfaces over the self assembling method. According to the two selected applications: sensors in the water monitoring and catheters for peritoneal dialysis, a borsilicat glass BORO FLOAT® B33 (Schott Jena AG) and a commercial medical silicone (Raumedic SIK 6504, Rehau AG) served as substrate materials. After the formation of the mono molecular tetraether lipid coating the second headgroup which is unnecessary for the fixation was modified. The functionalization of the tetraetherlipid coatings was realized with the goal of the variation of physico-chemical parameters and the coupling of specific functional groups. The characterization of the lipid films included the determination of energetic surface parameters and the estimation of the zeta potential in addition to the evaluation of the layer quality. A similar characterization was carried out for the microorganisms and media concerning their hydrophobicity, electrokinetics and morphology, in order to put the basis for the quantification of the resulting interaction energies at the interface between lipid and biosystem.

With the goal of receiving both a application-specific statement to initial bacterial adhesion in addition to a comprehensive picture of the biofilm formation the bioadhesion test was divided in this work into stages. In accordance with the application examples *in vitro* models were developed, which simulated application in the watermonitoring and medical conditions. The bioadhesion measurement in the laboratory was accomplished on defined flow conditions by use of flow chamber systems. In co-operation with industrial partners bringing the tetraetherlipid coatings into functionality test took place on real conditions as well as into the biocompatibility examination.

The mono molecular lipid films applied on the borsilicate glass clarified that the tetraether lipid isolated from the membrane of *Thermoplasma acidophilum* is covalently fixable on a glass surface. A new coating is available, which serves as spacer for functional molecules. The developed layer systems based on tetraether lipid films also retain their physical long-term stability and chemical resistance after the functionalization. The new lipid coatings also did not interfere with the optical and electrochemical sensor functionality. Additionally an effective lipid coating on the silicone surface with the help of a newly developed activation chemistry is demonstrated. However, as expected the nanoscale lipid coating on silicone achieves no homogeneity comparable to layers on the glass substrate. Nevertheless it is assumed that the whole polymer surface was coated including an acceptable number of defects.

The realised evaluation of the energetic and electrokinetic characterization of the modified tetraether lipid coatings revealed in particular on the substrate glass a limited range of the parameters. The characteristic properties hydrophilic/hydrophobic or negative/positive charged were not reached in the expected dimension. On the substrate silicone a significant variation can only be achieved concerning the surface charge. This limited range of variation is attributed either to the insufficient number or the reduced functionality of the coupled functional molecules.

Nevertheless the analysis of the antifouling potential of the tetraether lipid coatings and their modifications can be summarized in a positive summary. The reached reduction of the bacterial adhesion in *in vitro* laboratory tests is promising. In particular in the field test a clearly improved antifouling of the new layers was presented.

The pure tetraether lipid coating of the materials already shows a continuous reduction of bioadhesion. In the laboratory adhesion reductions are reached of up to 40% in river and drinking water, while in the waste water only a decrease of the adhesion of 20-25% was determined. The different functionalizations lead in the three water models to a varying order of rank in antifouling. For the samples TL PEG, TL negative, TL positive as well as unmodified lipid can be drawn in all aqueous media a positive balance. In contrast to this the samples TL PC and TL CF lead to a successful antifouling result in the infection model. Unmodified TL and the sample TL PEG possess again promising results. The functionalized silicone surfaces confirm the result as far as possible. The sample SIK TL Combi led on silicone to the best antifouling property.

The analysis of the adhesion measurement with single organisms served for the development of a close-to-reality biological model and clarifies a competitive adhesion of several organisms in the mixed culture. The adhesion potential of the bacteria varies drastically. These differences become additionally interpretable by the strong differences in the surface properties of the bacteria. It is shown that with increasing thickness of surrounding sime layer the number of the adhered bacteria decreases, i.e. attractively effective physicochemical interactions or protein functions are masked.

The comparative analysis of the results of the laboratory experiments and the field test confirms the acceptance that the selected methodology of *in vitro* bioadhesion evaluation represents a strong test condition which does not exist in the natural conditions.

In the context of the discussion of the individual surface parameters comparatively the results from the literature and own views of correlation were opposite placed. The result clarifies that the hydrophobicity of the substrate material affects the bacterial adhesion only insignificantly. The only exception are media with high ion strength e.g. peritoneal dialysis liquid, in which hydrophobic interactions increase. The electrostatically effective repulsion becomes more clear on the negatively charged glass surface. The lipid coating of the substrate does not show a relation, which is supported by the leveling of the zeta potentials of the lipid coated and modified substrates.

The experimentally based correlation analysis were supplemented by the representation of the interactions in the form of energy distance functions on the basis of thermodynamically colloid-chemical model conceptions. An own organization of the interaction energies serving in this thesis for the discussion of the bioadhesion took place in the concept identification. This aimed to estimation interactions apart from the classical DLVO theory, acid-base-model as well as steric interaction energy. The interpretation of the reached antifouling demonstrated that the contribution of van der Waals interactions is comparatively small and independent from the functionalization of the tetraether lipid film. Compared with van der Waals interactions the effect of electrostatic energies is somewhat larger and of higher range. While the selected media affect the height of the energy barrier, the functionalization of the tetraether lipids determines the range of the electrostatic interaction. In summary the represented antifouling is not derivable from the DLVO concept by itself. The view of the hydrophobic attraction and the hydrophilic repulsion permits likewise the statement that the prevention of the hydrophobic attraction e.g. by the lipid coating of the silicone surface cannot be interpreted as an effective principle of the antifouling. In contrast to this hydrophilic effects play a more substantial role caused by the lipid coating and its functionalization. The determined repulsion however only works in small distances. On the other

hand the interpretation of the steric interactions reveals a high potential for the antifouling by the example of the functionalized tetraether lipid layers. The selected polyethylene glycol represents as the optimally defined size for the repulsive steric effect. Both effects: the long sterically active polymer chain and the formation of a water barrier with medium chain lengths, combined with functional groups, could be described effectively at the modified glass and silicone. The quantification of the steric interactions illustrates additionally the influence of this energy under the condition of an optimal conformation of the polymers.

In summary and in principle concerning the theoretical description of the bioadhesion it is confirmed that none of the thermodynamic models describes the complex situation satisfyingly and comprehensively. Finally the specific situation is justified and models are optimized. Regardless it was clearly pointed out that the reduction of the initial bioadhesion can be attributed to acid-base-interaction in particular its hydrophilic and steric energy contribution and thus the creation of a sterically effective water barrier represents an promising antifouling concept.

With respect to the technical application of the tetraether lipid films among other things a patent application was developed. In accordance to the technical goal of the work the successful examination of selected optimized lipid coatings in field tests under material application environments, e.g. in a drinking water dam and a local purification plant took place. Additionally a good biocompatibility and compatibility as implant material could be proven in the context of the necessary functionality examination.

In preparation of the technological scale-up of the coating technology a prototype plant was developed for the coating of tubes. First coating attempts underlined the functionality of the coating principle in the laboratory dimension.

*The development of biomimetic surface coatings on the basis of new archaean tetraether lipids represents a promising lipid chemical approach for the establishment of a long-term-stable and biomimetic antifouling concept. The reduction of the initial bioadhesion and thus the reduced biofilm formation is attributed to repulsive hydrophilic and steric nonDLVO interactions. Due to their adjustable specific interactions with the respective medium and the covalent fixability on technical surfaces they can be applied field and process-suited.*

## Referenzen

1. Barberousse, H., et al., *Biofouling*, 2007. 23(1): p. 15-24.
2. Guggenheim, E., *Buch*, 1959: p. 46.
3. Butt, H., K. Graf, and M. Kappl, *Buch*, 2005.
4. Richter, D., *Universität Berlin*, 2004: p. 311.
5. van der Waals, J.D., *thesis*, 1873. Leiden.
6. Keesom, W.H., *Phys. Z.*, 1921. 22: p. 126.
7. Debye, P.J.W., *Phys. Z.*, 1920. 21: p. 178.
8. London, F., *Z. Physik*, 1930. 63: p. 245.
9. Lennard-Jones, J.E., *Trans. Faraday Soc.*, 1932. 28: p. 334.
10. Hamaker, H., *Physica IV*, 1937(10): p. 1058-1072.
11. de Boer, J.H., *Trans. Faraday Soc.*, 1936. 32: p. 10.
12. Israelachvili, J. and G. Adams, *J. Chem. Soc.*, 1978. 4: p. 975-1001.
13. Tadmor, R., *J. Physics: Condensed Matter*, 2001. 13: p. L195-202.
14. Derjagin, B.V., V.M. Müller, and J.P. Toporov, *J. Colloid Interface Science*, 1975. 53: p. 314.
15. Tabor, D. and F. Winterton, *Proc.Roy.Soc.A*, 1969. 312: p. 435-450.
16. Lifshitz, E.M., *Sov. Phys. JETP*, 1956. 2: p. 73-83.
17. Bhushan, B., *Buch.*, 2004.
18. van Oss, C., *Buch: Interfacial forces in aqueous media*, 1994: p. 1-409.
19. Butt, H., B. Capella, and M. Kappl, *Surface Science Reports*, 2005. 59: p. 1-152.
20. Atkins, P.W., *Buch: Physikalische Chemie*, 1987: p. 261-262.
21. Hunter, R.J., *Academic press London*, 1981.
22. Chapman, D., *Phil. Mag.*, 1913. 25: p. 475.
23. Verbich, S., S. Dukhin, and H. Matsumura, *J. Disp. Sci. Techn.*, 1999. 20(1,2): p. 83-104.
24. Jacobasch, H.J., et al., *tm Techn.Messen*, 1996. 63(12): p. 439.
25. Hogg, R., T. Healy, and D. Fuerstenau, *Buch: Mutual Coagulation of colloidal dispersions*, 1965: p. 1638-1651.
26. Bunaccurso, E., *Dissertation Uni Siegen*, 2001.
27. Derjaguin, B.V. and L.D. Landau, *Acta Physica Chimica USSR*, 1941. 14: p. 633 ff.
28. Verwey and Overbeek, *Elsevier, Amsterdam*, 1948.
29. Bos, R., H.C. van\_der\_Mei, and H.J. Busscher, *Fems Microbiology Reviews*, 1999. 23(2): p. 179-230.
30. Israelachvili, J., *BuchAcademic Press*, 1992.
31. Schmidt, R., *Buch: Werkstoffverhalten in biologischen Systemen, 2. Auflage*, 1999.
32. Grasso, D., et al., *Reviews in Environmental Science & Biotechnology*, 2002. 1: p. 17-38.
33. van Oss, C., *J. Dispersion Science Technology*, 1991. 12(2): p. 201-219.
34. Woodward, R., *Presented at TPOs in Automotive 2000*, 2000: p. 1-6.
35. Besseling, N., *Langmuir*, 1997. 13: p. 2113-2122.
36. Glaser, R., *Buch Biophysik*, 1996.
37. van Oss, C., *J. Mol. Recognition*, 2003. 16: p. 177-190.
38. Pashley, R. and J. Israelachvili, *J. Coll. Int. Sci.*, 1984. 101: p. 510-523.
39. Valle-Delgado, J., et al., *Langmuir*, 2005. 21: p. 9544-9554.
40. Pashley, R., *J. Coll. Int. Sci.*, 1981. 80(1): p. 153.
41. Valle-Delgado, J., et al., *J Chemical Physics*, 2005. 123: p. 034708-1.
42. Rabinovich, Y. and R. Yoon, *Langmuir*, 1994. 10: p. 1903-1909.
43. Israelachvili, J. and R. Pashley, *J. Coll. Int. Sci.*, 1984. 98(2): p. 500.
44. Pashley, R., *Coll. Int. Sci.*, 1982. 16: p. 57-62.
45. Aksoy, B., *Dissertation Blacksburg Virginia*, 1997. Chapter 1.
46. Christenson, H., et al., *J. Phys.Chem*, 1990. 94: p. 8004-8006.
47. Roosjen, A., et al., *Micorbiology*, 2006.
48. Rijnaarts, H., et al., *Coll. Surf. B: Biointerface*, 1999. 14: p. 179-195.
49. de Gennes, P., *Adv. Coll. Interf. Sci.*, 1987. 27: p. 189-209.
50. Ottewill, R., *Buch: Nonionic surfactants*, 1967. ed. Marcel Decker: p. 627.
51. Ji, H., et al., *Macromolecules*, 1990. 23: p. 698-707.
52. Huang, H. and E. Ruckenstein, *Langmuir*, 2006. 22(7): p. 3174-3179.
53. Scheutjens, J. and G. Fleer, *Macromolecules*, 1985. 18: p. 1882-1900.
54. Ruckenstein, E. and B. Li, *J.Chem. Phys*, 1997. 3(7): p. 932-942.
55. Milner, S., T. Witten, and M. Cates, *Europhys Lett*, 1988. 5: p. 413.
56. Vitte, J., et al., *European Cells and Materials*, 2004. 7: p. 52-63.
57. Dickinson, Ruta, and Truesdail, *Buch: SP Sawan, G Manivannan:Antimicrobial/Antiinfektive materials*, 2000. Kap.4: p. 67-93.
58. Bell, G.I., M. Dembo, and P. Bongrand, *Biophysical Journal*, 1984. 45(6): p. 1051-64.
59. Flemming, H. and J. Wingender, *Biologie in unserer Zeit*, 2001. 3(31): p. 169-180.
60. Martienssen, M., *Habilitation MLU Halle*, 2001.
61. Costerton, J.W., et al., *Annual Review of Microbiology*, 1995. 49: p. 711-45.
62. Christensen, B.E., *J.Biotechnol.*, 1989. 10: p. 181-202.
63. Characklis, W. and P. Wilderer, *Structure and function of biofilms*, 1989: p. 73-89.
64. Gomez\_Suarez, C., et al., *Microbiology (Reading, England)*, 2002. 148(Pt 4): p. 1161-9.
65. Frias, J., E. Olle, and M. Alsina, *Infection and Immunity*, 2001. 69(5): p. 3431-3434.

66. Folwaczny, M. and R. Hickel, *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*, 2003. 58(12): p. 648-659.
67. Busscher, H.J. and A.H. Weerkamp, *FEMS Microbiology Letters*, 1987. 46: p. 165-173.
68. Yebra, D., S. Kiil, and K. Dam-Johansen, *Progress in Organic Coatings*, 2004. 50: p. 75-104.
69. Willemsen, P., *TNO Science and Industry*, 2006.
70. Prentice, T., *WHO report*, 2002: p. 7-12.
71. gwf, *gwf Wasser-Abwasser*, 2000. 141(11).
72. Willsch, R., *OPTO*, 2000: p. 13-18.
73. Inoue, M., *Buch: Biodeterioration*, 1988. Elsevier, New York: p. 580-584.
74. Jones, R., *Buch: Sensors - a comprehensive survey*, 1995. Ed. Göpel, W.: p. 357-364.
75. Reimann, D., et al., *Ärzteblatt Sachsen*, 2001. 11: p. 509.
76. Dasgupta, M. and M. Larabie, *Peritoneal Dialysis International*, 2001. 21(3): p. 213-217.
77. Glantz, P.O., *J. Colloid Interface Science*, 1971. 37: p. 281-290.
78. Quirynen, M. and C.M. Bollen, *Journal of Clinical Periodontology*, 1995. 22(1): p. 1-14.
79. Busscher, Sjollem, and Mei, *Microbiell Cell Surface Hydrophobicity*, R. J. Doyle, M. Rosenberg, 1990.
80. Steinberg, P., *Tagungsband IBBS 2004 Mülheim*, 2004.
81. Ferreiros, et al., *FEMS Microbiology Letters*, 1989. 60: p. 89.
82. Grunz, A., E. Dayss, and G. Leps, *Surface and coating technology*, 1999. 116-119: p. 831-835.
83. Dankert, J., Hogt, and Feijen, *Critical Reviews in Biocompatibility*. 2(3): p. 219-301.
84. Pedri, L., *Dokument von Autor*, 2004: p. 1-24.
85. Toes, G., et al., *Biomaterials*, 2002. 23: p. 255-262.
86. Chaudhury, M., et al., *Biointerphases*, 2006. 1(1): p. 18-21.
87. Schmidt, R., *Auszug aud Abschlussbericht*, 2004: p. 26-50.
88. Gerson, D.F. and D. Scheer, *Biochem.Biophys.Acta*, 1980. 602: p. 506-510.
89. Schakenraad, J.M., et al., *Cell Biophysics*, 1988. 13: p. 75.
90. van der Valk, P., et al., *J.Biomed.Mat.Res*, 1988. 17: p. 807-817.
91. Roosjen, A., *Dissertation Universität Groningen*, 2005.
92. Allion, A., J. Baron, and L. Boulange-Petermann, *Biofouling*, 2006. 22(5): p. 269-278.
93. Brizzolara, R. and E. Holm, *Biofouling*, 2006. 22(5/6): p. 431-440.
94. Boulange-Petermann, Baroux, and Bellon-Fontaine, *In: Contact angle, wettability and adhesion Ed. K. L. Mittal*, 1993: p. 839-848.
95. Boulange-Petermann, L., et al., *Biofouling*, 2004. 20(1): p. 25-33.
96. Busscher, H.J., et al., *Appl Environ Microbiol*, 1984. 48: p. 980-983.
97. Roth, C. and A. Lenhoff, *Langmuir*, 1993. 9: p. 962-972.
98. Mozes, Marchal, and v. Haecht, *Biotechnol. Bioeng.*, 1987. 30: p. 439-450.
99. Weerkamp, A.H., Busscher, and Uyen, *J. Dental Research*, 1988. 67: p. 1483-1487.
100. Gottenbos, B., et al., *Biomaterials*, 2003. 24(16): p. 2707-10.
101. Gottenbos, B., et al., *Biomaterials*, 2002. 23(6): p. 1417-23.
102. Jucker, B.A., H. Harms, and A.J. Zehnder, *J. Bacteriology*, 1996. 178(18): p. 5472-5479.
103. Brandes, N., et al., *Biomaterialien*, 2004. 5(1): p. 22-27.
104. Hu, S., C. Jou, and M. Yang, *Biomaterials*, 2003. 24: p. 2685-2693.
105. Vigeant, M. and R. Ford, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997. 63(9): p. 3474-3479.
106. van Oss, C., R. Good, and M. Chaudhury, *Langmuir*, 1988. 4(4): p. 884-891.
107. Azeredo, J., J. Visser, and R. Oliveira, *Coll. Surf. B: Biointerface*, 1999. 14: p. 141-148.
108. Triandafillu, K., et al., *Biomaterials*, 2003. 24: p. 1507-1518.
109. Vigeant, M. and R. Ford, *Appl. Env. Microb.*, 1997. 63(9): p. 3474-3479.
110. Abu-Lail, N. and T. Camesano, *Biomacromolecules*, 2003. 4: p. 1000-1012.
111. Schmidt, W., H. Böttcher, and W. Pompe, *Vom Wasser*, 2002. 98: p. 177-192.
112. Harris, L., et al., *Biomaterials*, 2004. 25: p. 4135-4148.
113. Schumacher, J., et al., *Biofouling*, 2007. 23(1): p. 55-62.
114. Li, J., et al., *Tagungsband Functional Surfaces*, 2004: p. 243-250.
115. Baum, C., *Tagungsband IBBS 2004 Mülheim*, 2004.
116. Carmann, M., et al., *Biofouling*, 2006. 22(1): p. 11-21.
117. Marmur, A., *Biofouling*, 2006. 22(1/2): p. 107-115.
118. Qiu, Y., et al., *Macromolecules*, 1998. 31: p. 165-171.
119. Holland, N., et al., *NATURE*, 1998. 392(23): p. 799-801.
120. Gupta, A., et al., *Biomaterials*, 2006. 27: p. 3084-3095.
121. Biggs, S. and G. Spinks, *J. Adh. Sci. Techn.*, 1998. 12(5): p. 461-478.
122. Zhu, J. and R. Marchant, *Biomacromolecules*, 2006. 7(1036-1041).
123. Emoto, K., et al., *Coll. Surf. B: Biointerfacecs*, 2000. 18: p. 337-346.
124. Tziampazis, E., J. Kohn, and P. Moghe, *Biomaterials*, 2000. 21: p. 511-520.
125. Dalsin, J., et al., *J. Am. Ceram. Soc.*, 2003. 125: p. 4253-4258.
126. Wagner, V., J. Koberstein, and J. Bryers, *Biomaterials*, 2004. 25: p. 2247-2263.
127. Driver, M., *Internet*.
128. Lewis, A., et al., *J. Material science: Material in Medicine*, 2003. 14: p. 39-45.
129. Hongyan, B., et al., *Analytical Chemistry*, 2006. 04: p. A-G.
130. Iwasaki, Y., A. Yamasaki, and K. Ishihara, *Biomaterials*, 2003. 24: p. 3599-3604.
131. Iwasaki, Y., et al., *J. Biomater. Sci. Polymer Ed.*, 1999. 10(5): p. 513-529.
132. Zhang, S.F. and Rolfe, *Biosensors&Bioelectronics*, 1996. 11(10): p. 1019-1029.
133. Rose, S., et al., *Biomaterials*, 2004. 25: p. 2125-2135.
134. Krsko, P. and M. Libera, *materials today*, 2005. 8(12): p. 36-44.

135. Saroyan, J., *Symposium on the Biology of paints*, 1968.
136. Zhang, X., *Buch: Antimicrobial/Anti-infective Materials*, 2000. Ed..S.P.Sawan, G.Manivannan(ch 7): p. 149-180.
137. Alt, V., et al., *Biomaterials*, 2004. 25: p. 4383-4391.
138. Domenico, P., et al., *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, 2001. 45(5): p. 1417-1421.
139. Baveja, J., et al., *Biomaterials*, 2004. 25: p. 5003-5012.
140. Taylor, M., et al., *Appl. Env. Microb.*, 2004. 70(7): p. 4387-4389.
141. Kohnen, W., et al., *Biomaterials*, 2003. 24: p. 4865-4869.
142. Geer, S., et al., 19, 2003. 5(315-326).
143. Park, D. and S. Kim, 1998(19): p. 851-859.
144. Bavington, C. and C. Page, *Respiration*, 2005. 72: p. 335-344.
145. Friedrich, C.L., et al., *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, 2000. 44(8): p. 2086-2092.
146. Tiller, J., et al., *PNAS*, 2001. 98(11): p. 5981-5985.
147. Haynie, S.L., G.A. Crum, and B.A. Doele, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1995. 39(2): p. 301-7.
148. Jureti, D., et al., *Febs Letters*, 1989. 249(2): p. 219-23.
149. Pereira, M.O. and M.J. Vieira, *Biofouling*, 2001. 17(2): p. 93-101.
150. Stanley, M., et al., *Phytopathology*, 2002. 92: p. 378-383.
151. Xu, Q., et al., *Environ Toxicol*, 2005. 20: p. 467-474.
152. Subramanyan, S., et al., *Buch: Antimicrobial/Anti-infective Materials*, 2000: p. 220-238.
153. Vigeant, M., et al., *Appl. Env. Microb.*, 2002. 68(6): p. 2794-2801.
154. Lewis, L., *Coll. Surf. B: Biointerface*, 2000. 18: p. 261-275.
155. Park, S., J. Kim, and H. Suh, *Biomaterials*, 2004. 25: p. 3689-3698.
156. Tiller, J., et al., 2005.
157. Woese, C., O. Kandler, and M. Wheelles, *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1990. 87: p. 4576-4579.
158. Darland, G., et al., *Science*, 1970. 170: p. 1416-1418.
159. van de Vossenberg, J., A. Driessen, and W. Konings, *Extremophiles*, 1998. 2: p. 163-170.
160. Langworthy, T., P. Smith, and W. Mayberry, *J. Bacteriology*, 1972. 112(3): p. 1193-1200.
161. Gulik, A., et al., *J. Mol. Biol.*, 1985. 182: p. 131-149.
162. Gliozzi, A., et al., *Biochimica Biophysica Acta*, 1994. 1189: p. 96-100.
163. Sprott, G., *J. Bioenerg. Biomembranes*, 1992. 24(6): p. 555-566.
164. DeRosa, M., *thin solid films*, 1996. 284: p. 13-17.
165. Hanford, M. and T. Peebles, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2002. 97: p. 45-62.
166. Yamauchi, K., A. Moriya, and M. Kinoshita, *Biochimica Biophysica Acta*, 1989. 1003: p. 151-160.
167. Ernst, M., et al., *Chemistry Physics Lipids*, 1998. 94: p. 01. Dez.
168. Stern, J., et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992. 1128: p. 227-236.
169. Blöcher, D. and K. Ring, *Chemistry Physics Lipids*, 1991. 58: p. 233-239.
170. Langworthy, T., *Biochimica Biophysica Acta*, 1977. 487: p. 37-50.
171. Paltauf, F., *Chemistry Physics Lipids*, 1994. 74: p. 101-139.
172. Antonopolous, E., et al., *Uni Frankfurt*, 1994.
173. Bakowsky, U., *Dissertation: MLU Halle*.
174. Bykow, V., *Biosensors&Bioelectronics*, 1996. 11(9): p. 923-932.
175. KSV, *Internet : [www.ksvinc.com](http://www.ksvinc.com)*, 2001.
176. Bakowski, U., et al., *Chem. Phys. Lipids*, 2000. 105: p. 31-42.
177. Heyse, S., et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998. 85507: p. 319-338.
178. Dante, S., et al., *thin solid films*, 1996. 284: p. 459-463.
179. Berzina, T., et al., *Mat. Sci. Eng. C*, 1995. 3: p. 33-38.
180. Freisleben, H., D. Blöcher, and K. Ring, *Archives Biochemistry Biophysics*, 1992. 294(2): p. 418-426.
181. Bakowsky, U., et al., *Chem. Phys. Lipids*, 2000. 105: p. 31-42.
182. Freisleben, H., et al., *Chemistry Physics Lipid*, 1995. 78: p. 137-147.
183. Tamm, L. and H. McConnell, *Biophysical Journal*, 1985. 47(1): p. 105-113.
184. Prime, K. and G. Whitesides, *Science*, 1991. 252(5009): p. 1164-1167.
185. Schreiber, F., *Progress in Surface Science*, 2000. 65: p. 151.
186. Blume, A., *scientia halensis*, 2003. 3: p. 5.
187. Whitesides, G. and M. Boncheva, *PNAS*, 2002. 99(8): p. 4768-4774.
188. Freisleben, H., et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1994. 40: p. 745-752.
189. Bakowsky, U., U. Rothe, and C. Kneuer, *PATENT*, 2004. EP 1375494 A1.
190. Rothe, U., et al., *Biomaterials*. in preparation.
191. Frant, M., *Diplomarbeit: FH Gießen-Friedberg*, 1994.
192. Rusanov, A., *Phasengleichgewichte und Grenzflächenenergien*, 1978.
193. Neumann, A.W. and P.J.Sell, *Kunststoffe*, 1990. 37(20): p. 520.
194. Kwok, D. and A. Neumann, *Adv. Coll. Interf. Sci.*, 1999. 81: p. 167-249.
195. Sell, P.J. and A.W. Neumann, *Agew. Chemie*, 1966. 78(6): p. 321-331.
196. Young, T., *Philos Trans R. Soc London*, 1805. 95: p. 65.
197. Dupré, A., *Paris*, 1869.
198. Owens, D.K. and R.C. Wendt, *J.Appl. Polym.Sci*, 1969. 13: p. 1741-1747.
199. Kaelble, D.H., *J.Adhesion*, 1970. 2: p. 66-81.
200. Wu, S., *J.Adhesion*, 1973. 5: p. 39-55.
201. Gaydos and A.W. Neumann, *J.Coll.Int.Sci.*, 1987. 120(1).
202. Krekeler, C., H. Ziehr, and J. Klein, *Experientia*, 1989. 45: p. 1047.
203. Rosenberg, M., E. Rosenberg, and D. Gutnick, *FEMS Microbiology Letters*, 1980. 9: p. 29-33.

204. van Loosdrecht, M.C.M., et al., *Appl. Environmental microbiology*, 1987. 53(8): p. 1893-1897.
205. Pembrey, R., K. Marshall, and R. Schneider, *Appl. Env. Microb.*, 1999. 65(7): p. 2877-2984.
206. Svan, O., C.J and ??, *J. Coll. Int. Sci.*, 1989. 128(2): p. 313.
207. Smoluchowski, M., *Handbuch der Elektrizität und des Magnetismus*, Leipzig, 1921. 2.
208. Fairbrother and Mastin, *J.Chem.Soc.*, 1924. 75: p. 2318.
209. Jacobasch, H.J., *Progress organic coatings*, 1989. 17: p. 115.
210. Busscher, H.J. and W. Norde, *J. Biomed Mater Res*, 2000. 50: p. 463-464.
211. Cowan, M.M., et al., *Applied and Environmental Microbiology*, 1992. 58(4): p. 1326-1334.
212. Müller, R., *Buch: Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis*, 1996: p. 19-114.
213. Lagaly, G., *Buch: Technologie von Salben, Suspensionen und Emulsionen*, 1984: p. 31-61.
214. Bagatolli, L., E. Gratton, and T. Khan, *Biophysical Journal*, 2000. 79: p. 416-425.
215. Tocanne, J., et al., *FEBS*, 1989. 257(1): p. 10-16.
216. Romanus, H., *Abschlussbericht*, 2005.
217. Ammendolia, M., et al., *J. Clinical Microbiology*, 1999. 373(10): p. 3235-3238.
218. Donlan, R., *Buch: Biofilms: Recent advances in their study and control*, Ed. LV Evans, 2000: p. 333.
219. Flemming, H.C., G. Schaule, and H. Ridgway, *Internet: IWW Mülheim*, 2006. Mai 2006: p. 1-7.
220. Flanigan, M.J., et al., *Peritoneal Dialysis International*, 1996. 14: p. 248-254.
221. Holmes, S. and A. S., *Perit Dial Int*, 1990. 10(2): p. 157-60.
222. de Jong, P., M. Giffel, and E. Kiezebrink, *Int. J. Food Microbiol*, 2002. 74(1-2): p. 13-25.
223. Dickinson, R. and S. Cooper, *Bioeng. Food and Natural Products*, 1995. 41(9): p. 2160-2174.
224. Bruinsma, G.M., H.C. van\_der\_Mei, and H.J. Busscher, *Biomaterials*, 2001. 22(24): p. 3217-24.
225. Heiligenstadt, i., et al., *Abschlussbericht 02WU0491-5*, 2006.
226. Fittabile, L., et al., *thin solid films*, 1996. 284: p. 735-738.
227. Rothe, U., et al., *DPA*, 2004.
228. Berzina, T., et al., *Mat. Sci. Eng. C*, 1995. 3: p. 13-21.
229. Freisleben, *Buchbeitrag*, 2000: p. 4ff.
230. Elferink, M., et al., *J. Biol. Chem.*, 1992. 267(2): p. 1375-1381.
231. Elferink, M., et al., *Biochimica Biophysica Acta*, 1994. 1193: p. 247-254.
232. Gliozzi, et al., *Bioelectrochemistry & Bioenergetics*, 1982. 9: p. 591-560.
233. Nicolas, J., *JAOCs*, 2005. 82(10): p. 1023.
234. Schuster, B., et al., *IEEE Transactions on nanobioscience*, 2004. 3(1): p. 16-21.
235. Matsuda, T., et al., *Biomaterials*, 2003. 24: p. 4517-4527.
236. Lewis, J., *J. Am. Ceram. Soc.*, 2000. 83(10): p. 2341-2359.
237. Iwasaki, Y., et al., *J. Biomater. Sci. Polymer Ed.*, 1998. 9(8): p. 801-816.
238. Nicolas, J., *Lipids*, 2005. 40(10): p. 1023-1030.
239. Kim, K., C. Kim, and Y. Byun, *Biomaterials*, 2004. 25: p. 33-41.
240. Haque, H., T.J. Cutright, and N. B.Z., *Biofouling*, 2005. 21(2): p. 109-119.
241. Kaper, H.J., H.J. Busscher, and W. Norde, *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 2003. 14(4): p. 313-24.
242. Millsap, K., et al., *J. Coll. Int. Sci.*, 1999. 212: p. 495-502.
243. Katsikogianni, M. and Y.F. Missirlis, *European Cells and Materials*, 2004. 8: p. 37-57.
244. Gottenbos, B., et al., *J. Antimicrob. chemotherapy*, 2001. 48: p. 7-13.
245. Rijnaarts, H. and W. Norde, *Appl. Env. Microb.*, 1993. 59(10): p. 3255-3265.
246. Ista, L., et al., *Appl. Env. Microb.*, 2004. 70(7): p. 4151-4157.
247. Vacheethasanee, K. and R. Marchant, *J. Biomed. Mat. Res.*, 2000. 50: p. 302-312.
248. van\_der\_Mei, H.C., et al., *Microbiology (Reading, England)*, 1997. 143 ( Pt 12): p. 3861-70.
249. Kim, K., C. Kim, and Y. Byun, *Biomaterials*, 2004. 25: p. 33-41.
250. Ong and Razatos, *Langmuir*, 1999. 15: p. 2719-25.
251. Vacheethasanee, K., et al., *J Mater Res*, 1998. 42: p. 425-432.
252. Strevett, K. and G. Chen, *Research in microbiology*, 2003. 154: p. 329-335.
253. Grasland, B., et al., *Biofouling*, 2003. 19(5): p. 307-313.
254. Absolom, et al., *Biomed. Mat. Res*, 1988. 22(3): p. 215-229.
255. Absolom, D.R., et al., *Appl. Environ. Microbiology*, 1983. 46(1): p. 90-97.
256. Callow, J., et al., *J. R. Soc. Interface*, 2005. 2: p. 319-325.
257. O'Gara, J. and H. Humphreys, *J. Med. Microbiology*, 2001. 50: p. 528-587.
258. Baldassarri, L., et al., *Infection and Immunity*, 1997. 65(4): p. 1522-1526.
259. Salerno, M., B. Logan, and S. Velegol, *Langmuir*, 2004. 20: p. 10625-10629.
260. Gross, M., et al., *Infection and Immunity*, 2001. 69(5): p. 3423-3426.
261. Gottenbos, B., H.C. van\_der\_Mei, and H.J. Busscher, *Methods in Enzymology*, 1999. 310: p. 523-34.
262. van Loosdrecht, M.C., et al., *Applied and Environmental Microbiology*, 1987. 53(8): p. 1898-901.
263. Neumann, A., et al., *J. Coll. Int. Sci.*, 1974. 49: p. 291-304.
264. van Loosdrecht, M. and A. Zehnder, *Experientia*, 1990. 46: p. 817-822.
265. Rankl, M., S. Laib, and S. Seeger, *Coll. Surf. B: Biointerface*, 2003. 30(3): p. 177-186.
266. van Oss, C., et al., *Separation Purification Methods*, 1978. 7(2): p. 245-271.
267. Norde, W. and J. Lyklema, *Coll. Surf.*, 1989. 38: p. 1-13.
268. Asther, M., et al., *Biotechn Bioeng.*, 1990. 35: p. 477-482.
269. Abbott, A., P. Rutter, and R.-D. Berkeley, Standort MF, *J. Gen. Microb.*, 1983. 129: p. 439-445.
270. van Oss, C., R. Good, and M. Chaudry, *J. Coll. Int. Sci.*, 1986. 111(2): p. 378-390.
271. Lupu, M., et al., *Polymer Internationaö*, 2007. 56(3): p. 389-398.
272. Autumn, K., et al., *PNAS Early edition*, 2002: p. 1-5.

273. van Oss, C., M. Chaudhury, and R. Good, *Chem. Rev.*, 1988. 88: p. 927-941.
274. Sjollema, Busscher, and Weerkamp, *Biofouling*, 1988. 1: p. 101-112.
275. Gallardo-Moreno, A., et al., *Colloids and Surfaces: B Biointerfaces*, 2002. 24: p. 285-295.
276. Meyer, E., et al., *PNAS*, 2005. 102(19): p. 6839-6842.
277. Kokkoli, E. and C. Zukoski, *J. Coll. Int. Sci.*, 2000. 230: p. 176-180.
278. Vogler, E., *Adv. Coll. Interf. Sci.*, 1998. 74: p. 69-117.
279. Krishnan, A., et al., *Biomaterials*, 2006. 27: p. 3187-1394.
280. Fletcher, M., *Buch.: Bacterial Adhesion*, 1996. Wiley New York.
281. Desai, N. and J.A. Hubbell, *J. Biomed. Mat. Res.*, 1991. 25: p. 829-843.
282. Xu, Z., N. Holland, and R. Marchant, *Langmuir*, 2001. 17: p. 377-383.
283. Wong, J., et al., *Biophysical Journal*, 1999. 77(3): p. 1458-1468.
284. Baba, T., et al., *Biophysical Journal*, 2001. 81: p. 3377-3386.
285. McIntosh, T., A. Magid, and S. Simon, *Biophysical Journal*, 1989. 55: p. 897-904.
286. Mayer, G., et al., *aus Forschungsbericht BMBF FKZ 03C0346*, 2006: p. 1-4.
287. Della-Volpe, C. and S. Siboni, *J. Coll. Int. Sci.*, 1997. 195: p. 121-136.
288. Mittal, K., *Buch: Acid-Base Interactions: Relevance to adhesion science and technology*, 2000. 2.
289. Israelachvili, J., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1997. 94: p. 8378.
290. Kenworthy, A., et al., *Biophysical Journal*, 1995. 68(5): p. 1921-1936.
291. Klee, D., et al., *Tagungsband ITS 2003*, 2002.
292. Feng, W., J. Brash, and S. Zhu, *Biomaterials*, 2006. 27: p. 847-855.
293. Kuhl, T., et al., *Langmuir*, 1996. 12: p. 3003-3014.
294. Gudipati, C., et al., *Langmuir*, 2005. 21: p. 3044-3053.
295. Zheng, J., et al., *Biophysical Journal*, 2005. 89: p. 158-166.
296. Efremova, N., S. Sheth, and D. Leckband, *Langmuir*, 2001. 17: p. 7628-2736.
297. Lawrence, E. and I. Turner, *Medical Engineering & Physics*, 2005. 27: p. 443-453.
298. Danese, P., *Chemistry & Biology*, 2002. 9: p. 873-880.
299. Tamm, L., et al., *thin solid films*, 1996. 284-285: p. 813-816.
300. Kirby, B., et al., *Lab Chip*, 2003. 3: p. 5-10.
301. Wisniewski, N. and M. Reichert, *Coll. Surf. B: Biointerface*, 2000. 18: p. 197-219.

## **Danksagung**

Bei Herrn Prof. Leps möchte ich mich für die sehr gute Betreuung und die vielen hilfreichen Diskussionen und Hinweise bedanken. Ich danke ihm ebenso für die mir zugestandene Freiheit bei der Bearbeitung des Themas und die nötige Geduld.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Klaus Liefeith, der diese Arbeit als Leiter des Fachbereiches Biowerkstoffe am Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V. in Heiligenstadt ermöglichte und mich intensiv fachlich unterstützte.

Ebenso danke ich allen Mitarbeitern des Fachbereiches Biowerkstoffe am Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V. in Heiligenstadt für das hervorragende Arbeitsklima und die Unterstützung. Mein Dank gilt auch allen Kooperationspartnern für ihr Engagement.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name	Marion Frant, geb. Hildebrandt
Geburtstag	06. Mai 1970
Geburtsort	Grimma
Staatsbürgerschaft	deutsch

Anschrift	Klingelstraße 38 37308 Geisleden
Telefon	036084 81320

Familienstand	verheiratet
---------------	-------------

### beruflicher Werdegang / Ausbildung:

#### Schulbildung

1976 – 1986	Polytechnische Oberschule Halle-Neustadt und Geisleden
1987 – 1988	Erweiterte Oberschule Heilbad Heiligenstadt Abschluss: Abitur

#### Studium

1989 – 1990	Studium an der Technischen Hochschule Köthen im Studiengang: Chemische Verfahrenstechnik
1991 – 1994	Studium an der Fachhochschule Gießen – Friedberg im Studiengang: Maschinenbau, Gießerei- und Werkstofftechnik Abschluss: Diplomingenieur (FH) für Werkstofftechnik

#### Beruf

seit 1995	Wissenschaftliche Mitarbeiterin / Doktorandin im Fachbereich Biowerkstoffe am Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V. Heilbad Heiligenstadt
-----------	---

Heiligenstadt, 24. September 2007

## Schriftliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Marion Frant, dass ich die Dissertation mit dem Titel „*Funktionalisierung von Biowerkstoffen durch biomimetische Strukturen auf der Basis von Tetraetherlipiden – ein Antifoulingkonzept*“ selbständig verfasst, und dass ich bei den der Dissertation zugrundeliegenden Arbeiten nur die Hilfe in Anspruch genommen habe, die ich in der Dissertation in Zitaten, Fußnoten oder einer Danksagung genannt und gewürdigt habe.

Ich erkläre zudem, dass ich weder diese noch eine andere Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Dr.-Ing. an eine andere Technische Hochschule, Universität oder Akademie vorgelegt habe.

Heiligenstadt, 24. September 2007

---

Marion Frant