

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Maria Alles

geboren in Diwnogorsk, russ. Föderation

Tag der mündlichen Prüfung:

21.03.2014

Mikrofluidische
Adhäsionsstärkemessungen der
Diatomee *Navicula perminuta*

Gutachter:

Prof. Dr. Michael Grunze

apl. Prof. Dr. Hans-Robert Volpp

Kurzfassung

Biofouling ist die unerwünschte Besiedelung künstlicher Oberflächen durch diverse Organismen. Die ökonomischen und ökologischen Folgen dieser biologischen Besiedlung stellen nicht nur die Seeschifffahrt vor große Probleme. Als umweltfreundliche Maßnahmen gegen Biofouling stehen heutzutage sogenannte *fouling-release* Technologien im Vordergrund. Diese Beschichtungen sollen lediglich eine schwache Adhäsion der Organismen bewirken und bereits durch Einwirkung von leichten Scherströmungen zu einer Ablösung dieser führen. Da Diatomeen zu den ersten Mikroorganismen zählen, die eine Oberfläche bei Kontakt mit einem natürlichen Gewässer besiedeln und zudem häufig auf kommerziellen Beschichtungen vorkommen, wurde die Diatomee *Navicula perminuta*, eine Kieselalgen-Gattung, als Modellorganismus für die Adhäsionsstudien gewählt.

Die quantitative Untersuchung des Haftvermögens von *N. perminuta* erfolgte mit einem mikrofluidischen Flusssystem, indem adhärierte Algenzellen durch die Einwirkung einer stufenweise zunehmenden Scherströmung innerhalb $0,01 \text{ dyn/cm}^2$ und 5500 dyn/cm^2 von einer Oberfläche entfernt wurden.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden für die verwendete Kieselalge zunächst experimentelle Parameter wie z. B. Inkubationszeit und Flussratenerhöhung optimiert und anschließend der Effekt unterschiedlicher Oberflächeneigenschaften, welche Relevanz für den Prozess der Bioadhäsion besitzen, untersucht. Darunter fielen Benetzung, Hydratation und Ladung. Um den Einfluss unterschiedlicher Benetzungen auf die Adhäsionsstärke zu ermitteln, wurden chemisch unterschiedliche SAMs (selbst-aggregierende Monolagen) verwendet. Der Einfluss verschiedener Hydratationsgrade wurde durch Variation der Anzahl von Ethylen-Glykol (EG) Einheiten in den SAMs untersucht. Die Wechselwirkung einer Grenzfläche mit Wassermolekülen spielte ebenso bei der Untersuchung von Polysaccharidoberflächen und zwitterionischen SAMs eine wesentliche Rolle. Im Zusammenhang mit zwitterionischen SAMs wurden ebenfalls die positiv bzw. negativ geladenen Homologen analysiert.

Die Resultate zeigten, dass die Hydratation einer Oberfläche im Vergleich zur Benetzung und Ladung den größten Einfluss auf die permanente Adhäsion von *N. perminuta* hatte. Im Hinblick auf die Hydratation wurde anhand von EG-SAMs demonstriert, dass eine zunehmende Anzahl an EG-Einheiten eine stetige Schwächung der Adhäsion herbeiführte. Eine ähnliche schwache Adhäsion der Diatomeen wurde auf zwitterionischen SAMs verzeichnet. Mit Polysacchariden beschichtete Substrate zeigten entgegen den Erwartungen unzureichende *fouling-release* Eigenschaften, obwohl sie ähnlich wie OEG-SAMs Hydratationseigenschaften besitzen. Auf SAMs mit unterschiedlichen Benetzungseigenschaften konnte beobachtet werden, dass sich die Haftstärke der Diatomeen auf hydrophoben und hydrophilen SAMs deutlich unterschieden. Die Vorkonditionierung ausgewählter SAMs im natürlichen Seewasser führte zu Adsorption von Proteinen und Makromolekülen auf den Oberflächen, jedoch hatten diese in anschließenden Haftstärke-

messungen keinen eindeutigen Effekt auf die Adhäsionsstärke der Kieselalgen. Bei den Adhäsionsstudien auf entweder positiv oder negativ geladenen Oberflächen, wurde eine stärkere Adhäsion der Diatomeen auf den positiv geladenen SAMs festgestellt. Um die im Labor gewonnenen Adhäsionserkenntnisse einer einzelnen Diatomeen-Spezies mit denen einer gemischten Population unter natürlichen Bedingungen zu vergleichen, wurden mikrofluidischen Feldmessungen auf dem marinen Versuchsgelände des *Florida Institute of Technology* durchgeführt. Im Vergleich mit den Laborresultaten, wiesen die Organismen eine ähnlich schwache Adhäsion auf den EG-SAMs auf. Vor allen Dingen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Adhäsion der Mikroorganismen mit Zunahme der Ethylen-Glykol Einheiten abnahm. Bei den Adhäsionsstudien auf hydrophoben SAMs zeichneten im Vergleich zum Labor überraschend große Unterschiede ab.

Sowohl in den Untersuchungen im Feld als auch im Labor wurden motile Diatomeen auf den Oberflächen beobachtet. Die vollführten Gleitbewegungen sind dabei typisch für raphide Diatomeen. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob Bewegungsmuster und Geschwindigkeiten der Diatomeen durch Benetzungsunterschiede einer Oberfläche beeinflusst werden. Die Analysen zeigten, dass Diatomeen länger auf der hydrophilen als auf der hydrophoben Oberfläche motil waren. Mit Hilfe von visuellen Darstellungen der Gleitbewegungen konnten auf beiden Oberflächen keine Unterschiede in den Mustern beobachtet werden. Bei folgenden Geschwindigkeitsanalysen der unterschiedlichen Bewegungsmuster konnten ebenfalls keine Unterschiede zwischen den hydrophilen und hydrophoben Beschichtungen festgestellt werden.

Vor allem wenn die Unterschiede zwischen Oberflächen nur gering waren, konnten Trends aufgrund des Messfehlers nicht mit statistischer Signifikanz herausgearbeitet werden. Der abschließende Teil der Arbeit beschäftigte sich daher mit der Optimierung des mikrofluidischen Systems, um die Präzision der Messungen zu erhöhen. Anhand von Partikelmodellsystemen wurden unterschiedliche experimentelle Parameter wie Kanalpositionen, Kanalhöhen, Partikelkonzentrationen, Druckschwankungen und deren Einfluss auf die Streuung der Messwerte analysiert. Vor allem die Erweiterung des Setups durch die Verwendung von Abstandshaltern, sogenannten *Spacern*, verbesserte die Reproduzierbarkeit der Messungen deutlich.

Abstract

Biofouling is the undesired growth of marine organisms on artificial surfaces and has an important economic and environmental impact. In recent years *fouling-release* technologies have been significantly improved and can be considered as an environmental benign approach against marine biofouling. *Fouling-release* coatings refer to those surfaces on which microorganisms adhere only weakly allowing their release by applying low shear stress (e.g. at a moving ship). As diatoms are among the first organisms to settle on submerged surfaces and are frequently prevalent on *fouling-release* coatings commercially used, we decided to investigate the adhesion strength of the diatom *Navicula perminuta*.

To study cell adhesion strength quantitatively, a microfluidic shear force assay was used. With this device the adhesion strength of adherent diatoms could be analyzed by detaching them from substrates using a stepwise increased flow across six orders of magnitude starting with very low shear forces of 0.01 dyn/cm^2 . Therefore the microfluidic assay parameters such as incubation time and increase of the applied volumetric flow were optimized.

In the first part of the presented work the effect of different surface properties relevant for bioadhesion including wettability, hydration and charge was investigated. Consistently with respect to the adhesion strength of *N. perminuta*, chemically different SAMs (self-assembled monolayers) were used to observe the dependence on changing wettabilities. Furthermore, SAMs with a varying number of ethylene glycol (EG) units were investigated to demonstrate the effects of increasingly tightly bound water molecules to the boundary layer - so called hydration. This parameter was also a major issue in the examination of polysaccharide coatings and zwitterionic SAMs. In the context of zwitterionic SAMs, the impact of single charged SAMs was also tested.

In general, the results have shown that wettability of a surface is less important compared to hydration. It was demonstrated that an increasing number of EG units causes a continuous weakening of the adhesion. It has been assumed, that hydration induced by electrostatic interaction led to the same effect as described for EG-SAMs, since the adhesion strength of the diatoms on zwitterionic SAMs was very weak. Unfortunately, the polysaccharide coatings were shown to have unsatisfying *fouling-release* properties with regard to the investigated diatom species. In case of surfaces with different wettabilities, the diatoms were capable of distinguishing between hydrophobic and hydrophilic properties of a surface. The preconditioning of a hydrophilic and a hydrophobic SAM revealed to no significant effect on the adhesion of the algae cells. Furthermore, the adhesion of negative charges diatoms on single charged SAMs resulted in either attraction or repulsion. Overall, the mentioned findings are in accordance with the results of already described studies on *N. perminuta*.

In order to compare the laboratory assays using a single diatom species with adhesion behavior of mixed species under natural conditions, microfluidic measurements on the same surfaces used in the lab were performed at a marine test site of the *Florida Institute of Technology*. The results of these studies showed, on the one hand, similar adhesion trends as found in the laboratory test such as the good performance EG SAMs. In line with the lab results it was found that the adhesion of microorganisms decreased with increasing ethylene glycol units. Differences were found on hydrophobic SAMs, as the microorganisms adhered weakly compared to single species in the lab investigations.

Both, the observations in the field and in the laboratory showed diatoms moving over the surfaces. This movement, so called gliding is part of a raphide diatom. After it has been shown, that the permanent adhesion of *N. perminuta* depends on the wettability of a surface, the question arises whether the gliding processes including gliding patterns and velocities also are affected by different surface properties. The results reveal that movement was observed longer on the hydrophilic than on the hydrophobic surface. Furthermore, on both, hydrophobic and hydrophilic SAMs the movement patterns were indiscernible. In the following observations of the velocities of several movement patterns, noticeable features could be found neither on the hydrophilic SAM nor on the hydrophobic SAM.

Due to the biological variability in the conducted adhesion strength investigations, the closing part of this work deals with the optimization of the microfluidic device. Thereby, the reliability of the measurement should be improved. Using model systems based on particles different parameters and their implication on the measurements were tested including channel position, channel heights, concentration of the particles, and pressure fluctuations. It was assumed, that channel deformations caused by pressure drops at increasingly high shear stress levels seem to be the reason for the occurring lacks of reproducibility. By upgrading the microfluidic setup involving *spacer*, the device performance could be improved noticeably.

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG UND BIOFOULING-HINTERGRUND.....	1
2.	THEORIE	5
2.1.	Diatomeen	5
2.1.1.	Permanente Adhäsion und Motilität von raphiden Diatomeen	8
2.1.2.	Die Diatomee <i>Navicula perminuta</i>	12
2.2.	<i>Fouling-Release</i> Oberflächen	14
2.3.	Einfluss der Oberflächeneigenschaften auf Adhäsion	15
2.3.1.	Oberflächenchemie und Adsorption	18
2.3.2.	Hydratation und Adsorption	19
2.3.3.	Einfluss von Oberflächenladung	22
3.	MATERIAL UND METHODEN	29
3.1.	Präparation der Oberflächen	29
3.1.1.	Chemikalien	29
3.1.2.	Selbst-Aggregierende-Monolagen (SAMs)	29
3.1.3.	Polysaccharid Oberflächen	30
3.1.4.	Konditionierte Oberflächen	32
3.1.5.	Präparate für die Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM)	32
3.2.	Analytische Methoden.....	33
3.2.1.	Lichtmikroskopie	33
3.2.2.	Spektrale Ellipsometrie	34
3.2.3.	Kontaktwinkelmessungen	37
3.2.4.	Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM)	39
3.2.5.	UV/Vis-Spektroskopie	40
3.3.	Diatomeen Kultur	41
3.3.1.	Guillard's F/2 Medium	43
3.4.	Mikrofluidisches Scherkraft-Setup	43
3.4.1.	Das Kanalsystem	43
3.4.2.	Ausführung des Abriss-Experiments	45
3.5.	Mikrofluidische Scherkraft-Assay	46
3.5.1.	Laminare Strömung und Reynoldszahl	46
3.5.2.	Berechnung der Scherströmung τ	47
3.5.3.	Datenauswertung biologischer Untersuchungen	49
3.5.4.	Datenauswertung der Partikelexperimente	50

3.6.	Feldversuche.....	51
4.	OPTIMIERUNG DES MIKROFLUIDISCHEN SYSTEMS	53
4.1.	Carboxy-Polystyrol-Mikrosphären auf Polysaccharidoberflächen	54
4.1.1.	Kanalposition.....	55
4.1.2.	Reproduzierbarkeit der kritischen Scherströmungsmessungen.....	56
4.1.3.	Kanaldimensionen.....	58
4.1.4.	Konzentrationsabhängigkeit	59
4.1.5.	Druckschwankungen	60
4.1.6.	Einführung von Spacern als Abstandshalter	61
4.1.7.	Reproduzierbarkeit der kritischen Scherströmungsmessungen mit eingesetzten Spacern.....	63
4.2.	Carboxy-Polystyrol-Mikrosphären auf Dodecanthiol-SAMs	66
4.2.1.	Reproduzierbarkeit der kritischen Scherströmungsmessungen mit eingesetzten Spacern.....	66
4.3.	Zusammenfassung	68
5.	ADHÄSIONSSTÄRKEMESSUNGEN MIT <i>N. PERMINUTA</i>.....	71
5.1.	Optimierung der Versuchsparameter	71
5.1.1.	Auswirkung der Inkubationszeit auf die Adhäsionsstärke	71
5.1.2.	Auswirkung der Flussrate auf die Adhäsionsstärke	74
5.1.3.	Zellausrichtungen in der Strömung.....	76
5.1.4.	Einfluss verschiedener Zellorientierungen auf die Adhäsionsstärke der Diatomeen	80
5.1.5.	Zusammenfassung.....	84
5.2.	Adhäsion der Diatomeen auf SAMs unterschiedlicher Benetzungseigenschaften	85
5.2.1.	Eigenschaften der verwendeten SAMs	85
5.2.2.	Adhäsionsassays.....	86
5.2.3.	Vergleich von <i>N. perminuta</i> mit <i>N. incerta</i>	88
5.2.4.	Zusammenfassung.....	89
5.3.	Einfluss von Oberflächenkonditionierung auf die Adhäsion von Diatomeen.....	91
5.3.1.	Hintergründe der Oberflächenkonditionierung.....	91
5.3.2.	Eigenschaften der verwendeten SAMs	92
5.3.3.	Adhäsionsassays.....	92
5.3.4.	Zusammenfassung.....	94
5.4.	Adhäsion der Diatomeen auf Ethylen-Glykol terminierten SAMs.....	95
5.4.1.	Eigenschaften von EGxOH SAMs	95

5.4.2.	Adhäsionsassays	96
5.4.3.	Zusammenfassung.....	98
5.5.	Adhäsion der Diatomeen auf Polysaccharid-Oberflächen	99
5.5.1.	Eigenschaften von Polysacchariden-Oberflächen.....	99
5.5.2.	Adhäsionsassays	101
5.5.3.	Zusammenfassung.....	102
5.6.	Einfluss von Oberflächenladung auf die Adhäsion von Diatomeen	104
5.6.1.	Geladene und zwitterionische SAMs und ihre Eigenschaften	104
5.6.2.	Adhäsionsassays auf negativen und positiven SAMs.....	105
5.6.3.	Adhäsionsassays auf zwitterionischen SAMs.....	106
5.6.4.	Zusammenfassung.....	108
5.7.	Mikrofluidische Messungen in Feldversuchen	110
5.7.1.	Adhäsionsstudien	112
5.7.2.	Zusammenfassung.....	115
5.8.	Fehlerdiskussion.....	116
6.	MOTILITÄTSANALYSE VON <i>N. PERMINUTA</i>	119
6.1.	Bewegungsmuster und Geschwindigkeitsanalysen.....	120
6.2.	Zusammenfassung.....	126
7.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	129
8.	ANHANG	133
8.1.	Publikationen	133
8.2.	Konferenzen.....	133
8.3.	Zusammensetzung Guillard's F/2 Medium	133
8.4.	Abkürzungsverzeichnis	135
8.5.	Literaturverzeichnis.....	137

1. Einleitung und Biofouling-Hintergrund

Unter *Biofouling* wird die unerwünschte Anreicherung verschiedener Mikroorganismen an starre Grenzflächen in diversen Wassersystemen verstanden. Vor allem für die Schiff-fahrtindustrie ist dies ein beachtliches Problem. Angefangen bei Mikro- (Bakterien, Algen, Protozoen) bis hin zu Makroanlagerungen (Seepocken, Muscheln, Seetang) führen die biologischen Besiedlungen zu einem höheren Strömungswiderstand und somit zu enormen Energieverlusten und damit verbunden zu einer erhöhten Schadstoffemission [1-2]. Schon frühere Seefahrervölker versuchten die Problematik, die das Biofouling mit sich brachte, zu bezwingen. Phönizier zum Beispiel strichen ihre Schiffe mit einem Gemisch aus Öl, Arsen und Schwefel an, Wikinger benutzen Holzteer [3-4]. Auch in den letzten Dekaden wurden bereits unzählige Maßnahmen ergriffen, um solche biologischen Besiedlungen an Oberflächen zu verhindern, sei es im Hinblick auf ökonomische oder ökologische Bedenken [5-8]. Eine einfach erscheinende Methode beinhaltet lediglich das Abkratzen der Bewüchse von den betroffenen Stellen. Da diese Anlagerungen jedoch immense Ausmaße annehmen können, ist die Reinigung ein langwieriger Prozess, der zudem in neuester Zeit durch den Einsatz aggressiver Chemikalien als Hilfsmittel ein gesundheitsschädliches Risiko darstellt. Abgesehen davon, können ausgereifte Biofilme auf Seefahrzeugen nicht nur zu einer negativen Energieeffizienz führen, sondern ebenso das mikroorganelle Gleichgewicht heimischer Gewässer durch Einbringung fremder Spezies in diese gefährden [9-10].

Ein großer Schritt zur Bewältigung des Problems schien getan als biozidhaltige *anti-fouling*-Beschichtungen wie TBT-SPC Beschichtungsfarben (*tributyltin-self-polishing-copolymer*) den Markt eroberten [3]. Diese Farben wurden jedoch bald als hochtoxisch deklariert, denn sie verhinderten nicht nur die unerwünschte Adhäsion von Biofouling-Organismen an Oberflächen, sondern verursachten auch Störungen in bestimmten Entwicklungsphasen anderer mariner Lebewesen (sogenannte *non-target*-Organismen) [11-13]. Nach jahrzehntelanger Verwendung wurde 2001 daher ein schrittweises Verbot der TBT- und weiterer Organozinnverbindungen in Beschichtungsfarben durch die *Antifouling*-Konvention eingeleitet, welches bis 2008 vollzogen sein musste [14-17]. In dieser Zeit traten sogenannte *fouling-release* (FR)-Beschichtungen in den Fokus des Interesses [7-8, 18]. Diese sollten auf nicht-toxischer Ebene agieren und lediglich die Wechselwirkung der von den Mikroorganismen ausgesonderten Adhäsiven mit einer Oberfläche derart beeinflussen, dass kein permanenter Kontakt zustande kommen kann. Da die hochkomplizierten Adhäsionsvorgänge von Spezies zu Spezies und Oberfläche zu Oberfläche variieren, bedarf die Entwicklung solcher Beschichtungen ausführlicher Kenntnisse, zum einen über die physikalische und chemische Beschaffenheit der verwendeten Oberfläche und zum anderen über die Biologie (u.a. Adhäsionseigenschaften) der betroffenen Mikroorganismen. Physikochemische Aspekte wie Oberflächenenergie, Hydratisierung, Polarität und mechanische Eigenschaften, aber auch die Topographie einer Oberfläche, können eine Rolle für das Adhäsionsverhalten spielen [19-22]. Was die Mikroorganismen betrifft, wird den unizellulären Mikrofouthern wie Bakterien und

Diatomeen spezielle Aufmerksamkeit gewidmet, da sie den Biofouling-Prozess initiieren [8]. Im besten Fall sollte eine Beschichtung in biologischen Erprobungen mit einer Vielzahl an marinen Mikroorganismen untersucht werden, denn letztendlich entscheidet das Zusammenspiel vieler adhärrierender Organismen über die Leistungsfähigkeit eines *fouling-release*-Materials [23].

Um Interaktionen adhärrierender Zellen mit einer Oberfläche zu untersuchen existieren zahlreiche Methoden [24]. Oft macht man sich das erzwungene Ablösen von Zellen von einem Substrat zu Nutze. Hierfür werden im Labor hydrodynamische Scherkraftassays in Parallelplatten-Flusskammern, *Spinning Disc*-Methoden [25-26] oder die Rasterkraftmikroskopie (AFM, *engl.* Atomic Force Microscopy), die auf der Mikromanipulationsebene agiert [27-28], genutzt. In Bezug auf die Flusskammern, die extensiv in der Zellbiologie ihren Einsatz finden, sind vor allem Mikrokanalsysteme in den Vordergrund gerückt. Diese lassen im Vergleich zu konventionellen Parallelplattenassays weitaus höhere Scherkräfte im System zu [29-30]. Dies ist wiederum wichtig, um auch stärker adhärrierte Zellen von einer Oberflächen lösen und untersuchen zu können. Die Mikrodimensionen verlangen zudem keine große Menge an Zellmaterial und der wahlweise simultane Versuchsaufbau mit mehreren Proben ermöglicht eine hohe Experimentrate in einem kurzen Zeitraum [31]. Der wohl größte Vorteil ist die Variation des laminaren Flusses im Bereich einiger Größenordnungen und die Möglichkeit währenddessen mehrere Hundert Zellen simultan in ihrem Abrissverhalten verfolgen zu können [24, 29].

Wir haben ein mikrofluidisches Flusssystem entwickelt, mit dem sich eine quantitative Untersuchung von Zellinteraktionen mit verschiedenen Substraten verwirklichen lässt. Durch den Aufbau mit vier räumlich getrennten Kanalsystemen können zudem die Faktoren Oberfläche, Medium und Zellen individuell für jeden einzelnen Kanal unabhängig von den anderen variiert werden. Nach einer bestimmten Adhäsionsphase lassen sich festhaftende Zellen im darauffolgenden Abrissexperiment untersuchen, indem man sie während eines stufenweise zunehmenden Flusses während des Abrissvorgangs quantifiziert. Auf diese Weise konnte bereits mit dem mikrofluidischen System die Abhängigkeit der Adhäsionsstärke von Fibroblastzellen auf unterschiedlich stark hydratisierten Ethylen-Glykol (EG)-Oberflächen analysiert werden [32]. Die Untersuchung der gleichen Zellen auf anisotropen Polymerfilmen zeigte, dass deren Ablösung von der Flussrichtung abhängt [33]. Weiterhin konnte durch die Erforschung leukämischer CD44⁺⁺-Zellen gezeigt werden, dass ein sogenannter „catch-bond“-vermittelter Rollmechanismus auf Hyaluronsäure-Substraten besteht [34]. Im entsprechenden Zusammenhang wurde dieser Rollmechanismus in einer aktuellen Studie weiter untersucht [35]. In neuster Zeit konnten ebenso Adhäsionserkenntnisse über ein marines Bakterium auf SAMs unterschiedlicher Eigenschaften erlangt werden [36] und Zelluntersuchungen auf Metall-Organischen Gerüsten (MOFs *engl.* Metal-Organic Frameworks) erfolgen [37].

Sowohl in den zuvor genannten Publikationen als auch in dieser Arbeit dienten hauptsächlich Selbst-Aggregierende-Monolagen (SAMs) als Modelloberflächen [20]. Durch den Prozess der Selbst-Aggregation bilden sich nicht nur auf einfachste Weise definierte

und hoch reproduzierbare Oberflächenfilme aus, durch die Wahl des Substrats können zudem auch die mechanischen Eigenschaften eines SAMs bestimmt werden [38-40]. Vor allem im biomedizinischen Bereichen waren und sind SAMs von hohem Nutzen um Zell- bzw. Proteininteraktionen mit einer Oberfläche zu untersuchen [32, 41-44]. Aber auch in der marinen Biofouling-Forschung ist die Darstellung von Oberflächen durch die Selbst-Aggregation weit verbreitet [45-48].

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit nimmt sich zunächst der Optimierung der mikrofluidischen Versuchsparameter speziell für die Diatomee *Navicula perminuta* an, worauf anschließend im Hauptteil Adhäsionsstärkemessungen folgen. Die Wahl der Diatomee *N. perminuta* als bekannter Modellorganismus [48-51] gründet sich in dessen Bedeutsamkeit als Fouling Organismus. Diese Diatomee ist als ein sehr häufig auf kommerziellen *fouling-release* Anstrichen vorkommender Organismus eine besondere Herausforderung in der Biofouling-Forschung [52].

In diesem Zusammenhang standen die Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von *N. perminuta* auf Oberflächen unterschiedlicher Benetzbarkeit und Hydratation und der Einfluss von Oberflächenladung und -konditionierung im Vordergrund. Die Benetzbarkeit einer Oberfläche mit Wasser (Hydrophobie/Hydrophilie) stellt einen der wichtigsten Punkte für das Adhäsionsverhalten von Mikroorganismen und Zellen dar [45, 47, 53-55]. Für die Fähigkeit Wasser durch Wasserstoffbrückenbindungen nicht nur an der Grenzfläche sondern auch im Inneren der Oberfläche zu binden (Hydratation), sind vor allem Ethylen-Glykole bekannt [56-58]. Bei diesen Oberflächen geht die Anzahl der EG-Einheiten mit der Packungsdichte, der Konformation und der Hydratation einher [19, 56, 59-62]. Ähnliche Hydratationseigenschaften weisen immobilisierte Polysaccharide auf und waren aufgrundessen Teil der vorliegenden Untersuchung [63]. Die Ladung einer Oberfläche wird ebenfalls als ein einflussreicher Faktor für den Adhäsionsprozess von Mikroorganismen genannt [64]. In diesem Zusammenhang waren geladene SAMs und vor allem zwitterionische Systeme aufgrund ihrer starken, durch elektrostatische Wechselwirkungen hervorgerufenen Interaktion mit Wassermolekülen für diese Arbeit sehr interessant [65-68]. Auf die Konditionierung wurde in den vorliegenden Studien ebenso Bezug genommen, da diese erst kürzlich als ein wichtiger Parameter bei der Besiedlung einer Oberfläche durch Mikroorganismen beschrieben worden ist [69]. Da auf Laborebene Spezies oft nur unabhängig voneinander und unter künstlichen Bedingungen untersucht werden, stellen bei der Entwicklung neuer *fouling-release* Materialien sogenannte Feld-Tests eine wichtige Ergänzung zur bestehenden Laborforschung dar [52, 70-73]. Um die Leistung einiger zuvor genannter Modelloberflächen (SAMs unterschiedlicher Benetzungen bzw. EG-SAMs) im Hinblick auf adhärierende Mikroorganismen aus natürlicher Meerwasserumgebung zu untersuchen, wurden mikrofluidische Messungen an der atlantischen Küste von Florida durchgeführt (Versuchsgelände des *Florida Institute of Technology*, Abteilung für *Oceanography and Ocean Engineering*).

Unabhängig von der Spezies wurde bei den Experimenten die im Seewasser vorhandene gemischte Population betrachtet.

Im dritten Teil dieser Arbeit wird die Motilität von *N. perminuta* näher untersucht. Die verwendete Algenspezies ist zwar im frei schwebenden Zustand in Gewässern nicht motil, verfügt allerdings über die Fähigkeit nach Kontakt mit einer Oberfläche Kriechbewegungen auszuführen. Hypothesen und Aufklärungen über den Bewegungsmechanismus von Diatomeen finden sich zusammengefasst in Übersichtsartikeln [74-76], ebenso sind zahlreiche Einflüsse wie z. B. Salinität, Temperaturänderungen, Lichteinwirkung und elektromagnetische Strahlung auf die Kriechbewegungen untersucht worden [77-80]. Allgemeine Geschwindigkeitsanalysen auf Oberflächen mit variierenden Eigenschaften sind jedoch selten und werden aufgrund dessen in der vorliegenden Arbeit thematisiert. In diesem Zusammenhang erfolgt zunächst eine allgemeine Betrachtung der Kriechbewegungen von *N. perminuta* auf zwei SAMs mit gegensätzlichen Benetzungseigenschaften und anschließend eine Analyse der Geschwindigkeit einzelner motiler Diatomeen und als Gesamtheit.

Resultierend aus den vereinzelt schwankenden Statistiken der biologischen Untersuchungen, stellte sich im weiteren Verlauf der Arbeit die Frage, ob das verwendete mikrofluidische System hinsichtlich seiner Leistungsfähigkeit und Verlässlichkeit gegebenenfalls optimiert werden kann. Um die Reproduzierbarkeit zu testen, wurde ein System bestehend aus Hyaluronsäure- oder Dodecanthioloberflächen (DDT) und carboxyterminierten Polystyrol-Mikrosphären als Adhäsionsobjekte gewählt. Als starre Partikel unterliegen diese im Gegensatz zu Diatomeen keinen Umwelt- und Zyklusschwankungen. Zudem lagen die bestehenden Wechselwirkungskräfte zwischen Partikel und Oberfläche im Bereich der vom System generierten Scherströmung. Die Abrisseexperimente wurden mit unterschiedlichen Versuchsparametern durchgeführt und hinsichtlich der Reproduzierbarkeit getestet.

2. Theorie

2.1. Diatomeen

Im Jahr 1703 erschienen zum ersten Mal Berichte und Skizzen von Diatomeen. Der Entdecker, ein englischer Gutsherr, untersuchte zu diesem Zeitpunkt eigentlich Wasserlinsen (*Lemna*) eines Teiches unter einem Lichtmikroskop als ihm unbekannte Strukturen auffielen, die an den Linsen hafteten und auch ins Wasser übergingen. Er hielt die »vielen hübschen Formen« für Pflanzen (Abbildung 1) [81]. Tatsächlich handelte es sich um Kieselalgen (Diatomeen), deren Plastide im Gegensatz zu Landpflanzen und anderen photosynthetisch aktiven Algen lediglich Chlorophyll a und c und kein Chlorophyll b enthalten. Ende des 18. Jahrhunderts wurden erste offizielle Arbeiten über Diatomeen publiziert, worauf ein neues und bis heute spannendes Forschungsgebiet erschlossen war [82].



Abbildung 1: Vielfältige Formen von Diatomeen [83]. Ihre gelb-bräunliche Farbe ist das Resultat des Farbstoffes Fucoxanthin in den Chloroplasten. Diatomeen können Ketten bilden, auch Spiralen sind nicht selten. Beides geschieht aus Schutz vor Fressfeinden oder als Schwebhilfe im offenen Gewässer.

Eine revolutionäre Studie von Allen *et al.* aus dem Jahr 2011 zeigte, dass Diatomeen einen Harnstoffzyklus besitzen, der sie entwicklungsmäßig mit Säugetieren in Verbindung stellt, welche in der Evolution jedoch erst einige Millionen Jahre später auftauchten. Der vorhandene Harnstoffzyklus erklärt wiederum wieso sich Diatomeen zu Primärerzeugern in vielen Teilen der Weltmeere entwickelt haben: sie besitzen dadurch die Eigenschaft sich schnell nach langen Nährstoffmangelperioden zu erholen, um sich daraufhin wieder rapide zu vermehren [84-85].

Biologisch gesehen sind Diatomeen eukaryotische und autotrophe, einzellige Organismen, wobei es auch in Kolonien lebende Arten gibt. Charakterisiert sind sie vor allem durch ihre silikathaltigen (SiO_2) Zellwände (woher auch der Name Kieselalgen stammt), die eine ziervolle Nanofeinstruktur besitzen und artspezifisch sind [86-87]. Mittlerweile versuchen sogar Wissenschaftler diese außerordentlich komplexe Biomineralisation mittels Computersimulationen nachzuvollziehen [88-89]. Für die Diatomeen selbst stellen die harten Silikazellwände, die auch als Frusteln bezeichnet werden, einen Schutz gegen physikalische, biologische und chemische Umwelteinflüsse dar [76] oder helfen diesen

durch ihre Morphologie auf Strömungsaufkommen zu reagieren. Auf dem Gebiet des Diatomeenaufbaus, ihrer Zellteilung und Bewegung hat R. Lauterborn (Zool. Inst. Universität Heidelberg) im Jahr 1896 in einem bemerkenswerten Werk zusammengefasst [90]. Obwohl seine Beobachtungen mit minimalistischen Mitteln erfolgten, ist heute unumstritten, dass sie bis ins kleinste Detail richtig waren [91]. Betrachtet man den Aufbau einer pennaten Diatomee, eine Klasse, die in dieser Arbeit verwendet wurde, so besteht sie aus zwei identischen, sich überlappenden schalenförmigen Teilen (Valven = Theken) von denen eine Hälfte (Epitheka) etwas größer als die andere (Hypotheka) ist (Abbildung 2).

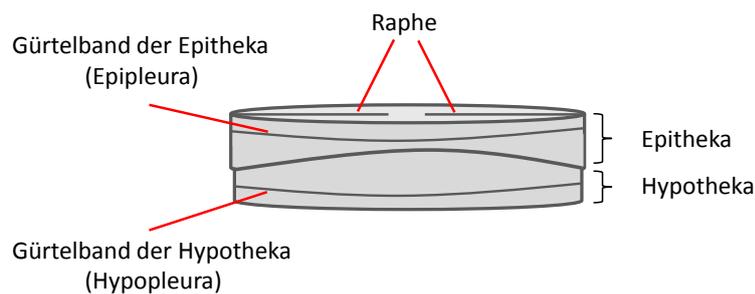


Abbildung 2: Grundlegender Aufbau einer pennaten, raphiden Diatomee.

Der Zusammenhalt zwischen den Theken wird durch die Gürtelbänder unterstützt, welche jede der beiden Theken komplett umlaufen. Auf jeder Valve verläuft eine Raphe- ein linienförmiger Spalt, der sich jeweils längs der Zellachse erstreckt und für die Aussonderung von extrazellulären Polymersubstanzen (EPS) verantwortlich ist (Kapitel 2.1.1, S. 8). Der Aufbau aus zwei Hälften spielt eine große Rolle bei der Vermehrung der diploiden (zwei vollständige Chromosomensätze) Kieselalge, die in erster Linie ungeschlechtlich durch Mitose (Kernteilung) und Cytokinese (Plasmateilung) stattfindet (Abbildung 3 a, blaue Hervorhebung). Dabei bildet jede dieser zwei Hälften ein neues Gegenstück, wobei sich die zwei so neu gebildeten Diatomeen nach vollkommener Ausbildung der jeweils neuen Valve trennen (Abbildung 3 b) [81, 92]. Folge der unterschiedlich großen Valven ist jedoch, dass mit der Zeit die Größe der nachkommenden Diatomeen abnimmt. Unterschreitet deren Größe eine bestimmte Grenze, findet sexuelle Fortpflanzung (Meiose) statt, um den Erhalt der Zelle zu sichern. Hierbei bildet die eine Hälfte der Zellen männliche Gameten und die andere Hälfte weibliche, die dann paarweise zur Zygote verschmelzen und eine neue einzellige Diatomee ausbilden. Nach dieser Phase der geschlechtlichen Vermehrung kann anschließend wieder ungeschlechtliche Vermehrung stattfinden (Abbildung 3 grüne Hervorhebung).

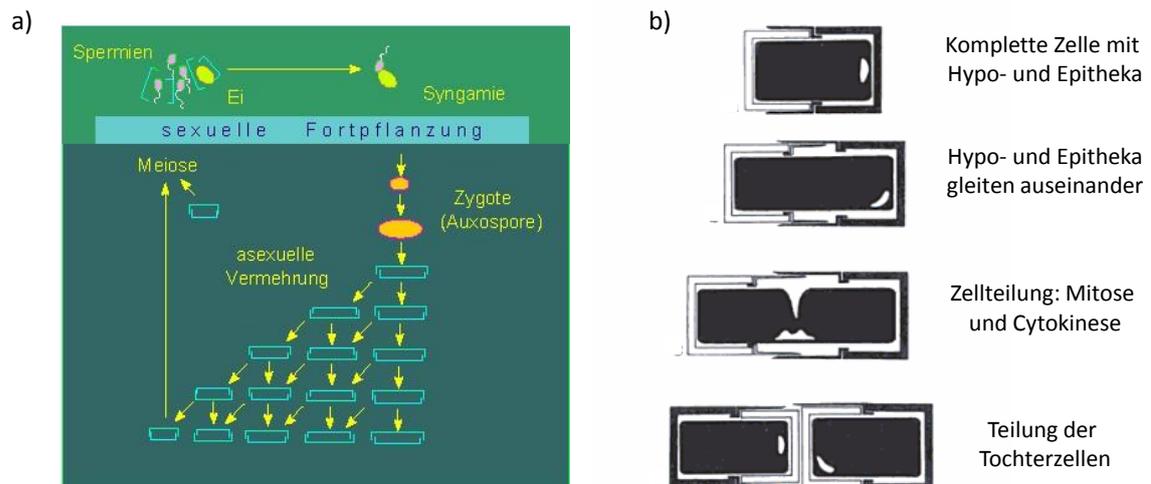


Abbildung 3: a) Illustrierung der beiden möglichen Fortpflanzungszyklen von Diatomeen [93]. Blaue Hervorhebung: ungeschlechtliche Fortpflanzung durch Mitose und Cytokinese. Grüne Hervorhebung: sexuelle Fortpflanzung (Meiose); b) detaillierte Darstellung der Zellteilungsprozedur [81].

Die Unterteilung der Diatomeen geschieht in drei Klassen (insgesamt ca. 200 Gattungen und 100 000 Arten, von einigen wenigen μm bis einigen mm groß) [94]: zentrische Kieselalgen haben meist runde oder auch dreieckige Schalen und kommen vorwiegend planktisch (frei schwebend im Ozean) vor. Raphide und araphide (pennate) Kieselalgen sind hingegen stab-, schiffchen-, oder auch mondformig und sind planktisch und benthisch (in Kontakt mit Substraten) vorzufinden [95]. Ableitbar aus der Anzahl der Spezies ist hierbei die größte vorkommende Kieselalgen-Gruppe die der raphiden Diatomeen. Wie bereits erwähnt, besitzen die Diatomeen in diesem Fall sogenannte Raphen, durch welche schleimartige Polymersubstanzen ausgesondert werden können. Diese sind für die permanente Adhäsion der Diatomeen von großer Bedeutung. Ebenso kann mittels dieser Substanzen Motilität bei Berührung mit einer Oberfläche gewährleistet werden [76]. Abgesehen von einigen wenigen männlichen Gameten ist allen drei Diatomeen-Klassen gemeinsam, dass sie im planktonischen Zustand nicht motile Spezies darstellen, die allein durch Gravitation auf Oberflächen absinken oder durch Gewässerströmungen ihre Richtung vorgegeben bekommen.

Als Lebensräume der Diatomeen sind zum einen feuchte oder in Wasser eintauchende Grenzflächen (benthischer Zustand) und zum anderen offene Wassersysteme (planktonischer Zustand) zu nennen. Sie kommen sowohl in Süß- als auch in Meerwasser vor [96]. Im letzteren sind sie aufgrund des Nährstoffreichtums vor allem in Küstennähe zu finden. In der offenen See sind es vorzugsweise die tieferen Gewässer, wo nährstoffreiches Tiefenwasser an die Ozeanoberfläche gebracht wird (Abbildung 4).

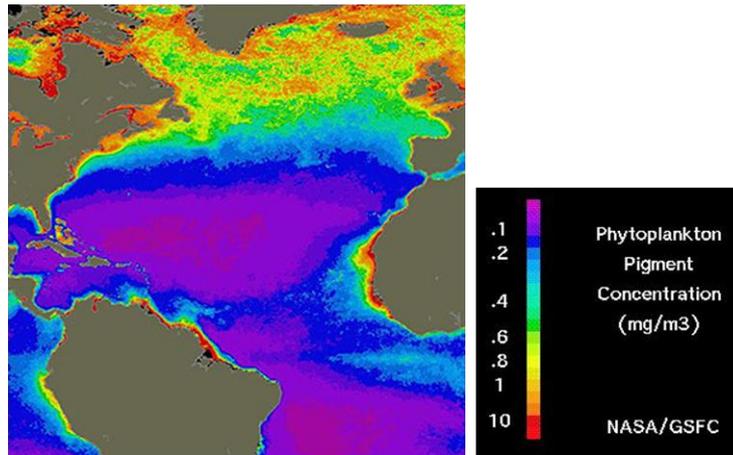


Abbildung 4: Verteilung des Phytoplanktons im atlantischen Ozean 1978-1979, gemessen an der Chlorophyll-Konzentration (Quelle: SeaWiFS-Projekt, NASA).

Auf dem Gebiet des Süßwasserphytoplanktons hat G. E. Hutchinson, ein bekannter Limnologe, bedeutende ökologische Untersuchungen unternommen [97-99]. Im Allgemeinen stellt Phytoplankton einen sehr wichtigen Faktor im Klimakreislauf dar [100]. Diatomeen machen hierbei rund ein Drittel aller pflanzlichen Planktonarten aus und leisten somit einen wesentlichen Beitrag zur Aufnahmefähigkeit des Ozeans für atmosphärisches Kohlendioxid (20 % der atmosphärischen CO₂-Fixierung) [101-103]. Mit Hilfe der Photosynthese baut Phytoplankton aus CO₂ und weiteren Nährstoffen seine Biomasse auf und ist somit die Basis in der Nahrungspyramide in Gewässern. Durch den Klimawandel sehen Wissenschaftler jedoch diese Fähigkeit als gefährdet an [104-105]. Dass Diatomeen abhängig ihrer Gattung gewisse Temperaturbereiche für ihr Wachstum beanspruchen und empfindlich auf Temperaturunterschiede reagieren können, wurde in zahlreichen Studien untersucht [96, 106-108]. Auch insgesamt nehmen Diatomeen Umwelteinflüsse (Salinität, pH-Wert des Wassers) empfindlich wahr [107, 109-111].

Da an marinen Oberflächen gebildete Biofilme oft reich an pennaten Diatomeen sind, ist die Erforschung dieser Gattungen und ihres Adhäsionsverhaltens von großem wissenschaftlichem Wert. Studien über die Kompositionen von Diatomeen-Gattungen und -Arten auf kommerziellen Schiffsbeschichtungen ergaben vor Kurzem, dass vor allem die Gattungen *Amphora*, *Cocconeis* und *Navicula* vertreten sind. Zudem hingen die Zusammensetzungen dieser und aller anderer Gattungen der gefundenen Diatomeen von der geographischen Lage der untersuchten Objekte ab [52, 112].

2.1.1. Permanente Adhäsion und Motilität von raphiden Diatomeen

Aufgrund der Nähe dieser Arbeit zu der raphiden Diatomeen-Gattung *Navicula* beschränkt sich dieses und das folgende Kapitel auf die Adhäsion von Diatomeen, die Raphen aufweisen.

Die initiale Adhäsion von raphiden Diatomeen kommt durch sogenannte extrazelluläre Polymersubstanzen zustande (EPS), die in erster Linie über die Raphen ausgesondert

werden [74-75] (Abbildung 5 A/B). Diese bestehen zum großen Teil aus Polysacchariden, Proteoglykanen und Proteinen, die in einer hochkomplexen Weise miteinander im Zusammenspiel stehen [113-118]. Für die Adhäsion von Diatomeen können im Wesentlichen zwei Gründe genannt werden. Wie bereits erwähnt, kann bei Kontakt mit einer Oberfläche Bewegung erfolgen (motile Adhäsion), die dazu dient an Orte mit günstigeren Lichtverhältnissen (Phototaxis) oder besserem Nährstoffaufkommen zu gelangen oder ungünstige Strömungsaufkommen zu meiden [119-121]. Bei der sessilen Adhäsion tritt ein permanenter Aufenthalt an einer starren Grenzfläche ein. Voraussetzung sowohl für die motile als auch die sessile Adhäsion ist die Aussonderung von Polymersubstanzen [113-114]. Die Zusammensetzung dieser Substanzen unterscheidet sich hierbei für beide Adhäsionsarten, und auch die Feinstrukturen der EPS können unterschiedlich sein: die Frusteln einer permanent adhären Diatomee können durchgehend oder stellenweise mit Polymersubstanzen bedeckt sein (Abbildung 5 A), ebenso können die sogenannten *Klebstoffe* (EPS) als eine Art Klebstrang ausgehend von den Raphen der Zelle fungieren (Abbildung 5 B/C) [113, 122] oder bei einer sich bewegenden Diatomee als Spur zurückbleiben (Abbildung 5 D).

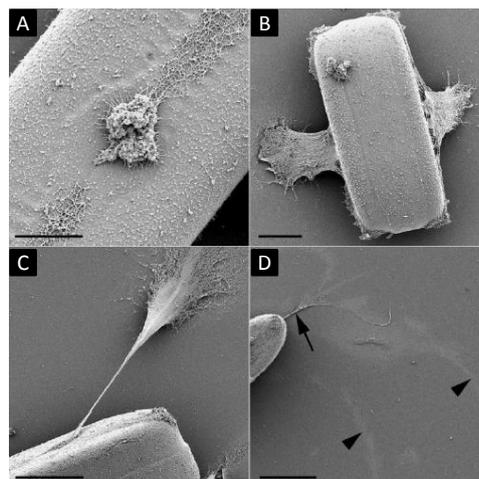


Abbildung 5: REM-Aufnahmen von *Pinnularia viridis*. (A) Polymere Klebstoffe aus einer Raphe ausgesondert; (B) aus beiden Raphen ausgesonderte Klebstränge mit Kontakt zum Substrat; (C) ein Klebstrang (1-2 µm breit), der erst nach 40 µm den Kontakt zum Substrat hergestellt hat (Ø Kontaktstelle: 10-15 µm); (D) zurückbleibende Spuren einer sich bewegenden *P. viridis*; Skala [µm]: 5 (A), 10 (B), 15 (C und D) [122].

Die Klebstränge müssen nicht zwangsweise durch die Raphen ausgesondert werden, auch Regionen wie an der Spitze liegende Zellhüllenporen sind dazu befähigt [113]. Diese Befähigung ist jedoch eher den araphiden als den raphiden Arten vorbehalten [123].

Der Kontakt einer raphiden Diatomee zu einer Oberfläche erfolgt hauptsächlich, indem sie nach der Landung auf einer Seite und auf dieser Seite liegend über eine Raphe oder beide Raphen adhären [114]. Die zweite Möglichkeit besteht in der Adhäsion nach dem direkt Landen auf einer der Raphen (Abbildung 6). Es wurde beschrieben, dass Diatome-

en vorzugsweise auf der Seite (Gürtelband) landen, welche dann die Ausgangslage für ihre permanente Adhäsion darstellt [114].

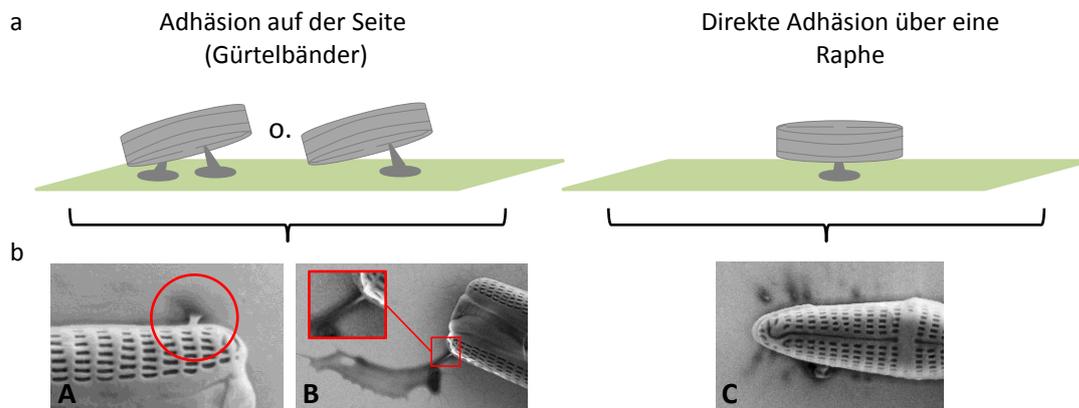


Abbildung 6: Mögliche Adhäsionsprofile einer raphiden Diatomee: (a) Schematische Darstellung einer Adhäsion über die Sekretion der EPS aus einer der beiden Raphen; (b) REM-Aufnahmen: (A, B) Zellen auf Gürtelbändern liegend über eine Raphe oder beide Raphen adhärirt; (C) Adhäsion direkt *via* einer Raphe.

Motilität einer Diatomee kann nur stattfinden, wenn sie direkt mit einer ihrer Raphen ein Substrat berührt oder aus ihrer seitlichen Gürtelbandlage in die Rapheorientierung *umkippt*. Erst in dieser Position ist die Voraussetzung für eine Kriechbewegung erfüllt. Bevor ein Umkippen zustande kommen kann, muss jedoch ein eventuell zweiter bestehender EPS-Klebestrang gelöst werden (roter Pfeil, Abbildung 7) [124]. Die Raphe, auf der die Bewegung letztendlich erfolgt wird auch Antriebsraphe genannt [74, 76].

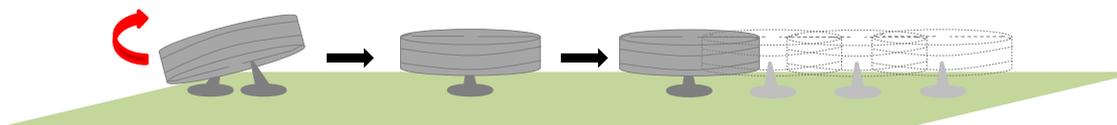


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Ablösung eines Klebestranges (roter Pfeil) und einer anschließenden Kriechbewegung einer raphiden Diatomee auf einer ihrer Raphen.

Findet eine Bewegung statt, so können die Geschwindigkeiten $0.1-25 \mu\text{m/s}$ im Durchschnitt betragen, wobei die Bewegungsrichtung eine rein zufällige ist und die Geschwindigkeiten von Spezies, Substratart und Umweltbedingungen abhängig sind [125-126]. Während des gesamten Kriechprozesses über ein Substrat werden Polymersubstanzen ausgesondert, die mit voranschreitender Bewegung als eine Art Spur auf dem Substrat zurückgelassen werden [127-128]. Mechanistisch betrachtet wird die Bewegung laut Edgar, Zavortink und Pickett-Heaps über Actin-Filament-assoziierte Motorproteine (Myosin) im Inneren der Zelle bewerkstelligt, die mittels transmembraner Linkermoleküle mit den extrazellulären Polymersubstanzen verbunden sind (Abbildung 8) [129-131]. Durch eine Actin- bzw. Myosin Inhibition wurde bestätigt, dass diese als Struktur- bzw. Motorprotein eine wesentliche Rolle in der Fortbewegung von Diatomeen spielen [132-133].

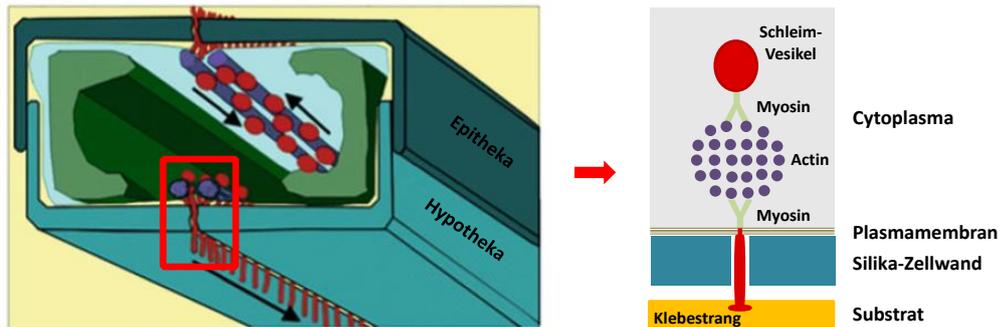


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Gleitmechanismus pennater Diatomeen anhand eines Querschnitts: Unmittelbar unter den Raphenspalten befinden sich paarweise angeordnete Actinfilamentbündel (violett), die als Transportbahnen für Schleimvesikel (rot) dienen. Den Transport des Schleimfadens entlang der Actinbündel übernimmt Myosin (grün) als Motorprotein. Die Klebstoffe werden über die Plasmamembran und durch die Raphenspalten hindurch nach außen gedrückt. Der an das Substrat haftende Klebestrang bleibt zunächst über das Myosin (grün) mit der Plasmamembran verbunden. Nachdem die Fäden das Ende der Raphe erreicht haben, werden sie von der Plasmamembran getrennt und bleiben aufgrund ihrer klebrigen Konsistenz auf der Unterlage haften. Dadurch kommt die Schleimspur zustande. Obere und untere Raphe produzieren gleichzeitig Schleimfäden. Zeichnung modifiziert aus [134].

Mit dem Modell nach Edgar ist die Vorwärtsbewegung in eine einzelne Richtung hinreichend beschrieben, jedoch besteht bis heute Erklärungsbedarf hinsichtlich des Richtungswechsels von kriechenden Diatomeen auf Oberflächen. Wie im Ergebniskapitel 6.1 (S. 120) gezeigt, können diese zufällig abbiegen oder sogar ohne zu wenden abrupt ihre Richtung wechseln. Letzteres wäre theoretisch durch eine Umkehrung des Motorsystems zu bewerkstelligen, allerdings ist der Hintergrund der zahlreichen und vielfältigen Kurven oder sogar Rotationsbewegungen schwierig mit dem „Geradeaus-Mechanismus“ wie ihn das Edgar-Modell beschreibt, zu deuten. Wang *et al.* postulierten kürzlich ein erweitertes Bewegungsmodell, in dem sich Diatomeen (*Navicula sp.*) über sogenannte Pseudopodien (Scheinfüßchen) fortbewegen, die durch Extrapolymeren Substanzen abwechselnd durch die Raphenspalten hinaus gedrückt werden und somit Reibungskraft produzieren, die schließlich in Bewegungen resultieren. Mittels konfokaler Mikroskopie untersuchten sie zwei zirkuläre Strukturen, die jeweils an beiden Enden einer Diatomee lokalisiert und reich an Actin sind. Da dieses als ein wichtiger Part in den Studien von Edgar identifiziert worden ist, wurden die zirkulären Strukturen als bedeutsames Funktionsglied für die Kriechbewegungen vermutet. Wieso jedoch lediglich 6.5 % der motilen Diatomeen diese zirkulären Strukturen aufwiesen bedarf noch weiterer Untersuchungen [135].

Die während einer Fortbewegung entstehenden EPS-Spuren konnten bereits gut visualisiert werden. REM-Aufnahmen von der Diatomee *P. viridis* beschrieben die zurückbleibenden Spuren als ungleichmäßige zur Bewegungsrichtung senkrecht ausgerichtete Kräuselungen aus Klebesträngen, die flach auf dem Substrat kleben. Eine ergänzende AFM-Studie ergab, dass die Klebestränge in hydratisierter Form 3 μm breit und 300 nm hoch waren und sich über Millimeter auf dem Substrat hinzogen. Zudem wiesen sie keinerlei Substruktur auf [127]. Mittels AFM konnten außerdem im All-

gemeinen Aufschlüsse über die physikalische Beschaffenheit von EPS gewonnen werden [122]. Es kommt zum Beispiel vor, dass die ausgesonderten Polymersubstanzen derart dicht und fest in ihrer Struktur sind, dass sie die Zellen in ihrer Weiterbewegung hemmen können [75]. Als Folge kann es daraufhin zu einer permanenten Adhäsion kommen. Jedoch können kriechende Diatomeen auch generell jeder Zeit von der motilen in die permanente Adhäsion übergehen. Abbildung 9 zeigt zusammenfassend eine Übersicht der Adhäsionsmöglichkeiten.

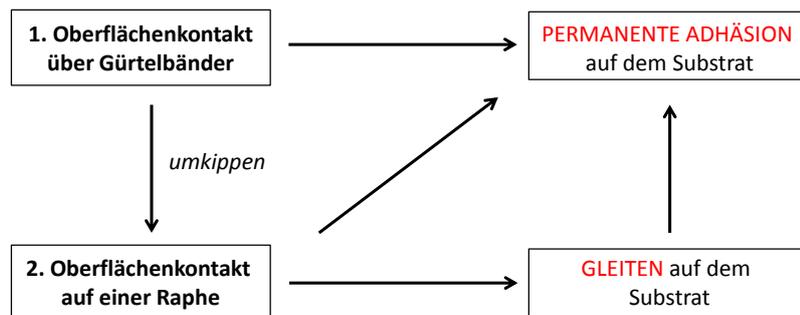


Abbildung 9: Mögliche Adhäsionsweisen der Diatomee *N. perminuta*.

Gegenwärtig ist wenig darüber bekannt, ob sich die adhäsiven Polymersubstanzen an unterschiedliche Oberflächen durch Aussonderung von Polymeren in verschiedenen Zusammensetzungen anpassen können oder in wie fern die molekularen Eigenschaften der Makromoleküle ihre mechanischen Funktionen bei der Adhäsion an ein Substrat bestimmen. Während AFM-Studien von Higgins *et al.* erkennen ließen, dass die ausgesonderten Polymere auf einer hydrophoben bzw. hydrophilen Oberfläche in ihrer Festigkeit variierten, berichteten Arce *et al.* über keinen auffallenden Unterschied bei der Ablösung von Diatomeen von einer hydrophoben bzw. hydrophilen Oberfläche durch einen AFM-Cantilever Spitze [126, 136].

2.1.2. Die Diatomee *Navicula perminuta*

Insgesamt umfasst die Diatomeengattung der *Navicula* rund 250 Spezies. Ihren Namen hat sie ihrer schiffchenartigen Form zu verdanken, die in der Raphenansicht deutlich wird (Abbildung 10 A/a). In der Seitenansicht erscheinen diese Kieselalgen rechteckig (Abbildung 10 B/b). Abbildung 10 C/c zeigt zudem die Seitenansicht sich teilender Diatomeen. Die Zellgrößen der *Navicula* Algen betragen 5-70 μm [137]. *Navicula perminuta*, die in dieser Arbeit verwendete Spezies, ist 10-13 μm lang und etwa 5-6 μm breit [137].

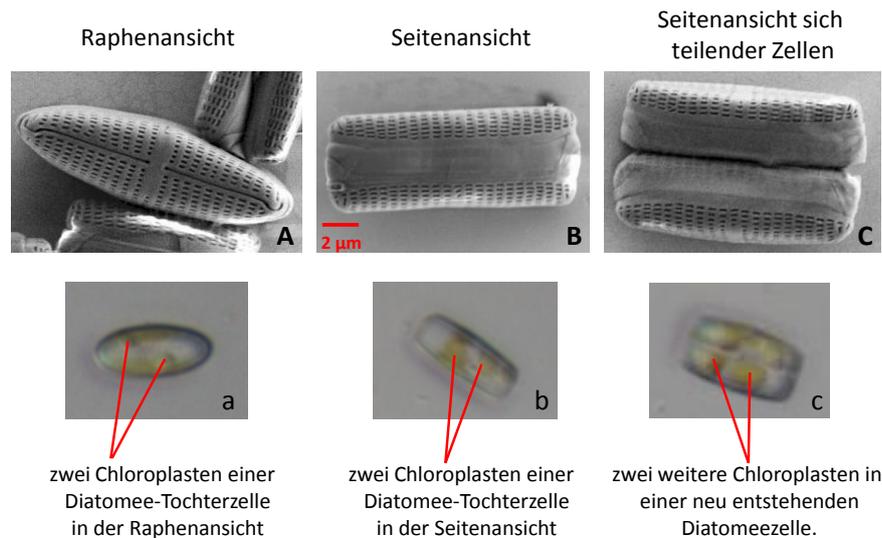


Abbildung 10: REM- (A, B, C) bzw. Lichtmikroskopieaufnahmen (a, b, c) dreier wichtiger Zellansichten von *Navicula perminuta*: (A/a) Zelle von oben betrachtet (Raphenansicht); (B/b) in der Seitenansicht sind die zwei Valven der Frustel erkennbar; (C/c) neu gebildete Diatomeezelle als finale Phase der Zellteilung.

Was ihre Adhäsionseigenschaften auf unterschiedlichen Substraten betrifft, so ist aus vorhergehenden Studien bekannt, dass *N. perminuta* stärker auf hydrophoben als auf hydrophilen Oberflächen adhärert [48, 126]. Schilp *et al.* untersuchten die Algenzellen auf EG₆OX-Oberflächen mit sich systematisch ändernder Benetzbarkeit (Kontaktwinkel: X = H (32°), Me (63°), Et (81°), Pr (95°)), indem sie adhärente Zellen in einer turbulenten Wasserkanalapparatur einer konstanten Strömung (Wandschubspannung von 8.2 Pa (82 dyn/cm²)) aussetzten. Dabei zeigte sich, dass diese Diatomeen auf hydrophilen Oberflächen leichter durch die bestehende Strömung entfernt werden konnten [48]. Untersuchungen auf Xyrogel-Oberflächen mit Alkyl-, Fluoroalkyl- oder Aminoalkyl-Funktionalität zeigten ähnliche Resultate, hydrophobe Xerogel-Oberflächen (Kontaktwinkel zwischen 85° und 105°) erwiesen sich im Gegensatz zu hydrophilen Oberflächen (35-54°) als attraktiver für die Diatomeenadhäsion (52 Pa Wandschubspannung in einem turbulenten Wasserkanal) [138]. Dieser Trend wird ebenso durch Arbeiten von Krishnan *et al.* gestützt, die diese Diatomeen auf Blockcopolymer-Oberflächen mit hydrophilen PEG (Poly(Ethylen-Glykol))- oder hydrophoben fluorierten Seitenketten adhären ließen, wobei sich wiederum eine größere Adhäsionsstärke von Zellen auf den hydrophoben Substraten zeigte [49]. Insbesondere amphiphile Blockcopolymer-Oberflächen mit abwechselnd hydrophoben und hydrophilen Seitenketten (sowohl PEGyliert als auch fluoriert) führten zu einer verminderten Adhäsion von Algenzellen [139]. Auch auf SAM-Substraten gleicher chemischer Terminierung (gleiche Oberflächenenergie), jedoch unterschiedlicher Kettenlängen (HS-(CH₂)_x-CH₃, x = 7-17), wurde von Bowen *et al.* ein Unterschied des Adhäsionsverhaltens der Zellen festgestellt, indem die Anzahl der Kieselalgenzellen (Zellen/mm²) vor und nach einem angelegten Fluss von 54 Pa bestimmt wurde [50]. Dieser Effekt lässt sich auf molekularer Ebene erklären: Längere Kettenmoleküle weisen durch verstärkte intermolekulare *van der Waals*-Wechselwirkungen eine

geordnete bzw. kristalline Struktur auf ($x = 11-17$), während dieser Effekt bei den kürzeren Ketten weniger ausgeprägt ist und diese als Folge in amorpher Form vorliegen ($x = 7-10$). Auf diese strukturellen Unterschiede haben bereits Evans und Ulman *et al.* früh hingewiesen [140-141]. In jüngster Zeit bestätigten Leggett *et al.* diese Tatsache mittels AFM durch Messungen der Reibungskoeffizienten (μ), wobei der Wert für μ mit den abnehmenden Methyleneinheiten zunimmt [142]. Resultat dieser Studie mit *N. perminuta* war, dass die Kieselalgen sich durch die angelegte Scherströmung bedeutend einfacher von den kristallinen (*trans*-Struktur) als den amorphen (*gauche*-Struktureinheiten: „Defekte“) Oberflächen entfernen ließen. Es wurde postuliert, dass die amorphe Beschaffenheit der Oberfläche eine ausgedehntere Kontaktfläche für die von den Kieselalgen ausgesonderten EPS bietet. Werden zudem die amorphen Oberflächen einem Fluss ausgesetzt, so wird durch den höheren Reibungswiderstand ein Teil der Strömungsenergie in Form von Wärme abgeleitet, so dass diese nicht mit voller Wirkung auf die adhärenen Zellen trifft. Als geladene Mikroorganismen zeigen *N. perminuta* außerdem auf Oberflächen mit einem elektrischen Potential ein deutlich anderes Verhalten als auf ungeladenen Substraten. Bei zwitterionischen Poly(Sulfobetainmethacrylat)-Substraten (PolySBMA) konnte verglichen zu Glas ein um 85 % reduziertes Haftungsvermögen (Zellen/mm²) verzeichnet werden. Die Zelldichte wurde hierbei vor und nach einem angelegten Fluss von 54 Pa bestimmt [67].

2.2. Fouling-Release Oberflächen

Aufgrund von gesetzlichen Reglementierungen und bekannter ökologischer Probleme ist es im Kampf gegen *Biofouling* inzwischen wichtiger geworden das Augenmerk nicht ausschließlich auf die Entwicklung resistenter (Biozide miteinbegriffen) *anti-fouling*, sondern auch auf *fouling-release* Oberflächen zu richten. Diese verhindern nicht, dass Mikroorganismen mit der Oberfläche in Kontakt treten oder bei Kontakt abgetötet werden, sondern sollen sich erst bei der Interaktion eines Mikroorganismus mit dieser als unattraktiv erweisen oder ihre volle Funktionalität vor allem durch Bewegungen eines Seefahrzeuges, am besten schon bei niedrigen Geschwindigkeiten, entfalten. Statische, dem Wasser ausgesetzte Objekte hingegen müssten bei Verwendung von *fouling-release* Beschichtungen durch nur leichte Einwirkungen von mechanischen Hilfsmitteln vom unerwünschten Bewuchs zu befreien sein [143].

Grundlegende Studien von Whitesides *et al.* ermöglichten es eine Reihe von Aussagen zu potentiell inerten Oberflächen zu formulieren [144]. »Eine *non-fouling* bzw. *fouling-release* Oberfläche sollte hydrophile Eigenschaften besitzen« Angelehnt war diese Aussage an die hervorragenden Proteinresistenzigenschaften von EG-Oligomeren. Auch elektrisch neutrale und zu Wasserstoffbrückenbindungen befähigte Oberflächen sind potentiell geeignet [145]. Zudem wurden konformative Flexibilität und Elastizität als positive Eigenschaften identifiziert. In Bezug auf letzteres ist PDMS (Poly(dimethylsiloxan)) als Elastomer mit niedriger Oberflächenenergie ein prominentes und wirkungsvolles Beispiel und ist zudem in vielen kommerziellen Beschichtungen als Verbindungs-

material enthalten. Als hydrophobes Material widerspricht es jedoch dem erstgenannten Kriterium. Zum Beispiel sind Diatomeen sehr häufig vorkommende Organismen auf PDMS-basierenden Beschichtungen und zeigen somit, dass eine einzig erfüllte Voraussetzung nicht eine *fouling-release* Oberfläche ausmachen kann [52, 126, 146-148]. Auch für die weiteren genannten Faktoren lassen sich zahlreiche Gegenbeispiele finden, die eindeutig zeigen, dass keine einheitlichen Regeln gelten: SAMs mit Wasserstoffdonor-terminierten Mannosegruppen erwiesen sich als proteininert [149]. Im Vergleich von neutral und negativ geladenen, jedoch chemisch gleichen Oberflächen, stellten sich letztere als potentiell bessere Option heraus [21].

In erster Linie zeigen diese Beispiele, dass sich aufgrund der Existenz unzähliger und sich in ihren Adhäsionsmechanismen unterscheidender Spezies die oben genannten Kriterien nicht verallgemeinern lassen. Aufgrund dessen wird heutzutage vermehrt auf die Erforschung von Oberflächen mit sich ergänzenden Eigenschaften gesetzt, welche die Adhäsion mehrerer Organismen auf einmal beeinflussen sollen: Amphiphile Substrate mit abwechselnd hydrophoben und hydrophilen Einheiten sind vielversprechend [49, 139, 150-152]. In der Praxis ist *Intersleek®900*, ein amphiphiles Fluoropolymer, eine der momentan führenden *fouling-release* Beschichtung in der Schifffahrtindustrie [153]. Hinweise auf *fouling-release*-Eigenschaften alternierend geladener Oberflächen lieferte die Natur selbst, da beispielsweise Phospholipide von Zelloberflächen oder auch Aminosäuren im physiologischen pH-Bereich zwitterionisch sind [154]. Topographische Funktionalisierungen wurden durch den Lotuseffekt als Protobeispiel inspiriert und sind in Form von sogenannten *Sharklets* kommerziell eingesetzt worden [155-156]. Anhand von diesen Beispielen wird die Inspiration und schnell voranschreitende Entwicklung hinsichtlich der Biofouling-Forschung deutlich.

Im Folgenden sollen einige Oberflächeneigenschaften detaillierter besprochen werden, um Einsicht in die Physikochemie gegen Biofouling wirksamer Beschichtungen zu erlangen. Zunächst wird jedoch näher auf die Auswirkung dieser auf Adhäsionsvorgänge im Allgemeinen eingegangen.

2.3. Einfluss der Oberflächeneigenschaften auf Adhäsion

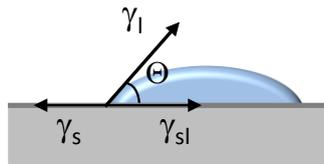
Als Adhäsion wird im Allgemeinen das Haften gleich- oder verschiedenartiger Stoffe aneinander bezeichnet. Wie stark ein Stoff an einen anderen klebt, hängt dabei von den molekularen Wechselwirkungen zwischen beiden Grenzflächen ab.

Eine wichtige physikochemische Größe durch die eine Oberfläche beschrieben werden kann, ist ihre Oberflächenenergie γ . Sie resultiert in erster Linie aus ihrer Oberflächenchemie, wobei sich diese durch atomare oder molekulare Vorgänge an der Grenzfläche verändern kann. Aufgrund der zahlreichen Grenzflächen-Phänomene, die auf unterschiedlichen Kräften beruhen, entstanden dementsprechend unterschiedliche Theorien, um Adhäsionsvorgänge an einer Grenzfläche beschreiben zu können [157]: Zum einen gibt es die Ausbildung chemischer Bindungen bei der Adhäsion, zum anderen werden Grenz-

flächenvorgänge auf der Ebene der Thermodynamik (Zisman, Fowkes, Good und Wu, 1963) oder Molekularphysik interpretiert. Die molekularphysikalische Auslegung unterteilt sich hierbei nochmal in die *Polarisationstheorie* nach De Bryne (1935), *Elektrostatische Theorie* nach Derjagin (1950 bzw. erweitert durch Landau, Verwey und Overbeek; DLVO-Theorie) und die *Diffusionstheorie* nach Voyutskij (1960). Die Theorie zur Beschreibung von Oberflächenenergie baut auf grenzflächenenergetischen Größen auf, die sich aus dem unterschiedlichen Potenzial zwischen den Molekülen und der Umgebung innerhalb einer Oberfläche und den Molekülen an der Oberfläche (Phasengrenze) ergeben. Da sich Oberflächen unterschiedlicher Eigenschaften in ihrem molekularen Aufbau unterscheiden ist es selbstverständlich, dass jegliche zwischenmolekular auftretenden Wechselwirkungen zwischen adsorbierenden Molekülen und Oberfläche ungleich sind. Daraus resultierend kann auch die Adhäsion unterschiedlich stark sein. Ebenso sollte der Adhäsionsvorgang nicht ausschließlich auf eine scharfe Linie zwischen Grenzfläche und dem zweiten betrachteten Medium beschränkt werden, denn je nach Struktur eines Substrats kann der Adhäsionsvorgang durch mehrere Atomschichten beeinflusst werden (siehe Kapitel 2.3.2 und 2.3.3, S. 19ff).

Um Einblicke in einen Adhäsionsvorgang z. B. von Proteinen oder Mikroorganismen an ein Substrat zu erlangen, müssen zunächst Informationen über die Oberflächenenergie des Substrats vorliegen. Dies ermöglicht in einfachster Art ein Benetzungsexperiment (Kontaktwinkelmessung) mit Wasser Abbildung 11. Dabei wird ein Substrat umso mehr durch Wasser benetzt (kleiner werdender Kontaktwinkel Θ), desto höher seine Oberflächenenergie in Bezug auf die zu benetzende Flüssigkeit ist. Dies ist eine Folge daraus, dass ein System stets das Bestreben nach der kleinsten freien Energie hat. Bei Kontaktwinkeln von $0^\circ \leq \Theta \leq 90^\circ$ spricht man von einer hydrophilen Oberfläche. In einem Bereich von $90^\circ \leq \Theta \leq 150^\circ$ werden Oberflächen als hydrophob bezeichnet (genauere Definitionen des Kontaktwinkels werden im Kapitel 3.2.3, S. 37, gegeben).

Kommt eine Oberfläche in Kontakt mit einem Medium, so kommt es sofort zu Wechselwirkungen zwischen Substrat und den Verbindungen im Medium (je nach Substrat sind es *van der Waals*-, polare- oder elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen etc.)- es findet Adhäsion statt. Die Adhäsionsarbeit ($W_{s,l}$), die hierbei verrichtet werden muss, ist als die Arbeit definiert, die benötigt wird um das Medium (l, *engl.* liquid) vom Substrat (s, *engl.* solid) zu separieren. Sie setzt sich zusammen aus der Oberflächenenergie des Substrats plus Oberflächenspannung des Mediums abzüglich der Grenzflächenenergie zwischen Substrat und Medium (Abbildung 11).



- γ_s = Oberflächenenergie Feststoff (solid)
- γ_l = Oberflächenspannung Flüssigkeit (liquid)
- γ_{sl} = Grenzflächenenergie zwischen Feststoff und Flüssigkeit (solid/liquid)
- Θ = Kontaktwinkel zwischen den Phasen

Abbildung 11: Wirksame Kräfte bei der Ausbreitung eines Wassertropfens auf einer Oberfläche. Der Kontaktwinkel Θ ist ein Maß für die Stärke der Wechselwirkungen zwischen beiden Phasen.

Als Gleichung lässt sich dieser Sachverhalt folgendermaßen ausdrücken:

$$W_{sl} = \gamma_s + \gamma_l - \gamma_{sl}$$

Da $W_{sl} = -\Delta G_{sl}(T,p,V,n)$ (freie Energie, Gibbs Energie) folgt:

$$-\Delta G_{sl} = \gamma_s + \gamma_l - \gamma_{sl}$$

Mit $\cos \Theta = (\gamma_s - \gamma_{sl})/\gamma_l$ folgt die Young-Dupré Gleichung

$$-\Delta G_{sl} = \gamma_l(1 + \cos \Theta)$$

Aus dieser Gleichung ist ersichtlich, dass die Adhäsionsenergie mit abnehmender Oberflächenenergie, also schwächerer Benetzung des Substrats durch Wasser abnimmt [158]. Zur Berechnung der Oberflächenenergie eines Substrats wird der Extremfall eines Kontaktwinkels von 0 ($\cos \Theta = 1$) zu Hilfe genommen. In diesem Fall wird die Adhäsionsarbeit gleich der Kohäsionsarbeit (da Kohäsionsarbeit: $2 \cdot \gamma_s$) und die Spreitung (Ausbreitung) des Wassers wird maximal. Zisman nutzte diesen Zusammenhang, indem er $\cos \Theta$ für verschiedene Flüssigkeiten gegen die Oberflächenspannung auftrug und die Ausgleichsgerade auf $\cos \Theta = 1$ extrapolierte. Der korrespondierende Oberflächenspannungswert wird als kritische Oberflächenspannung $\gamma_{krit.}$ bezeichnet. Dieser Wert entspricht der Oberflächenenergie des Festkörpers γ_s [159].

Als Schlussfolgerung kann zunächst festgehalten werden, dass zunehmende Hydrophobizität mit einer Abnahme der Oberflächenenergie einhergeht bzw. mit zunehmender Hydrophilie die Oberflächenenergie zunimmt. Jedoch wird dieses Prinzip umgekehrt nicht strikt eingehalten: eine abnehmende Oberflächenenergie hat nicht immer eine Zunahme der Hydrophobizität (Kapitel 2.3.2 und 2.3.3, S. 19-22) und ebenso nicht immer eine Abnahme der Adhäsionsstärke zur Folge.

In diesem Hinblick ist es von großer Bedeutung, empirische Daten zu sammeln und damit Oberflächeneigenschaften-abhängige Adhäsionstrends auszuarbeiten. Vor allem sind realitätsbezogene Laborassays vielversprechende Möglichkeiten Adhäsionsverhalten von diversen Mikroorganismen untersuchen zu können. Kürzlich entwickelten Finlay *et al.* in diesem Zusammenhang ein Kultivierungssystem, welches erlaubt Diatomeen während ihres Wachstumszyklus in einem dynamischen Strömungskanal in ihrem Adhäsionsverhalten und ihren Adhäsionsbedingungen zu evaluieren. Solche Studien ermöglichen

zum einen die Betrachtung der Biofilmentstehung in einem frühen Stadium und zum anderen die Untersuchung von Adhäsionsprozessen über eine längere Periode hinaus [51, 160]. Holm *et al.* verwendeten zum Beispiel unterschiedliche beschichtete *Rotationsdisks*, um den durch akkumulierte Biomasse verursachten hydrodynamischen Widerstand zu quantifizieren [148]. Von immenser Bedeutung ist es ebenso, im Labor entwickelte und viel versprechende Modellsysteme realen aquatischen Bedingungen auszusetzen, auf statische oder dynamische Weise [70-73, 161-163]. Auf diese Art wird es im zunehmend größeren Maße möglich Informationen über Adhäsionsvorgänge zu erhalten und neue *fouling-release* Materialien zu entwickeln.

2.3.1. Oberflächenchemie und Adsorption

Eine allgemeine Beziehung zwischen Benetzbarkeit eines Substrats und seiner Biofouling-Eigenschaften wurde durch erstmals durch Baier 1970 formuliert [164-165]. Er fand, dass der Bereich, in dem die Biomassenakkumulation auf einem Substrat am geringsten ist, einer kritischen Oberflächenenergie von 20-30 mN/m entspricht (Abbildung 12 a). Jedoch bedeutet eine gegen kleinere Werte strebende Oberflächenenergie nicht eine weitere Abnahme der Biomassenakkumulation. Der Bereich der minimalen Adsorption von Biomasse ist der sogenannte *theta-Bereich* und basiert wie aus der Bezeichnung ersichtlich auf dem Konzept der Kontaktwinkelmessung (Abbildung 12 b) [55].

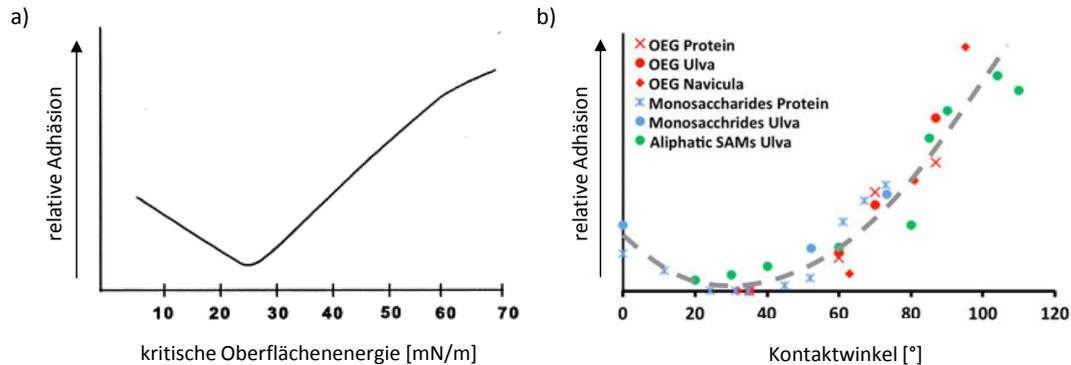


Abbildung 12: a) Empirische Beziehung zwischen kritischer Oberflächenenergie und der relativen Menge an Biomassenakkumulation nach Baier. Eine vollständige Resistenz gegen Adhäsionsvorgänge ist nach der Theorie von Baier nicht möglich [166]; b) Übersicht diverser Untersuchungen zum Einfluss der Oberflächenbenetzung auf die Biomassenakkumulation in Form von Proteinen, Algensporen und Diatomeen [55].

Die chemische Terminierung einer Oberfläche korreliert unmittelbar mit seiner Oberflächenenergie und ist somit ein sehr wichtiger Parameter [167]. Damit einhergehend variiert die Adhäsionsstärke von Mikroorganismen auf Substraten mit unterschiedlichen Oberflächenchemien. Dies wurde durch zahlreiche Studien belegt, sei es für marine Bakterien oder Mikroalgen (Abbildung 12 b) [47, 54-55, 168]. Vieler dieser Studien sind auf einem schnellen Weg Modelloberflächen mit definierten Modifikationen zu erstellen realisiert worden -die Selbstassemblierung. Zum ersten Mal wurde diese Methode 1983

von Nuzzo und Allara beschrieben [169]. Durch den Prozess der spontanen Adsorption von meist langkettigen Molekülen mit chemisch unterschiedlichen Terminierungen zu einem monomolekularen Film auf festen Substraten entstehen *Selbst-Aggregierende-Monolagen* (SAMs) [38]. Lange Molekülketten der zu adsorbierenden Moleküle ermöglichen hierbei durch Maximierung der *van der Waals*-Wechselwirkungen eine hohe Ordnung des adsorbierten Films. Vor allem durch Chemisorption der entsprechenden Thio- late an Gold, die auch in dieser Arbeit die Methode der Wahl zur SAM-Herstellung war, werden hoch reproduzierbare Monolagen in einer großen Bandbreite erhalten. Heutzutage haben SAMs, ob im biomedizinischen Bereich oder in der marinen Biofouling-Forschung, einen großen Anwendungsbereich [32, 36, 42, 47-48, 170].

2.3.2. Hydratation und Adsorption

Ende der 80er Jahre zeigten Jeon und Andrade, dass die Proteinresistenz von Poly-(Ethylen-Glykol) (PEG)-beschichteten Oberflächen in Form von SAMs ein Resultat von starken Wechselwirkungen der Oberfläche mit Wassermolekülen ist [171-172]. Dieser Effekt wird „sterische Repulsion“ genannt und auf die EG = ((-OC₂H₄)_x)-Einheiten zurückgeführt, welche die ausgeprägte Fähigkeit besitzen Wasser durch Wasserstoffbrückenbindungen (H-Brücken) an der Grenzfläche, aber auch im Inneren ihrer Molekülstruktur zu binden [173]. Im Allgemeinen weisen alle Oligo(Ethylen-Glykol)-terminierten SAMs diese Eigenschaft mehr oder weniger ausgeprägt auf [56-58]. Die Proteinresistenz wird in direkter Folge damit erklärt, dass der Kontakt zwischen Protein und Oberfläche durch den vorhandenen Wasserfilm verhindert wird. Da sich zum einen H-Brücken zu der Oberfläche nicht nur auf die Grenzfläche beschränken, sondern auch in oberflächennahen inneren Schichten auftreten, ist die Verdrängung des Wasserfilmes durch das Protein mit einem hohen energetischen Aufwand verbunden. Desweiteren gehen durch die Annäherung des Proteins an die Oberfläche konformative Freiheitsgrade der Oberflächenmolekülketten verloren. Zolk *et al.* zeigten mittels IR-Vis-Summenfrequenzspektroskopie an EG₃-OMe-SAMs, dass sich im Allgemeinen die Struktur von OEG-SAMs ändert, sobald diese in Kontakt mit Wasser kommen. Die Morphologie der Filme wandelte sich hierbei von einem geordneten kristallinen in einen ungeordneten amorphen Zustand um [174]. Wie stark sich dabei der Hydratationseffekt der OEG-Einheiten auswirkt, hängt wiederum direkt von der Packungsdichte und somit der Konformation ab [19, 56, 59-62]. Abbildung 13 stellt den Sachverhalt der Wassermolekülwechselwirkungen in OEG-SAMs anhand eines schematischen Beispiels vereinfacht dar und zeigt, dass die Packungsdichte bzw. Ordnungsgrad der Oberflächen als Folge der zunehmenden EG-Einheiten abnimmt. Damit einhergehend nimmt die Hydratisierung der Oberfläche zu.

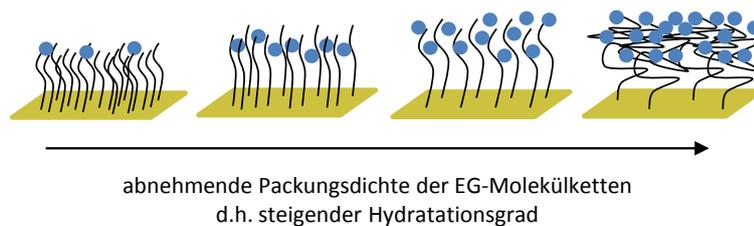


Abbildung 13: Ordnungsgrad der Oberflächen nimmt als Folge der zunehmenden EG-Einheiten ab und damit einhergehend die Hydratisierung dh. die Anzahl der gebundenen Wassermoleküle (blau) zu.

So ergaben IR-Messungen von OEG-SAMs nach Wasserkontakt, dass dichtgepackte EG-Molekülketten mit durchgehender *trans*-Konformation (geordnet) im Vergleich zu weniger dicht gepackten EG-Ketten mit helikalen oder amorphen Strukturelementen vermehrt Proteine absorbierten und somit minder dazu befähigt waren Wassermoleküle in ihre Struktur einzulagern [60]. Einen ähnlichen Struktureffekt bestätigten Fick *et al.* anhand von Neutronenreflektrometrie an amorphen sowie quasi-kristallinen PEG-SAMs. Das Quellverhalten durch Wasseraufnahme lag bei SAMs mit ungeordneten EG-Molekülketten um 30 % höher (38 % (w/w), 1,5 Wassermoleküle/EG-Einheit) als bei kristallinen Monolagen (8 % (w/w), 0,25 Wassermoleküle/EG-Einheit) [175]. Daraus lässt sich schließen, dass nicht allein die molekulare Komposition der Oberfläche ausschlaggebend ist, sondern ebenso die Fähigkeit der Ethylen-Glykol-Einheiten die Wassermoleküle entsprechend an ihrer Oberfläche bzw. im Inneren zu organisieren. Aktuellere Untersuchungen anhand von Molekular Dynamischen Simulationen zeigten am Beispiel von gemischten OEG/OH-SAMs (OEG = $-S-(CH_2)_{11}-(EG)_4OH$) in verschiedenen Verhältnissen (Oberflächenanteil $\chi_{OEG} = 0,2, 0,5, 0,8, 1,0$), dass die minimale Proteinadsorption aufgrund starker Wassermolekülwechselwirkungen bei einer 1:1 Mischung ($\chi_{OEG} = 0,5$) von OEG- zu OH-SAMs lag. In diesem Verhältnis war die Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen am höchsten. War die OEG-Dichte zu hoch bzw. zu niedrig ($\chi_{OEG} = 1,0$ bzw. $0,2$), sank die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen und somit auch die Proteinresistenz [173]. Der Vergleich mit hydroxylterminierten Alkyloberflächen (HO-SAMs), welche den gleichen Benetzungsgrad aufwiesen, zeigte, dass die Hydroxyl-Terminierungen der HO-SAMs nicht wie die der $(-OC_2H_4)_x$ -Einheiten als Wasserstoffbrücken-Donor agierten. Wang *et al.* zeigten mittels Vibrations-Summenfrequenzspektroskopie, dass EG_6OMe SAMs nach Entnahme aus einer Wasseratmosphäre und anschließender Vakuumbehandlung ihre ursprüngliche Morphologie zurückerlangten und bei darauffolgend wiederholtem Kontakt mit Wasser in den ungeordneten amorphen Zustand übergingen [176].

Aufgrund der hervorragenden Resistenzeigenschaften bezogen auf Proteine wurden OEG-Substrate auch im Hinblick auf marine Mikroorganismen wie Algensporen, Bakterien und Diatomeen untersucht [20, 57, 177]. Resultat war, dass auch diese durch die unterschiedlichen Hydratationsgrade der OEG-SAMs, wie zuvor beschrieben, beeinflusst wurden. Die Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von Fibroblasten auf einer Serie von EG-Substraten (EG_xOH , mit $x = 1, 2, 3, 6$) zeigte eindeutig, dass das zunehmende Ver-

mögen Wasser in der Molekülstruktur zu binden, ein wichtiger Aspekt für *anti-fouling* ist: Von EG₁OH bis zu EG₃OH nahm der Anteil von Fibroblasten, die befähigt waren die Wasserbarriere an der Grenzfläche zu durchdringen und eine Adhäsion zu dem jeweiligen Substrat herzustellen, ab. Auf dem EG₆OH-Substrat konnten keine haftenden Zellen mehr beobachtet werden. Die Adhäsionsstärke der haftenden Zellen nahm von EG₁OH bis hin zu EG₃OH um zwei Größenordnungen [32, 178].

Ähnlich wie OEG-Oberflächen weisen Polysaccharide die Fähigkeit zu Hydratation auf, wobei vor allem Hyaluron- und Alginsäure häufig untersuchte Klassen darstellen. Während HA (*engl.* Hyaluronic Acid) ein natürlich in Säugetierzellen vorkommendes Glykosaminoglykan ist, liegt AA (*engl.* Alginic Acid) hauptsächlich in diversen Algenzellen vor [179]. Die strukturell ähnlichen Polysaccharide sind in Abbildung 14 gezeigt. Alginsäure unterscheidet sich hierbei durch eine zusätzliche Carboxylgruppe von Hyaluronsäure. Die Carboxylgruppen, welche Wasserstoffbrückenbindungen intramolekular als auch zu Wassermolekülen eines Mediums ermöglichen, sind hierbei ein wichtiges Merkmal dieser Substanzklasse.

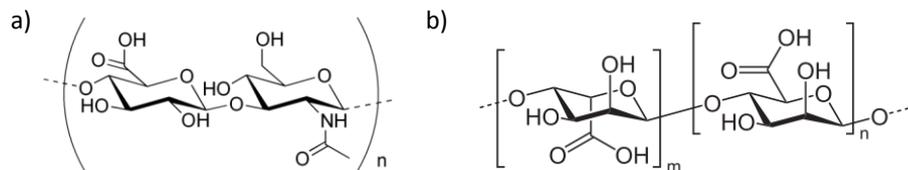


Abbildung 14: Strukturen der a) Hyaluronsäure und b) Alginsäure.

In Untersuchungen mit biologischen Systemen stellten sich die Polysaccharide in immobilisierter Form als gegen unspezifische Proteinadsorption resistente Oberflächen heraus [180]. Morra und Cassineli zeigten die Resistenz von Hyaluron- und Alginsäureoberflächen gegenüber fibroblastischen Zellen und Bakterien [63]. Ebenso zeigten Cao *et al.*, dass HA und AA immobilisiert auf Glas der Adhäsion hämatopoetischen Zellen widerstanden [180]. Die Resistenz gegenüber Biomolekülen und Zellen ist auf die starke Hydratisierung dieser Oberflächen zurückzuführen [181-182]. Diese wird zum einen durch strukturelle Effekte der Makromoleküle (intramolekulare H-Brückenbindungen: Sekundärstruktur [183]) in Lösung hervorgerufen, zum anderen spielen elektrostatische Wechselwirkungen eine große Rolle, da bedingt durch den physiologischen pH-Wert von 7,4 die Carboxylgruppen negative Ladung tragen und somit vermehrt die Möglichkeiten zu Wasserstoffbrückenbindungen gegeben sind [63, 184].

Im Hinblick auf die Wechselwirkung der Oberflächen mit marinen Organismen, ändert sich der Sachverhalt der Adhäsionsresistenz: Cao *et al.* zeigten, dass die analogen, zuvor gegen Protein und Zellen resistenten Polysaccharidoberflächen der Hyaluron und Alginsäure nicht das gleiche Resistenzverhalten, bezogen auf die Mikroorganismen *Ulva linza* (Algensporen) und *Balanus amphitrite* (Cypris-Larven der Seepocke), aufwiesen [180]. Ebenso wurde das fehlende Resistenzverhalten in Adhäsionsstudien mit Kieselalgen festgestellt.

Dieser Effekt in Medien hoher Salinität wurde bereits früh durch Grant *et al.* beschrieben und ist auf die hohe Calcium(II)-Ionen-Konzentration zurückzuführen [185]. Durch die Carboxylgruppen der Polysaccharide, die in mariner Umgebung ebenfalls deprotoniert vorliegen, können Calciumionen gebunden und in der Struktur eingelagert werden, worauf sich diese verfestigt (Synärese). Es entsteht ein dreidimensionales Netzwerk, bei welchem Calciumionen wie Eier in der Schachtel liegen, weshalb diesem System der Name „*egg-box*“-Modell zugesprochen wurde [185]. Als Folge dieser Strukturänderung wird die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen intramolekular wie auch zu den umgebenden Wassermolekülen und die damit einhergehende Hydratisierung des Systems verhindert. Mittlerweile ist diese aufklärende Studie durch andere, ebenfalls in Bezug auf marine Mikroorganismen, bestätigt worden [186-187]. Bauer *et al.* untersuchten hierbei die Adhäsionsstärken der marinen Bakterie *Cobetia marina*, der Diatomee *Navicula incerta* und der Grünalge *Ulva linza* auf Hyaluronsäureoberflächen mit durch Trifluoräthylamin (TFEA)-blockierten Carboxylgruppen und deren unblockierten Homologen. Durch die Einführung der hydrophoben TFEA-Einheiten wurde nicht nur die Bindung von Calcium-(II)-Ionen unterbunden, sondern den Polysacchariden zudem amphiphile Eigenschaften verliehen, welche bekanntermaßen hohes *anti-fouling* Potential besitzen [49, 139, 150-152]. In allen drei Fällen konnte gezeigt werden, dass sich die Hyaluronsäureoberflächen mit blockierten Carboxygruppen als bessere Option erwies: Die Adhäsionsstärke der verschiedenen marinen Mikroorganismen nahm auf dieser jeweils im Vergleich zur unblockierten HA-Oberfläche ab.

Wie sich die vorhandenen bzw. fehlenden Wasserstoffbrückenbindungen in OEG- bzw. HO-SAMs auf die in dieser Arbeit untersuchten Diatomeen *N. perminuta* und ihrer Haftstärke auswirken, wird im Kapitel 5.2 (S. 85) und Kapitel 5.4 (S. 95) beschrieben. Ebenso wird *N. perminuta* im Hinblick auf ihr Adhäsionsverhalten auf Hyaluron- und Alginsäureoberflächen und der Effekt von TFEA-blockierten Carboxygruppen auf die Algenzellen untersucht (Kapitel 5.5, S. 99).

2.3.3. Einfluss von Oberflächenladung

Die meisten Organismen besitzen im physiologischen Bereich eine negative Nettoladung [188]. Eine geladene Oberfläche hat somit bei einem hinreichend kleinem Abstand eine elektrostatische Wirkung auf geladene Organismen, sei es eine abstoßende oder anziehende. Vor allem pathogene Bakterien, die infektiöse Krankheiten verursachen können, werden auf geladenen Oberflächen breitgefächert untersucht [189-191]. Jansen und Kohlen beobachteten, dass Bakterien des Stammes *Staphylococcus epidermis* eine verminderte Adhäsion auf negativ geladenen Carboxylat-Polymerfilmen aufwiesen, wobei der direkte Vergleich mit entsprechenden entladenen Polymerfilmen gleicher Adhäsionsenthalpie erfolgte [192]. Dass die Adhäsion selbst jedoch nur den Initialschritt der Biofilmbildung darstellt und folglich die Relevanz im darauffolgenden exponentiellen Wachstum der Bakterien liegt [193], zeigen Arbeiten von Gottenbos *et al.*: Bakterienstämme verschiedener und gleicher Gattungen (gram-negativ, gram-positiv) adhärten

zwar am rapidesten auf positiv-geladenen Methacrylat-Oberflächen, jedoch war hier bei gram-negativen Stämmen das für die Biofilmbildung notwendige Wachstum unterbunden. Auf negativen und theoretisch auf Bakterien abstoßend wirkenden Methacrylat-Oberflächen war zwar die Adhäsionskinetik vermindert, die anschließende exponentielle Vermehrung von gram-negativen als auch gram-positiven Stämmen hingegen stark ausgeprägt [194].

Im Hinblick auf marine Mikroorganismen gab es die ersten Hinweise auf eine elektrostatisch induzierte Adhäsionsabnahme, als für Algensporen von *Ulva linza* eine verminderte Besiedlungsdichte für gemischte COOH/CH₃- verglichen mit OH/CH₃-SAMs gleichen Benetzungsgrades festgestellt wurde [45]. Es wurde die Entstehung einer Carboxylat-Terminierung und somit einer negativen Ladung der Oberflächen im Medium vermutet, die die negativ geladenen Algen abstieß. Gestützt wurde diese Hypothese durch den Vergleich der Besiedlung und Adhäsionsstärke dieser Grünalge auf Oberflächen gleicher chemischer Terminierung, aber unterschiedlichen netto-Ladungen (positiv, negativ und neutral). Die Zellen tendierten weniger dazu sich auf der negativen Oberfläche niederzulassen. Ein Vergleich der Adhäsionsstärken auf allen drei Oberflächen zeigte, dass die permanente Adhäsion auf den negativ geladenen weniger stark ausgeprägt war als auf ihren positiv geladenen bzw. neutralen Homologen [21]. Ein Beispiel dafür, dass der initiale Adhäsionsprozess, wie zuvor für Bakterien erwähnt, nicht unbedingt auch die Adhäsionsstärke bestimmt, liefert die Untersuchung von *Ulva linza* auf kationischen Oligopeptid-SAMs. Wie erwartet wurde an dieses Peptid-Substrat von einer großen Anzahl von Sporen besiedelt. Jedoch durchlief ein Großteil der Sporen nicht den regulären Adhäsionsweg- es lag annähernd durchgehend eine *Pseudobesiedlung* vor [64].

Zur theoretischen Erklärung dieser elektrostatischen Sachverhalte wird oft die DLVO-Theorie (nach Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) herangezogen, welche die Oberflächenenergie eines Substrats als ein Zusammenspiel von *van der Waals*-Wechselwirkungen und der Ausbildung einer elektrochemischen Doppelschicht betrachtet. Klassischerweise beschreibt die Theorie die Annäherung eines Kolloidteilchens an eine Oberfläche in Abhängigkeit vom Abstand der beiden Oberflächen zueinander und die dabei auftretende Änderung der freien Enthalpie (Gibbssche Energie). Die Anwendung dieser Theorie für Adhäsionen von Mikroorganismen an geladene Oberflächen ist begrenzt möglich [195]. Die Theorie ist zwar in der Lage eine Vorhersage über die Möglichkeit einer irreversiblen Adsorption zu treffen, betrachtet jedoch nicht die spezifischen Wechselwirkungen in sogenannten *short range* Abständen (< 1 nm), in der sich die eigentliche Adhäsion abspielt. Zudem ist die Anwendung dieser Theorie in Medien hoher Salzkonzentrationen umstritten [196].

Nichtsdestotrotz können wir zumindest die Ausbildung einer elektrochemischen Doppelschicht an der Grenzschicht zum Elektrolyten schematisch darstellen, da diese bei der Annäherung eines Mikroorganismus an ein geladenes Substrat eine wichtige Rolle spielt (Abbildung 15). Hierbei wird die mittlere Ausdehnung der Ladung des Substrats senkrecht zur Oberfläche durch den Abstand zur Oberfläche, der *Debye Länge*, aus-

gedrückt und beträgt in Elektrolytlösungen 0,1-10 nm. Sie variiert mit der Ladung des Substrats und der Art und Konzentration der Lösung. Meerwasser zum Beispiel hat eine hohe Salinität mit einer Ionenstärke von $\approx 0,7$ M und kann somit die Ladung des Substrats abschirmen (*Debye Länge* $1/\kappa$: 4 Å).

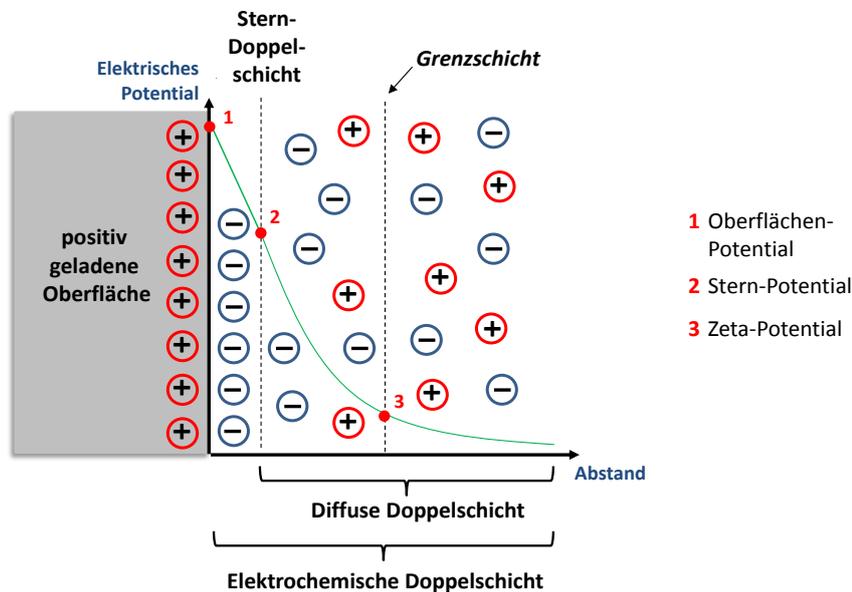


Abbildung 15: Ausbildung einer elektrochemischen Doppelschicht (Stern-Doppelschicht) bei Annäherung von Ladungsträgern an eine geladene Oberfläche. Sie besteht aus einer starren (nach Helmholtz) sowie einer diffusen Doppelschicht (nach Gouy-Chapman). In niedrig konzentrierten Elektrolytlösungen wird das Zeta-Potential dem Stern-Potential gleichgesetzt.

Die elektrochemische Doppelschicht beschreibt somit wie sich Ladungsträger in direkter (Stern-Doppelschicht) und unmittelbarer Nähe (diffuse Doppelschicht) eines starren Ladungsträgers (geladene Oberfläche) verhalten und sich damit das elektrische Potential ändert. Der maximale Wert für dieses Potential befindet sich an der Grenzfläche zur Oberfläche. Er sinkt zunächst über die Stern-Doppelschicht linear ab, bis er in der diffusen Doppelschicht mit zunehmender *Debye Länge* exponentiell abnimmt. Bewegt sich ein geladenes Teilchen in die Grenzschicht, so ändert sich dessen Potential durch die unmittelbare elektrostatische Beeinflussung der Oberfläche. Das dann bestehende Potential des Teilchens wird Zeta-Potential genannt und ist ebenfalls ein bedeutender Parameter für die Interaktionen von geladenen Substraten mit Mikroorganismen [21].

In Bezug auf biomedizinische und marine Fouling-Forschung sind vor allem zwitterionische Substrate durch ihre hervorragende Proteinresistenzigenschaften in den zentralen Blickpunkt des Interesses gerückt [67-68, 197]. Neben den hydrophilen Materialien wie PEG und Polysacchariden wird diese Materialklasse ebenso durch ihre starke Hydratisierung, in diesem Fall jedoch hervorgerufen durch starke elektrostatische Wechselwirkungen, charakterisiert [198]. Zwitterionische Oberflächen beinhalten gegensätzliche Ladungen in einem solchen Verhältnis, so dass sie nach außen hin elektrisch neutral sind.

Die Ladungen können sich in einer Molekülkette (auch Seitenketten) befinden oder in Form von negativ und positiv geladenen Molekülketten vorliegen (Abbildung 16) [65].

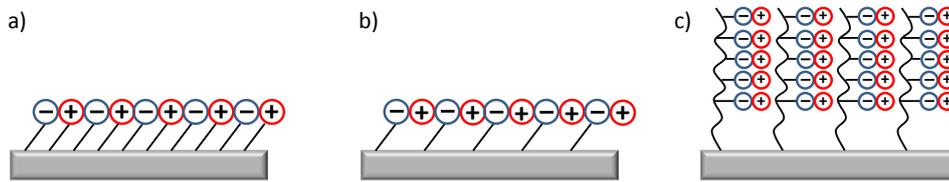


Abbildung 16: Mögliche Ladungsverteilungen bei zwitterionischen Oberflächen; a) gemischte SAMs mit negativen und positiven Molekülketten; b) Einkomponenten-SAMs mit jeweils einer positiven und negativen Ladung in einer Molekülkette; c) zwei entgegengesetzte Ladungen in jeweils einer Seitenkette.

Als Prototypen für zwitterionische Oberflächen haben sich Polycarboxy-, Polysulfo- und Phosphobetaine bereits in vielerlei Hinsicht für die Anwendung im biomedizinischen Bereich bewährt (Abbildung 17). Sie tragen sowohl die positive als auch die negative Ladung in einem Monomer. Im speziellen sind hier Polysulfobetainmethacrylat (pSBMA), Polycarboxybetainmethacrylat (pCBMA) und 2-Methacryloyloxyethyl-Phosphorylcholin (MPC) zu nennen [66, 68, 199-201]. Letztere ist biologisch deswegen interessant, da ihre Phosphorylcholin-Kopfgruppe in Form von Phospholipiden in Außenschichten von Zellmembranen für Biokompatibilität verantwortlich ist [202]. Ebenso weisen Carboxy- und Sulfofetaine, dessen Strukturen denen von Glycin-Betain bzw. Taurin ähneln, Biokompatibilität auf [203-205]. Glycin-Betain und Taurin besitzen im menschlichen Körper unter anderem wichtige Stoffwechselfunktionen [206-207].

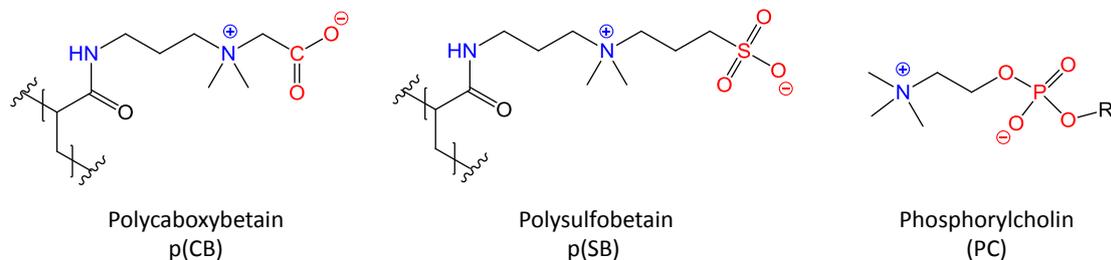


Abbildung 17: Strukturen von Polycarboxybetain, Polysulfobetain und Phosphorylcholin. Alle weisen naturnahe Strukturen auf, die ihnen ihre Biokompatibilität verleihen.

Ein Beispiel, dass humane Bakterien auf zwitterionische Oberflächen reagieren, lieferten Untersuchungen mit *S. epidermidis* (gram-positiv) und *P. aeruginosa* (gram-negativ) [208]. In der Gegenüberstellung von Adhäsionsstärken beider Gattungen auf langkettigen PolySBMA-Oberflächen, CH_3 -SAMs und Glas zeigte sich, dass auf dem zwitterionischen Substrat in Relation zu Glas 92 % bzw. 96 % weniger Zellen *S. Epidermidis* bzw. *P. aeruginosa* pro cm^2 adhärten.

Die Erforschung der zwitterionischen Materialklasse auf der marinen Biofoulingbasis gestaltet sich schwieriger. Im biomedizinischen Bereich erfolgen die Untersuchungen in physiologischen Medien, auch im Plasma oder Blutserum. Meerwasser als marines Medium birgt jedoch durch seine hohe Salinität diverse Herausforderungen. Da zum

Beispiel oft Langzeitexperimente notwendig sind, jedoch vor allem MPCs ähnlich zu PEG stark zur Hydrolyse neigen, haben obengenannte Verbindungen (pCBs, pSBs) ungeachtet ihrer hervorragenden Proteinresistenz in physiologischen Bereichen nicht allesamt *anti-fouling* Potential in mariner Umgebung. Jedoch haben sich gewisse Sulfo- als auch Carboxybetaine in Form von Polymersubstanzen auch in der Biofouling-Forschung bewährt. Zhang *et al.* verglichen innerhalb von 1-24 Stunden die Besiedlung und Adhäsionsstärke der Grünalge *Ulva linza* auf PolySBMA (immobilisiert auf Glas) mit der auf Glas und PDMS (Silastic T2, hydrophob). Es zeigte sich, dass die Besiedlungsdichte (Sporen/mm²) auf PolySMBA selbst nach 24 Stunden Inkubationszeit auf nicht mehr als 8 % Besiedlung relativ zu Glas anstieg. Im Anschluss an diese Experimente wurden die nach 6 h inkubierten und adhärenen Sporen in einem Abrissexperiment durch einen sogenannten Wasserjet [209] einer Scherströmung von 63 kPa ausgesetzt. Im Vergleich zur PDMS-Beschichtung, welche generell für ihre gute Antifouling-Leistung im Hinblick auf *Ulva* Sporen bekannt ist [210], erreichte auch hier das zwitterionische Substrat die besseren antiadhäsiven Resultate, 66,6 % der *Ulva*-Sporen wurden entfernt, vom PDMS-Substrat lediglich 17,8 % [67]. Analog dieser Vorgehensweise wurden die Diatomeen *N. perminuta* auf PolySMBA untersucht. Innerhalb von 1-24 Stunden waren, verglichen zu Glas, maximal 15 % der Algenzellen permanent an die zwitterionische Oberfläche adhärirt. Nach 8 Tagen Kultivierung adhärirten die Zellen nicht stärker an das Substrat, so dass bereits leichte Erschütterungen, wie der Transfer der Oberflächen zum Mikroskop, Ablösung und Klumpenformation der Kieselalgen zur Folge hatte [67] (Abbildung 18).

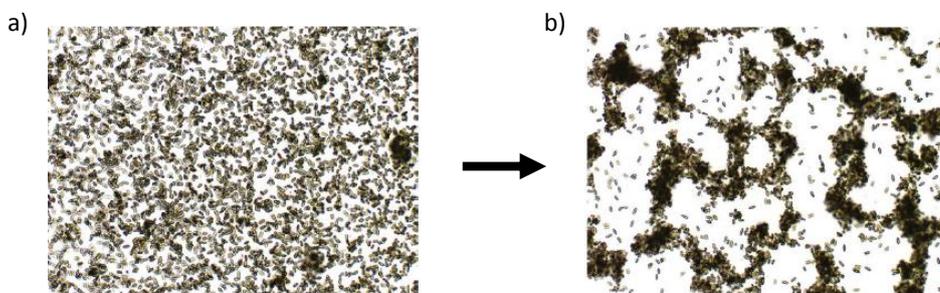


Abbildung 18: a) Kieselalgen nach 8 Tagen auf PolySBMA-Oberfläche; b) Klumpenformation der Kieselalgen nach leichten Bewegungen der Oberfläche aus (a) [67].

Um eventuelle Einflüsse auf die Motilität von Kieselalgen auf PolySBMA zu überprüfen wurde die Spezies *Craspedostaurus australis* verwendet. Es gab ein eindeutiges und offensichtlich durch die Ladungsverteilung verändertes Bewegungsmuster bzw. eine herabgesetzte Bewegungsbereitschaft: eine kleinere Anzahl an Zellen war fähig sich von der Gürtelband- in die Rapheposition umzuorientieren, welche jedoch für eine Kriechbewegung notwendig ist (Abbildung 9). Von 100 innerhalb 1 h beobachteten Kieselalgen konnten sich lediglich 18 fortbewegen (auf Glas bzw. PDMS ca. 64 von 100 Algen), wobei zudem nur 6 Zellen das übliche Fortbewegungsmuster zeigten [67]. Die unter dynamischen Bedingungen (0,54 Pa) auf pSBMA und pCBMA kultivierte Diatomee

Navicula incerta zeigte eine verminderte Biomassenakkumulation und Adhäsionsstärke auf pSBMA [51].

In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit die Haftstärke der Diatomee *N. perminuta* auf geladenen Oberflächen in Form von SAMs ($\text{N}(\text{Me})_3^+$ - und SO_3^- -Terminierungen) sowie entsprechend gemischte zwitterionische SAMs ($\text{N}(\text{Me})_3^+/\text{SO}_3^-$ -Terminierungen) in mikrofluidischen Adhäsionsstärkemessungen untersucht.

3. Material und Methoden

3.1. Präparation der Oberflächen

3.1.1. Chemikalien

Alkanthiole für die SAM-Präparation: Dodecanthiol (DDT), 11-Hydroxy-1-undecan-thiol (HUDT) und 11-Amino-1-undecanthiol (AUDT) wurden von *Sigma Aldrich* (St. Louis, MO, USA) bezogen. Hydroxy-PEG2000-thiol (PEG) von *Rapp Polymere GmbH* (Tübingen, Deutschland). 11-(Tridecafluorooctyloxy)-1-undecanthiol (FUDT), Hydroxy-(ethylene-glykol)-1-undecanthiol (EG₁OH), Hydroxy-tri-(ethylene-glykol)-1-undecan-thiol (EG₃OH) und Hydroxy-hexa-(ethylene-glykol)-1-undecanthiol (EG₆OH), 11-(Mer-captoundecyl)-*N,N,N*-trimethylammoniumchlorid (MUDT), und Natrium-11-(Mercapto-undecyl)-sulfonat (MUDS) stammen von *ProChimia Surfaces* (Sopot, Polen). Alle Thiole wurden ohne weitere Reinigung direkt verwendet.

Polysaccharid-Oberflächen: 3-Aminopropyltrimethoxysilan (APTMS, 99 %), 2,2,2-Tri-fluorethylamin (TFEA, 99,5 %), *N*-Hydroxysuccinimid (NHS 98 %) und Hyaluronsäure-Natriumsalz aus *Streptococcus equi* (HA) wurden von *Sigma Aldrich* bezogen. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC, ≥ 98 %) und Alginsäure-Natriumsalz aus Braunalgen (AA) stammen von *Fluka* (St. Louis, MO, USA). 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES, $\geq 99,5$ %) wurde von *Carl Roth* (Karlsruhe, Deutschland) erworben.

Kalibration: Die Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) stammte von *Sigma Aldrich*, die Carboxylsäure-funktionalisierten Polystyren-Mikrosphären (Polybead[®] Carboxylate Mi-crospheres, $4,42 \pm 0,17 \mu\text{m}$, 2,5 % (w/v) wässrige Suspension, $4,99 \times 10^8$ Partikel/ml) wurden von *Polysciences Inc.* (Eppelheim, Deutschland) erworben.

Lösungsmittel: Aceton *p.a.* stammt von *Fluka*. Ethanol *p.a.*, Ethylacetat (EE) und Toluol ($\geq 99,9$ %) wurden von *Sigma Aldrich* bezogen. Destilliertes Wasser wurde zusätzlich durch ein Milli-Q[®]-Plus System (*Millipore*, Schwalbach, Deutschland) gereinigt.

3.1.2. Selbst-Aggregierende-Monolagen (SAMs)

Die für die SAM-Herstellung notwendigen Gold-Substrate wurden von Georg Albert (PVD-Beschichtungen, Silz, Deutschland) gefertigt, wobei ultraglatte Floatglassubstrate (NexterionB[®], *Schott*, Mainz, Deutschland) für die Goldabscheidung verwendet wurden. Vor der thermischen Dampfabscheidung von polykristallinem Gold (30 nm, 99,99 % Reinheit) wurde zunächst eine 5 nm Schicht Titan als Haftvermittler aufgetragen. Die Beschichtungen erfolgten in einem Hochvakuum von 2×10^{-7} mbar und einer Ab-scheiderate von 0,5 nm/s. Die Rauigkeit der Goldsubstrate betrug im quadratischen Mittelwert 1 nm. Sie wurden bis zu ihrer Verwendung unter Argonatmosphäre gelagert.

Unmittelbar vor der SAM-Herstellung wurden die Goldsubstrate (Au-Substrate) zur restlosen Entfernung organischer Verunreinigungen zunächst 2 h mit UV-Licht (ozon-

erzeugend [211], 150 W Quecksilberdampfampe, Modell TQ150, *Heraeus Noblelight GmbH*, Hanau, Deutschland) und anschließend im Ultraschallbad (3 min in Ethanol *p.a.*) behandelt. Nach Abspülen mit Ethanol *p.a.* wurde jedes Substrat mittels Ellipsometrie vermessen. Im Anschluss wurden die Au-Substrate in die entsprechende 1 mmol Thiol-Lösung für einen Zeitraum von 24 h (im Fall von PEG 48 h) eingelegt. Nach der Einlegezeit wurden die Oberflächen mit Ethanol *p.a.* gespült und 3 min im Ultraschallbad in Ethanol *p.a.* behandelt. Nach Entnahme aus dem Ultraschallbad wurden sie wiederholt mit Ethanol *p.a.* abgespült, im Stickstoffstrom getrocknet und bis zu ihrer Verwendung unter Argon aufbewahrt (Abbildung 19).

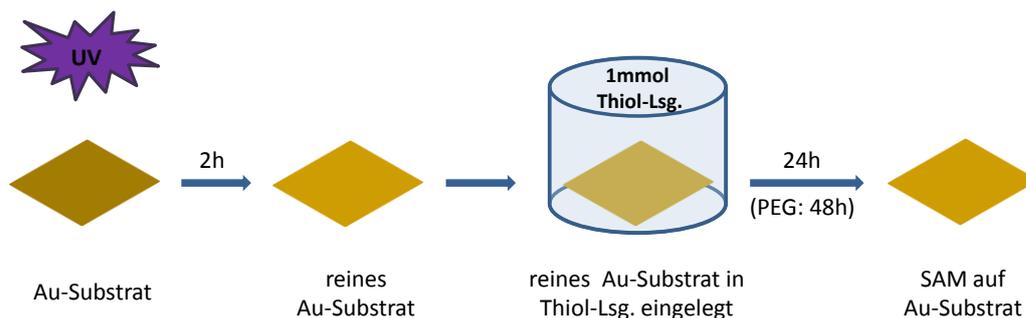


Abbildung 19: Prozedur zur SAM-Herstellung. Zunächst wird das Goldsubstrat (Au) gereinigt, worauf es anschließend in einer Thiolatlösung eingelegt wird.

3.1.3. Polysaccharid Oberflächen

Die Polysaccharid-Oberflächen wurden von Dipl. Chemikerin S. Bauer aus unserem Arbeitskreis präpariert und zur Verfügung gestellt. Abbildung 20 zeigt die zweistufige Prozedur zur Darstellung von immobilisierten Polysacchariden. Zunächst erfolgte die Kopplung von 3-Aminopropyltrimethoxysilan (APTMS) an NexterionB[®]-Glassubstrate, welche die Basis für die anschließende Immobilisierung von HA und AA darstellten.

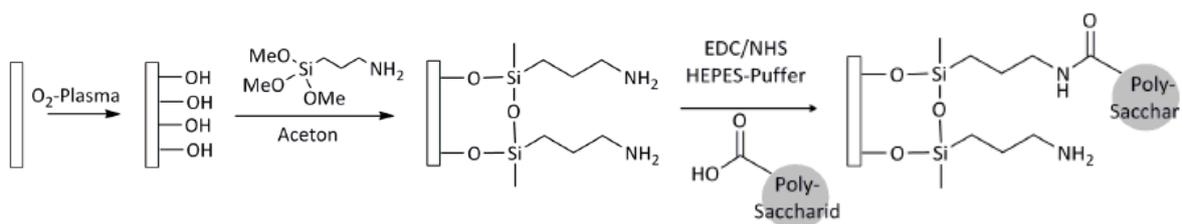


Abbildung 20: Reaktionsschema zur Aktivierung eines Glassubstrats im O₂-Plasma, Kopplung dieses mit APTMS und anschließende Funktionalisierung mit einem zuvor aktivierten Polysaccharid.

Hierzu wurden die Glassubstrate zunächst nacheinander jeweils 30 s in Toluol, Ethylacetat, Ethanol und Milli-Q[®]-Wasser im Ultraschallbad (Typ TRUSR070, Triton) gereinigt und anschließend im Stickstoffstrom getrocknet. Nachfolgend erfolgte die 3-minütige Aktivierung der Substrate im O₂-Plasma (Typ 100-E, *TePla*, Wettenberg,

Deutschland, 0,4 mbar, 150 W). Die aktivierten Proben wurden anschließend im Stickstoffstrom mit einer 5 %-Vol.-Lösung von APTMS in trockenem Aceton überschichtet. Die Kopplungsreaktion erfolgte bei Raumtemperatur über 30 min im Ultraschallbad. Anschließend wurden die Proben mit Aceton abgespült und für je 20 s im Ultraschallbad in Ethylacetat, Ethanol und Milli-Q[®]-Wasser gereinigt. Die mit Milli-Q[®]-Wasser abgespült und im Stickstoffstrom getrockneten Oberflächen wurden charakterisiert (Kontaktwinkel und spektrale Ellipsometrie) und unmittelbar weiterverwendet. Die folgende Immobilisierung der Polysaccharide mittels EDC/NHS-Kopplung erfolgte in Anlehnung an bekannte Protokolle [212-213]. Bei Raumtemperatur wurden Hyaluron- und Alginsäure in HEPES-Puffer (10 mM) unter starkem Rühren gelöst (1 mg/mL). Zu der Lösung wurden nach ca. 1,5 h NHS (0.01 M) gefolgt von EDC (0,05 M) gegeben und bei RT für 15 min weitergerührt. Anschließend wurden die aminofunktionalisierten Objekträger in einen Farbekasten gestellt und mit der aktivierten Lösung übergossen. Die Kopplung erfolgte innerhalb von 18 h bei Raumtemperatur auf einem Schütteltisch (60 rpm) und wurde durch Überschwemmen mit Milli-Q[®]-Wasser (8-faches Volumen der ursprünglichen Polysaccharid-Lösung) beendet. Zum vollständigen Entfernen nicht gekoppelter Polysaccharide sowie EDC und NHS-Resten blieben die Proben drei weitere Tage in Milli-Q[®]-Wasser (Schütteltisch, 60 rpm), welches täglich ausgetauscht wurde. Nach Entnahme wurden die Oberflächen mit Milli-Q[®]-Wasser abgespült und bis zur weiteren Verwendung in frischem Milli-Q[®]-Wasser aufbewahrt. Für die Charakterisierung wurde eine Probe aus dem Milli-Q[®]-Wasser entnommen, mit Stickstoff trocken-geblasen mit Hilfe des statischen Kontaktwinkels, Ellipsometrie und XPS vermessen.

Für die Prozedur zur Funktionalisierung der Polysaccharide wurde ein Teil der Proben nicht wie oben beschrieben nach drei Tagen aus dem Milli-Q[®]-Wasser entnommen, sondern direkt weiter mit Trifluorethylamin (TFEA) umgesetzt (Abbildung 21).

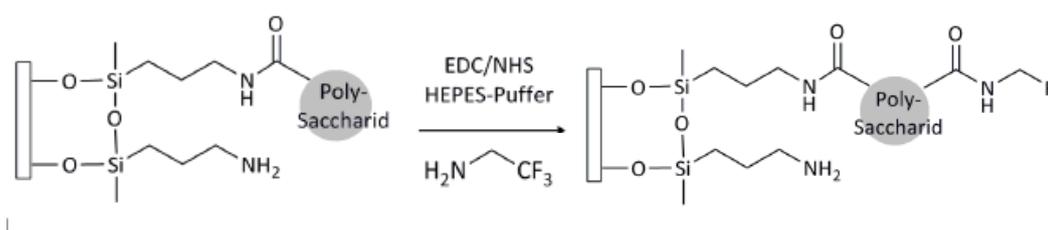


Abbildung 21: Reaktionsschema zur Funktionalisierung von Polysacchariden durch TFEA.

Hierzu wurde das Milli-Q[®]-Wasser aus dem Farbekasten entfernt und die Oberflächen mit einer aktivierten Lösung aus NHS (5 mM) und EDC (25 mM) in HEPES-Puffer (10 mM) überschichtet. Nach 15 min bei RT auf dem Schütteltisch (60 rpm) wurde das 2,2,2-Trifluorethylamin (TFEA) als HEPES-Lösung hinzugegeben (10 mM, $c(\text{TFEA}) = 40 \text{ mM}$). Die Kopplungsreaktion erfolgte bei RT über 18 h auf dem Schütteltisch (60 rpm) und wurde durch erneutes Überschwemmen mit Milli-Q[®]-Wasser (8-faches Volumen der aktivierenden Lösung) beendet. Bei täglichem Wasserwechsel wurden die

beschichteten Oberflächen weitere drei Tage in Milli-Q[®]-Wasser belassen. Nach Entnahme wurden die Oberflächen mit Milli-Q[®]-Wasser abgespült und bis zur weiteren Verwendung in frischem Milli-Q[®]-Wasser aufbewahrt. Die Charakterisierungen durch XPS, Messung des statischen Kontaktwinkels und der ellipsometrischen Schichtdicke erfolgten mit frisch aus dem Milli-Q[®]-Wasser entnommenen und im Stickstoffstrom getrockneten Proben.

3.1.4. Konditionierte Oberflächen

Die Oberflächen wurden nach Vorschrift eines kürzlich in unserer Gruppe etablierten Protokolls konditioniert [69]. Als Seewassermedium diente natürliches Seewasser (Atlantische Küste, entnommen am Versuchsgelände Raft des Florida Institute of Technology, Melbourne, Florida, USA, 27°53'59"N, 80°28'28"W). Bis zur Verwendung wurde das Wasser bei -80°C gelagert. Die SAMs wurden zunächst als 25 × 25 mm² große Stücke in 50 mL großen Breithalsflaschen in 5 ml selbst-gemischtem künstlichem Seewasser (vorgefiltert durch 0,22 µm, PVDF-Spritzenfilter, hohe Proteinadsorption: 125 µg/cm²) für 15 min eingelegt (Tabelle 1) [214]. Anschließend wurden zu dieser Lösung 20 ml des natürlichen Seewassers (vorgefiltert durch 0,45 µm, CA-Spritzenfilter, sehr geringe Proteinadsorption 3,8 µg/cm²) dazugegeben und die Oberflächen 48 h in dieser belassen. Die Lösung wurde anschließend mit 500 ml Milli[®]-Q-Wasser verdünnt, nach Entnahme vorsichtig mit Milli[®]-Q-Wasser abgespült und mit Stickstoff getrocknet. Die Charakterisierung erfolgte mittels spektraler Ellipsometrie und Kontaktwinkelmessungen.

Tabelle 1: Salze zum Anmischen von künstlichem Seewasser (ASW) nach Kester [214].

Salz	[g/l]
NaCl	23,926
Na ₂ SO ₄	4,008
KCl	0,677
NaHCO ₃	0,196
KBr	0,098
H ₃ BO ₃	0,026
NaF	0,003

3.1.5. Präparate für die Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM)

Auf ein 25 × 25 mm² großes, mit DDT-SAM beschichtetes Substrat wurden Tropfen einer *N. perminuta* Kultur gegeben und für 4 h inkubiert. Hierzu befand sich der SAM in einer 50 mL Breithalsflasche. Um die adhärennten Diatomeen anschließend zu fixieren, wurde die Probe für 1 h in einer 5%-igen Glutaraldehyd-Lösung (25 ml) eingelegt. Anschließend wurde die Aldehydlösung soweit abgenommen, dass die Oberfläche gerade noch vollständig mit Flüssigkeit bedeckt war. Vorsichtig wurde anschließend die verbliebene Lösung durch künstliches Seewasser (ASW) ausgetauscht (200 ml) und 15 min in diesem belassen. Anschließend erfolgte der Austausch mit einer Mischung von ASW/Milli[®]-Q-

Wasser (200 ml) im Verhältnis 50:50 und einer wiederholten 15-minütigen Inkubationsphase. Zuletzt wurde die Oberfläche 15 min in reinem Milli[®]-Q-Wasser (200 ml) inkubiert. Im letzten Schritt wurde die Probe mit Milli[®]-Q-Wasser abgespült, mit Stickstoff getrocknet und unter Argon aufbewahrt. Um die Probe für die Aufnahmen leitfähig zu machen, wurde diese mit einer dünnen Schicht Graphit (< 1 nm) besputtert (Hochvakuum-Beschichtungssystem, Typ MED020, *Bal-Tec AG*). Die Aufnahmen erfolgten schließlich mit einem LEO 1530 Mikroskop (*Zeiss*, Oberkochen, Deutschland). Die Elektronenenergie betrug 3 keV, der Detektor war ein SE2 Detektor.

3.2. Analytische Methoden

3.2.1. Lichtmikroskopie

Die gültigen physikalischen Grundlagen der Mikroskopie erarbeitete E. Abbe. Durch die gemeinsame Arbeit mit C. Zeiss, O. Schott und A. Köhler entstanden Ende des 19. Jahrhunderts die ersten Lichtmikroskope. Heutzutage ist die Lichtmikroskopie eine der wichtigsten Untersuchungsmethoden auf biologischem und medizinischem Feld.

Der grundlegende Bau eines Lichtmikroskops besteht aus einem zwei-Linsensystem, dem wechselbaren Objektiv und dem Okular. Je nach notwendiger Mikroskopieart (Auflichtmikroskopie, Durchlichtmikroskopie), welche abhängig von der Beschaffenheit der Probe ist, ändert sich der Strahlengang. Weiter kann in Hellfeldmikroskopie, Dunkelfeldmikroskopie und Phasenkontrastmikroskopie unterteilt werden. Welche dieser Beleuchtungsarten für das Mikroskopieren gewählt wird, wird von dem Eigenkontrastreichtum des zu untersuchenden Objekts bestimmt. Zudem muss die passende Vergrößerung gewählt werden, um das bestmögliche Ergebnis zu erzielen.

Abbildung 22 zeigt den vereinfachten Strahlengang eines zweistufig arbeitenden Mikroskops: das Objektiv erzeugt ein vergrößertes und reelles Zwischenbild, das anschließend durch das Okular betrachtet wird. Das Okular vergrößert hierbei zusätzlich das vom Objektiv erzeugte Bild, für die Auflösung ist jedoch allein das Objektiv verantwortlich.

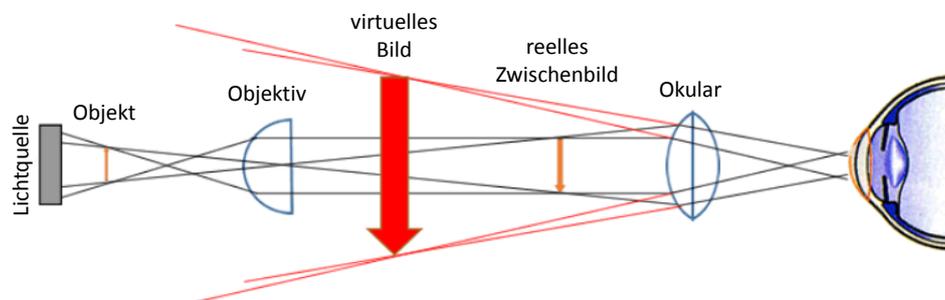


Abbildung 22: Vereinfachter Strahlengang eines zweistufig arbeitenden Mikroskops [215].

Die Auflösung eines Objektivs (Abstand d zwischen zwei Punkten des Präparats) kann durch folgende Formel berechnet werden. Sie hängt unter anderem von der Wellenlänge λ des verwendeten Lichts ab.

$$d = \frac{\lambda}{2 NA}$$

NA, die numerische Apertur, ist der wichtigste Faktor für die Leistungsfähigkeit (Auflösungsvermögen) eines Objektivs [216].

$$NA = n \sin(\alpha)$$

Die aufgeführte Definition der NA gilt nur, wenn sich Luft zwischen der Frontlinse des Objektivs und der Probe befindet. n ist der Brechungsindex des Mediums zwischen Objektiv und Präparat (Medium Luft: $n = 1$). α ist der halbe Öffnungswinkel (Aperturwinkel) des Objektivs. Es ist der Winkel des halben Lichtkegels, der die Frontlinse des Objektivs verlässt oder in dieses eintritt. Je größer dieser ist, desto höher ist somit die Auflösung (Abbildung 23).

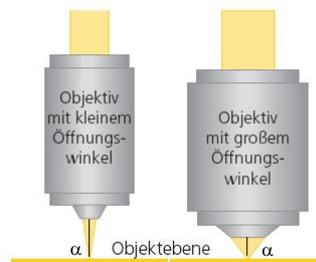


Abbildung 23: Halber Öffnungswinkel α von Objektiven [217]. Je größer der Öffnungswinkel ist, desto höher ist die Auflösung.

Das Mikroskop dieser Arbeit war ein inverses semi-automatisches Fluoreszenzmikroskop (TE-2000-U, *Nikon*, Tokio, Japan), welches in einem speziell angefertigten Inkubator aus transparentem Poly(methyl-methacrylat) (PMMA) positioniert war (Kapitel 3.4.1, Abbildung 32 c, S. 43). Die Aufnahmen erfolgten mit einer schwarz/weiß Kamera (2-Megapixel). Für die mikrofluidischen Adhäsionsstärkeuntersuchungen der Diatomeen wurde ein 10x-Phasenkontrastobjektiv (Ph1, *Nikon*, Tokio, Japan) mit einer numerischen Apertur von 0,25 verwendet.

3.2.2. Spektrale Ellipsometrie

Ellipsometrie ist ein optisch analytisches Verfahren, bei dem die Polarisationszustände eines auf eine Probe treffenden Lichtstrahls und dessen Reflektion gemessen werden [218-220]. Das Prinzip der ellipsometrischen Messung in Abbildung 24 schematisch dargestellt.

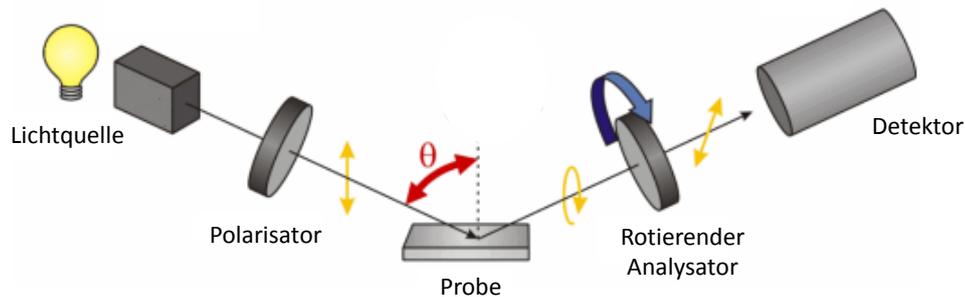


Abbildung 24: Funktionsweise eines Ellipsometers. Durch einen Polarisator linear polarisiertes Licht trifft unter einem bestimmten Einfallswinkel auf eine teilweise reflektierende Probe. Die durch die Reflexion entstandene elliptische Polarisation des Lichts wird mit einem rotierenden Analysator detektiert, das Intensitätssignal wird hierbei in ein elektrisches Signal umgewandelt. Abbildung wurde von [221] übernommen und angepasst.

Die polychromatische Lichtquelle sendet unpolarisiertes Licht aus, welches durch einen Polarisator zunächst linear polarisiert wird (in s- und p-Ebene). Dieses trifft anschließend im Einfallswinkel θ_1 auf die Probe und elliptisch polarisiertes Licht wird teilweise reflektiert, teilweise dringt es in das Material mit dem Brechungsindex n_2 ein. Die Transmission und Reflexion an einer Grenzfläche, welche zusätzlich noch einen darüber liegenden Film trägt, wird durch Abbildung 25 verdeutlicht. Der Brechungswinkel θ_2 lässt sich nach dem Snelliusschen Gesetz ($n_1 \sin\theta_1 = n_2 \sin\theta_2$) aus dem Einfallswinkel und den Brechungsindizes der beiden Medien berechnen.

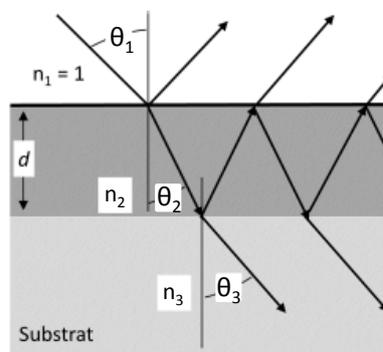


Abbildung 25: Modell von Reflexion und Transmission eines Filmes auf einem Substrat.

Bezüglich der Reflexion, macht man sich zunutze, dass s- und p-polarisiertes Licht unterschiedlich stark reflektiert wird. Diese Reflexion ist über den Brechungsindex materialabhängig. Gemessen wird die Phasenverschiebung Δ zwischen der s- und p-Komponente des einfallenden (δ_1) sowie des reflektierten Lichtstrahls (δ_2).

$$\Delta = \delta_2 - \delta_1$$

Gleichzeitig wird die Änderung der Intensität beider Komponenten und damit des Polarisationswinkels ψ bestimmt. Als Messgröße ist die Polarisationsänderung ρ des reflek-

tierten Lichts über die Frensel'schen Formeln in folgender Grundgleichung der Ellipsometrie zusammengefasst:

$$\rho = \frac{|R_P|}{|R_S|} = \tan\Psi e^{i\Delta}$$

$\tan(\Psi) = |R_P| / |R_S|$ ist dabei das Verhältnis der Amplituden vor und nach der Reflexion. R_P und R_S sind die totalen Reflexionskoeffizienten und ergeben sich als Summe aus den Frensel'schen Reflexionskoeffizienten r^p und r^s , separiert nach parallelem und senkrechtem Anteil.

$$R_P = \frac{r_{12}^p + r_{23}^p e^{-2i\beta}}{1 + r_{12}^p r_{23}^p e^{-2i\beta}}, \quad R_S = \frac{r_{12}^s + r_{23}^s e^{-2i\beta}}{1 + r_{12}^s r_{23}^s e^{-2i\beta}}$$

mit:

$$r^p = \frac{n_2 \cos \theta_1 - n_1 \cos \theta_2}{n_2 \cos \theta_1 + n_1 \cos \theta_2}, \quad r^s = \frac{n_1 \cos \theta_1 - n_2 \cos \theta_2}{n_1 \cos \theta_1 + n_2 \cos \theta_2}$$

Die gesuchte Schichtdicke d ist in der Formel für die Filmphasendicke enthalten:

$$\beta = 2\pi \frac{d}{\lambda} \sqrt{n_2^2 - n_1^2 \sin^2 \theta_1}$$

Bei der ellipsometrischen Methode werden somit keine absoluten Werte, sondern Verhältnisse und Differenzen gemessen. Die Interpretation erfolgt über Modellrechnungen, bei denen die Parameter (physikalisch interpretierbare Größen) der totalen Reflexionskoeffizienten solange an die experimentell zugänglichen Größen Δ und Ψ in einem Wellenlängenbereich angepasst werden, bis sie diese bestmöglich beschreiben. Dabei stellen diese Parameter die optische Konstanten (Brechungsindex n_2 und Extinktionskoeffizient k) und die gesuchte Schichtdicke dar. Grundsätzlich ist es möglich mit Hilfe von Ellipsometrie Brechungsindex und Schichtdicke einer Monolage gleichzeitig zu bestimmen. Bei sehr dünnen Filmen jedoch ($< 50 \text{ \AA}$), wie auch im Fall dieser Arbeit, muss zunächst der Wert eines Parameters angenommen werden, um den Wert des anderen zu erhalten [222]. Hierzu wurde als Brechungsindex n_2 für die Monolage 1,45 angenommen, da dieser im Bereich der geltenden Werte für Alkanthiole liegt (1,45 und 1,50) [223]. Speziell der wellenlängenabhängige Verlauf des Brechungsindex $n_2(\lambda)$ des Oberflächenfilms ist wichtig. Für transparente (nicht lichtabsorbierende) Proben ($k = 0$) wird dieser durch das Cauchy-Modell, welches auch in dieser Arbeit verwendet wurde, angenähert. Hierbei wurden die Cauchy-Parameter $A = 1,45$ und $B = 0,01$ eingesetzt und im Wellenlängenbereich zwischen 300 nm und 1000 nm gemessen.

$$n_2(\lambda) = A + \frac{B}{\lambda^2}$$

In der Praxis wird die Polarisationsellipse mit Hilfe eines rotierenden Analysators (Abbildung 24) durchgeföhren und als Intensitätsverteilung in Abhängigkeit des Analysatorwinkels gemessen. Das auf diese Weise erhaltene sinusförmige Lichtintensitätssignal wird detektiert, in ein elektrisches Signal umgewandelt und daraus die ellipsometrischen Winkel Δ und Ψ berechnet.

In dieser Arbeit wurden die optischen Eigenschaften der Filme mit einem M-44-Ellipsometer (*J. A. Woollam Co.*, Lincoln, NE, USA) bei konstantem Winkel (75°) bestimmt. Als Lichtquelle diente eine polychromatische Xenonbogen-Lampe. Schichtdicken wurden mit der Herstellersoftware WVASETM (*J. A. Woollam Co.*, NE, USA) unter Vorgabe des Brechungsindex ermittelt. Die angegebenen Schichtdicken stellen stets Mittelwerte aus drei Messungen dar, als Fehlerbereich werden $\pm 3 \text{ \AA}$ angegeben.

3.2.3. Kontaktwinkelmessungen

Eine Methode, die Aussagen über die Benetzung von Oberflächen liefert, ist die Kontaktwinkelmessung. Der Kontaktwinkel (Θ) ist dabei definiert als der Winkel, der sich zwischen der Oberfläche und der Tangente, die an der Oberfläche eines Flüssigkeitstropfens angelegt wird, bildet. In Abbildung 26 ist der direkte Zusammenhang des zu bestimmenden Kontaktwinkels (Θ) und den drei bereits in Kapitel (S. 15) angesprochenen Größen γ_s (Oberflächenenergie Festkörper), γ_l (Oberflächenspannung Flüssigkeit) sowie der Grenzflächenspannung zwischen Festkörper und Flüssigkeit (γ_{sl}) dargestellt. Der mathematische Zusammenhang dieser Größen wird unter Gleichgewichtsbedingungen über die Young-Gleichung beschrieben [224-225].



Abbildung 26: Schematische Darstellung eines Tropfens einer nicht vollständig benetzenden Flüssigkeit auf einer festen Oberfläche und der mathematische Zusammenhang der beschreibenden Größen.

Diese Gleichung ist nur dann erfüllt, wenn die Oberfläche ideal d.h. glatt, unelastisch, chemisch homogen, unlöslich und inert ist [226]. Der Kontaktwinkel wird mikroskopischer Kontaktwinkel genannt, da er von makroskopischen (mit dem bloßen Auge erkennbar) Strukturen der Oberfläche unbeeinflusst bleibt. Er hängt lediglich von Oberflächenchemie, Druck und Temperatur ab. Abbildung 27 illustriert die Benetzung einer glatten und homogenen Oberfläche. Bei Kontaktwinkeln von $0^\circ \leq \Theta \leq 90^\circ$ ist eine Oberfläche hydrophil. In einem Bereich von $90^\circ \leq \Theta \leq 150^\circ$ werden Oberflächen als hydrophob bezeichnet. Oberflächen mit Kontaktwinkeln von $150^\circ \leq \Theta \leq 180^\circ$ sind nicht benetzbar und werden superhydrophob genannt [227].

Der kleinste mögliche Kontaktwinkel ist 0° , d.h. die Oberfläche ist vollständig benetzt. Für den letzten Fall muss folgende Ungleichung zutreffen:

$$(\gamma_s - \gamma_{sl}) \geq \gamma_l$$

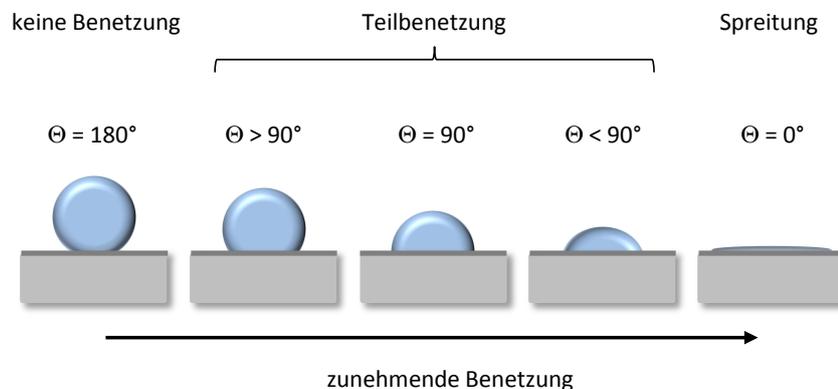


Abbildung 27: Zusammenhang von Kontaktwinkel und Benetzungsverhalten einer Oberfläche mit variierender Oberflächenenergie γ_s . Von links nach rechts nimmt die Oberflächenenergie des Substrats zu bzw. die Kohäsionskräfte des zu benetzenden Mediums ab (Kapitel 2.3, S. 15).

Beim nicht idealen Fall muss die Morphologie (Rauigkeit) einer Oberfläche bei der Kontaktwinkelmessung berücksichtigt werden [228]. Wenzel untersuchte bereits früh den Einfluss der homogenen Oberflächenrauigkeit auf den Kontaktwinkel [229]. Seine Resultate zeigten, dass der tatsächliche Kontaktwinkel (Θ_r) für mikroskopisch hydrophobe raue Oberflächen ($\Theta > 90^\circ$) mit zunehmender Rauigkeit anstieg, der hydrophobe Charakter somit verstärkt wurde. Umgekehrter Sachverhalt galt für hydrophile raue Oberflächen ($\Theta < 90^\circ$). Wenzel stellte diese Faktoren in folgender Grundgleichung zusammen:

$$\cos \theta_r = r \cos \theta$$

Der Rauheitsfaktor r stellt hierbei das Verhältnis zwischen der wirklichen Oberfläche (raue Oberfläche) und der geometrisch projizierten Oberfläche (glatte Oberfläche) dar. Θ ist der Young-Kontaktwinkel. Eine wesentliche Annahme seiner Studien war, dass die benetzende Flüssigkeit in die Vertiefungen der Oberfläche eindringt und die dort vorhandene Luft verdrängt (Abbildung 28, links). Busscher *et al.* korrigierten Wenzels Werte später auf $60^\circ > \Theta > 86^\circ$. Bei Oberflächen mit Kontaktwinkeln zwischen 60° und 86° ist kein Einfluss der Rauigkeit zu beobachten. Zudem erweiterten sie um die Aussage, dass die Auswirkung der Oberflächenrauigkeit verschwindend klein wird, wenn diese unter $0,1 \mu\text{m}$ sinkt [230].

Das Cassie-Baxter-Modell beschreibt das heterogene Benetzungsverhalten, bei dem die benetzende Flüssigkeit nicht fähig ist die Luft aus den Vertiefungen einer rauhen Oberfläche zu verdrängen. Nicht benetzte und benetzte Bereiche d.h. Flächenanteile des Festkörpers ($f_1 = f_{sl}$ mit dem Kontaktwinkel Θ_1) und die der Luft (f_2) müssten daher

separat betrachtet werden [231]. Dabei ist $f_2 = 1 - f_{sl}$ da $f_1 + f_2 = 1$. Nach Vereinfachungen und Kombination mit Wenzels Grundgleichung folgt daraus:

$$\cos \theta_r = r f_{sl} \cos \theta_1 - (1 - f_{sl})$$

Die Modelle von Wenzel und Cassie-Baxter lassen sich mit Hilfe von Abbildung 28 veranschaulichen.

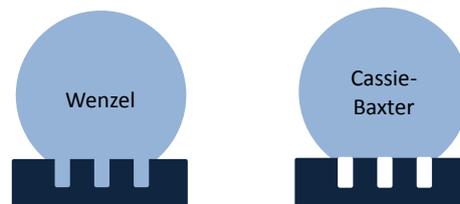


Abbildung 28: Veranschaulichung des homogenen Wenzel-Modells (Tropfen verdrängt die Luft und dringt somit in die Strukturen der Oberfläche ein) und des heterogenen Cassie-Baxter-Modells (Tropfen sitzt auf der strukturierten Oberfläche auf ohne die Luft zu verdrängen).

Weitere intensive Studien auf diesem komplexen Gebiet, auch im Hinblick auf die Biofouling-Forschung, folgten von Marmur: Er untersuchte die Kontaktwinkel von rauen Oberflächen unter anderem unter verschiedenen Neigungswinkeln [226, 232-235].

In dieser Arbeit wurden die Kontaktwinkel auf statische Weise mit einem speziell angefertigten Kontakwinkelmessgerät unter Raumbedingungen vermessen. Der Messvorgang verlief über eine Videobilddigitalisierung. Der auf die Oberfläche aufgesetzte Wassertropfen wurde nach Young-Laplace modelliert. Die bestimmten Kontaktwinkel stellen stets Mittelwerte aus drei Messungen an verschiedenen Stellen der Oberfläche dar. Neben der statischen Messung des Kontaktwinkels, der durch Aufsetzen eines bestimmten Tropfenvolumens nach Abklingen aller dynamischen Effekte ermittelt wird, erfolgt bei der dynamischen Untersuchung für Fort- und Rückschreitwinkel eine ständige Neubildung der Grenzfläche durch kontinuierliche Zunahme (maximaler Kontaktwinkel) oder Wiederaufnahmen des Tropfenvolumens (minimaler Kontaktwinkel) während der Messung. Die Differenz zwischen dem Fort- und dem Rückschreitwinkel wird als Kontaktwinkelhysterese bezeichnet [233, 236-237]. Die Bestimmung dieser beiden Winkel ist schwieriger als die des statischen Kontaktwinkels, sie erfassen jedoch eventuell vorhandene Heterogenitäten der Oberfläche. In der vorliegenden Arbeit sind statische Kontaktwinkel ($\pm 3^\circ$) angegeben, da alle Oberflächen homogen sind.

3.2.4. Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM)

Mit dem Rasterelektronenmikroskop ist es möglich Topographie und Morphologie einer Oberfläche mittels Elektronen (durch eine Glühkathode erzeugt), die durch Magnetlinsen zu einem feinen Elektronenstrahl gebündelt werden, abzutasten [238]. Mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops kann eine Vergrößerung bis zu 100 000 erreicht werden. Der Abrasterungsprozess findet im Ultrahochvakuum statt, um Wechselwirkungen mit

Fremdatomen oder -molekülen zu verhindern. Sobald ein Elektronenstrahl auf die Probenoberfläche trifft, werden die Elektronen abgebremst und geben dabei kinetische Energie an die Probe ab. Dadurch werden Sekundärelektronen (aber auch Rückstreuungselektronen, Augerelektronen und Röntgenstrahlung) von der Probenfläche emittiert. Beim REM werden in erster Linie die Sekundärelektronen als Signal verwendet. Diese werden durch einen Sekundärelektronendetektor registriert und verstärkt. Die Intensität des Signals ist dabei hauptsächlich von der mittleren Ordnungszahl der Atome im Material abhängig.

Das Auflösungsvermögen d eines Elektronenmikroskops ist wie beim Lichtmikroskop durch die Wellenlänge λ der verwendeten Strahlung, in diesem Fall der des einfallenden Elektronenstrahls vorgegeben. NA ist die numerische Apertur der Linse:

$$d = \frac{\lambda}{2 NA}$$

Die Wellenlänge des Elektrons lässt sich nach de Broglie ausdrücken:

$$\lambda = \frac{h}{p} = \frac{h}{\sqrt{2 m_e E_{kin}}}$$

h ist die Planck Konstante, λ die Wellenlänge, p der Impuls, E_{kin} die Energie und m_e die Masse des Elektrons.

Mit der verwendeten Elektronenenergie von 3 keV haben die Elektronen eine Wellenlänge von 0,0072 nm. Somit hat die Rasterelektronenmikroskopie im Gegensatz zu der Lichtmikroskopie (Wellenlängen des sichtbaren Lichts) den Vorteil durch die viel geringeren Wellenlängen der beschleunigten Elektronen eine weitaus höhere Auflösung zu erzielen.

In dieser Arbeit erfolgten die REM-Aufnahmen mit einem LEO 1530 Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Die Elektronenenergie (E_{kin}) betrug 3 keV (Beschleunigungsspannung $U = 3$ kV), der Detektor war ein SE2 Detektor. Die leitenden Proben für die Messungen wurden wie in Kapitel 3.1.5 (S. 32) beschrieben präpariert.

3.2.5. UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektroskopie bedient sich elektromagnetischer Strahlung im sichtbaren und ultravioletten Bereich. Je nach Spektrometer reichen die Messungen jedoch auch in den nahen Infrarot Bereich hinein. Es wird somit ein Wellenlängenbereich von 200 nm bis 1000 nm abgedeckt.

Wenn sichtbares Licht der Intensität I auf ein Medium trifft, so wird es um dI abgeschwächt falls das betroffene Medium zumindest eine Substanz, deren Valenzelektronen in dem eingestrahlten Wellenlängenbereich angeregt werden, enthält. Die Abschwächung der Intensität ist hierbei proportional zum durchlaufenen Weg ds , der

Konzentration c des Mediums und der eingestrahnten Intensität I des Lichts. Der Proportionalitätsfaktor $k(\lambda)$ ist der wellenlängenabhängige molare Absorptionskoeffizient. Die beschriebenen Parameter hängen folgendermaßen zusammen:

$$dI = -k(\lambda) I c ds$$

Nach Integration wird das Lambert-Beer Gesetz erhalten:

$$\frac{I_t}{I_0} = e^{-k(\lambda)cs} = 10^{-\varepsilon(\lambda)cs} \quad \rightarrow \quad -\log \frac{I_t}{I_0} = \varepsilon(\lambda)cs = A$$

I_t ist dabei die transmittierte und I_0 die eingestrahnte Intensität. ε ist der dekadische molare Absorptionskoeffizient. $\varepsilon(\lambda)cs$ lassen sich zu A , der Absorbanz, zusammenfassen. s ist Weglänge des Lichtstrahls durch die Probe, c die Konzentration Probe.

UV/Vis-Messungen werden in erster Linie zur Bestimmung von charakteristischen Absorptionen einer absorbierenden Substanz herangezogen (qualitative Analyse). Quantitative Untersuchungen sind z. B. Konzentrationsanalysen. Diese bedürfen eines bekannten Absorptionsmaximums der zu untersuchenden Substanz und die Zuhilfenahme von Kalibrierkurven. Zudem darf die Absorption nicht zu groß sein. In der Regel werden Verdünnungsreihen bekannter Konzentrationen erstellt, um auf diesem Weg unbekannte Konzentration der zu untersuchenden Substanz zu erhalten.

Im Fall dieser Arbeit wurden die Absorptionsmessungen für die qualitative Analyse angewendet. Zum einen erfolgte die einmalige Bestimmung der Absorptionsmaxima der Diatomeen in ihrem Kulturmedium. Anschließend folgte vor jedem mikrofluidischen Experiment eine Messung der optischen Dichte bei der Wellenlänge eines Maximums der stärksten Absorptionsbande ($\lambda = 444 \text{ nm}$).

3.3. Diatomeen Kultur

Die verwendete raphide Diatomee *N. perminuta* wurde von der Callow Gruppe (School of Biosciences, Birmingham, UK) bereitgestellt. Die Kieselalgen wurden im mit Nährstoffen angereicherten künstlichen Seewasser (*Instant Ocean*[®], ASW für *engl.* artificial seawater) wöchentlich kultiviert (1:10 Kultur/Medium). Das zuvor autoklavierte Medium (Guillard's F/2 Medium) wurde vor jeder Verwendung durch ein 0,22 μm Filter (PFEA, proteindurchlässig) gefiltert, um während des Autoklavierens entstandene Niederschläge abzutrennen. Zudem wurden durch die Filtrierung eventuell neu eingetragene bakterielle Verunreinigungen entfernt. Die Diatomeenkultur wurde in einem Temperaturschrank (*Snijders Scientific*, Tilburg, Niederlande) in 100 mL Erlenmeyerkolben bei 18°C in einem Tages/Nachtrhythmus von 16:8 h (Photonenflussdichte: 340 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) unter statischen Bedingungen kultiviert. Die Kolben waren durch einen luftdurchlässigen Cellulosestopfen verschlossen. Abbildung 29 a und b zeigt das Absorptionsspektrum der verwendeten Diatomeen im sichtbaren Bereich mit den Absorptionsmaxima (Chlorophyll

a und c) und das Emissionsspektrum bei der Anregungswellenlänge von 444 nm (Chlorophyll c). Eine repräsentative Wachstumskurve bei der entsprechenden Wellenlänge (optische Dichte: OD_{444}) der Diatomeenkultur über 13 Tage zeigt Abbildung 29 c [239]. Hierzu wurden sieben Kulturen angesetzt. Für jeden der sieben Messpunkte der OD wurde jeweils eine Kultur verwendet. Die Algenzellen wurden vor den Messungen durch wenige Sekunden Ultraschall vom Boden des Erlenmeyerkolbens gelöst.

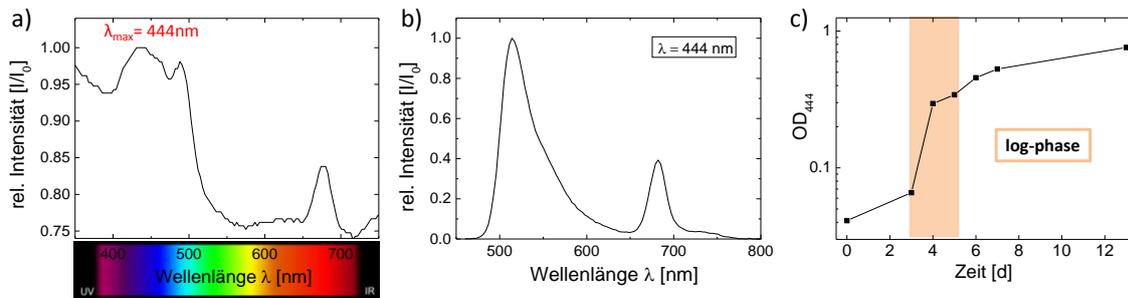


Abbildung 29: a) Absorptionsspektrum der Diatomee *N. perminuta*; b) Emissionsspektrum bei einer Anregungswellenlänge von 444 nm; c) Wachstumskurve der verwendeten Diatomeenkultur innerhalb von 13 Tagen ($\lambda = 444\text{ nm}$). Die farbliche Hervorhebung in c illustriert die exponentielle Wachstumsphase der Diatomeen (*engl.* log phase).

Abbildung 30 verdeutlicht das Erscheinungsbild der *N. perminuta* anhand von Lichtmikroskopaufnahmen verschiedener Vergrößerung.

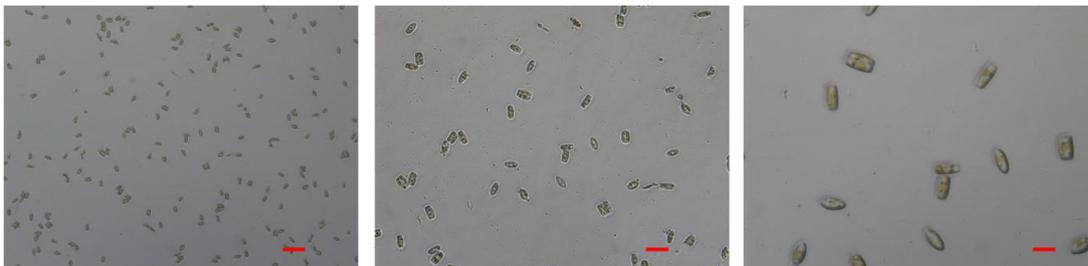


Abbildung 30: Lichtmikroskopieaufnahmen von *N. perminuta* (Hellfeld, DIC, Nikon 90i): a) 10-, b) 20-, c) 40-fache Vergrößerung. Skala: 40 μm in (a), 20 μm in (b) und 10 μm in (c).

Für die mikrofluidischen Adhäsionsexperimente wurden die Algenzellen durch wenige Sekunden Ultraschall vollständig vom Boden des Erlenmeyerkolbens gelöst. Die optische Dichte (OD_{444}) der Algenzellensuspension, gemessen mit einem Photometer (Du-70, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland), betrug stets zwischen 0,3-0,4. Dies entsprach einer Zelldichte von $\approx 10^6$ Zellen/ml, was durch manuelles Zählen mit Hilfe einer Neubauer-Zellkammer bestimmt wurde. Die Algenzellen wurden ohne weitere Vorbehandlung für die mikrofluidischen Adhäsionsmessungen eingesetzt.

3.3.1. Guillard's F/2 Medium

Die Zusammensetzung des in dieser Arbeit verwendeten Mediums basierte auf dem Rezept von Guillard & Ryther (1962, [240]), wurde jedoch nach einer Vorschrift der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Callow und Dr. M. Callow (School of Biosciences, Universität Birmingham, UK) modifiziert. Der Unterschied zu der Original-Rezeptur bestand in der Verwendung von künstlichem Seewasser, welches aus einem Salzgemisch (*Instant Ocean*[®]) und Milli-Q[®]-Wasser angemischt wurde. Die Zugabe der Zusätze zum künstlichen Seewasser ergab schließlich das Guillard F/2 Medium (siehe Anhang 8.3).

3.4. Mikrofluidisches Scherkraft-Setup

3.4.1. Das Kanalsystem

Adhäsionsstärkemessungen von *Navicula perminuta* wurden mit einem in unserer Arbeitsgruppe entwickelten mikrofluidischen Setup durchgeführt [32-34, 36, 178]. Der Aufbau dieses Setups bestand aus vier baugleichen Kanalsystemen, auf deren einzelne Elemente in Abbildung 31 eingegangen wird.

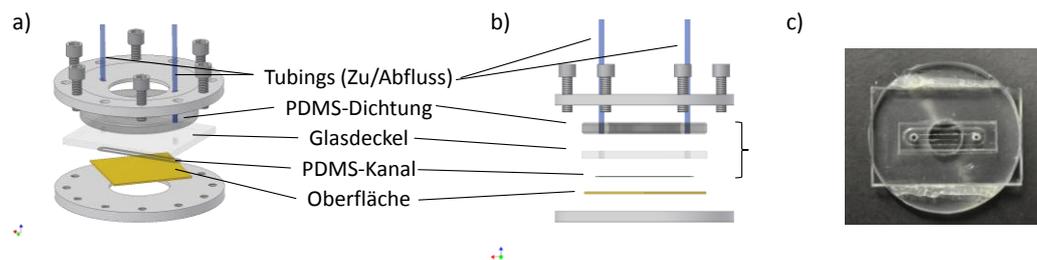


Abbildung 31: a) Einzelteile eines Kanalsystems; b) Seitenschnitt zur Verdeutlichung des Tubingverlaufs; c) Ausrichtung eines Kanals auf dem Glasdeckel, welches zuvor mit dem PDMS-Ring verklebt wurde.

Jedes einzelne Kanalsystem bestand aus einem aus Polydimethoxysiloxan (PDMS, Sylgard 184; *Dow Corning*, Midland, MI, USA) gefertigten Kanal mit den Dimensionen $13 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 150 \text{ }\mu\text{m}$ (Länge, Breite, Höhe). Dieser wurde mit Hilfe von Ethanol auf einem Glasdeckel ($20 \times 30 \times 2 \text{ mm}$) mit zwei gebohrten Löchern (13 mm Abstand, im Anschluss an die Bohrungen getempert) in der Weise ausgerichtet, dass die Bohrungen für Ab- und Zulauf mit diesem übereinstimmten (Abbildung 31 a-c). Der Innendurchmesser (ID) der verwendeten Tubings (Polyfluoroalkoxy, *VICI AG*, Schenkoon, Schweiz) betrug an den unmittelbaren Zu- und Ablaufstellen des Kanalsystems $1/16''$ (AD/ID $1,5/1 \text{ mm}$). Diese gingen an der Anschlussstelle in $1/8''$ Tubings (AD/ID $3,2/1,59 \text{ mm}$) über (Detailaufnahme Abbildung 32 b). Die größeren Durchmesser der $1/8''$ Tubings sorgten hierbei für einen geringeren Druckabfall. Die Tubings wurden in die Aussparungen für Zu- und Abfluss der elastischen PDMS-Dichtung geführt und trafen jeweils auf die gebohrten Zu- und Abflussbohrungen des Glasdeckels (Abbildung 31 b). Um das exakte Zusammentreffen der Zu- und Abflussbohrungen von Glasdeckel und PDMS-Ring zu gewährleisten, wurden diese Komponenten zuvor durch einen lösungsmittelfreien

Klebstoff (Pattex Repair Extreme, *Henkel*, Düsseldorf, Deutschland) zusammengefügt (Abbildung 31 c). Schließlich wurde jedes der vier *sandwich*-artigen Systeme durch jeweils drei Schrauben an eine Mikroskop-Objektisch-Einsetzplatte, mit jeweils runden Aussparungen für den Strahlengang (Sichtfenster), befestigt. Die zu untersuchenden Oberflächen lagen hierbei exakt auf der runden Aussparung als unterste Glieder des Systems auf. Sie waren $25\text{ mm} \times 25\text{ mm}$ groß und resultierten aus einem jeweils in drei Stücke gebrochenen, großen $75\text{ mm} \times 25\text{ mm}$ beschichteten Substrat (Kapitel 3.1, S. 29). Die Einsetzplatte wurde schließlich in ein inverses Mikroskop (TE-2000-U, *Nikon*, Tokio, Japan) montiert (Abbildung 32 c). Die Tubings wurden mittels Tesafilm am Mikroskop-Objektisch (xy) befestigt und so vor mechanischen Schwingungen geschützt.

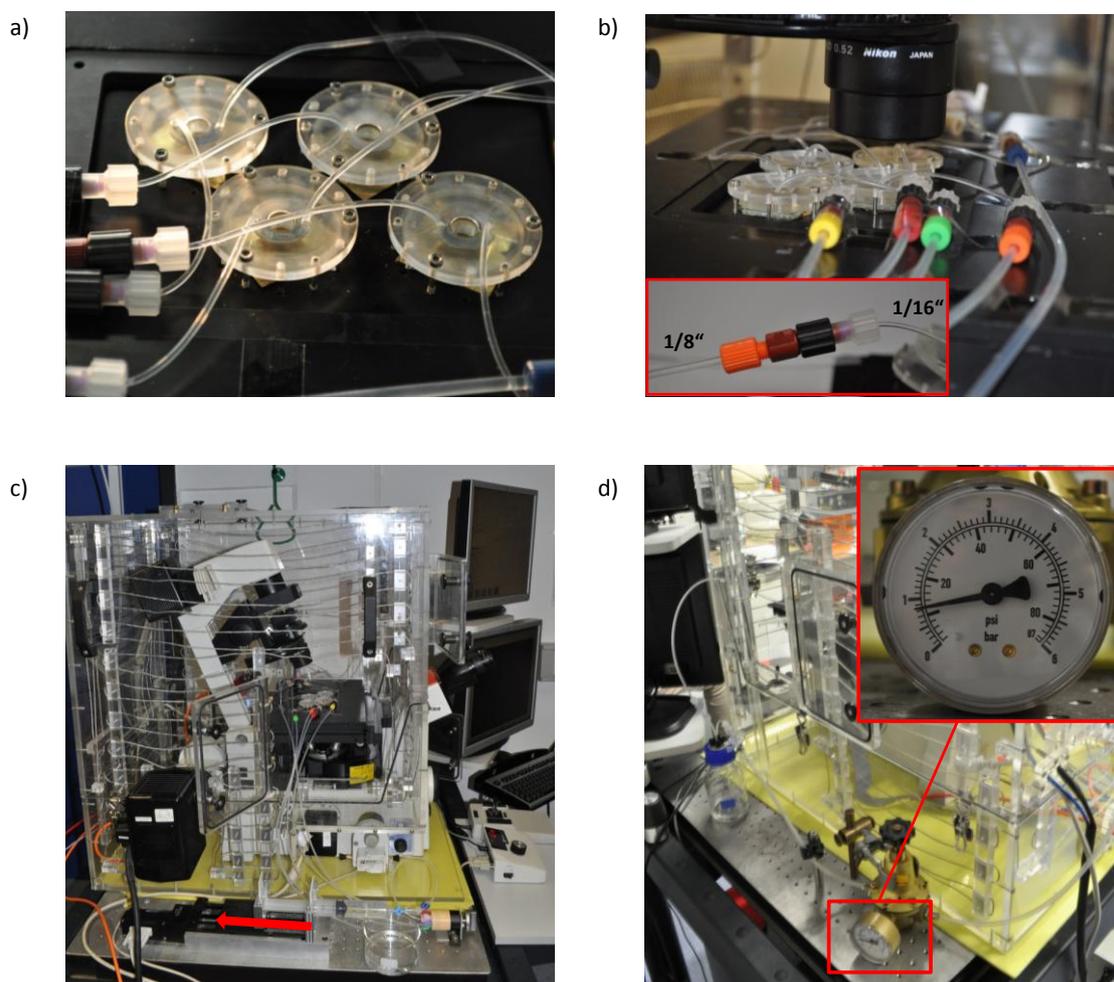


Abbildung 32: a/b) Vier auf eine (herausnehmbare) Objektisch-Einsetzplatte montierte Kanalsysteme; in b) zusätzliche Detailaufnahme der 1/16"- und 1/8"-Tubing-Verbindung; c) mikrofluidischer Aufbau unter dem Mikroskop mit Pumpe (roter Pfeil) und mit Überdruck verbunden (d). Das Mikroskop war in einem Inkubator platziert.

3.4.2. Ausführung des Abriss-Experiments

Nach Platzierung des Kanalsystems im Mikroskop (Abbildung 32 c) wurden zunächst die Tubings für den Zu- bzw. Abfluss mit dem Medium-Reservoir bzw. mit der Pumpe (PI, *Physics Instruments GmbH & Co.KG*, Karlsruhe, Deutschland), welche den Fluss generiert, verbunden (Abbildung 33). Diese wurde extern über ein Programm (Micromove[®]) gesteuert. Zudem wurde an das Medium-Reservoir ein Überdruck (N₂) von 0,7 bar angelegt, um den unweigerlich durch den begrenzten Durchmesser der Tubings entstehenden Druckabfall zu kompensieren. Vor jedem Experiment wurde das System mit dem zu verwendenden Medium (steriles ASW im Fall der Diatomeen-Messungen) gespült, um Luftansammlungen zu entfernen und das System zu hydratisieren. Anschließend wurde per Spritze über einen Verteiler (Upchurch 7-Port (P-150), *IDEX Health Science LLC*, Oak Harbor, USA) eine frisch gevortexte Diatomeensuspension gleichmäßig in alle vier Kanäle injiziert. Um einen idealen Druckausgleich zwischen Spritze und Druckreservoir zu gewährleisten und um sicherzustellen, dass zu Beginn des Experiments keine Druckschwankungen auftreten, wurde das System während der Inkubationsphase unter 0,7 bar Überdruck im „by pass“ Modus, eine außerhalb der Kanäle verlaufende Tubingverbindung zwischen Selektor und Verteiler, belassen.

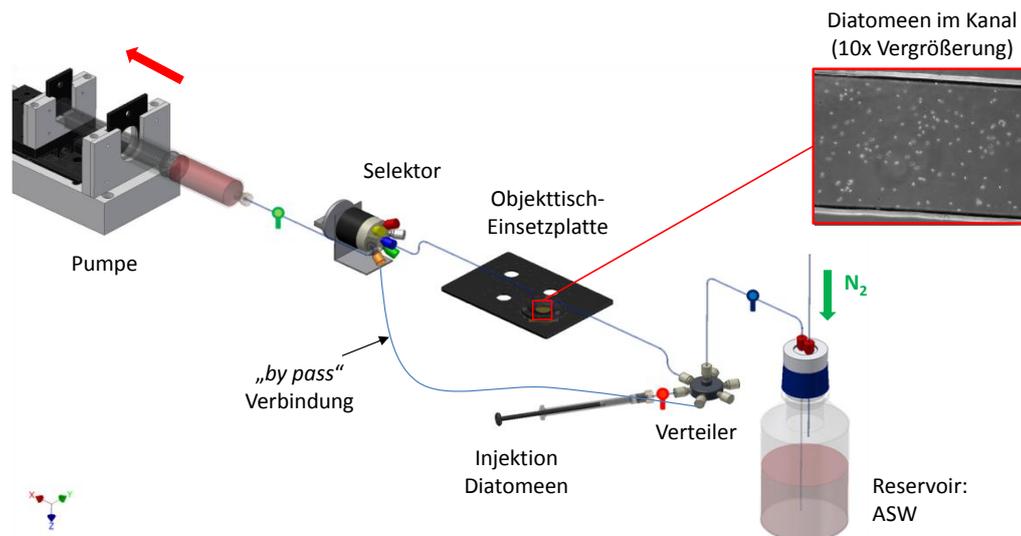


Abbildung 33: Schematische Darstellung des mikrofluidischen Systems. Zur Übersicht ist nur eines von vier Kanalverläufen gezeigt.

Auf die Inkubationszeit folgte das Abriss-Experiment, indem durch den Selektor (Valco Cheminert C25-3186, *VICI AG*) der jeweilige Kanaldurchgang geöffnet und die Pumpengeschwindigkeit stufenweise (5 s, siehe folgendes Kapitel) erhöht wurde. Der Abrissprozess wurde dabei mit digitaler Mikroskopie (TE-2000, *Nikon*, ein Bild pro Sekunde) mit einer 10-fachen Vergrößerung durch ein Phasenkontrastobjektiv (NA: 0,25, Ph1) verfolgt. Das Sichtfeld lag hierbei jeweils in der Mitte des Kanals und umfasste $1001 \times 750 \mu\text{m}$.

Nach Durchführung der Experimente wurden zunächst die Kanaldimensionen mediumfrei unter 0,7 bar Überdruck vermessen. Zur Bestimmung der Kanalbreite wurde ein 4x-

Phasenkontrastobjektiv (NA: 0,13, PhL) eingesetzt, für die Kanalhöhe ein 20x-Phasenkontrastobjektiv (NA: 0,45, Ph1). Durch den auf die elastischen Kanäle verursachten Druck beim Zusammenfügen des Systems bzw. herstellungsbedingten Schwankungen lagen die Kanaldimensionen in der Regel in Größenordnungen von $13 \text{ mm} \times 0.9 \text{ mm} \times 140 \text{ }\mu\text{m}$ (Länge $\pm 0,01 \text{ mm}$, Breite $\pm 0,1 \text{ mm}$, Höhe $\pm 20 \text{ }\mu\text{m}$). Anschließend wurde das gesamte mikrofluidische System mit Milli-Q[®]-Wasser und Ethanol *p.a.* gespült. Nach dem Ausbau der PDMS-Kanäle aus dem System wurden diese wiederholt mit Ethanol *p.a.* abgespült und für 1 h in Extran (1 % ig in Milli-Q[®]-Wasser) eingelegt, um Zellüberreste zu entfernen. Bis zur nächsten Benutzung wurden die Kanäle in Milli-Q[®]-Wasser aufbewahrt und unmittelbar vor Benutzung mit *iso*-Propanol gespült.

3.5. Mikrofluidische Scherkraft-Assay

3.5.1. Laminare Strömung und Reynoldszahl

Das Strömungsverhalten von Flüssigkeiten mit der Geschwindigkeitskomponente u in x -Richtung lässt sich anhand des Verhältnisses von Trägheitskraft zu den auftretenden Reibungskräften beschreiben [241]. Die Trägheitskraft ist definiert als:

$$\text{Trägheitskraft} = \rho \frac{du}{dt} = \frac{du}{dx} \times \frac{dx}{dt} = \rho u \frac{du}{dx}$$

Sie ist somit proportional zur Dichte ρ des Fluids und abhängig von Raum x und Zeit t . Die Reibungskraft ist die Änderung der Scherströmung des Fluids:

$$\text{Reibungskraft} = \frac{\partial \tau}{\partial y} = \mu \frac{\partial^2 u}{\partial y^2} \quad \text{mit} \quad \tau = \mu \frac{du}{dy}$$

Die Reibungskraft ist proportional zur Viskosität μ und an verschiedenen Raumpunkten unabhängig von der Zeit.

Überwiegt die Trägheitskraft, so bezeichnet man die Strömung als turbulent. Es kommt zur Ausbildung von Wirbeln, hervorgerufen durch räumlich und zeitlich zufällige Bewegungen der Fluidteilchen (Querströmungen). Sind die Reibungskräfte größer, so spricht man von einer laminaren Strömung. Kennzeichen dieser ist, dass die Flüssigkeit in parallelen Schichten fortbewegt wird, ohne dass es zu einer Durchmischung dieser Schichten kommt.

In den in dieser Arbeit verwendeten mikrofluidischen Kanälen herrschten für alle erreichten Scherströmungen τ laminare Bedingungen (Abbildung 34). Dass die theoretisch berechneten Scherströme den experimentell erreichten entsprechen, wurde in vorherigen Arbeiten durch Messungen des Flussprofils parallel zur Oberfläche mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie bestätigt [178].

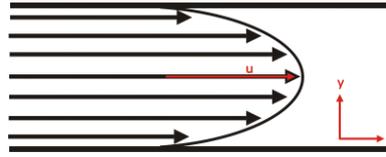


Abbildung 34: Geschwindigkeitsprofil und Strömungsbahnen einer laminaren Strömung. Die Strömungsbahnen verlaufen parallel zueinander. u ist die Geschwindigkeitskomponente in x -Richtung.

Trifft die Strömung auf z. B. adhärenzte kugelrunde Volumenelemente mit dem Durchmesser d , so werden diese von der laminaren Strömung mit der Geschwindigkeit u umflossen (Abbildung 35).

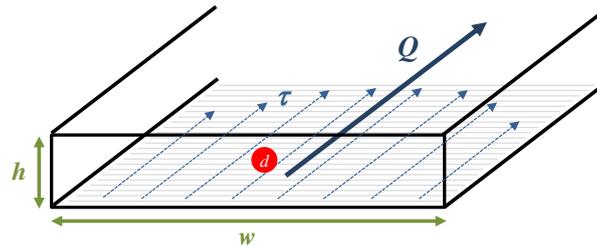


Abbildung 35: Schematische Darstellung eines adhärenzten Volumenelements mit Radius d in einer laminaren Strömung innerhalb eines parallelen Kanals mit Höhe h und Breite w . Die Strömungsbahnen verlaufen nach Umströmung des Volumenelements weiterhin parallel.

u ist hierbei proportional zur Anströmungsgeschwindigkeit v ($v = Q/h \times w$), der Geschwindigkeitsgradient $\partial u/\partial x$ ist proportional zu v/d und $\partial^2 u/\partial y^2$ proportional zu v/d^2 . Damit wird das Verhältnis von Trägheitskraft zu Reibungskraft:

$$\frac{\text{Trägheitskraft}}{\text{Reibungskraft}} = \frac{\rho u \partial u/\partial x}{\mu \partial^2 u/\partial y^2} \sim \frac{\rho v^2/d}{\mu v/d^2} = \frac{\rho v d}{\mu} = Re_e$$

Diese Gleichung beschreibt die dimensionslose Reynoldszahl in Bezug auf die Umströmung von kugelrunden Widerstandskörpern des Durchmessers d durch ein Fluid mit dem Volumenstrom Q bzw. Anströmungsgeschwindigkeit v , der Viskosität μ und der Dichte ρ .

3.5.2. Berechnung der Scherströmung τ

Die in den Kanälen während des Experiments erzeugte Wandscherströmung τ ließ sich nach dem Poiseuille Modell für rechteckige Flusskanäle berechnen [26].

$$\tau = \frac{6Q\mu}{h^2w}$$

Hierbei ist Q die Flussrate bzw. Volumenstrom (ml/min), μ die Viskosität des Mediums (ASW als künstliches Meerwasser und PBS: $\approx 10^{-3} \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei 20°C), h die Kanalhöhe

(*engl.* height) und w die Kanalbreite (*engl.* width). Diese vereinfachte Formel ist in Übereinstimmung mit komplexeren Beschreibungen paralleler Flusskammern [29].

Ein Beispiel für die stufenweise (5 s-Schritte), exponentielle Erhöhung der Pumpengeschwindigkeit (mm/s) ist in Abbildung 36 gezeigt. Die stufenweise Beschleunigung der Pumpe ging mit einer Erhöhung des Volumenstroms Q ([ml/min], rechte Ordinate) bzw. der Scherströmung τ ([dyn/cm²], linke Ordinate) im Kanal einher. Dabei lagen die Volumenströme im Bereich von 300 nl/min bis 81 ml/min und entsprachen Scherströmungen innerhalb sechs Größenordnungen. Durch die Kanaldimension und den unterstützenden Überdruck war es so möglich Scherströmungen bis zu 5500 dyn/cm² zu erzeugen, ohne die Laminarität zu beeinträchtigen.

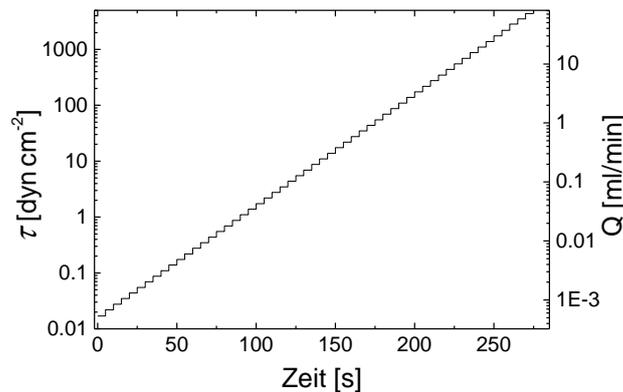


Abbildung 36: Illustrierung der stufenweisen (5 s-Schritte) Erhöhung der Scherströmung τ über die Zeit des Experiments. Abbildung 36 zeigt die 26 %/5 s-Rampe.

Auch für den maximalen Volumenstrom von $Q_{\max} \approx 81$ ml/min ($v_{\max} = Q_{\max}/h \times w = 9$ m/s) und die maximalen Kanaldimensionen von 1 mm x 150 μ m ($w \times h$), betrug die Reynoldszahl $R_e \approx 1300$ und lag somit noch im laminaren Bereich [242-243]. Für laminare Strömungen gilt im Allgemeinen $R_e < 2200$. In der unten aufgeführten Berechnung wird angenommen, dass sich die Viskosität μ und Dichte ρ des künstlichen Seewassers (ASW) bei 20°C nicht von den Werten des natürlichen Seewassers unterscheiden ($\mu = 1,07 \times 10^{-3}$ kg/m s, $\rho = 1,02 \times 10^3$ kg/m³) [244].

$$R_e = \frac{\rho v_{\max} h}{\mu}$$

Wie schnell die Pumpe die maximale Scherströmung erreichte, konnte durch Selektion eines entsprechenden Scherströmungsrate-Programms gewählt werden. In dieser Arbeit wurden Scherströmungsrate von 8 %, 26 %, 52 % und 90 % pro 5 s getestet (Abbildung 37). Die Prozentangabe bezieht sich dabei stets auf die Erhöhung des Scherströmungswertes der jeweils vorherigen Stufe. Die Anfangs- bzw. Endscherströmungsgeschwindigkeiten der vier Scherströmungsrate waren annähernd gleich (abhängig von Kanaldimensionen). Lediglich die Anzahl der 5 s-Schritte, in der die Maximalscherströmungen erreicht wurden, variierte bzw. nahm von 90 % bis 8 % zu (ersichtlich an der Punktwert-

anzahl der einzelnen Scherrampen). Dies resultierte in unterschiedlichen Abrissexperimentdauern von 1,67 min bis 13,5 min. Zudem ist aus Abbildung 37 ersichtlich, dass bei den einzelnen Scherströmungsraten analoge Flussgeschwindigkeiten jeweils unterschiedlich schnell erreicht werden (Schnittpunkt der Scherrampen mit gestrichelter Linie bei z. B. 100 dyn/cm^2 zeigt die entsprechend unterschiedliche Dauer).

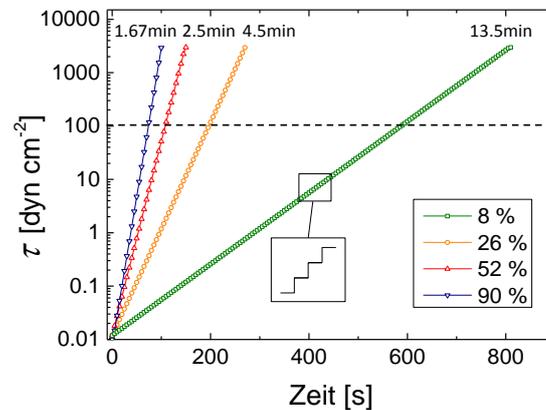


Abbildung 37: Mögliche Scherströmungsraten von 8 %, 26 %, 52 % bzw. 90 % pro 5 s. Diese entsprachen Abrissexperimentdauern von 1,67 min, 2,5 min, 4,5 min bzw. 13,5 min.

3.5.3. Datenauswertung biologischer Untersuchungen

Abbildung 38 illustriert, wie die Anzahl der Diatomeen mit zunehmender Scherströmung abnimmt.

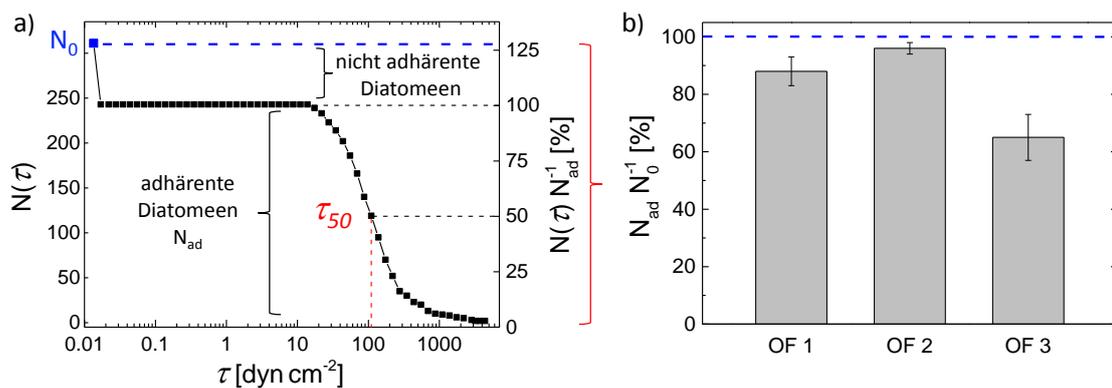


Abbildung 38: a) Beispiel einer Abrisskurve: haftende Zellen nehmen mit zunehmender Scherströmung ab. N_0 = Anzahl aller Zellen im Sichtfeld vor Beginn des Abrissexperiments, N_{ad} = Anteil der Zellen, die nach Erreichen von Scherströmungen von $\tau \leq 0,05 \text{ dyn/cm}^2$ adhären auf der Oberfläche verblieben; τ_{50} = kritische Scherströmung, bei der 50 % aller haftenden Zellen (N_{ad}) von der Oberfläche entfernt wurden: $\tau_{50} = \frac{1}{2} N_{ad}$; b) Beispiel einer Balkendarstellung von adhären Zellanteilen $N_{ad} N_0^{-1}$ [%] von drei fiktiven Oberflächen (OF). N_0 wurde in Balkendiagrammen stets auf 100 % normiert.

Die Datenauswertung lag darin abreiende Algenzellen der aufgenommenen Mikroskopievideos mit zunehmender Scherströmung im 5 s-Takt manuell zu zählen. Die so erhaltenen Werte $N(\tau)$ wurden im Anschluss gegen die korrespondierenden Scherströmungswerte τ aufgetragen. Der daraus resultierende Kurvengraph lieferte zwei charakteristische Kenngroen: a) Der adhrente Zellanteil $N_{ad}N_0^{-1}$ [%] ergab sich aus der Anzahl der adhärenten Zellen (N_{ad}) dividiert durch die gesamte Anzahl der Zellen N_0 , die sich vor Beginn des Abrissexperiments im Sichtfeld befanden. Als adhrente Kieselalgen wurden diejenigen Zellen betrachtet, die nach Beginn des Experiments bei Erreichen von Scherströmungen von $\approx 0,05 \text{ dyn/cm}^2$ weiterhin an der Oberfläche hafteten (Abbildung 38 a). Zur besseren Übersicht lässt sich dieser Sachverhalt in einem Balkendiagramm darstellen (Abbildung 38 b). b) Die kritische Scherströmung τ_{50} ist ein aus dem Diagramm abgelesener Punkt (rechte y-Achse), an dem 50 % der adhärenten Zellen von der Oberfläche entfernt wurden ($N(\tau_{50}) = 0,5 N_{ad}$). Dieser Wert spiegelte die Adhäsionsstärke der Diatomeen auf verschiedenen Oberflächen wieder.

Da die initiale Anzahl der Algenzellen (N_0) im Sichtfeld von Experiment zu Experiment variierte, wurden absolute Zellzahlen auf prozentuale Anteile normiert ($N(\tau) \cdot N_{ad}^{-1}$ [%], rechte Ordinate). Hierzu wurden scherstrmungsabhngige Zellzahlen ($N(\tau)$) durch die absolute Anzahl der adhärenten Zellen (N_{ad}) dividiert. Auf diese Weise wurde ein direkter Vergleich der kritischen Scherströmungen τ_{50} von Diatomeen auf unterschiedlichen Oberflächen realisiert.

Um die in den Kanälen generierte laminare Scherströmung mit der turbulenten Scherströmung an einem sich bewegenden Seefahrzeug zu korrelieren, können Berechnungen von Schultz *et al.* genutzt werden. Sie zeigen, dass die Wandschubspannung am Bug eines sich mit 16 kn bewegenden Schiffes 56 Pa (560 dyn/cm^2) in einer laminaren Flusskammer entspricht [245].

3.5.4. Datenauswertung der Partikelexperimente

Die Auswertung der durchgeführten Partikelmessungen erfolgte, bis auf die automatische Auszählung, analog der im vorangegangenen Kapitel. Bedingungen für die automatisierte Auszählung der Carboxybeads waren: Zirkularität: 0,88-1, Groe: 6,5-7,5 px ($4,2\text{-}4,8 \mu\text{m}$). Durch die große Menge der aus den Tubings nachkommenden Carboxybeads unmittelbar nach dem Start des Experiments, war der vom automatischen Zhlprogramm angegebene 100 %-Wert verfälscht. Aufgrund dessen wurde die Carboxybeadanzahl erst nachdem ein stabiles Plateau erreicht war in die Wertung aufgenommen (Abbildung 39).

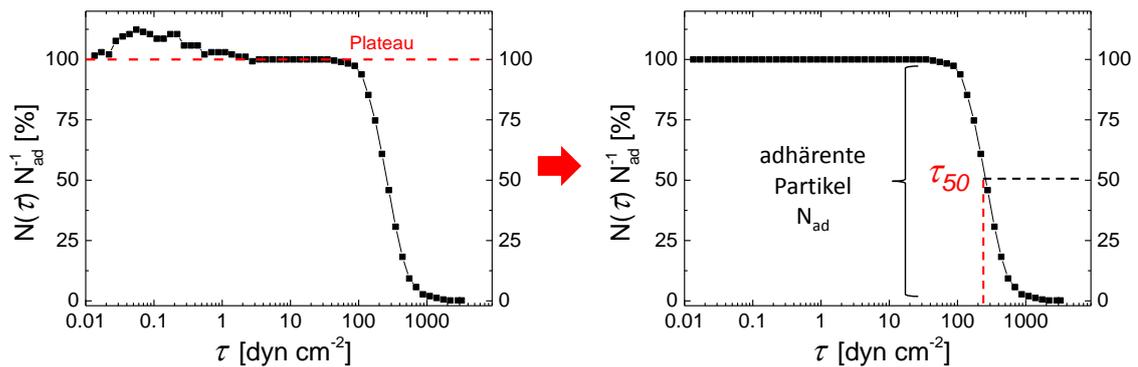


Abbildung 39: Beispiel für den Abriss von Partikeln von einer Oberfläche. Die reale Kurve (links) wurde nach Bestimmung eines konstanten Plateaus auf den jeweiligen Wert begradigt (rechts).

3.6. Feldversuche

Die mikrofluidischen Feldversuche fanden auf dem Forschungsgelände des Florida Institute of Technology (FIT, Prof. Dr. G. Swain) in der *Indian River Lagoon* im November bzw. Dezember 2010 statt. Diese Lagune befindet sich an der Ostküste Floridas ($27^{\circ}53'59''\text{N}$, $80^{\circ}28'28''\text{W}$). Das für die Untersuchungen verwendete Wasser befand sich in Tanks und wurde ununterbrochen aus der Lagune gepumpt, um die gleichen Bedingungen wie sie in der Lagune herrschten zu schaffen (Abbildung 40). Nach der Wasserentnahme aus dem Tank wurde dieses durch ein $100\ \mu\text{m}$ Filter gefiltert und direkt in die mikrofluidischen Kanäle injiziert (Kapitel 3.4.2, S 45). Die Inkubationszeit betrug stets 4 h, die Erhöhung der Scherströmung für alle Experimente 26 % alle 5 s. Der benötigte Überdruck von 0,7 bar wurde mit Hilfe einer Luftdruckgasflasche, unterstützt durch einen Druckregler, realisiert. Die Aufnahmen erfolgten mit einem inversen Mikroskop (Axiovert 25C, Zeiss, Jena, Deutschland, 10x-Phasenkontrast Objektiv, NA: 0,25), welches über eine Autobatterie betrieben wurde. Der dafür nötige technische Umbau wurde vor der Abreise durchgeführt.



Abbildung 40: Position des Versuchsgeländes (links); aus der Lagune gepumptes Wasser im Tank (rechts).

4. Optimierung des mikrofluidischen Systems

Das vorliegende Thema zur Optimierung des mikrofluidischen Systems vorab behandelt werden, um die schwankenden Statistiken der biologischen Untersuchungen im Hauptkapitel *Adhäsionsstärkemessungen mit *N. perminuta** (S. 71ff) entsprechend deuten zu können. Zudem wird auf kürzlich durchgeführte Arbeiten mit einem identischen System verwiesen [246].

Nach der Durchführung der biologischen Untersuchungen, stellte sich die Frage, ob das verwendete mikrofluidische System hinsichtlich seiner Leistungsfähigkeit und Verlässlichkeit weiter optimiert werden kann. Da es sich bei dem Setup um eine bei jeder einzelnen Messung stets neu zusammengesetzte Anordnung handelt und die Experimentdurchführung durch eine Reihe von Faktoren gesteuert wird, sollen im Folgenden systematisch beeinflussbare Versuchsparameter und ihr Einfluss auf die Reproduzierbarkeit der Messungen untersucht werden. Abbildung 41 greift hierzu, ohne direkten Bezug auf die Messungen zu nehmen, Beispiele heraus, um die Variabilität der Experimente mit *N. perminuta* aufzuzeigen.

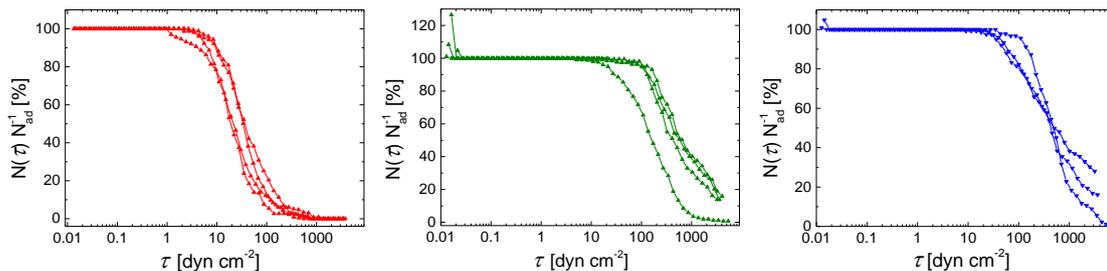


Abbildung 41: Abrisskurven von *N. perminuta* auf einzelnen Oberflächen zur Verdeutlichung der Variabilität der Messungen im Kapitel 5 *Adhäsionsstärkemessungen mit *N. perminuta**.

Um die Reproduzierbarkeit zu testen, wurde ein Messsystem bestehend aus Hyaluronsäure- oder Dodecanthioloberfläche (DDT) und carboxyterminierten Polystyrol-Mikrosphären (kurz: Carboxybeads, 4,5 μm) als Adhäsionsobjekte gewählt. Als starre Partikel unterlagen diese im Gegensatz zu Diatomeen keinen Umwelt- und Zyklusschwankungen. Zudem lagen die bestehenden Scherkräfte zur Entfernung der Carboxybeads von den Oberflächen im Bereich der vom System generierten Strömung (siehe Resultate).

Für die Messungen wurden 25 μl der 4,5 μm -Carboxybeadsuspension ($\approx 10^4$ Partikel/mL) in PBS (pH = 7,4) aufgenommen und dreimal mit dem selbigen gewaschen (13000 rpm, 4 min). Die vorbereitete Suspension wurde innerhalb eines Experimenttages bis zur Benutzung bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die verwendeten DDT-SAMs (Dodecanthiol) bzw. Hyaluronsäureoberflächen stammten aus einer Herstellungscharge. Sie wurden zuvor frisch präpariert und im Fall von HA bis zu ihrem Einsatz in Milli-Q[®]-Wasser aufbewahrt. Die Abrissprozesse wurden stets mit einer 10-fachen Vergrößerung (Phasenkontrastobjektiv, NA: 0,25, Ph1, Sichtfeld: $1001 \times 750 \mu\text{m}$) verfolgt.

Gleichmäßig in alle Kanäle injiziert wurden die Carboxybeads bei Raumtemperatur 5 min bzw. 10 min (DDT- bzw. HA-Oberfläche) inkubiert und anschließend jeweils in Abriss-experimenten (26 %/5 s-Scherströmungsrate, siehe Kapitel 5.1.2, S. 74) von den Oberflächen entfernt. Als Spülmedium diente in beiden Fällen PBS (pH = 7,4).

4.1. Carboxy-Polystyrol-Mikrosphären auf Polysaccharidoberflächen

Die für die Adhäsion verantwortlichen Wechselwirkungen zwischen den Hyaluronsäureoberflächen (Kontaktwinkel: $\approx 10^\circ$, Schichtdicke $\approx 25 \text{ \AA}$) und den Carboxybeads beruhen vorwiegend auf intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den deprotonierten Carboxylgruppen (pH = 7,4) der Polystyrol-Mikrosphären und den zu Wasserstoffbindungen befähigten Gruppen der Hyaluronsäure (-NH, -COO⁻ und -OH, siehe hierzu Kapitel 3.1.3, S. 30) (Abbildung 42).

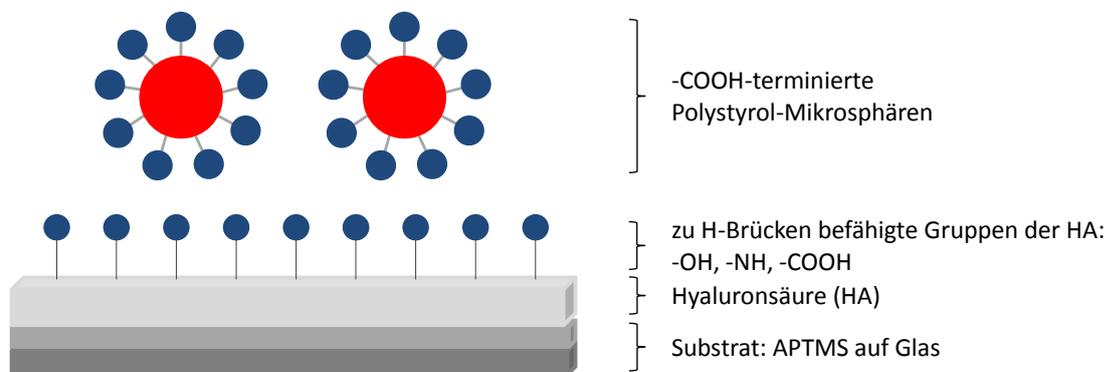


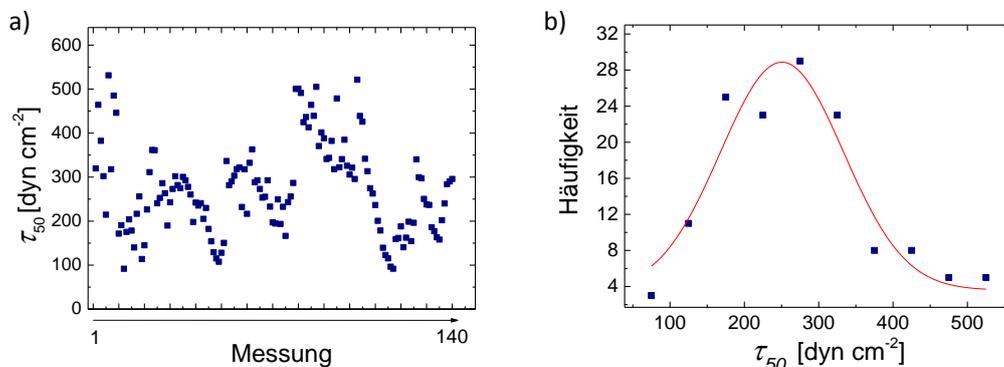
Abbildung 42: Wechselwirkungen zwischen polaren carboxyterminierten Polystyrol-Mikrosphären mit der polaren HA-Oberfläche werden durch Wasserstoffbrückenbindungen bewirkt.

Tabelle 2 gibt einen Überblick der in den folgenden Kapiteln untersuchten Parameter, ihre Ursachen und möglichen Konsequenzen für die Messungen.

Tabelle 2: Übersicht der veränderbaren Parameter während der mikrofluidischen Messungen.

Variablen bei mikrofluidischen Messungen	Ursache	Konsequenz für Messungen
Kanalposition	rundes Sichtfenster im Setup beträgt 70 mm, Sichtfeld für die Aufnahmen $1001 \times 750 \mu\text{m}$	unterschiedliche Scherströmungsbedingungen an verschiedenen Punkten des Kanals
Konzentration der adhärirten Objekte	unterschiedliche Handhabung bei der Aufbereitung der verwendeten Beads	Beads erfahren unterschiedliche Scherströmungsstärke bedingt durch gegenseitige Abschirmung
Kanaldimensionen	unterschiedliche Kraftausübung auf elastische Kanäle beim Zusammenbau der Kanalsysteme	Einfluss auf Scherströmung trotz Berücksichtigung der Kanaldimensionen bei Berechnungen
Druckschwankungen	- nicht messbare Fluktuationen im Druckminderer ($p = 0,7 \text{ bar}$) - Druckabfall bei zunehmendem Saugen der Pumpe	- Störungen laufender Messungen durch Druckpulse - Kompressionen der Kanäle

Vorab soll die Streuung der τ_{50} -Werte in den durchgeführten Carboxybeadmessungen in Abbildung 43 verdeutlicht werden. Dies ist ein eindeutiger Hinweis darauf, dass die statistischen Schwankungen bei den Adhäsionsstärkeuntersuchungen mit Diatomeen offensichtlich nicht aufgrund von biologischer Variabilität auftraten.

Abbildung 43: Streuung der τ_{50} -Werte innerhalb 140 Messungen zur Entfernung von $4,5 \mu\text{m}$ -Carboxybeads von HA-Oberflächen.

4.1.1. Kanalposition

Das Sichtfenster, das für den Strahlengang des Mikroskops zur Verfügung stand, umfasste die Aussparung im PDMS-Ring und war 70 mm groß. Das Sichtfeld des 10x-Objektivs, welches für die Adhäsionsstärkemessungen eingesetzt wurde, betrug $1001 \times 750 \mu\text{m}$. Es bestanden somit mehrere Möglichkeiten das Sichtfeld für eine Messung innerhalb des Kanals zu positionieren. Zunächst wurde geprüft, ob die kritischen Scher-

strömungen für die Entfernung von 50 % Carboxybeads abhängig von den Kanalpositionen variieren. Hierzu wurden drei Punkte im Kanal gewählt: in der Nähe des Auslasses, in der Mitte und in der Nähe des Einlasses (Abbildung 44, rote Kreuzmarkierungen). Die Kanalhöhen wurden zu Beginn und im Anschluss der Experimente vermessen und waren an allen drei Kanalpositionen in allen Fällen identisch. Für jede der drei Positionen wurden zwei Messungen durchgeführt.

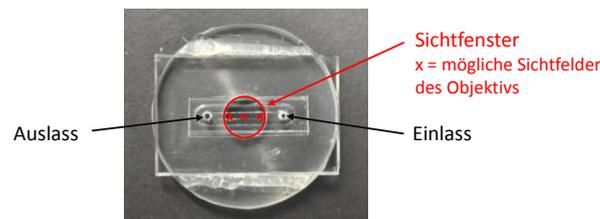


Abbildung 44: Sichtfenster im PDMS-Ring des mikrofluidischen Aufbaus und mögliche Messpunkte im Experiment (x).

Abbildung 45 zeigt eindeutig, dass unabhängig von den Kanalpositionen die kritischen Scherströmungen nur geringfügig variierten. Die Standardabweichung (SA) lag bei maximal 5 %. Die Resultate bestätigen somit, dass die laminare Strömung im gesamten Sichtfenster identisch ist. Für zukünftige Messungen, die der Kalibration als auch der Diatomeen-Adhäsionsstudien wurde als Sichtfeld stets die Mitte des Kanals festgelegt.

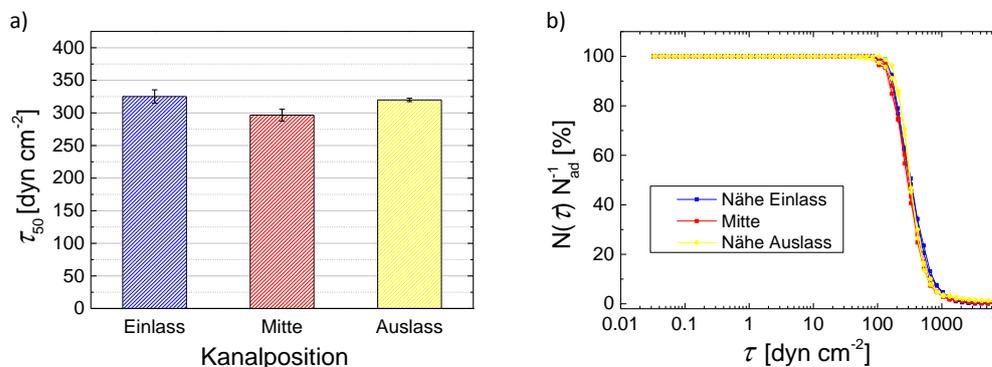


Abbildung 45: Entfernung von 4,5 μm -Carboxybeads von einer HA-Oberfläche für verschiedene Kanalpositionen; a) kritische Scherströmungen τ_{50} ; b) Abrisskurven für die drei Kanalpositionen.

Um im Anschluss die Reproduzierbarkeit der Kanäle zu testen, wurden alle vier Kanäle bei gleichen Bedingungen vermessen.

4.1.2. Reproduzierbarkeit der kritischen Scherströmungsmessungen

Die Abrisskurven innerhalb der vier Kanäle sind in Abbildung 46 a-d gezeigt. Innerhalb der Kanäle ergaben die einzelnen Messungen zum Teil sehr ähnliche kritische Scherströmungswerte (Kanal 1), jedoch sind ebenso davon abweichende Messungen zugegen

(Kanal 3-4). Die Carboxybeads zeigten einen kritischen Scherströmungswert τ_{50} von $210 \pm 43 \text{ dyn/cm}^2$ für Kanal 1, $161 \pm 41 \text{ dyn/cm}^2$ für Kanals 2, $126 \pm 29 \text{ dyn/cm}^2$ für Kanal 3 und $206 \pm 27 \text{ dyn/cm}^2$ für Kanal 4.

Die Standardabweichungen (SA) innerhalb der Kanäle lagen somit zwischen 13 % und 26 % (Abbildung 47 a). Die Abweichungen von den τ_{50} -Werten von Kanal zu Kanal betrugen 15-34 %. Die chronologische Betrachtung der jeweiligen drei Messungen in Abbildung 47 b ließ keinen Zusammenhang der abweichenden Messwerte untereinander erkennen: Im Kanal 1, Kanal 3 und Kanal 4 stiegen die τ_{50} -Werte innerhalb der drei Messungen an, Kanal 2 hingegen war der Sachverhalt exakt Gegenteilig. Zudem ließ der Vergleich der τ_{50} -Werte zwischen den Kanälen innerhalb der Fehlergrenzen lediglich eine Korrelation zwischen Kanal 1 und Kanal 4 ($\tau_{50} = 210 \pm 43 \text{ dyn/cm}^2$ bzw. $206 \pm 27 \text{ dyn/cm}^2$) bzw. Kanal 2 und Kanal 3 zu ($\tau_{50} = 161 \pm 41 \text{ dyn/cm}^2$ bzw. $126 \pm 29 \text{ dyn/cm}^2$).

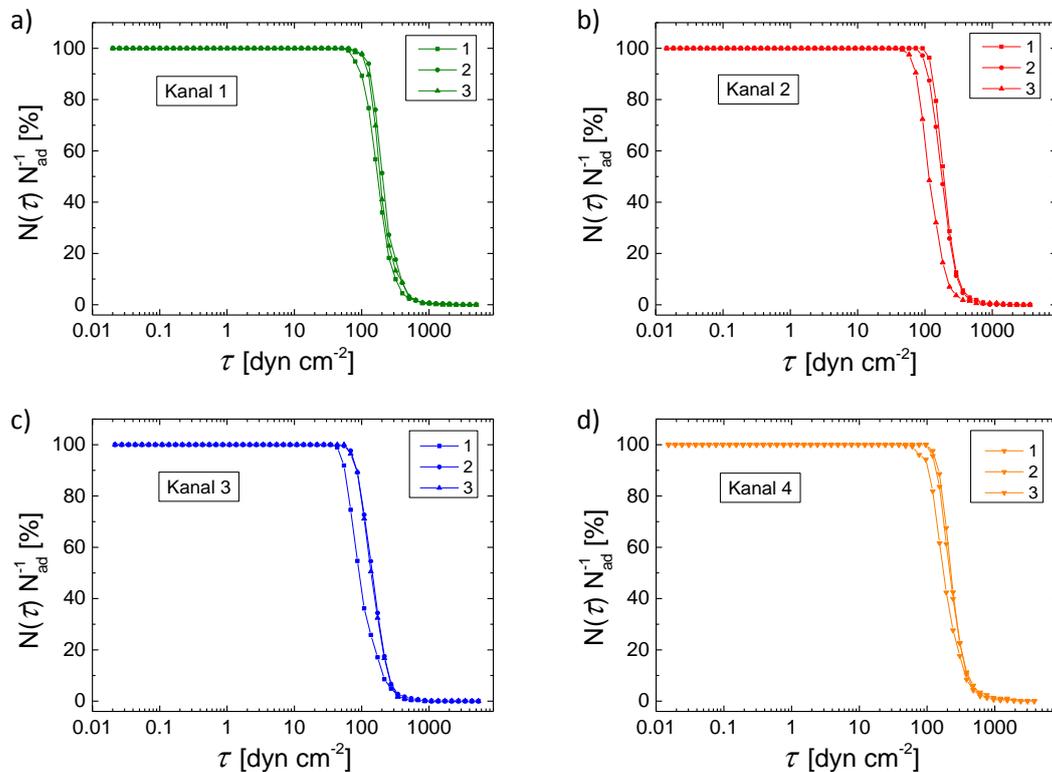


Abbildung 46: Abrisskurven von 4,5 μm -Carboxybeads von HA-Oberflächen im Kanal 1-4.

Basierend auf diesen Resultaten kann zunächst keine Aussage getroffen werden, da kein ersichtliches Muster zu erkennen war, welches ein Indiz für die Streuung der Messwerte liefern würde.

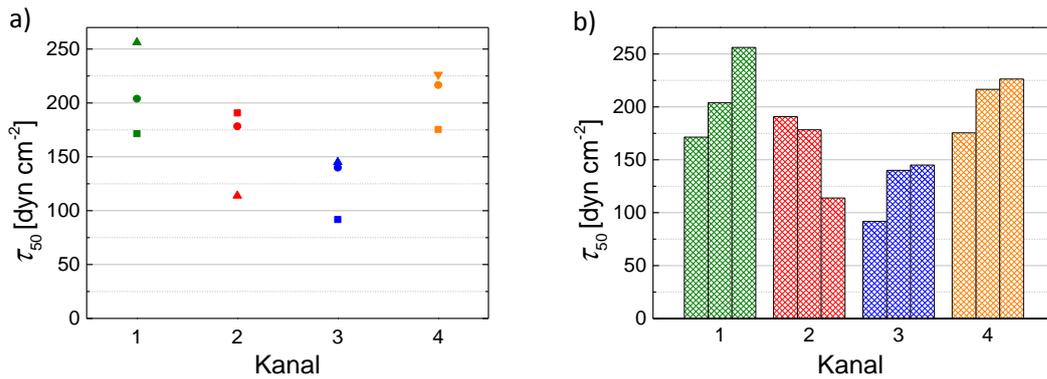


Abbildung 47: Abriss von 4,5 μm -Carboxybeads von HA-Oberflächen im Kanal 1-4. a) Vergleich der kritischen Scherströmungen τ_{50} ; b) chronologische Darstellung der Messungen.

4.1.3. Kanaldimensionen

Als mögliche Ursache für die Schwankungen der τ_{50} -Werte in Abbildung 47 wurden Unterschiede in den Kanaldimensionen (Höhe und Breite) vermutet. Der mikrofluidische Aufbau besteht zwar aus vier baugleichen Kanalsystemen, jedoch können die Maße jedes einzelnen elastischen Kanals durch die Kraftausübung beim Zusammenfügen variieren. Die Dimensionen der Kanäle lagen nach Einbau in die Kanalsysteme in der Regel durchschnittlich im Bereich von $13 \text{ mm} \times 0,9 \text{ mm} \times 140 \mu\text{m}$ (Länge $\pm 0,01 \text{ mm}$, Breite $\pm 0,1 \text{ mm}$, Höhe $\pm 20 \mu\text{m}$). Die Kanaldimensionen wurden zwar wie in Kapitel 3.4.1 (S. 43) beschrieben bei Kalkulationen der Scherströmung jedes einzelnen Kanals berücksichtigt, nichtsdestotrotz könnten Änderungen der Maße einen größeren Einfluss als theoretisch angenommen verursacht haben. Da die Änderungen in der Kanalbreite in diesem Fall minimal waren und diese zudem nur einfach in den Kalkulationen berücksichtigt sind, wurden lediglich die Höhendimensionen, die quadratisch in die Berechnungen der Scherströmungen eingehen, in den Vergleich mit einbezogen. In diesem Fall lagen jeweils zwei Kanalhöhen in einer Größenordnung: die Höhe von Kanal 1 bzw. Kanal 3 betrug $125 \mu\text{m}$, die von Kanal 2 bzw. Kanal 4 $150 \mu\text{m}$. Der Unterschied der Kanalhöhen resultiert in einem Unterschied der Scherströmungen um den Faktor 1,4 ($\tau_{125 \mu\text{m}} > \tau_{150 \mu\text{m}}$). Abbildung 48 zeigt den Zusammenhang zwischen Kanalhöhe und den kritischen Scherströmungen τ_{50} . Obwohl Kanal 1/2 bzw. Kanal 2/4 in den gleichen Dimensionsbereichen lagen, unterschieden sich dennoch die kritischen Scherströmungen τ_{50} . Zur Verdeutlichung der Ähnlichkeit der Kanäle 1/3 bzw. 2/4 wurden die Verhältnisse der Kanalvolumina ($h \times b \times w$) herangezogen. Diese ergaben für Kanal 1/3 = 1,09 und für Kanal 2/4 den Faktor 1,10.

Die dargestellte Gegenüberstellung von den τ_{50} -Werten und den Kanalhöhen als eine Variable in den Messungen, gibt somit keinen Hinweis auf die Streuung der τ_{50} -Werte zwischen den Kanälen. Diese müssen somit einen anderen Ursprung bei der Durchführung der Experimente gehabt haben.

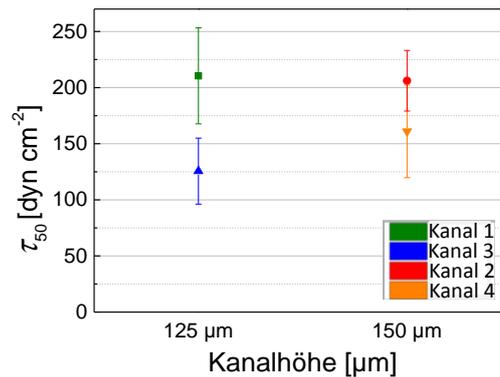


Abbildung 48: Abriss von 4,5 μm -Carboxybeads von HA-Oberflächen im Kanal 1-4. Zusammenhang zwischen τ_{50} und unterschiedlichen Kanalhöhen.

4.1.4. Konzentrationsabhängigkeit

Wie in der Einleitung beschrieben, wurden die Carboxybeads vor den Messungen einer Reinigung unterzogen. Diese bestand aus dreimaligem Waschens mit PBS. Jeweils nach den Zentrifugationsvorgängen wurde hierzu die überstehende PBS-Lösung abgetrennt. Dadurch wurden vereinzelt unterschiedliche Mengen der Mikrosphären von den sogenannten Pellets abgetrennt wurden, was folglich zu Schwankungen in den Konzentrationen führte. In diesem Zusammenhang wurde eine Konzentrationsabhängigkeit der kritischen Scherströmungen in Betracht gezogen. Ein möglicher Effekt hierfür wäre, dass abgeschirmte Mikrosphären eine niedrigere Scherströmung erfuhren und dadurch im Gegensatz zu Mikrosphären, die der Strömung direkt ausgesetzt waren, erst bei höheren Scherströmungen auf diese reagierten (Abbildung 49). Es sollte daher die Hypothese geprüft werden, ob eine zu hohe Mikrosphärenkonzentration zu einer höher gemessenen kritischen Scherströmung führt.

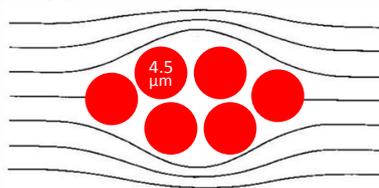


Abbildung 49: Mögliche Abschirmung einiger Mikrosphären bedingt durch eine zu hohe Mikrosphärenkonzentration.

Hierzu wurden die τ_{50} -Werte der zuvor durchgeführten Messungen nach den unterschiedlichen Bead-Konzentrationen aufgetragen. Anhand von Abbildung 50 wird deutlich, dass die Werte der kritischen Scherströmungen innerhalb der Kanäle keine offensichtliche Abhängigkeit von der Beadanzahl aufzeigten.

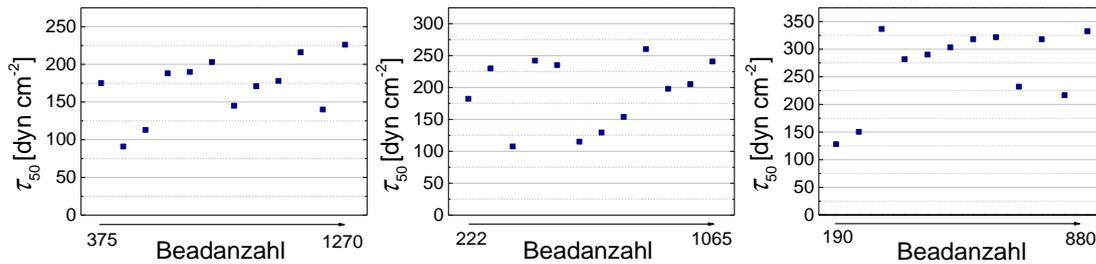


Abbildung 50: Kritische Scherströmungen τ_{50} in Abhängigkeit einer zunehmenden Beadanzahl.

4.1.5. Druckschwankungen

Der auf das Medium-Reservoir ausgeübte Stickstoff-Überdruck von 0,7 bar, wurde durch einen Druckminderer konstant gehalten (Abbildung 32 d, S. 44). Da das mikrofluidische System empfindlich auf Druckunterschiede reagieren kann, könnten jedoch bereits leichte, für die Druckanzeige nicht wahrnehmbare, Druckdifferenzen laufende Messungen gefährden.

Um eventuelle Druckfluktuationen davon abzuhalten unmittelbar ins System zu gelangen, wurde zwischen Druckregulierer und Medium-Reservoir eine zusätzliche Schott-Druckflasche eingesetzt. Als Verbindung zwischen diesen diente ein 1/16“ Tubing. Zu dieser zusätzlichen Druckstabilisierung wurde der Effekt des zunehmenden Leervolumens im Medium-Reservoir in laufenden Messungen beobachtet. Abbildung 51 a zeigt, dass die abnehmende Flüssigkeitsmenge und das somit zunehmende Leervolumen mit fortschreitenden Messungen keinen nennbaren Einfluss auf die kritischen Scherströmungswerte τ_{50} zu haben scheint. In Abbildung 51 b wird dieser Sachverhalt anhand von einer chronologischen Darstellung der Messungen deutlich. Die Reproduzierbarkeit lag hier bei $413 \pm 97 \text{ dyn/cm}^2$ (SA: 23 %). Die Vermutung die ersten drei Messungen könnten einen Trend indizieren, konnte bei analogen Messungen nicht wiederholt beobachtet werden. Abweichende Messwerte schienen ohne erkennbares Muster aufzutreten.

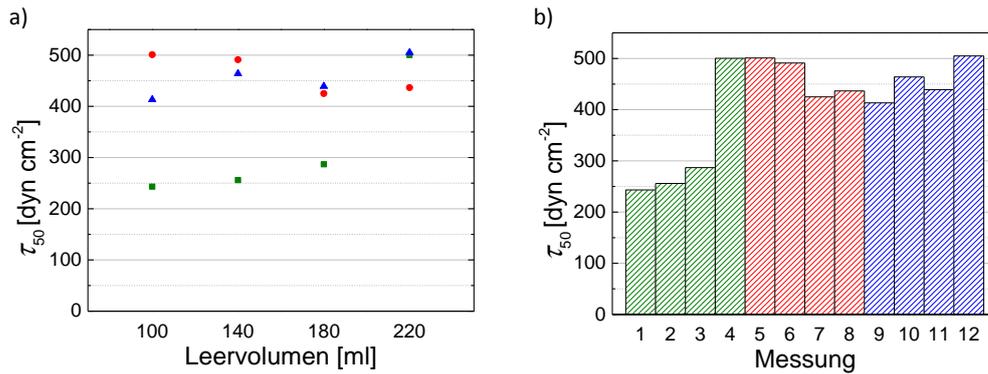


Abbildung 51: Abriss von 4,5 μm -Carboxybeads von HA-Oberflächen in einem Kanal. a) Abhängigkeit der kritischen Scherströmungen τ_{50} von dem Leervolumen im Medium-Reservoir; b) chronologische Darstellung der Messungen.

4.1.6. Einführung von Spacern als Abstandshalter

Aufgrund ihrer Elastizität könnten Kanäle durch die unterschiedlichen Kräfte während des Zusammenbaus oder während des Experimentes zu Kanalhöhen führen, die sich während der Messung ändern. Insbesondere die zunehmende Saugleistung der Pumpe könnte eine zunehmende Kompression der Kanäle verursachen. Wie bereits in Kapitel 3.4.1 (S. 43) beschrieben, variiert die Höhe der Kanäle nach der Assemblierung im Bereich von $140 \pm 20 \mu\text{m}$. Die Kanalhöhen entlang des Sichtfensters eines einzelnen Kanals variierten fast gar nicht ($\pm 1 \mu\text{m}$) (Kapitel 4.1.1, S 55). Zudem konnte wie in Kapitel 4.1.3 (S. 58) beschrieben keine unmittelbare Korrelation zwischen den τ_{50} -Werten und der Kanalhöhe gefunden werden.

Um eine Kompression der Kanäle zu verhindern wurde das mikrofluidische System um speziell angefertigte Abstandshalter, sogenannte Spacer, erweitert. Als Material für die Spacer wurde Aluminium gewählt, da dieses inkompressibel ist und damit bei einer Verschraubung und bei Druckänderungen nicht nachgibt. Die Spacer wurden jeweils zwischen Oberfläche und Glasdeckel eingelegt (Abbildung 52 a). Für jeden der vier Kanäle war im Spacer eine passende Aussparung vorhanden, damit ein vollständiger Kontakt zur Oberfläche gewährleistet werden konnte (Abbildung 52 b/c). Die Dicke des Spacers war geringfügig dünner (130-140 μm) als die der Kanäle (150-160 μm). Dadurch wurde der für die Dichtigkeit notwendige Anpressdruck sichergestellt.

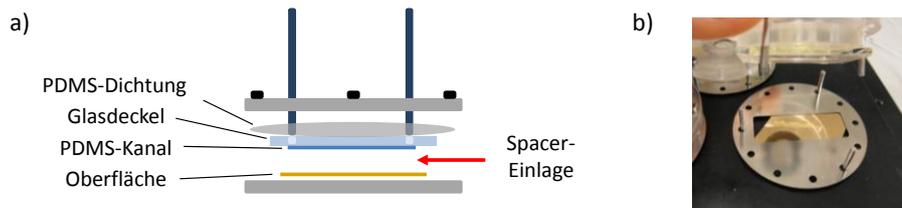


Abbildung 52: a) Seitliche Darstellung eines Kanalsystems zur Verdeutlichung des Einsatzes eines Spacers; b) vor der Verschraubung eines Kanalsystems auf einer Oberfläche aufliegender Spacer mit passender Aussparung für den Kanal.

Für die initialen Versuche wurden Spacer mit einer Stärke von $140\ \mu\text{m}$ eingesetzt. Bei initialen Messungen bestand jedoch das Problem einer unzureichenden Dichtigkeit der Kanäle. Die Verwendung von Spacern mit einer Dicke von $130\ \mu\text{m}$ erwies sich hingegen als passend, das Kanalsystem blieb zu jedem Zeitpunkt einer Messung dicht.

Abbildung 53 zeigt ohne einen Bezug auf bestimmte Experimente zu nehmen, dass die Schwankungen der Kanalhöhe mit einem Spacer im System deutlich geringer ausfielen. Der Vergleich erfolgte mit den Kanalhöhen der zuvor in diesem Kapitel durchgeführten Experimente. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Spacer eine Limitierung der Kraftausübung und damit herbeigeführtes Quetschen der Kanäle beim Verschrauben bewirkten. Die Kanalhöhen in den Kanalsystemen ohne eingesetzte Spacer betragen $135 \pm 11\ \mu\text{m}$, die Schwankung lag somit bei $8\ \%$. Mit einem Spacer im System schwankten die Kanalhöhen mit Werten von $156 \pm 4\ \mu\text{m}$ nur wenig ($3\ \%$).

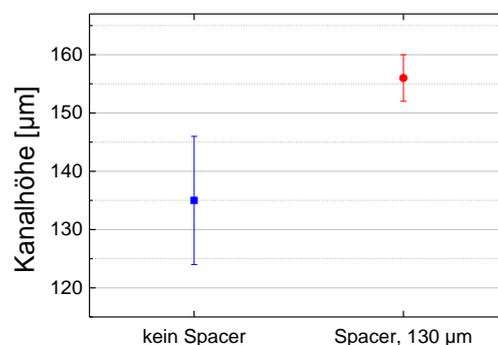


Abbildung 53: Vergleich von Kanalhöhen nach Verschraubungen im mikrofluidischen System mit bzw. ohne Spacer.

Darauf folgend wurden zunächst wiederholt in einem Kanal Adhäsionsstärkemessungen von Carboxybeads auf Hyaluronsäureoberflächen durchgeführt.

4.1.7. Reproduzierbarkeit der kritischen Scherströmungsmessungen mit eingesetzten Spacern

Die wiederholten Messungen in einem Kanalsystem ergaben durch den Einsatz eines Spacers eine erhöhte Reproduzierbarkeit mit einer geringen Abweichung der τ_{50} -Messwerte voneinander (5 %). Diese betragen $388 \pm 17 \text{ dyn/cm}^2$. Analoge Messungen ohne Spacer resultierten in τ_{50} -Mittelwerten von $355 \pm 47 \text{ dyn/cm}^2$, was einer Standardabweichung von 13 % entsprach. Die Abrisskurven in Abbildung 54 a zeigen den engeren Verlauf der Kurven durch den Einsatz eines Spacers im Gegensatz zu den Messungen ohne Spacer. Abbildung 54 b verdeutlicht diese Tatsache durch einen Vergleich der Streuung der τ_{50} -Messwerte.

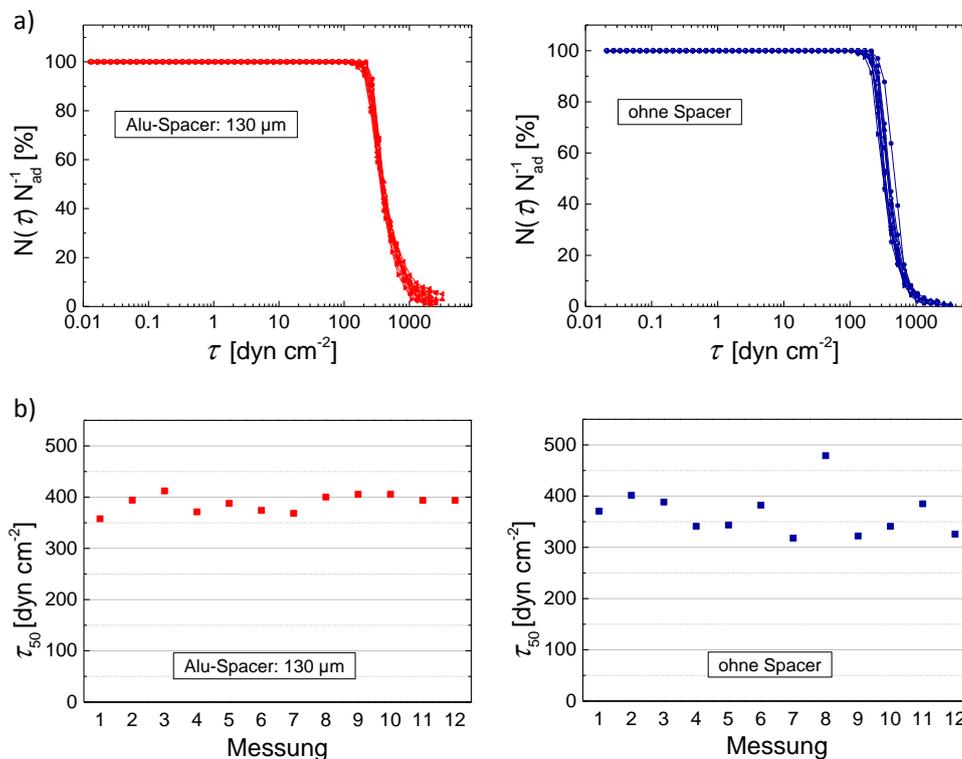


Abbildung 54: Vergleich der Reproduzierbarkeit der kritischen Scherströmungen in einem Kanal mit und ohne Spacer a) Abrisskurven von 4,5 µm-Carboxybeads auf HA-Oberflächen; b) Streuung der τ_{50} -Werte.

Eine Gegebenheit, die trotz des Einsatzes von Spacern beobachtet wurde ist, dass die Reproduzierbarkeit von τ_{50} nach Reassemblierung des Kanalsystems nicht immer gewährleistet war. Abbildung 55 zeigt zur Veranschaulichung dieses Sachverhalts Messdurchläufe innerhalb von drei Tagen unter gleichen Bedingungen. Deutlich ersichtlich ist, dass die Messungen an Tag 1 und Tag 2 ähnliche τ_{50} -Werte liefern ($\tau_{50} = 401 \pm 21 \text{ dyn/cm}^2$ bzw. $383 \pm 19 \text{ dyn/cm}^2$), während am Tag 3 der τ_{50} -Wert wesentlich kleiner war ($\tau_{50} = 117 \pm 5 \text{ dyn/cm}^2$). Die Abweichungen zwischen den τ_{50} -Werten zwischen den Kanälen (bzw. Tagen) lagen somit zwischen 6-61 %. Anhand von den Standardabweichungen der einzelnen Tage ist jedoch ersichtlich, dass innerhalb der Messungen eine

hohe Reproduzierbarkeit gegeben war (Tag 1 und 2 (n = 6): SA = 5 %, Tag 3 (n = 8): SA = 4 %).

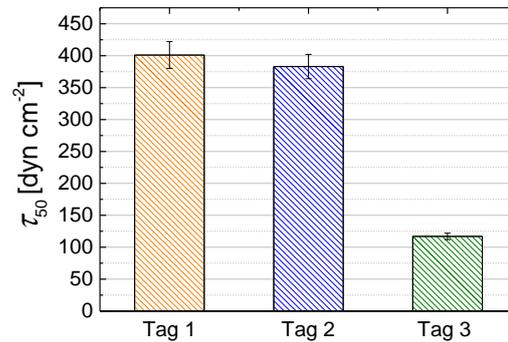


Abbildung 55: Reproduzierbarkeit der Scherströmungen zwischen Messungen an drei verschiedenen Tagen in einem Kanal unter Einsatz eines Spacers (4,5 μm -Carboxybeads auf HA-Oberflächen). Die Standardabweichung beträgt zwischen den einzelnen Tagen bis 61 %.

Die von Messung zu Messung vorgenommene Reassemblierung des Kanalsystems gibt Anlass zur Vermutung, dass die Reproduzierschwierigkeiten ihren Ursprung im Zusammenbau der Kanalsysteme finden. Damit wären ebenfalls die Schwankungen (SA = 15-34 %) bei den anfänglich bei der Optimierung durchgeführten Messungen innerhalb der vier Kanäle verständlich (Kapitel 4.1.2, Abbildung 47).

Trotz dieser Tatsache wurden anschließend Adhäsionsexperimente unter Einsatz von Spacern in vier Kanälen durchgeführt. Die Messungen erfolgten in jedem Kanal jeweils drei Mal. Die Kurven in Abbildung 56 a-d geben die Abrissprozesse 4,5 μm -Carboxybeads auf HA-Oberflächen in den einzelnen Kanälen wieder. Im Kanal 1 zeigten die Carboxybeads kritische Scherströmungswerte τ_{50} von $240 \pm 9 \text{ dyn/cm}^2$, die Standardabweichung (SA) betrug 4 %. Für Kanal 1 wurden τ_{50} -Mittelwerte von $239 \pm 6 \text{ dyn/cm}^2$ gemessen, was einer SA von 2 % entsprach. Kanal 2 wies mit $\tau_{50} = 102 \pm 12 \text{ dyn/cm}^2$ eine SA von 11 % auf. Der τ_{50} -Mittelwert im Kanal 4 betrug mit einer Standardabweichung von 3 % $169 \pm 5 \text{ dyn/cm}^2$.

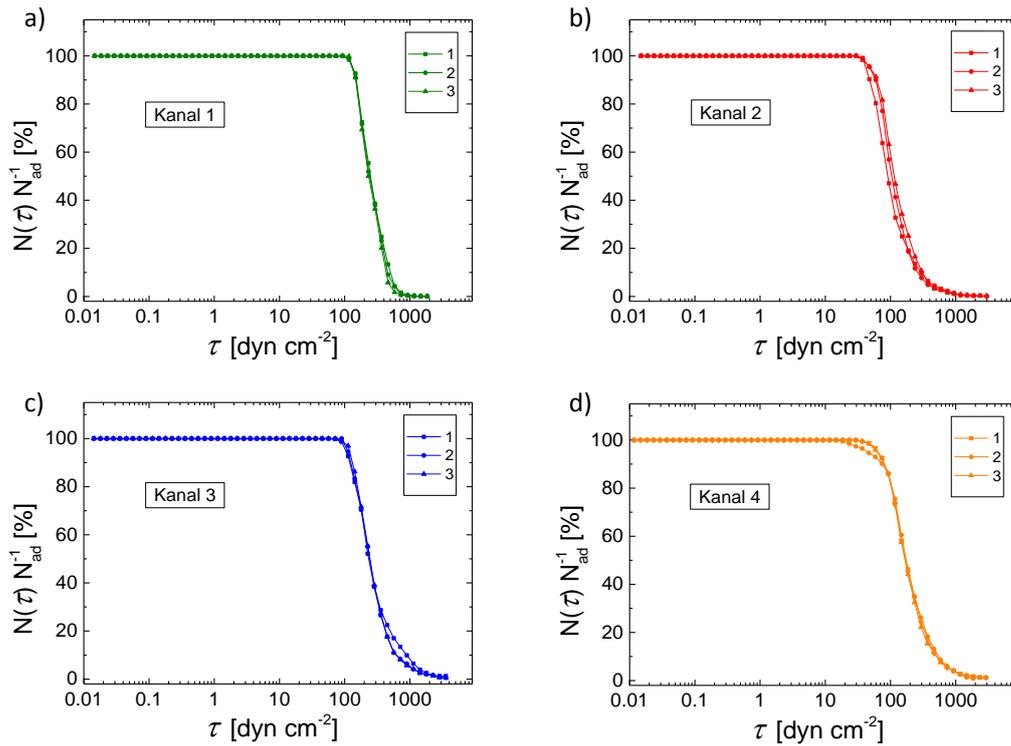


Abbildung 56: Reproduzierbarkeit des Kanals 1-4 mit Einsatz von Spacern. a-d) Abrisskurven von 4,5 µm-Carboxybeads auf HA-Oberflächen.

Der Vergleich der vorliegenden Resultate mit analog ohne Spacer erfolgten Messungen aus Kapitel 4.1.2 (S. 56), zeigt die deutliche Verbesserung der Reproduzierbarkeit innerhalb der einzelnen Kanäle: die drei Messungen lagen jeweils sehr dicht beieinander ($SA_{ohneSpacer}$: 13-26 %, $SA_{mitSpacer}$: 2-11 %). Die Reproduzierschwierigkeiten von Kanal zu Kanal blieben wie in den Messungen ohne Spacer bestehen. Diese kritischen Scherströmungen schwankten zwischen 3-44 % (Abbildung 57).

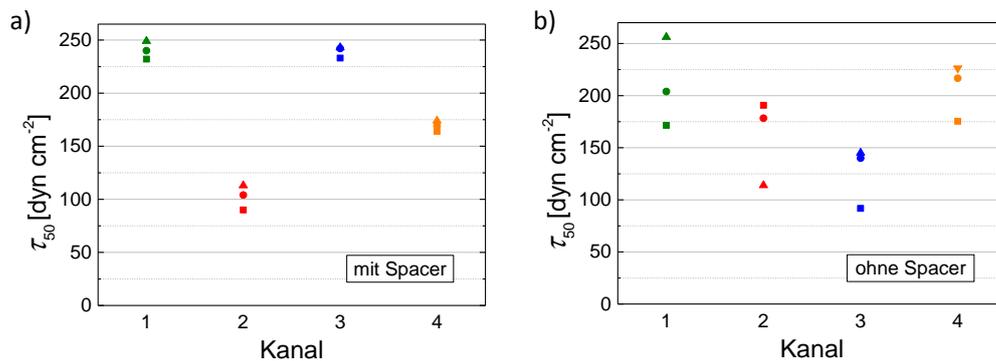


Abbildung 57: Vergleich der Reproduzierbarkeit im Kanal 1-4 durch Adhäsion von 4,5 µm-Carboxybeads auf HA-Oberflächen. a) mit Einsatz von Spacern; b) ohne Einsatz von Spacern.

Die Schwankung der τ_{50} -Werte zwischen den Kanälen könnte ebenfalls mit den unterschiedlichen Assemblierungen der vier Kanalsysteme zusammenhängen. Auch wenn

weniger wahrscheinlich, so kann eine weitere mögliche Ursache der Schwankungen in den verwendeten Polysaccharidoberflächen liegen. Wie in Kapitel 3.1.3 (S. 30) beschrieben, ist die Darstellung von Polysaccharidoberflächen ein mehrstufiger Prozess, bei dem Kopplungsdefekte nicht gänzlich ausgeschlossen werden können. Zudem sind die immobilisierten Makromolekülketten flexibel, worauf unterschiedliche Konformationen eingenommen werden können und sich damit die Wechselwirkungen mit den Mikrosphären ändern. Es muss zudem bedacht werden, dass das Sichtfeld bei den Messungen fix war und mit $1\text{ mm} \times 0,75\text{ mm}$ sehr klein. Aufgrund dessen können bereits minimale Oberflächenunterschiede im Sichtfeld des untersuchten Kanals zu unterschiedlichen τ_{50} -Mittelwerten führen. Von enormer Bedeutsamkeit ist nichtsdestotrotz die sichtliche Abnahme der Schwankungen innerhalb der Kanäle, diese lagen lediglich zwischen 2-11 %.

4.2. Carboxy-Polystyrol-Mikrosphären auf Dodecanthiol-SAMs

Um den Einfluss des Substrates näher zu beleuchten, wurde im nächsten Schritt ein Modellsystem basierend auf DDT-SAMs und carboxyterminierten Polystyrol-Mikrosphären untersucht. Durch die Verwendung von SAMs anstatt von Polysacchariden wurde erwartet, dass aufgrund der verminderten Flexibilität der Molekülketten, bedingt durch *van der Waals*-Wechselwirkungen der C_{12} -Ketten untereinander, eine erhöhte Stabilität des Oberflächen/ Mikrosphärensystems und somit eine höhere Reproduzierbarkeit erreicht werden kann.

Die Adhäsion zwischen den DDT-SAMs und den carboxyterminierten Polystyrol-Mikrosphären wird vorwiegend durch Wasser vermittelt. Dies bedeutet, dass Wassermolekülwechselwirkungen zwischen den polaren Carboxylgruppen und dem befindlichen Medium auch bei der Annäherung an eine hydrophobe Oberfläche nicht gänzlich entfernt werden und folglich Wassermoleküle an den Carboxybeads adsorbiert bleiben. Der DDT-SAM ist dann durch eine evaporierte Wassermolekülschicht von diesen getrennt (Ausbildung einer sogenannten Janus Grenzschicht) [247-248].

Die Experimentdurchführung war zu der mit den HA-Oberflächen identisch, mit dem Unterschied der Inkubationszeit von lediglich 5 min. Die Zeitvariable wurde nach Bezugnahme auf zuvor durchgeführte Mikrosphärenmessungen auf DDT-SAMs gewählt [178].

4.2.1. Reproduzierbarkeit der kritischen Scherströmungsmessungen mit eingesetzten Spacern

Abbildung 58 zeigt, dass die Reproduzierbarkeit des Systems zusätzlich verbessert werden konnte. Kanal 1 wies mit kritischen Scherströmungswerten von $326 \pm 4\text{ dyn/cm}^2$ lediglich eine Standardabweichung von 1 % auf. In der gleichen Weise verhielten sich die Carboxybeads im Kanal 2, mit τ_{50} -Messwerten von $220 \pm 2\text{ dyn/cm}^2$ betrug die SA eben-

so 1 %. Kanal 3 ergab $\tau_{50} = 273 \pm 4 \text{ dyn/cm}^2$ (SA = 2 %). Im Kanal 4 wurde eine kritische Scherströmung von $634 \pm 7 \text{ dyn/cm}^2$ gemessen (SA = 1 %).

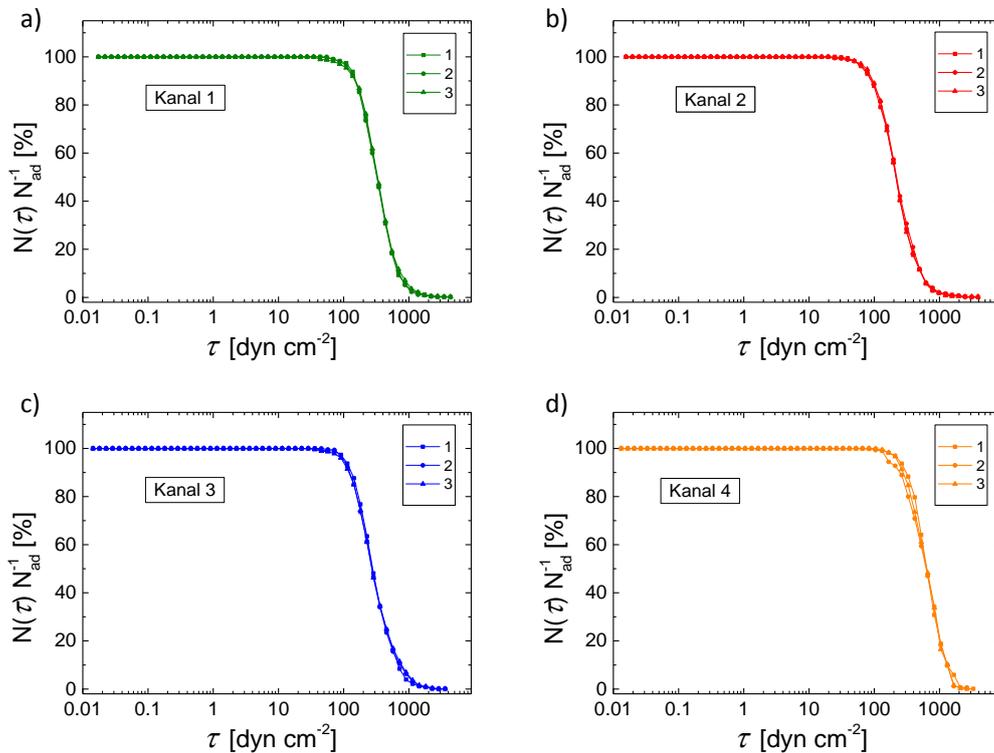


Abbildung 58: a-d) Abrisskurven von 4,5 μm -Carboxybeads auf DDT-SAMs im Kanal 1-4 mit Einsatz von Spacern.

Abbildung 59 stellt in einer Übersicht die τ_{50} -Messwerte der vier Kanäle dar.

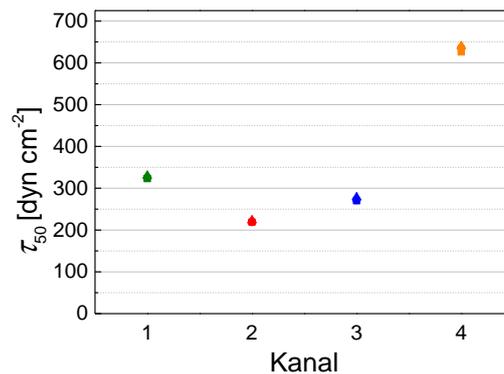


Abbildung 59: Kritische Scherströmungen τ_{50} von 4,5 μm -Carboxybeads auf DDT-SAMs im Kanal 1-4 mit Einsatz von Spacern.

Bei diesem Vergleich ist ebenfalls auffällig, dass zwar die Reproduzierbarkeit der τ_{50} -Werte innerhalb der Kanäle ideal ist, jedoch von Kanal zu Kanal wie bereits auf HA festgestellt, teilweise große Schwankungen auftreten. Die kritischen Scherströmungswerte von Kanal 1-3 lagen im Bereich von $\tau_{50} = 273 \pm 46 \text{ dyn/cm}^2$, Kanal 4 hingegen

wies einen doppelt so hohen Wert auf ($\tau_{50} = 634 \pm 7 \text{ dyn/cm}^2$). Die Abweichungen zwischen den Kanälen lagen zwischen 10-53 %.

Die Schwankungen zwischen den Kanälen traten somit gleichermaßen im HA- (3-44 % als auch im DDT/Carboxybead-System (10-53 %) auf. Damit kann zumindest ausgeschlossen werden, dass die Oberflächenfilme des Polysaccharids HA zu diesen Abweichungen führten.

4.3. Zusammenfassung

Um die Reproduzierbarkeit des mikrofluidischen Systems zu testen, wurde ein System bestehend aus Hyaluronsäure (HA) und carboxyterminierten Polystyrol-Mikrosphären als Adhäsionsobjekte gewählt. Tabelle 3 gibt einen chronologischen Überblick der untersuchten Parameter, deren Implikationen auf die Reproduzierbarkeit der kritischen Scherströmungen und durchgeführte Maßnahmen, um dem negativen Einfluss eines Faktors entgegenzuwirken.

Tabelle 3: Auflistung untersuchter Variablen bei der Optimierung des mikrofluidischen Systems, ihre Konsequenzen für die Reproduzierbarkeit der kritischen Scherströmung und die durchgeführten Maßnahmen. Bedeutung der Symbole: ✓ = ja, ✗ = nein, ○ = keine direkte Beeinflussung.

untersuchte Variablen	Konsequenz für Reproduzierbarkeit von τ_{50}	durchgeführte Maßnahmen	Folge
Kanalposition	✗	✗	✗
Konzentration der adhärten Objekte	✗	✗	✗
Kanaldimensionen	○	✗	✗
Druckschwankungen durch Druckminderer	✗	✗	✗
Druckabfall durch Sog der Pumpe	Kompressionen der Kanäle ✓	Einführung von Spacern	- verbesserte Reproduzierbarkeit - einheitliche Kanalhöhen

Bevor die Reproduzierbarkeit der kritischen Scherströmungen im System erfolgte, wurde geprüft, ob diese abhängig von einer Kanalposition variieren. Bedingt durch den Aufbau des Setups gab es ein rundes Sichtfenster (70 mm), wodurch es möglich war das Sichtfeld für die Messungen (1 mm × 0,75 mm) an mehreren Stellen im Kanal zu positionieren. Zur Überprüfung wurden drei Punkte in gleichmäßigen Abständen im Kanal gewählt. Es zeigte sich eindeutig, dass unabhängig von den Kanalpositionen die kritischen Scherströmungen nur geringfügig variierten (5 %). Zudem variierten die Kanalhöhen in allen drei gemessenen Punkten höchstens um $\pm 1 \mu\text{m}$. Für zukünftige Messungen wurde als Sichtfeld stets die Mitte des Kanals festgelegt.

Bei der anschließenden Reproduzierung der kritischen Scherströmungen in den Kanalsystemen ergaben die Messwerte, dass die τ_{50} -Werte innerhalb den einzelnen Kanäle

zwischen 13-26 % schwankten. Die Abweichungen zwischen den einzelnen Kanalsystemen lagen bei 15-34 %.

Die Vermutung die Konzentration der gemessenen Partikel im Kanal könnte Einfluss auf die die τ_{50} -Werte haben, wurde widerlegt. Ebenso konnten die vermessenen Kanalhöhen ($140 \pm 20 \mu\text{m}$) als sehr wichtiger Faktor für die generierte Strömungsstärke, in keiner direkten Verbindung mit den τ_{50} -Schwankungen von Kanal zu Kanal gebracht werden. Druckfluktuationen als Einflussgröße konnten nach Einsatz einer zusätzlichen Schott-Druckflasche zwischen Druckregulierer und Medium-Reservoir ausgeschlossen werden.

Obwohl die Kanalhöhen entlang des Sichtfensters eines einzelnen Kanals fast nicht variierten ($\pm 1 \mu\text{m}$) und keine unmittelbare Korrelation zwischen den τ_{50} -Werten und einer Kanalhöhe bestätigt werden konnte, wurden weiterhin die elastischen Kanäle als wesentlicher Einflussfaktor vermutet. Insbesondere die zunehmende Saugleistung der Pumpe könnte eine zunehmende Kompression der Kanäle verursachen. Um die unterschiedlich große Kompression der Kanäle bereits beim Zusammenbau zu verhindern, wurde das mikrofluidische System um speziell angefertigte Abstandshalter ($130 \mu\text{m}$), sogenannte Spacer, erweitert. Diese sollten auch während der zunehmenden Saugleistung der Pumpe die Stabilität der elastischen Kanäle gewährleisten. Die Spacer wurden jeweils zwischen Oberfläche und Glasdeckel eingelegt.

Durch die Verwendung der Spacer in weiteren Partikelexperimenten wurde die Reproduzierbarkeit der kritischen Scherströmungen innerhalb der einzelnen Kanäle wesentlich verbessert (SA: 2-11 %). Zudem führten die Spacer zu einheitlicheren Kanalhöhen (mit Spacer: $156 \pm 4 \mu\text{m}$, SA: 3 %; ohne Spacer: $140 \pm 20 \mu\text{m}$, SA: 8 %). Die Schwankungen der τ_{50} -Werte zwischen den Kanälen waren trotz Spacer vorhanden (3-44 %). Durch den Ersatz der aus Makromolekülen bestehenden HA-Oberflächen durch SAMs (DDT), konnte eine zusätzliche Verbesserung der Reproduzierbarkeit innerhalb der Kanäle erfolgen (SA: 1-2 %), zwischen den Kanälen waren die Schwankungen der τ_{50} -Werte zum Teil weiterhin immens (10-53 %). Es scheint, dass die Reassemblierung der vier Kanalsysteme von Messung zu Messung unbekannte Fehlerfaktoren birgt, die bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht verhindert werden konnten.

In Bezug auf die biologischen Untersuchungen mit *N. perminuta* wird in Kapitel 5.8 eine gesonderte Fehlerdiskussion gegeben.

5. Adhäsionsstärkemessungen mit *N. perminuta*

Diatomeen, darunter *N. perminuta*, sind neben Bakterien einer der ersten Organismen, die bei Berührung mit einer künstlichen Oberfläche in marinerer Umgebung an diese adhären. Zudem gehören *N. perminuta* zu einer sehr häufig auf kommerziellen *fouling-release* Anstrichen vorkommende Spezies, weshalb ihr als Modellorganismus eine große Bedeutung zukommt [52].

Der folgende Teil dieser Arbeit soll dazu dienen Erkenntnisse über Adhäsionsprozesse dieser Alge auf diversen Oberflächen unterschiedlicher Eigenschaften zu erlangen. Für die Durchführung der geplanten Adhäsionsstudien sollten jedoch zunächst experimentelle Parameter sorgfältig bestimmt werden.

5.1. Optimierung der Versuchsparameter

5.1.1. Auswirkung der Inkubationszeit auf die Adhäsionsstärke

Die Aussonderung von Adhäsiven und der damit verbundene Adhäsionsvorgang bedürfen einer gewissen Zeit. Dass beispielsweise die Adhäsionsstärke der Diatomeen-Spezies *Amphora* zeitabhängig ist, wurde bereits durch Schultz *et al.* in einer turbulenten Flusskammer gezeigt [249].

Für die mikrofluidischen Abrissexperimente sind Zellen mit entsprechender Haftung an diverse Oberflächen Voraussetzung. Eine zu starke Adhäsion würde außerhalb des erreichbaren Geschwindigkeitsbereichs der Pumpe liegen, eine zu schwache Haftung der Diatomeen könnte hingegen Messungen von potentiellen *fouling-release*-Oberflächen erschweren. Daher mussten zunächst die Inkubationsparameter untersucht werden, um diese an das Adhäsionsverhalten der verwendeten Kieselalgen *N. perminuta* anzupassen.

Hierzu wurde die Haftstärke der Diatomeen in Abhängigkeit von verschiedenen Inkubationsdauern (1 h, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h) untersucht. Als Oberflächen dienten Glassubstrate (NexterionB[®]). Für Inkubationszeiten von 1 h, 2 h und 4 h wurden vier Wiederholungen durchgeführt, die Inkubationszeiten 6 h und 24 h wurden drei Mal vermessen. Als Scherströmungsrate wurde zunächst 26 %/5 s gewählt, da sich diese bereits in Untersuchungen einer anderen marinen Spezies als geeignet erwiesen hatte [246].

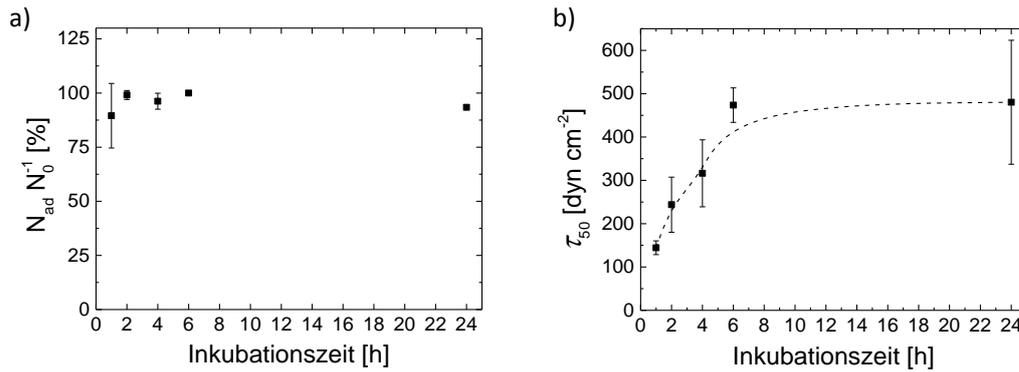


Abbildung 60: a) Adhärenter Zellanteil von *N. perminuta* bzw. b) kritische Scherströmungen nach Inkubationszeiten von 1 h, 2 h, 4 h, 6 h und 24 h. Die angegebenen Fehler zeigen die Standardabweichung.

Abbildung 60 a zeigt den adhärenen Zellanteil der korrespondierenden Inkubationszeiten. Es ist ersichtlich, dass die initiale Adhäsionsphase der Kieselalgen nach 2 h erreicht wurde. Während für die Inkubationsdauer von 1 h, ersichtlich an der Standardabweichung (SA), ein äußerst schwankender adhärenter Zellanteil beobachtet werden konnte (70 % bis 98 %), betrug der adhärente Zellanteil nach 2 h bereits 98 ± 2 %. Ab diesem Zeitpunkt zeigte sich kein merklicher Unterschied mehr, annähernd 100 % der Diatomeen waren nach Inkubationszeiten von 4 h, 6 h und 24 h permanent an die Oberfläche adhärert. Auch die Adhäsionsstärke der Diatomeen nach 1 h war entsprechend schwach: die kritische Scherströmung (τ_{50}) betrug lediglich 144 ± 16 dyn/cm² (Abbildung 60 b). Nach zweistündiger Inkubation verdoppelte sich die Adhäsionsstärke der Zellen auf 244 ± 64 dyn/cm². Nach weiteren 2 h auf dem Glassubstrat, nach einer 4-stündigen Inkubationsphase, wurde eine zusätzliche Adhäsionsverstärkung um 50 % gemessen (316 ± 77 dyn/cm²). Bei einer Inkubationsdauer von 6 h stieg die kritische Scherströmung auf 474 ± 40 dyn/cm². Hier war die Diatomeenablösung vom Substrat zunehmend unvollständig und betrug abhängig vom Experiment lediglich 68 %.

Aus diesen Resultaten konnte zunächst geschlossen werden, dass trotz der gleichmäßigen und reproduzierbaren Zellentfernung (Abbildung 61 a) nach einer Inkubationsdauer von 1 h diese als ungeeignet eingestuft werden musste. Die bereits auf Glas schwachen Adhäsionsstärken deuteten darauf hin, dass die Diatomeen auf antiadhäsiven Oberflächen eventuell nicht messbare Haftstärken zeigen würden. Ebenso bestand dieses Risiko bei der 2-stündigen Inkubation (Abbildung 61 b). Im Gegensatz dazu könnten Inkubationsdauern von 6 h und höher dazu führen, dass für die Diatomeen attraktivere Oberflächen als das hier verwendete Glassubstrat zu Haftstärken oberhalb den maximal möglichen Scherströmungen liegen könnten. Da die 6-stündige Inkubationsdauer allerdings auf eine weitere Adhäsionsstärkezunahme hindeutete, wurde zusätzlich eine Inkubationsdauer von 24 h getestet (Abbildung 61 e). Im Fall der 24 h wurde eine kritische Scherströmung von 480 ± 143 dyn/cm² gemessen, was auf eine eintretende Sättigung hinwies. Dies kann zum einen auf die höchst mögliche Haftstärke auf diesem Substrat zurückzuführen sein. Eine weitere Erklärung bietet das geschlossene System und damit einhergehender Nährstoff-

mangel. Zellen leiteten eventuell die Lösung ihrer permanenten Adhäsion ein, um in bessere Nährstoffaufkommen zu gelangen.

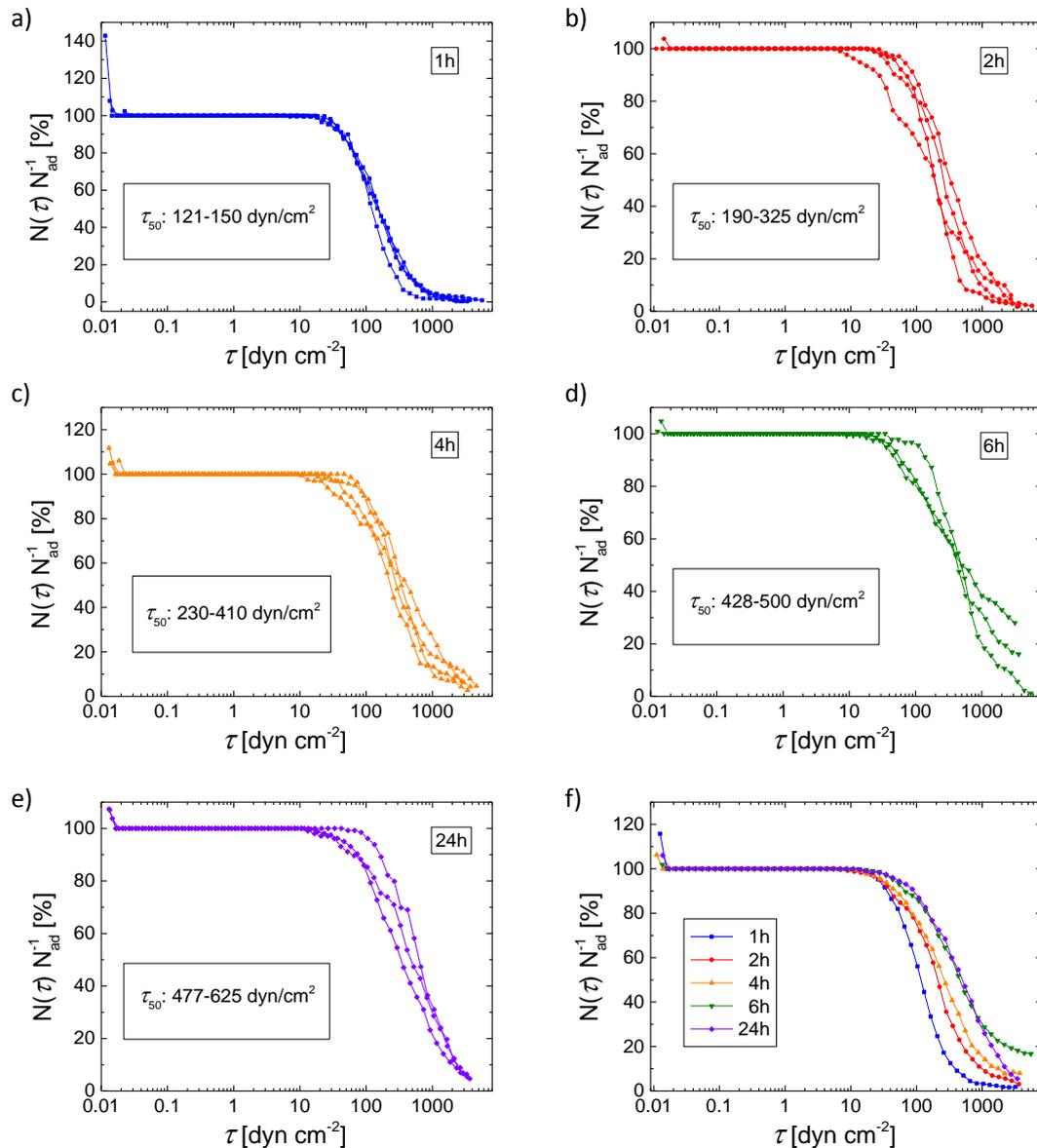


Abbildung 61: Abrisskurven von *N. perminuta* nach Inkubationszeiten von a) 1 h; b) 2 h; c) 4 h; d) 6 h und e) 24 h auf NexterionB®-Glassubstraten; f) Durchschnittskurven aus den Abrisskurven aus a-e. Standardabweichungen der adhärenen Zellanteile sind der Übersicht halber nicht gezeigt. Alle in dieser Arbeit folgenden Experimente wurden mit einer 4-stündigen Inkubationsperiode durchgeführt. Die Absolutzahlen der adhärenen Diatomeen (N_{ad}) im Sichtfeld der Experimente lagen zwischen 200 und 300.

Schlussgefolgert aus den erhaltenen Daten wurden alle weiteren Abrissexperimente dieser Arbeit stets nach einer 4-stündigen Inkubationsphase durchgeführt. Hier ist die Haftstärke der Kieselalgen stark genug für präzise Messungen, und eine zufriedenstellende Reproduzierbarkeit ist ebenfalls gegeben (Abbildung 62 c).

5.1.2. Auswirkung der Flussrate auf die Adhäsionsstärke

Eine auf eine Zelle (z. B. endotheliale Zellen) wirkende Scherströmung kann eine Vielzahl an Zellreaktionen auslösen: Änderungen der Signalübertragungswege, Steuerung von Genexpressionen oder strukturelle Wandlungen des Cytoskeletts können verursacht werden [250]. Letzteres wurde mit dem in dieser Arbeit verwendeten mikrofluidischen System an fibroblastischen Zellen beobachtet [178].

Bei Diatomeen werden keine strukturellen, durch den Fluss herbeigeführten Verformungen erwartet, da diese Algengruppe von einer robusten Silikaschale umgeben ist. Dennoch könnte ein unterschiedlich lang anhaltender Fluss adhärente Diatomeen in ihrem Abrissverhalten beeinflussen. Um diesen Effekt zu untersuchen wurden Zellen der *N. perminuta* vier unterschiedlichen Scherströmungsraten ausgesetzt: 8 %, 26 %, 52 % bzw. 90 % pro 5 s. Wie bereits im Kapitel 3.5.2 (Abbildung 37, S. 49) beschrieben, waren die Geschwindigkeiten der Anfangs- bzw. Endströmung bei den verschiedenen Schrittgrößen annähernd gleich, jedoch variierte die Zeitspanne, in der die maximale Flussgeschwindigkeit erreicht wurde, was zu unterschiedlichen Experimentdauern führte. Die 5 s-Schritte wurden bei allen vier Scherströmungsraten beibehalten während die Anzahl der Schritte mit zunehmender Experimentdauer zunahm. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die getesteten Scherströmungsraten und die entsprechenden Zeitspannen des Experiments.

Tabelle 4: Getestete Scherströmungsraten und dazugehörige Abrissexperimentdauern.

Scherströmungsrate ($5s^{-1}$)	Dauer des Abrissexperiments
8%	13,5 min
26%	4,5 min
52%	2,5 min
90%	1,67 min

Als Substrate dienten wie auch bei den Inkubationszeiten-Untersuchungen NexterionB[®]-Glassubstrate. Die Inkubationszeit betrug 4 h. Die einzelnen Scherströmungsratenexperimente wurden jeweils drei Mal wiederholt.

Abbildung 62 zeigt den adhärennten Zellanteil der Diatomeen und die entsprechenden kritischen Scherströmungen τ_{50} nachdem die Algenzellen nach einer 4-tündigen Inkubationszeit den unterschiedlichen Scherströmungsraten ausgesetzt wurden.

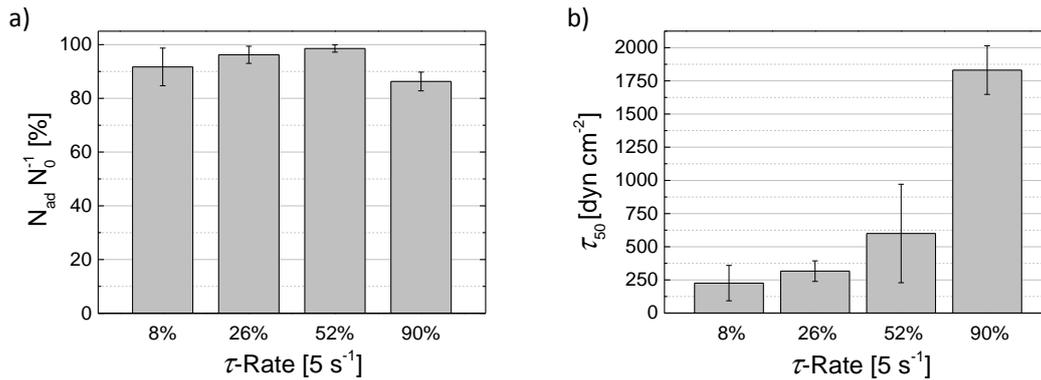


Abbildung 62: a) Adhärenter Zellanteil von *N. perminuta* bzw. b) kritische Scherströmungen τ_{50} der Scherströmungsraten [5 s^{-1}] von 8 %, 26 %, 52 % und 90 %.

Da die Scherströmungen für alle vier Scherströmungsraten zu Beginn identisch waren, unterschieden sich die adhärenen Zellanteile wie erwartet nicht signifikant voneinander und betragen zwischen 86 % und 98 % (Abbildung 62 a). Bei den kritischen Scherströmungen jedoch zeigten sich eindeutige Unterschiede (Abbildung 62 b). Beginnend mit dem 26 %-Scherströmungsratenexperiment, bei der eine kritische Scherströmung von $316 \pm 77 \text{ dyn/cm}^2$ gemessen wurde, stieg dieser Wert auf $600 \pm 371 \text{ dyn/cm}^2$ im 52 %-Experiment. Für das schnelle 90 %-Experiment waren $1831 \pm 183 \text{ dyn/cm}^2$ nötig, um 50 % der adhärenen Zellen von der Oberfläche zu entfernen. Es scheint als benötigen die Algenzellen eine gewisse Zeit, um auf den Fluss anzusprechen. Da dieser jedoch im 90 %-Experiment schneller zunahm als der Zellablöseprozess dauerte, verschob sich die kritische Scherströmung zu höheren Werten. Diese Hypothese wird durch eine genauere Betrachtung der 90 %-Abrisskurve in Abbildung 63 d gestützt. Verglichen mit dem 26 %- bzw. 52 % Experiment (Abbildung 63 b und c), bei welchen der Abriss der ersten Algenzellen bereits bei $19 \pm 7 \text{ dyn/cm}^2$ bzw. $42 \pm 30 \text{ dyn/cm}^2$ begann, zeigte sich, dass im extremen Fall der 90 %/5 s-Scherströmungsrates der anfängliche Zellabriss deutlich später eintrat ($\tau_{min} = 100 \pm 50 \text{ dyn/cm}^2$).

Im Fall des langen 8 %/5 s-Scherströmungsratenexperimentes betrug die Experimentdauer 13.5 min. Auffallend war, dass sich die Ablösung einzelner Zellen über einen breiteren Scherströmungsbereich hin, was an den flacheren Kurven erkennbar ist (Abbildung 63 a). Im Vergleich zu den schnelleren Scherströmungsraten begannen sich die Zellen bereits bei $10 \pm 6 \text{ dyn/cm}^2$ von der Oberfläche zu lösen. Im Mittel betrachtet schien die verlängerte Flussaussetzung der 8 %/5 s-Scherströmungsrates im Vergleich zu den höheren Scherströmungsrates jedoch keine auffallende Veränderung auf die Haftstärke der Algenzellen zu haben und ähnelte mit $226 \pm 133 \text{ dyn/cm}^2$ dem 26 %-Experiment ($\tau_{50} = 316 \pm 77 \text{ dyn/cm}^2$).

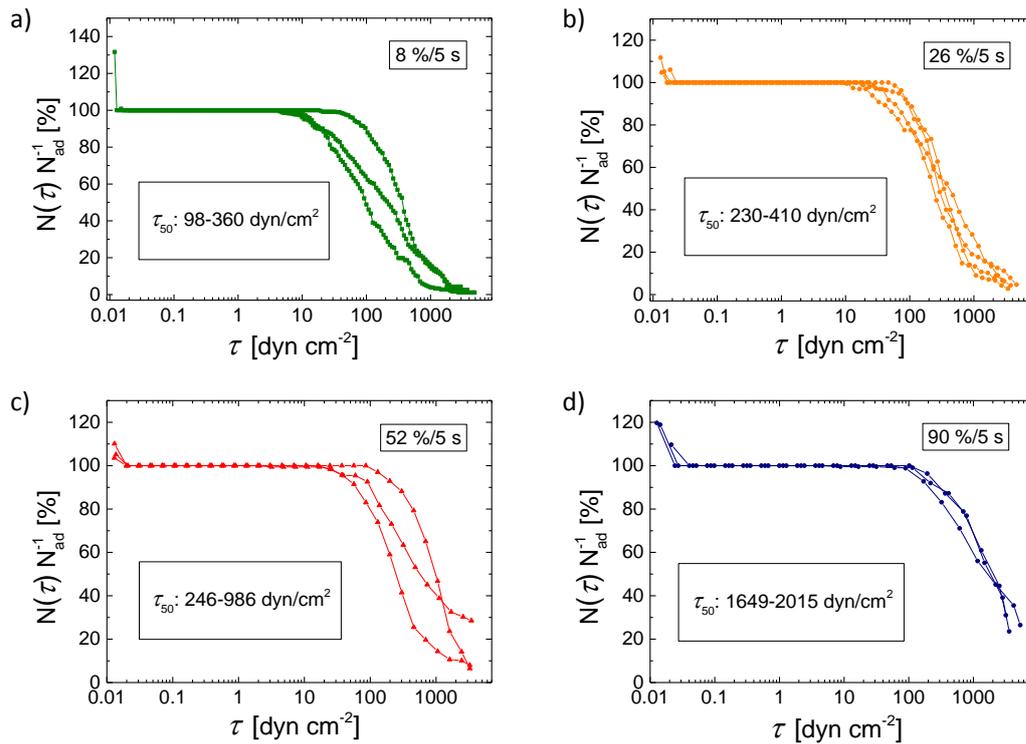


Abbildung 63: Abrissverhalten von *N. perminuta* auf NexterionB[®]-Glas unter Scherströmungsraten [5 s^{-1}] von a) 8 %; b) 26 %; c) 52 % und d) 90 %.

Aufgrund der Experimentdauer (4,5 min) und der Reproduzierbarkeit des 26 %-Scherströmungsratenexperiments wurden alle folgenden Experimente dieser Arbeit wenn nicht anders angegeben bei einer 4-stündigen Inkubationszeit und der Scherströmungsrate von 26 %/5 s durchgeführt.

5.1.3. Zellausrichtungen in der Strömung

Die Zellausrichtung bei der Adhäsion von *N. perminuta* erfolgt nach dem Zufallsprinzip. Abbildung 64 illustriert die zufälligen Adhäsionsanordnungen der Diatomeen auf einer Oberfläche. Die Zellen können, ob in der Raphen- als auch Seitenorientierung (folgendes Kapitel bzw. Kapitel 2.1.1, S. 8), senkrecht oder parallel zur Strömungsrichtung adhären und ebenso in unterschiedlichen Winkeln zur Strömungsrichtung geneigt sein (Abbildung 64 a-c). Dies bedeutet, dass je nach Adhäsionsorientierung und Adhäsionsausrichtung zur Strömung hydrodynamische Kräfte unterschiedlich stark auf die Diatomeen wirken können.

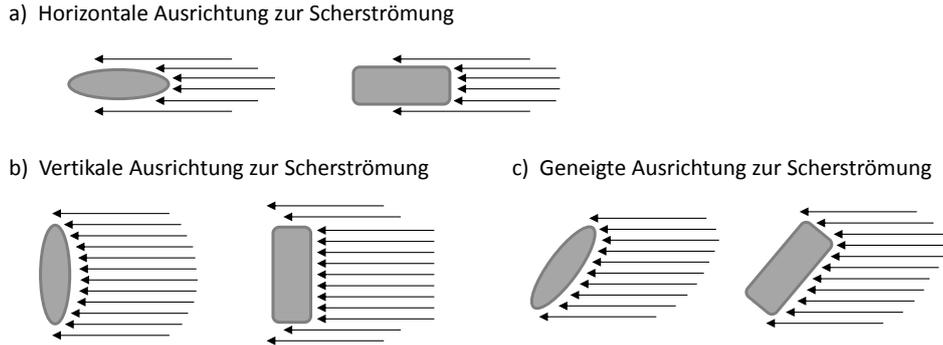


Abbildung 64: In den Adhäsionsstudien beobachtete Ausrichtungen der Diatomeen zur Scherströmung (jeweils in Raphe- und Seitenorientierung).

Schultz *et al.* entwickelten ein vereinfachtes Modell, mit Hilfe dessen die hydrodynamische Kräfte (Auftriebs- und Widerstandskraft), die auf eine Seepocke innerhalb einer Scherströmungsgeschwindigkeit von 0-4 m/s wirken, gemessen werden konnten. Abbildung 65 illustriert das dabei entstehende Kräfteprofil [251]. Die wirkenden Kräfte sind hierbei Widerstandskraft F_W und Auftriebskraft F_A .

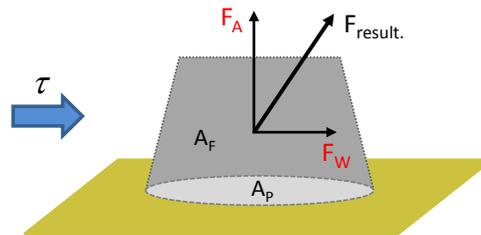


Abbildung 65: Schematische Darstellung einer adhärenierten Seepocke und auf diese in einer Scherströmung τ wirkenden hydrodynamischen Kräfte. F_A = Auftriebskraft, F_W = Widerstandskraft, $F_{result.}$ = resultierende Kraft, A_F = frontale Fläche: direkte Angriffsfläche für Scherströmung (F_W wirkt), A_P = projizierte Fläche: direkter Kontakt zur Oberfläche (F_A wirkt).

Mathematisch lassen sich in diesem Zusammenhang, jedoch auch im Allgemeinen, Auftrieb- und Widerstandskraft (F_A bzw. F_W) folgendermaßen beschreiben:

$$F_A = \frac{1}{2} C_A A_P \rho v^2$$

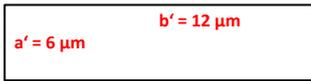
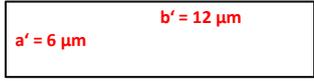
$$F_W = \frac{1}{2} C_W A_F \rho v^2$$

Dabei ist $c_{A/W}$ = Koeffizient für Auftrieb bzw. Widerstand (der sogenannte Beiwert), ρ = Dichte des Fluids, v = Geschwindigkeit der freien Strömung, $A_{P/F}$ = projizierte bzw. frontale Fläche des umströmenden Körpers.

Dieser für Seepocken beschriebene und untersuchte Sachverhalt lässt sich im Ansatz ebenso auf adhärenierte *N. perminuta* übertragen, wobei davon ausgegangen wird, dass alle Diatomeen in ihrer Form gleich sind ($5 \times 6 \times 12 \mu\text{m}$). Allgemein folgt, dass eine senkrecht zur Strömungsrichtung adhärenierte Algenzelle, verglichen mit einer parallel zur Strömung

adhärierten Diatomee, eine höhere Widerstandskraft mit zunehmender Scherströmung erfahren sollte, da in diesem Fall die frontale Angriffsfläche größer ist. In diesem Zusammenhang muss unterschieden werden, ob eine Diatomee auf der Raphe oder Seite adhäriert vorliegt d.h. welche Fläche der Diatomee die frontale bzw. die projizierte Fläche darstellt und auf welche Fläche folglich die Widerstands- bzw. Auftriebskraft wirkt. Hierzu ist es hilfreich die Zellwandflächen einer Diatomee in Form von einzelnen geometrischen Körpern zu illustrieren (Ellipse und Rechteck). Das Rechteck, welches die Seite der Kieselalge darstellt, ist mit einer Fläche von $\approx 60 \mu\text{m}^2$ größer als die Fläche der Ellipse ($\approx 47 \mu\text{m}^2$), welche die Raphe beschreibt. Tabelle 5 fasst die frontalen bzw. projizierten Flächen einer Diatomee in den zwei möglichen Adhäsionsprofilen zusammen. In diesem Fall werden nur die senkrecht zur Strömung liegenden Diatomeen zur Strömung berücksichtigt.

Tabelle 5: Frontale bzw. projizierte Flächen von *N. perminuta* in Raphe- bzw. Seitenposition.

Adhäsions-orientierung	Frontale Fläche A_F	Projizierte Fläche A_P
Raphe	 $A_{F_Seite} = a' \times b' = 60 \mu\text{m}^2$	 $A_{P_Raphe} = \pi \times \frac{1}{2}a \times \frac{1}{2}b = 47 \mu\text{m}^2$
Seite	 $A_{F_Raphe} = \pi \times \frac{1}{2}a \times \frac{1}{2}b$	 $A_{P_Seite} = a' \times b'$

Zur Abschätzung der hydrodynamischen Kräfte, die in einer Strömung auf eine Diatomee in zwei möglichen Adhäsionsorientierungen (Seite und Raphe) wirken, müssen Auftriebskraft F_A und Widerstandskraft F_W berechnet werden. Für diese Berechnung benötigt man die uns unbekannt Koeffizienten für Auftrieb bzw. Widerstand (c_A/c_w). Diese sind nur experimentell zugänglich. Ihre Größe hängt unter anderem von der Geometrie des umströmten Körpers sowie dessen Orientierung in der Strömung und seiner Oberflächenbeschaffenheit ab. Der Widerstandsbeiwert c_w kann zumindest für eine auf der Raphe und senkrecht zur Strömung adhärierte Diatomee als „senkrecht angeströmte Platte“ genähert werden. In diesem Fall gilt: $c_w = \text{Breite}/\text{Höhe} \rightarrow b'/a' = 2 \rightarrow c_w = 1,15$.

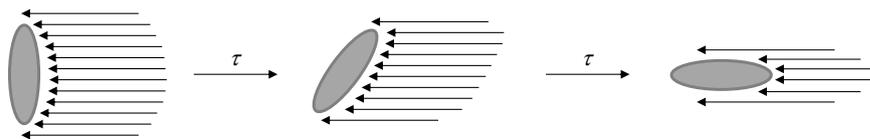
Zur Vereinfachung wird die Auftriebskraft F_A im Folgenden vernachlässigt, da diese aufgrund der Adhäsion kleiner sein muss als die Widerstandskraft F_W . Zudem betrachten wir lediglich die senkrechte Ausrichtung der Diatomeen zur Strömung. Die frontalen Flächen in der Strömung sind hierbei bekannt ($A_{F_Seite} = 47 \mu\text{m}^2$, $A_{F_Raphe} = 60 \mu\text{m}^2$). Für den Vergleich der Widerstandskraft F_W in den beiden Orientierungen werden diese Kräfte ins Verhältnis gesetzt:

$$\frac{F_{W_Seite}}{F_{W_Raphe}} = \frac{\frac{1}{2} C_W A_{F_Seite} \rho U_e^2}{\frac{1}{2} C_W A_{F_Raphe} \rho U_e^2} = \frac{A_{F_Seite}}{A_{F_Raphe}}$$

Folglich hängt bei gleichen Strömungsbedingungen und Dichte des Fluids die Widerstandskraft vereinfacht nur von der frontalen Fläche der beiden Orientierungen ab. Die frontale Fläche von Diatomeen, die senkrecht zur Strömung auf der Seite haften ist kleiner (Ellipse: $47 \mu\text{m}^2$), als die der Diatomeen, welche auf der Raphe adhären (Rechteck: $60 \mu\text{m}^2$). Es folgt, dass im Extremfall (vertikal zur Strömung) nur eine geringfügig höhere Widerstandskraft (Faktor 1,3) auf die auf der Raphe adhären Diatomeen wirken würde. Bei parallel zur Strömung ausgerichteten Diatomeen, wird eine gleich große Widerstandskraft erwartet, da sie frontalen Flächen in dieser Ausrichtung gleich sind.

Anhand von unterschiedlich groß wirkenden Widerstandskräften je nach Ausrichtung der Zellen zur Strömung, lassen sich in dieser Arbeit gemachte Beobachtungen von adhären *N. perminuta* deuten, ohne Bezug auf die Haftstärken der Diatomeen zu nehmen. Offensichtlich aus der höheren Widerstandskraft, welche auf die vertikal zur Strömung ausgerichteter Zellen wirkte, wurde vereinzelt beobachtet, dass Zellen bei zunehmender Scherströmung von der vertikalen in die parallele Ausrichtung übergingen und so die Kraft auf die frontale Fläche minimiert wurde (Abbildung 66 a). Zudem kam es vor, dass Diatomeen bei zunehmenden Scherströmungen τ von der Rapheposition ($A_{F_R} \approx 60 \mu\text{m}^2$) in die Seitenposition ($A_{F_S} \approx 47 \mu\text{m}^2$) umkippten, was ebenso auf die erhöhte Widerstandskrafteinwirkung auf eine größere frontale Fläche zurückzuführen wäre (Abbildung 66 b).

a) Umorientierung von der vertikalen in die horizontale Ausrichtung zur Scherströmung



b) Übergang von der Rapheposition in eine Seitenposition

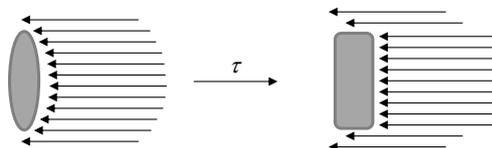


Abbildung 66: Bei zunehmender Scherströmung beobachtete Umorientierungen a) Übergang von der vertikalen in die parallele Ausrichtung zur Scherströmung, b) Umkippen von der Raphe- in die Seitenposition.

5.1.4. Einfluss verschiedener Zellorientierungen auf die Adhäsionsstärke der Diatomeen

Wie in Kapitel 2.1 (S. 6) beschrieben, besitzen die meisten pennaten Diatomeen, *N. perminuta* eingeschlossen, eine Raphe auf jeder ihrer beiden Valven (Abbildung 2, S. 6). Der Kontakt zu einer Oberfläche kann nach Absinken einzelner Algenzellen durch Gravitation auf einer der beiden Raphen oder auf der Seite (Gürtelbandposition) hergestellt werden. Durch direktes Landen auf einer der beiden Raphen erfolgt eine anschließende Aussonderung der EPS aus dieser direkt aufliegenden Raphe an die Oberfläche (Abbildung 67 a). Beim Oberflächenkontakt in der Gürtelbandposition tritt die Adhäsion über eine oder beide Raphen ein (Abbildung 67 b). An dieser Stelle ist wichtig zu erwähnen, dass neben einzelnen Zellen im Diatomeenteilungszyklus ebenso noch nicht vollständig geteilte Tochterzellen beobachtet wurden, welche in den Auswertestudien nicht vernachlässigt werden sollten (Abbildung 67 c).

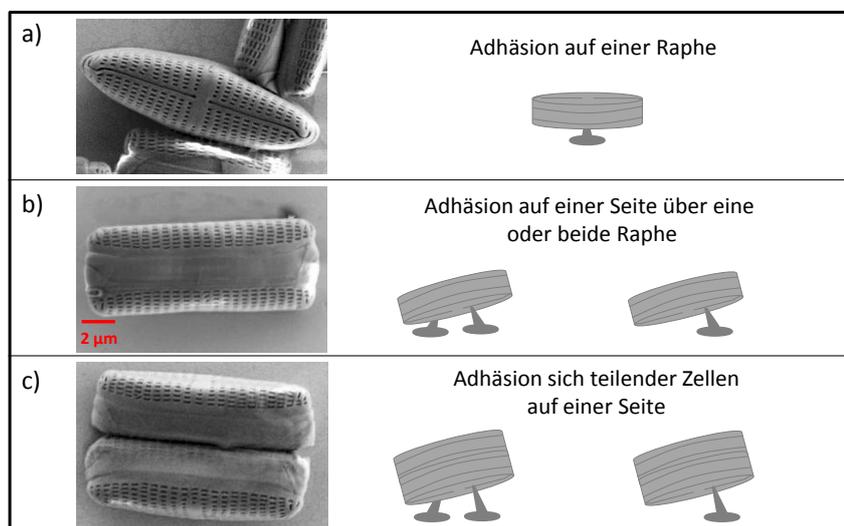


Abbildung 67: In Adhäsionsuntersuchungen beobachtete Zellorientierungen.

Lind *et al.* beschrieben, dass der Kontakt von pennaten Diatomeen mit einer Oberfläche vorzugsweise über die Seite (Gürtelbandansicht) vollzogen wird [114]. Auch die vorliegende Arbeit bestätigt, dass die Zellen der Diatomee *N. perminuta* vorzugsweise den permanenten Kontakt zur Oberfläche über ihre Seite liegend herstellten (siehe folgende Analysen auf DDT und EG₆OH).

In diesem Teil der Arbeit stellte sich die Frage, ob ein Unterschied zwischen den Haftstärken der auf der Seite oder direkt über die Raphe adhärenen *N. perminuta* besteht. Zudem sollte untersucht werden, ob die Adhäsion von noch nicht geteilten Zellen ein eventuell außergewöhnliches Haftverhalten aufzeigt.

Abbildung 67 zeigte die drei Adhäsionsorientierungen, die aus drei Abrissexperimenten unabhängig voneinander ausgewertet wurden. Als Oberflächen dienten die SAMs DDT

und EG₆OH mit entgegengesetzten Benetzungseigenschaften: DDT wurde als hydrophobe Oberfläche eingesetzt, während EG₆OH eine hydrophile und hydratisierte Oberfläche darstellt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Oberflächeneigenschaften der verwendeten SAMs. Die Schichtdicke wurde durch Ellipsometrie bestimmt. Fehler der Kontaktwinkel- bzw. Ellipsometriemessungen: $\pm 3^\circ$ bzw. $\pm 3 \text{ \AA}$.

Oberfläche	Formel	Kontaktwinkel/ $^\circ$	Schichtdicke/ \AA
DDT	HS-(CH ₂) ₁₁ CH ₃	104	13
EG ₆ OH	HS-(CH ₂) ₁₁ (OC ₂ H ₄) ₆ OH	32	22

DDT (Dodecanthiol-SAM)

Abbildung 68 a-c zeigt die Abrisskurven dreier Experimente auf dem hydrophoben SAM DDT, in welchen die Zellorientierungen unabhängig voneinander ausgewertet wurden. Die aus den Abrisskurven resultierenden τ_{50} -Mittelwerte bzw. deren geringe Standardabweichungen Abbildung 68 d bzw. in Tabelle 7 zeigen, dass die Adhäsionsstärken der Diatomeen auf DDT in den drei Zellorientierungen in drei einzelnen Messungen ähnlich waren. Durch Hypothesentests (T-Test bei einer Stichprobe) konnte bestätigt werden, dass sich die Werte drei Orientierungen (Raphe, Seite, ungeteilte Zellen) in allen drei Messungen nicht signifikant vom Testmittelwert (τ_{50} der drei Zellorientierungen insgesamt) unterschieden ($0,5 < p < 1$). Dieses Resultat bedeutet wiederum, dass die im vorangegangenen Kapitel diskutierten unterschiedlichen Zellausrichtungen in der Strömung keinen eindeutigen Einfluss auf die kritischen Scherströmungen der Diatomeen hatten. Es wurde abgeschätzt, dass die in der Raphe adhären Diatomeen im Vergleich zu den auf der Seite haftenden eine höhere Widerstandskraft (Faktor 1,3) erfahren müssten. Da dieser Faktor jedoch zum einen sehr gering ist und zum anderen nur für den Extremfall von senkrecht zur Strömung adhären Diatomeen gilt, liegt die Vermutung nahe, dass sich der Effekt durch die zufällig ausgerichteten Zellen in der Strömung herausmittelt.

Tabelle 7: Mittelwerte der kritischen Scherströmungen τ_{50} der drei Zellorientierungen auf DDT.

Messung	τ_{50} Raphe [dyn/cm ²]	τ_{50} Seite [dyn/cm ²]	τ_{50} ungeteilte Zellen [dyn/cm ²]	τ_{50} der drei Zellorientierungen [dyn/cm ²]
1	1282	1340	1439	1354 \pm 80
2	1129	1328	1370	1275 \pm 129
3	1881	1544	1271	1565 \pm 306

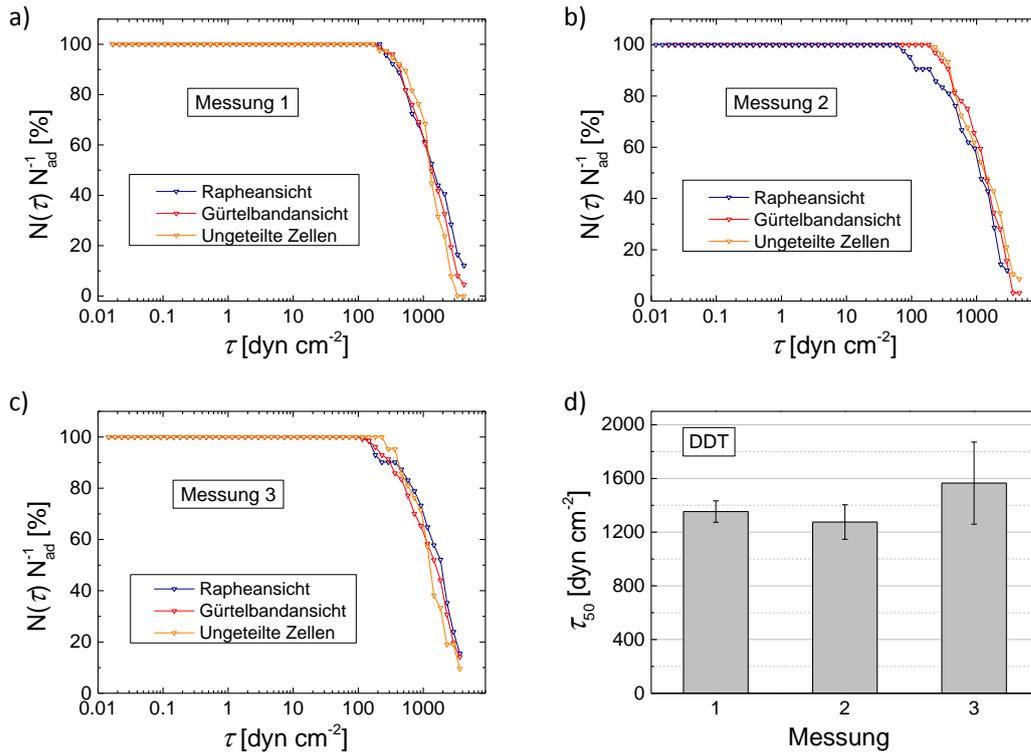


Abbildung 68: a-c) Abrisssexperimente von *N. perminuta* auf DDT mit unabhängig voneinander ausgewerteten Zellorientierungen; d) jeweils aus drei Zellorientierungen resultierende Durchschnittswerte der kritischen Scherströmungen τ_{50} . Die angegebenen Fehler zeigen die Standardabweichung der jeweils drei Orientierungen.

Der Anteil der Zellen, die auf der Seite liegend über eine oder beide Raphe adhärten betragen im Durchschnitt der drei Messungen $57 \pm 2 \%$. Direkt über eine Raphe stellten $30 \pm 5\%$ der Algenzellen den permanenten Kontakt zur Oberfläche her. Ungeteilte Diatomeen kamen wesentlich seltener vor, lediglich $13 \pm 4 \%$ der Zellen auf DDT lagen in einer ungeteilten Zyklusstufe vor (Abbildung 69).

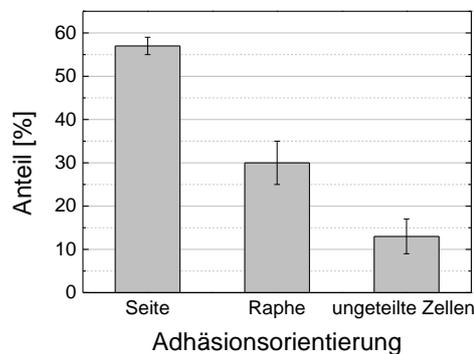


Abbildung 69: Prozentuale Anteile der Diatomeen in drei Adhäsionsorientierungen auf DDT. Anzahl der Zellen (N_{ad}) in Rapheansicht: 42-116, Gürtelbandansicht: 105-180 und ungeteilte Zellen: 21-38.

EG₆OH

Abbildung 70 a-d zeigt, dass auch auf EG₆OH die Adhäsionsstärken der drei Zellorientierungen von *N. perminuta* in drei unabhängigen Messungen ähnlich waren. Tabelle 8 führt die einzelnen Werte der kritischen Scherströmungen auf. Wie auch bei der hydrophoben Oberfläche DDT, zeigte sich in diesem Fall anhand von Hypothesentests (T-Test bei einer Stichprobe), dass sich die τ_{50} -Werte der drei Orientierungen (Raphe, Seite, ungeteilte Zellen) in allen drei Messungen nicht signifikant vom Testmittelwert (τ_{50} der drei Zellorientierungen) unterschieden ($0,5 < p < 1$). Da die Diatomeen auf dieser Oberfläche zudem schwach hafteten, war die Herausarbeitung von derart präzisen Signifikanzen nicht möglich (siehe hierzu auch Kapitel 4: Optimierung des mikrofluidischen Systems, S. 53).

Tabelle 8: Mittelwerte der kritischen Scherströmungen τ_{50} der drei Zellorientierungen auf EG₆OH.

Messung	τ_{50} Raphe [dyn/cm ²]	τ_{50} Seite [dyn/cm ²]	τ_{50} ungeteilte Zellen [dyn/cm ²]	τ_{50} der drei Zellorientierungen [dyn/cm ²]
1	16	16	14	15 ± 1
2	20	25	14	20 ± 5
3	44	28	27	33 ± 9

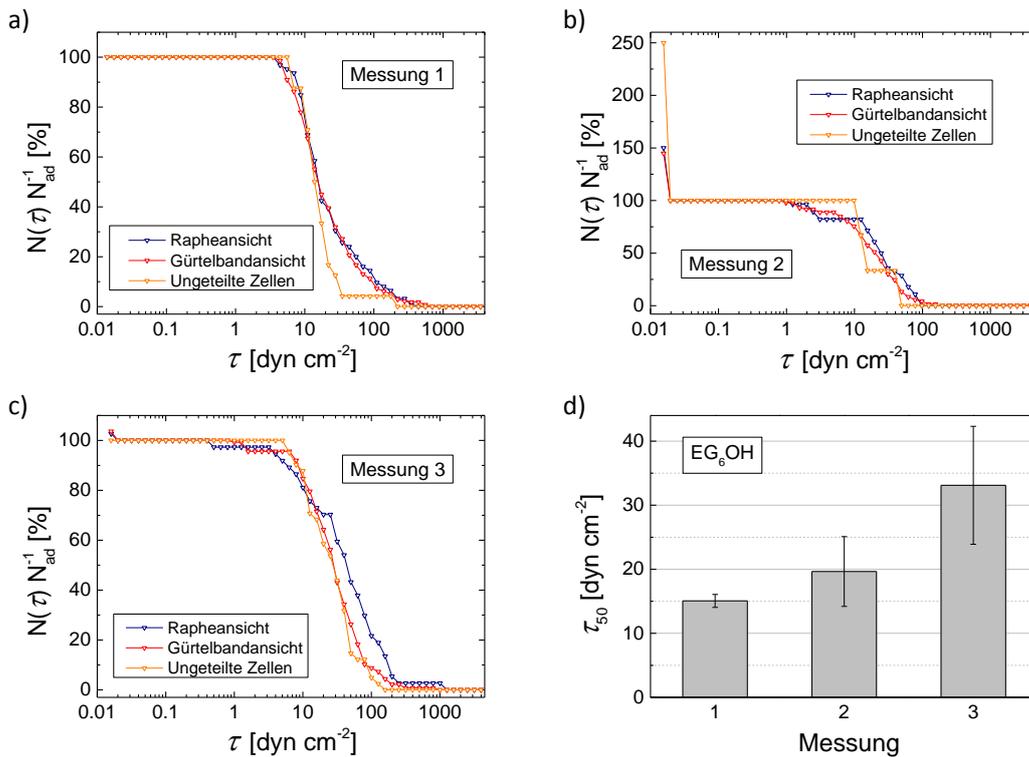


Abbildung 70: a-c) Abrissexperimente von *N. perminuta* auf EG₆OH. Zellorientierungen in der Raphe- und Gürtelbandansicht sowie ungeteilte Zellen wurden unabhängig voneinander ausgewertet; d) daraus resultierende Durchschnittswerte der kritischen Scherströmungen τ_{50} . Die angegebenen Fehler zeigen die Standardabweichung der jeweils drei Orientierungen.

Die prozentuale Verteilung der Adhäsionsorientierungen in auf EG₆OH glich der auf DDT. Der Großteil der Algenzellen waren ebenfalls über die Seite liegend an die Oberfläche adhärirt ($70 \pm 8 \%$). Der Anteil der Diatomeen in der direkten Rapheposition betrug $21 \pm 6 \%$. Ungeteilte Zellen kamen auch hier selten vor ($9 \pm 7 \%$). Aufgrund dessen ist die Aussage der kritischen Scherströmung τ_{50} der ungeteilten Zellen vor allem in Messung 2 mit Vorsicht zu betrachten, da sich die Statistik auf den Abriss von lediglich sechs adhärirten Zellen (N_{ad}) stützt. Dies war an der stufenartigen Kurve ersichtlich.

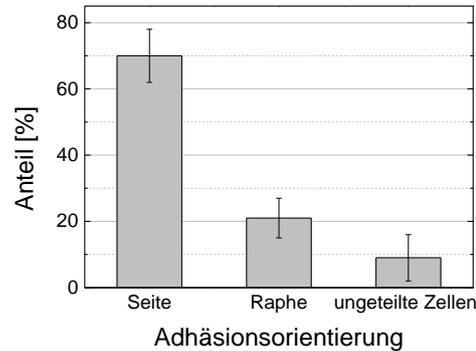


Abbildung 71: Prozentuale Anteile der Diatomeen in drei Adhäsionsorientierungen auf EG₆OH. Anzahl der Zellen (N_{ad}) in Rapheansicht: 28-125, Gürtelbandansicht: 137-276 und ungeteilte Zellen: 6-42.

5.1.5. Zusammenfassung

Die mikrofluidischen Versuchsparameter für die Diatomee *N. perminuta* wurden erfolgreich ermittelt. Es zeigte sich, dass eine 4-stündige Inkubationsphase zu reproduzierbaren Ergebnissen führte. Da zudem die Scherströmungsrate von $26 \%/5 \text{ s}$ mit einer Experimentdauer von 4.5 min einen verlässlichen und reproduzierbaren Algenabriss aufwies, wurde diese für weitere Experimente gewählt. Die Annahme eine höhere Widerstandskraft würde auf Diatomeen wirken, welche auf einer ihrer Raphen und über einer der Seiten adhärirten, konnte durch anschließende Analyse der unterschiedlichen Adhäsionsorientierungen widerlegt werden. In zukünftigen Auswertungen dieser Arbeit wurden folglich alle Zellorientierungen stets gleichwertig bewertet.

5.2. Adhäsion der Diatomeen auf SAMs unterschiedlicher Benetzungseigenschaften

Es ist bekannt, dass Oberflächeneigenschaften wie Benetzbarkeit und Oberflächenenergie einen Effekt auf die Adhäsion im Allgemeinen als auch auf die Adhäsionsstärke von Mikroorganismen haben [165, 167, 252]. Wie im Bezug auf die Zellorientierungsanalyse von *N. perminuta* (siehe Kapitel 5.1.4, S. 80) beschrieben wurde, zeigten die Algenzellen auf dem hydrophilen Ethylen-Glykol-SAM EG₆OH ein vermindertes Adhäsionsvermögen im Vergleich zu dem hydrophoben aliphatischen SAM DDT. Daraufhin wurde in diesem Teil der Arbeit in mikrofluidischen Messungen die Adhäsionsstärke von *N. perminuta* auf SAMs unterschiedlicher Terminierungen untersucht.

5.2.1. Eigenschaften der verwendeten SAMs

Als chemisch unterschiedliche SAMs wurden -O-(C₂H₄)(CF₂)₅CF₃ (FU DT), -CH₃ (DDT), -NH₂ (AU DT), -OH (HU DT) und (-OC₂H₄)₄₄-OH (PEG2000-OH) terminierte Oberflächen eingesetzt. Die Charakterisierung der unterschiedlichen Benetzungen erfolgte durch Kontaktwinkelmessungen. HU DT und PEG wiesen mit Kontaktwinkeln von 30° bzw. 33° hydrophilen Charakter auf, während FU DT und DDT hydrophobe Eigenschaften besaßen (Kontaktwinkel: 112° bzw. 104°). Der AU DT-SAM zeigte mit einem Kontaktwinkel von 55° einen dazwischenliegenden Wert. Die Schichtdicken wiesen bei allen verwendeten SAMs ähnliche Werte zwischen 13 Å und 16 Å auf. PEG war mit 33 Å etwas dicker. An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass PEG eine spezielle Stellung in dieser Untersuchungsreihe zukommt: als ein Poly(Ethylen-Glykol) ist dieser SAM nicht lediglich hydrophil, sondern besitzt ebenso Hydratationseigenschaften. Dieser Beschichtung wird aufgrund ihrer abweisenden Wirkung auf Proteine, eukaryotische Zellen, Bakterien etc. ein antiadhäsiver Charakter zugeschrieben. In diesem Zusammenhang werden (Ethylen-Glykol)-Oberflächen genauer im Kapitel 5.4 (S 95) untersucht.

Die Eigenschaften der verwendeten SAMs sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Die Angaben stimmten mit bereits veröffentlichten Daten überein [57, 69, 253]. Die Abkürzung PEG bezieht sich stets auf den PEG2000-OH SAM. Die mikrofluidischen Adhäsionsstudien wurden für alle SAMs viermal durchgeführt, die Messungen mit PEG erfolgten dreimal. Als Versuchsparameter dienten die zuvor in Kapitel 5.1 (S. 71) ermittelten (4 h Inkubationsphase, 26 %/5 s Scherströmungsrate).

Tabelle 9: Eigenschaften der verwendeten SAMs mit unterschiedlichen Benetzungsgraden. Die Schichtdicken wurden mittels Ellipsometrie bestimmt. Fehler der Kontaktwinkel- bzw. Ellipsometriemessungen: $\pm 3^\circ$ bzw. $\pm 3 \text{ \AA}$.

Oberflächenchemie	Abkürzung	Kontaktwinkel/ $^\circ$	Schichtdicke/ \AA
HS-(CH ₂) ₁₁ -O-(CH ₂) ₂ -(CF ₂) ₅ -CF ₃	FUDT	112	16
HS-(CH ₂) ₁₁ -CH ₃	DDT	104	13
HS-(CH ₂) ₁₁ -NH ₂	AUDT	55	16
HS-(CH ₂) ₁₁ -OH	HUDT	33	13
HS-(CH ₂) ₂ -(O-(CH ₂) ₂) ₄₄ -OH	PEG	30	33

5.2.2. Adhäsionsassays

Anhand von Abbildung 72 a ist zu erkennen, dass die adhärenen Zellanteile in allen Fällen ähnlich hoch zwischen 91 % und 97 % lagen. Auf PEG assemblierten nicht adhärenen Algenzellen zu Klumpen, worauf die Absolutzahl N_0 nicht erfassbar und somit der $N_0 N_{ad}^{-1}$ -Wert nicht zugänglich war. Die Adhäsionsstärken auf den unterschiedlich terminierten SAMs variierten hingegen, was sich in den stark unterschiedlichen Werten der kritischen Scherströmungen τ_{50} widerspiegelt (Abbildung 72 b).

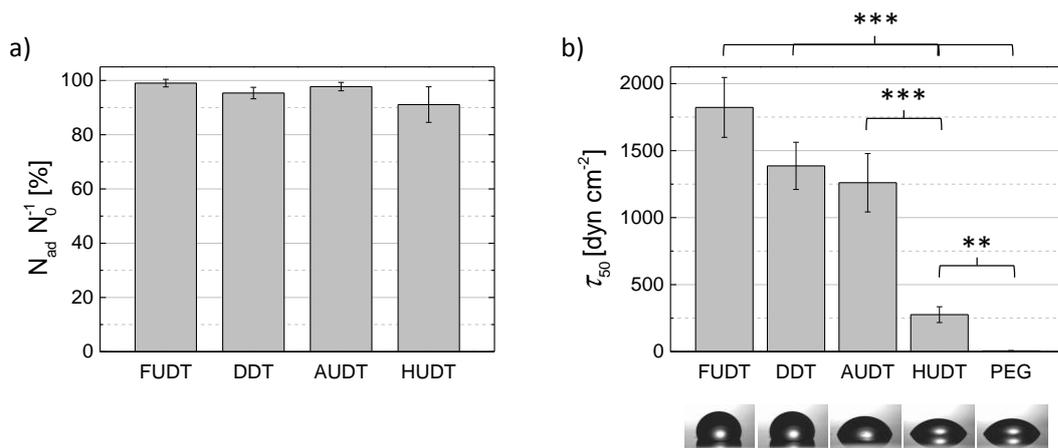


Abbildung 72: Adhäsion von *N. perminuta* auf SAMs unterschiedlicher Benetzungsgrade nach einer 4 h Inkubation; a) adhärenen Zellanteil der Diatomeen (nicht adhärenen Algenzellen assemblierten auf PEG zu Klumpen, weshalb der N_0 -Wert nicht erfassbar war); b) Durchschnittswerte der kritischen Scherströmungen τ_{50} , die nötig waren um 50 % der adhärenen Zellanteile zu entfernen. Die Wassertropfen illustrieren die Benetzungseigenschaften der SAMs. Die angegebenen Fehler zeigen die Standardabweichung (n = 4). Sternsymbole: ** = statistisch signifikant, *** = statistisch hoch signifikant.

Anhand von den Abrisskurven in Abbildung 73, lässt sich der Abriss der Zellen im Detail verfolgen.

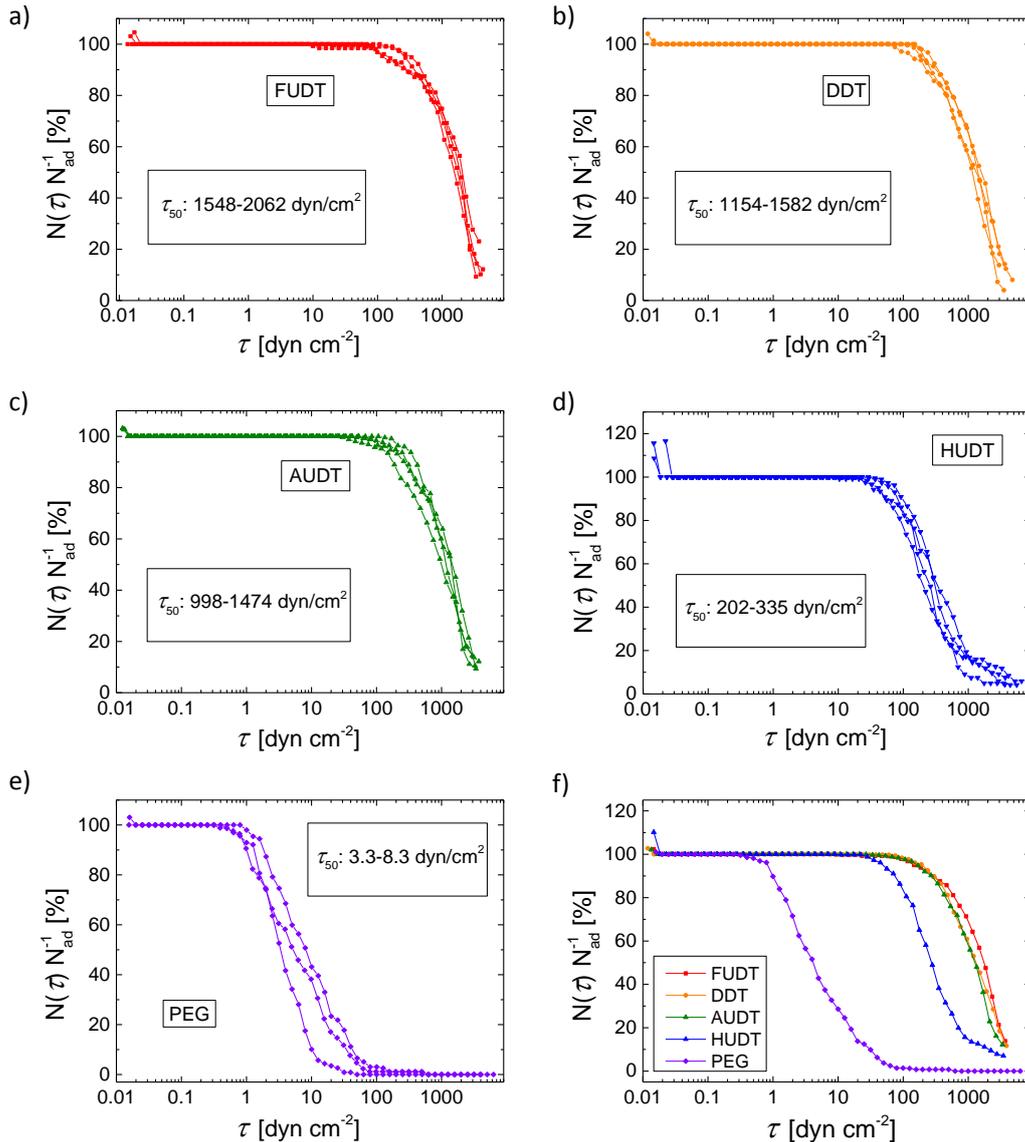


Abbildung 73: Abrisskurven der *N. perminuta* von Oberflächen mit unterschiedlichen Benetzungseigenschaften; a) FUDT; b) DDT; c) AUDT; d) HUDT; e) PEG; f) Durchschnittskurve der Abrisskurven aus a-e. Die Absolutzahlen der adhärenen Diatomeen (N_{ad}) im Sichtfeld des Experiments: 163-326 (FUDT), 174-397 (DDT), 224-353 (AUDT), 119-186 (HUDT) und 141-197 (PEG).

Die Diatomeen zeigten eine schwache Adhäsion auf den hydrophilen SAMs HUDT ($\tau_{50} = 276 \pm 59$ dyn/cm²) und PEG, auf welchem die Adhäsion zudem mit den kritischen Scherströmungen von $\tau_{50} = 6 \pm 2$ dyn/cm² um zwei Größenordnungen schwächer war. Die Algenzellen beginnen sich auf diesen Oberflächen bereits bei 36 ± 8 dyn/cm² (HUDT) bzw. $0,7 \pm 0,2$ dyn/cm² (PEG) abzulösen (Abbildung 73 d und e). Auf den hydrophoben SAMs hingegen adhärten die Diatomeen deutlich stärker. Auf FUDT und DDT waren Scherströmungen von 1823 ± 224 dyn/cm² bzw. 1386 ± 176 dyn/cm² nötig, um 50 % der adhärenen Zellenanteile von den Oberflächen zu entfernen. Obwohl der Kontaktwinkel von AUDT mit 55° weit unter dem von DDT mit 104° lag, wurde eine ähnliche kritische Scherströmung bestimmt ($\tau_{50} = 1260 \pm 218$ dyn/cm²). Die Ablösung

der ersten Zellen auf diesen Oberflächen (FU DT, DDT, AU DT) begann nicht bevor eine Scherströmung von $117 \pm 47 \text{ dyn/cm}^2$ erreicht war (Abbildung 73 a-c). Als entsprechende Übersicht zeigt Abbildung 73 f die Durchschnittskurven der fünf einzelnen Oberflächen.

Eine auf die τ_{50} -Werten angewendete ANOVA Analyse (einfach) zeigte eine hohe statistische Signifikanz ($p \leq 0,001$) zwischen den τ_{50} -Werten der hydrophoben (FU DT, DDT, $> 100^\circ$) und hydrophilen (HU DT, PEG, $\approx 30^\circ$) SAMs. Der zusätzliche paarweise Vergleich (Tukey Test) der Oberflächen, wies ebenso eine hohe statistische Signifikanz zwischen den Mittelwerten von AU DT ($\approx 50^\circ$) und HU DT ($\approx 30^\circ$) auf. Zudem konnte zwischen den hydrophilen SAMs HU DT und PEG ein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden ($0,001 < p \leq 0,01$). Zwischen diesen beiden SAMs besteht zwar die Gemeinsamkeit in der hohen Benetzung, jedoch ein Unterschied in ihren Hydratationseigenschaften (siehe Kapitel 5.4, S. 95).

5.2.3. Vergleich von *N. perminuta* mit *N. incerta*

Es ist keine Seltenheit, dass sich unterschiedliche marine Spezies in ihren Adhäsionsmerkmalen unterscheiden. Ebenso kommt es vor, dass eine bestimmte Oberflächeneigenschaft von zwei unterschiedlichen Spezies ähnlich attraktiv bzw. abstoßend wahrgenommen wird: die Grünalge *Ulva linza* siedelt zum Beispiel vermehrt auf DDT verglichen mit HU DT [47]. Grob geht dieses Verhalten mit dem oben beobachteten Trend für *N. perminuta* einher. Bei einer anderen Oberfläche kann sich dieser Sachverhalt bereits ändern. PDMS-haltige Beschichtungen zeigen in Hinblick auf die Ablösung von *Ulva*-Sporen eine gute Leistung, fallen jedoch oft in Bezug auf Diatomeen durch [49, 126, 147].

In diesem Teil der Arbeit wurden *N. perminuta* und *N. incerta* als Diatomeen gleicher Gattung, jedoch unterschiedlicher Spezies im Hinblick auf ihr Verhalten gegenüber einem hydrophoben (FU DT) und einem hydrophilen SAM (HU DT) untersucht. Die SAMs waren identisch mit den in Tabelle 9 beschriebenen. Die Wahl dieser Oberfläche gründete in den deutlich unterschiedlichen Adhäsionsstärken der *N. perminuta*.

Was die adhärenen Zellanteile betrifft, so wurde auf beiden SAMs und Spezies kein Unterschied festgestellt (Abbildung 74 a). Anhand der gemittelten Werte für die kritischen Scherströmungen τ_{50} in Abbildung 74 b fällt jedoch unmittelbar auf, dass *N. incerta* ebenso wie *N. perminuta* dem Trend folgt, stark auf dem hydrophoben FU DT zu adhären ($\tau_{50(N. perminuta)} = 1823 \pm 224 \text{ dyn/cm}^2$ vs. $\tau_{50(N. incerta)} = 1326 \pm 46 \text{ dyn/cm}^2$). Auf dem hydrophilen HU DT hingegen war ein statistisch signifikanter Unterschied ($0,001 < p \leq 0,01$) zu erkennen. Die Mittelwerte der kritischen Scherströmungen von *N. incerta* waren mit einem Wert von $1657 \pm 259 \text{ dyn/cm}^2$ um das Sechsfache höher bezogen auf die Werte von *N. perminuta* auf diesem SAM ($\tau_{50} = 276 \pm 59 \text{ dyn/cm}^2$). Die kritischen Scherströmungen $\tau_{50(N. incerta)}$ lagen somit in dem Bereich, der zuvor als charakteristisch für hydrophobe SAMs eingestuft wurde (Abbildung 72, S. 86).

Wird der Beginn des Zellabrisses zwischen FUDT und HUDT für *N. incerta* in Abbildung 74 c verglichen, so liegt dieser mit Werten von $93 \pm 7 \text{ dyn/cm}^2$ (FUDT) bzw. $85 \pm 30 \text{ dyn/cm}^2$ (HUDT) erwartungsgemäß im ähnlichen Bereich und bestätigt die Tatsache, dass die Zellen der *N. incerta* annähernd keinen Unterschied zwischen der hydrophilen und hydrophoben Eigenschaft der SAMs machen. Bei *N. perminuta* hingegen bestand auf FUDT und HUDT ein große Differenz in den Scherströmungen des ersten Zellabrisses ($\tau_{\text{FUDT}} = 108 \pm 45 \text{ dyn/cm}^2$, $\tau_{\text{HUDT}} = 34 \pm 9 \text{ dyn/cm}^2$) (Abbildung 74 d).

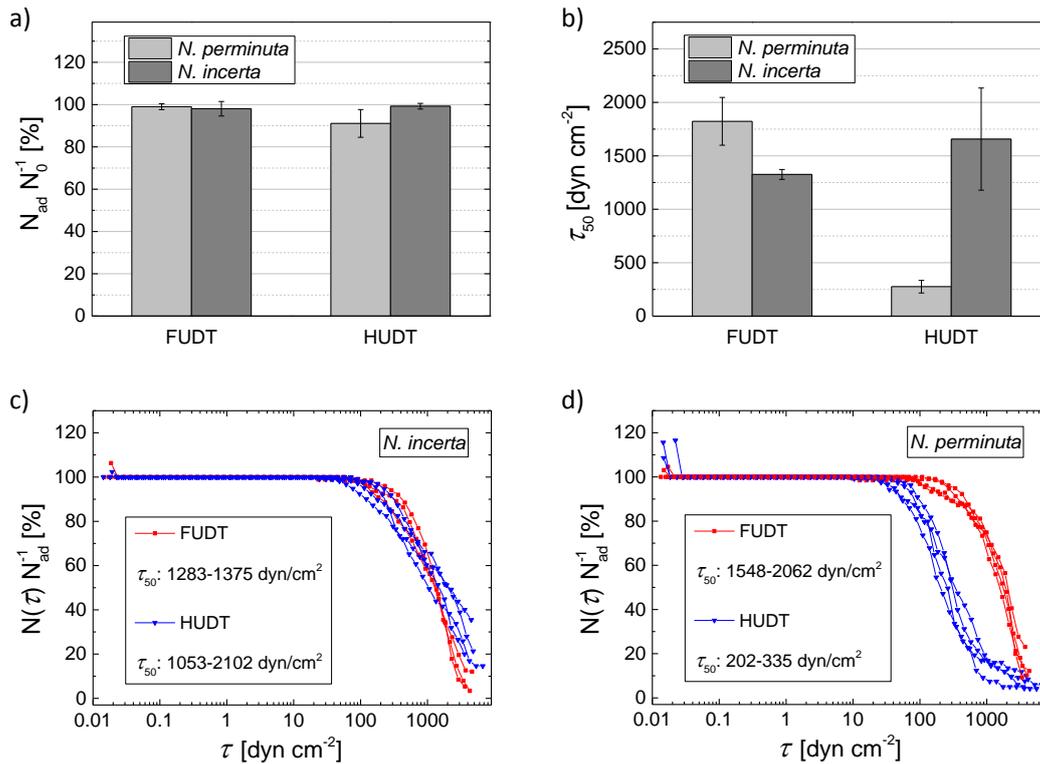


Abbildung 74: Vergleich zwischen *N. perminuta* und *N. incerta* als Diatomeen gleicher Gattung jedoch unterschiedlicher Spezies auf den SAMs FUDT und HUDT; a) adhärenz Zellanteile der beiden Spezies; b) kritische Scherströmungen τ_{50} ; c) Abrisskurven *N. incerta*; d) Abrisskurven von *N. perminuta*. Die angegebenen Fehler zeigen die Standardabweichung ($n = 4$).

5.2.4. Zusammenfassung

Die Resultate dieser Studien zeigen eindeutig, dass die Algenzellen der *N. perminuta* zwischen Oberflächen unterschiedlichen Terminierungen (FUDT, DDT, AUDT, HUDT, PEG) und der daraus folgenden variierenden Benetzungen unterscheiden. Während hydrophobe Oberflächen wie FUDT, DDT und AUDT (Kontaktwinkel: $55-100^\circ$) attraktiv auf die Zellen wirkten, waren HUDT und PEG als hydrophile Oberflächen (Kontaktwinkel $\approx 30^\circ$) weniger anziehend. PEG nahm als hydratisierte Oberfläche mit *fouling-release* Eigenschaften einen besonderen Stellenwert ein. Auf diesen Sachverhalt und dessen Auswirkungen wird im Kapitel 5.4 (S. 95) ausführlicher eingegangen.

Überraschend in allen Fällen (FU DT, DDT, AU DT und HU DT) war, dass sich die adhären ten Zellanteile ($N_{ad} N_0^{-1}$) sehr glichen. Die Diatomeen schienen während des initialen Prozesses der Adhäsion keinen Unterschied zwischen den Benetzungen wahrzunehmen, erst innerhalb der vierstündigen Inkubation zeigte sich der Gegensatz in der Aussonderung der extrapolymere n Substanzen und somit der Adhäsionsstärke. Dass sich Diatomeen auf PEGylierten Oberflächen zu Klumpen formieren können, wurde bereits zuvor beobachtet (persönliche Konversation mit John Finlay, ehemaliges Gruppenmitglied von Prof. Callow, School of Biosciences, University of Birmingham, UK).

Die Bestrebung von *N. perminuta* stärker auf hydrophoben als auf hydrophilen Oberflächen zu adhären, wurde bereits zuvor durch Besiedlungsstudien dieser Kieselalgen auf einer Serie von EG₆OX SAMs mit sich ändernden Benetzungseigenschaften gezeigt (Kontaktwinkel: X = H (32°), Me (63°), Et (81°), Pr (95°)). In diesen Studien wurden die Diatomeen 45 min inkubiert und anschließend in einer Wasserkanalapparatur einer turbulenten Strömung mit konstanter Wandschubspannung von 8,2 Pa (82 dyn/cm²) ausgesetzt. Es wurde dabei festgestellt, dass sich Zellen von hydrophilen Oberflächen leichter durch die Strömung ablösen ließen [48]. Diese Tendenz bestätigten ebenso die Ergebnisse einer aktuellen Untersuchung auf Xyrogel-Oberflächen mit Alkyl-, Fluoralkyl- und Aminoalkyl Terminierungen: *N. perminuta* adhärten deutlich stärker auf den hydrophoben Oberflächen (Kontaktwinkel zwischen 85° und 105°) als auf denen mit kleineren Kontaktwinkeln (35-54°). Die Abrissexperimente erfolgten hierbei in einer turbulenten Wasserkanalapparatur mit konstanter Wandschubspannung von 52 Pa (520 dyn/cm²) [138]. Weiter wird dieser Trend durch Krishnan *et al.* bestätigt, welche die Besiedlung durch die besagte Kieselalge auf Blockcopolymer-Oberflächen mit fluorierten und PEGylierten Seitenketten untersuchten. Auf den Polymeroberflächen mit fluorierten Seitenketten wurde eine höhere Haftstärke der Algenzellen beobachtet [49]. Im Vergleich von methoxyterminierten PEG-DOPA₃-Polymeroberflächen (hydrophil, Kontaktwinkel von 33°) und einem hydrophoben *fouling-release* Elastomer (Kontaktwinkel von 115°) zeigten *N. perminuta* eine deutlich schwächere Adhäsion auf der hydrophilen Beschichtung [147]. Die allgemein schwache Besiedlung und Adhäsion mariner Mikroorganismen auf PEGylierten Oberflächen ist durch zahlreiche Studien bekannt [20, 53, 150, 254]. Die in dieser Arbeit durch mikrofluidische Messungen erlangten Resultate stehen somit im Einklang mit zahlreichen anderen Ergebnissen, die durch alternative Methoden erhalten wurden.

Der Vergleich der Spezies *N. perminuta* und *N. incerta* auf einem hydrophoben (FU DT) und einem hydrophilen (HU DT) SAM lieferte die überraschende Erkenntnis, dass selbst zwischen Diatomeen gleicher Gattungen Adhäsionsstärkeunterschiede vorkommen können. Während *N. perminuta* auffallend unterschiedliche Adhäsionsstärken auf FU DT und HU DT aufwies, wirkten beide Oberflächen ähnlich attraktiv auf *N. incerta*. Als Grund kann die unterschiedliche Zusammensetzung der für die permanente Adhäsion verantwortlichen extrapolymere n Polymersubstanzen (EPS) vermutet werden. Bestehend aus Polysacchariden, Proteoglykanen, Proteinen und diversen unspezifizierten Makromole-

külen, könnte bereits ein kleiner Unterschied in den Verhältnissen dieser dazu führen, dass Wechselwirkungen mit gleichen Oberflächen verschiedenartig zustande kommen. Dieses Gebiet ist aufgrund der enormen Komplexität jedoch noch weitgehend unerforscht. Dass die initialen Wechselwirkung jedoch stets gleich stark zu sein schienen, zeigten auch in diesem Fall die adhärenen Zellfraktionen ($N_{ad} N_0^{-1}$), die kaum variierten. Dieses Ergebnis deckte sich mit der unmittelbar zuvor diskutierten Tatsache (Kapitel 5.2.2, S. 86), dass die Diatomee *N. perminuta* im anfänglichen Adhäsionsprozess keinen Unterschied zwischen verschiedenen benetzten SAMs (FUDT, DDT, AUDT, HUDT) zeigte.

5.3. Einfluss von Oberflächenkonditionierung auf die Adhäsion von Diatomeen

5.3.1. Hintergründe der Oberflächenkonditionierung

Sobald eine Oberfläche in Kontakt mit einer Wasserumgebung kommt, adsorbiert diese zunächst Makromoleküle, bevor erste Mikroorganismen wie Bakterien und Algen folgen. Die auf diese Weise aus den angelagerten Makromolekülen entstehende Lage wird *Konditionierungsfilm* genannt. Die ersten Ansätze zur chemischen Analyse von aus natürlichem Seewasser adsorbierten Konditionierungsfilmen machten Baier und Loeb George [255-256]. Mit dem Fortschritt analytischer Techniken folgten weitere Studien, vor allem in natürlichem Meerwasser. Sie zeigten, dass Konditionierungsfilme aus diversen Glykoproteinen, Huminsäuren, Lipiden, Nukleinsäuren, Polysacchariden, Proteinen und nicht weiter spezifizierten Makromolekülen bestehen [256-261]. Maki *et al.* berichteten, dass die Chemie eines Substrates lediglich in den ersten Stunden eine Rolle spielte, jedoch nach vier Stunden unterschiedlich beschichtete Substrate gleichermaßen konditioniert wurden [262]. Thome *et al.* beschrieben, dass unabhängig von der Oberflächenchemie die Ausbildung eines Konditionierungsfilmes quantitativ vergleichbar verlief [69].

Eine Frage, die im weiteren Verlauf auftrat, war, ob und in welchem Ausmaß sich ein Konditionierungsfilm auf die weitere Besiedlung durch Organismen auswirkt. Diesen Effekt untersuchten ebenfalls Thome *et al.* mit unterschiedlich lange vorkonditionierten Oberflächen verschiedener Benetzungsgrade und die anschließende Besiedlung durch die Grünalge *Ulva linza*. Es zeigte sich, dass auf kurz vorinkubierten Proben (1 h) ein immenser Unterschied in der Besiedlungsdichte durch die Algensporen bestand, der sich jedoch auf zunehmend länger vorinkubierten Proben (bis 22 h) anglich [69]. Da das Augenmerk dieser Studie auf der Siedlungsdichte und nicht auf der Adhäsionsstärke der besiedelnden Organismen lag, stellte sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob adsorbierte Konditionierungsfilme die Adhäsionsstärke nachfolgender Organismen beeinflussen.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde das Abrissverhalten von *N. perminuta* auf konditionierten und unkonditionierten Oberflächen untersucht. Als Oberflächen wurden FUDT und HUDT, zwei SAMs mit unterschiedlichen Benetzungsgraden, gewählt. Diese zeigten zuvor in dieser Arbeit große Unterschiede in der Adhäsionsstärke der Diatomeen

und waren daher für Konditionierungsstudien besonders vielversprechend. Die Konditionierung wurde nach dem von Thome *et al.* erarbeiteten Protokoll in *Raft-Wasser* (Atlantik, Florida) durchgeführt [263] (Kapitel 3.1.4, S. 32).

5.3.2. Eigenschaften der verwendeten SAMs

Tabelle 10 zeigt die Eigenschaften der beiden SAMs vor und nach der Inkubation in Meerwasser. Durch die Konditionierung wurde HUDT hydrophober (Kontaktwinkeländerung von 33° auf 38°), während der Kontaktwinkel von FUDT sank (Kontaktwinkeländerung von 112° auf 105°), was in Übereinstimmung mit anderen Studien stand [69, 264]. Die Schichtdicke nahm nach Ausbildung des Konditionierungsfilmes bei beiden Proben um durchschnittlich 3-4 Å zu. Zuvor durchgeführte IR-Vermessungen (IRRAS) der Konditionierungsfilme zeigten nach 48 h Inkubation in *Raft-Wasser* auf HUDT starke Valenzschwingungsbanden für die Carbonylgruppen ($\nu(\text{C}=\text{O}) \approx 1775 \text{ cm}^{-1}$, $\nu(\text{HNC}=\text{O}) = \text{Amid I} \approx 1650 \text{ cm}^{-1}$) und typische Deformationsschwingungen ($\delta(\text{C-N-H})$, $\text{Amid II} \approx 1550 \text{ cm}^{-1}$) [263]. Diese deuten daraufhin, dass Makromoleküle wie Proteine, Glykoproteinen, Polysaccharide und Lipide an die Oberflächen adsorbierten. Konditionierte FUDT-SAMs wiesen im Vergleich zu HUDT sehr schwache Carbonylschwingungen ($\nu(\text{C}=\text{O})$) auf, die charakteristische Amid I-Schwingungsbande war jedoch vorhanden. Dies spricht dafür, dass im Wesentlichen die Adsorption von proteinogenen Verbindungen erfolgte [263].

Tabelle 10: Eigenschaften der konditionierten bzw. unkonditionierten SAMs. Die Schichtdicken wurden mittels Ellipsometrie bestimmt. Fehler der Kontaktwinkel- bzw. Ellipsometriemessungen wenn nicht anders angegeben: $\pm 3^\circ$ bzw. $\pm 3 \text{ \AA}$.

Oberfläche	FUDT	FUDT _{kond.}	HUDT	HUDT _{kond.}
Kontaktwinkel/°	112	105	33	38
Schichtdicke/Å	16	20 ± 4	13	16

5.3.3. Adhäsionsassays

Die vierstündigen Inkubationen der Diatomeen auf den vorinkubierten Oberflächen FUDT und HUDT, und anschließend jeweils für jeden SAM vier Mal durchgeführten mikrofluidischen Abrissexperimenten ergaben die in Abbildung 75 zusammengefassten Resultate.

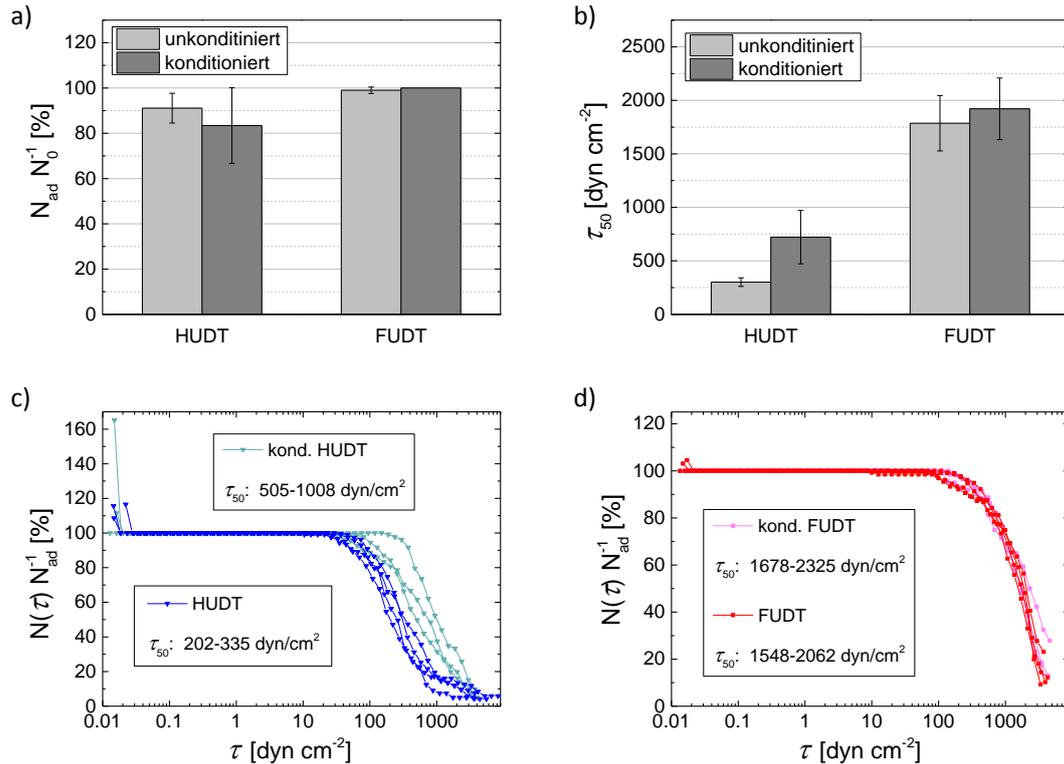


Abbildung 75: Adhäsion von *N. perminuta* auf den SAMs HUDT und FUDT im un- bzw. konditionierten Zustand; a) adhärenente Zellanteile; b) kritische Scherströmungen τ_{50} c) und d) Abrisskurven der Diatomeen. Die angegebenen Fehler zeigen die Standardabweichung ($n = 3$).

Abbildung 75 a gibt die adhärenente Zellanteile auf den konditionierten SAMs in Gegenüberstellung mit ihren unconditionierten Homologen wieder.

Der konditionierte Zustand von HUDT beeinflusste den adhärenente Zellanteil der Kieselalgen etwas mehr als es beim unconditionierten SAM beobachtet wurde. Auf HUDT_{kond.} variierten diese in einzelnen Messungen zwischen 61 % und 100 %, während die Streuung der Werte auf HUDT im unconditionierten Zustand 86-100 % betrug. Nichtsdestotrotz war diese Änderung innerhalb der Fehlergrenzen nicht signifikant.

Auf dem konditionierten FUDT-SAM blieb der adhärenente Zellanteil im Vergleich zu seinem unconditionierten Homologen mit 100 % adhärenente Diatomeen ($N_{ad} N_0^{-1} = 97-100$ %), annähernd gleich.

Anschließende Adhäsionsstärkemessungen ließen erweiterte Aussagen über den Konditionierungsfilmeneinfluss auf HUDT bzw. FUDT zu (Abbildung 75 b).

Ein expliziter Effekt des Konditionierungsfilmes auf HUDT wurde durch die kritischen Scherströmungen auf diesem SAM aufgezeigt. Die Diatomeen wiesen auf dem konditionierten HUDT im Vergleich zum unconditionierten SAM eine stärkere Adhäsion auf ($\tau_{50(\text{HUDT}_{\text{kond}})} = 722 \pm 306$ dyn/cm² vs. $\tau_{50(\text{HUDT})} = 300 \pm 40$ dyn/cm²), welche jedoch einen breiten Bereich abdeckte (siehe Abrisskurven in Abbildung 75 c). Der anfängliche Zellabriss lag hierbei zwischen 41 dyn/cm² und 236 dyn/cm² und war somit höher als auf dem unconditionierten HUDT-SAM ($\tau = 26-46$ dyn/cm²). Ein Signifikanztest (ANOVA) zum

Vergleich der τ_{50} -Mittelwerte ergab zwischen dem konditionierten und unkonditionierten jedoch lediglich einen Trend ($0,1 > p \geq 0,05$).

Die Haftstärke auf dem konditionierten FUDT-SAM änderte sich mit $1921 \pm 352 \text{ dyn/cm}^2$ nicht merklich zu der Adhäsionsstärke auf dem unkonditionierten SAM ($\tau_{50(\text{FUDT})} = 1823 \pm 224 \text{ dyn/cm}^2$). Dies bestätigte ein Signifikanztest: die τ_{50} -Werte unterschieden sich in keiner Messung signifikant voneinander ($p = 0,62$). In diesem Fall zeigten die Abrisskurven in Abbildung 75 d dementsprechend eine große Ähnlichkeit. Auch der Beginn des Zellabrisses erfolgte im analogen Bereich ($\tau_{(\text{FUDT}_{\text{kond}})} = 109\text{-}176 \text{ dyn/cm}^2$ vs. $\tau_{(\text{FUDT})} = 67\text{-}172 \text{ dyn/cm}^2$).

5.3.4. Zusammenfassung

Der Einfluss eines Konditionierungsfilmes auf die Adhäsionsstärke von *N. perminuta* wurde auf zwei SAMs mit unterschiedlicher Benetzbarkeit untersucht. FUDT wurde hierbei als hydrophobe Oberfläche gewählt, HUDT als hydrophile. Durch die Konditionierung nahm die Schichtdicke der SAMs um durchschnittlich 3-4 Å zu. Der Kontaktwinkel nahm auf FUDT_{kond} um 6 % ab, auf HUDT_{kond} um 15 % zu.

Im Vergleich des konditionierten FUDT-SAMs mit seinem unkonditionierten Homologen zeigte sich weder bezüglich des adhärenen Anteils von *N. perminuta* noch in der Haftstärke dieser ein signifikanter Unterschied. Dieses Resultat erfüllte qualitativ betrachtet die Erwartungen einer ähnlichen Adhäsionsstärke, da die Oberflächen mit einem Kontaktwinkel von 105° bzw. 112° annähernd analoge Benetzungseigenschaften aufwiesen. Die zusätzlichen Makromoleküle hatten offensichtlich keinen Einfluss auf die Adhäsionsstärke der Kieselalgen. Im Gegensatz dazu hatte der Konditionierungsfilm auf HUDT einen zunehmenden Effekt auf den adhärenen Anteil sowie einen wesentlichen Einfluss auf die Haftstärke der Diatomeen.

Als Grund können die variierenden Makromolekülzusammensetzungen der Konditionierungsfilme auf HUDT und FUDT vermutet werden, welche offensichtlich eine jeweils andere Auswirkung auf die Adhäsionsstärke der Kieselalgen hatten. Mit Hilfe von IRRAS-Messungen konnte in vorhergehenden Arbeiten gezeigt werden, dass FUDT hauptsächlich proteinogene Makromoleküle adsorbiert, während HUDT neben proteino-genen Verbindungen ebenso zahlreiche Carbonylverbindungen aufweist. Eine mögliche Interpretation ist daher, dass nur die proteinreichen Konditionierungsfilme die Adhäsionsstärke beeinflussen, nicht jedoch die aliphatischen.

5.4. Adhäsion der Diatomeen auf Ethylen-Glykol terminierten SAMs

Studien zeigten, dass Proteine, Algensporen, eukaryotische Zellen und Bakterien, empfindlich durch die Hydratationseigenschaften von Ethylen-Glykol (EG)-Oberflächen beeinflusst werden [19-20, 32, 53, 56-57, 265]. In Untersuchungen mit Fibroblasten wurde erkannt, dass bereits kleine Hydratationsunterschiede innerhalb einer oligomeren EG-Reihe zu großen Unterschieden in der Adhäsionsstärke führten [178]. Die Resultate wurden auf die sich ändernde Packungsdichte der EG-Molekülketten mit zunehmender Anzahl von $-(OC_2H_4)-$ Einheiten zurückgeführt. Die Untersuchung der für diese Repulsion verantwortlichen Wassereinlagerungen in den Strukturen von OEG-Oberflächen war bereits Gegenstand zahlreicher Studien (Kapitel 2.3.2, S. 19).

Die schwache Adhäsionsstärke von *N. perminuta* auf Poly(Ethylen-Glykol)-SAM (PEG) im vorangegangenen Kapitel führte zu der Frage, ob und in welchem Maße sich verschieden hydratisierte EG-SAMs im Bezug auf die Diatomeenadhäsion auswirken. Hierzu wurden EG-SAMs mit zunehmenden EG-Einheiten und somit zunehmendem Hydratationsgrad im Hinblick auf die Adhäsionsstärke der Diatomeen verglichen.

5.4.1. Eigenschaften von EGxOH SAMs

Als Oberflächen dienten EG-SAMs der Form $(-OC_2H_4)_x-OH$, $x = 1, 3, \text{ und } 6$. PEG mit $x = 44$ wurde als polymeres Homolog zu den EG-SAMs mit einbezogen (Abbildung 76).

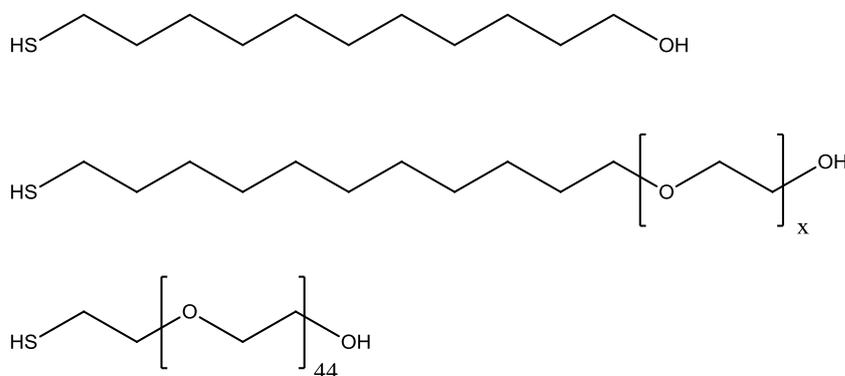


Abbildung 76: Strukturen von a) HUDT; b) EG_xOH ($x = 1, 3, 6$) und c) PEG2000-OH.

Alle Oberflächen waren hydrophil mit Kontaktwinkeln zwischen 28° und 32° und besaßen eine Schichtdicke von 15-33 Å. Die Schichtdicke von PEG ähnelte trotz der großen Anzahl an Ethylen-Glykol-Einheiten der von EG₆OH. Grund hierfür ist, dass bedingt durch den kürzeren Alkyl-Spacer von nur zwei Methyleneinheiten eine büstenartige Struktur eingenommen werden, die Molekülketten somit nicht gestreckt vorliegen (Abbildung 13, S. 20) [266].

HUDT-SAMs wurden als nicht proteinresistente SAMs in den Vergleich mit einbezogen, da sie zwar ähnliche Benetzungseigenschaften wie die EG-Serie besitzen (Kontaktwinkel von 33°), jedoch keine Ethylen-Glykol-Einheiten enthalten. Die hier verwendeten OEG-

SAMs und PEG wurden in vorangegangenen Arbeiten, in erster Linie mit Hilfe von XPS und FT-IRRAS, intensiv charakterisiert [246]. Die IR-Analysen der genannten Arbeit indizierten bei EG₃OH und EG₆OH hauptsächlich helikale Konformationen, wobei EG₆OH vereinzelt auch eine amorphe Konformation vermuten ließ. Die Konformation von EG₁OH-SAMs war, wie durch eine analoge Studie bestätigt, teilweise nicht exakt charakterisierbar [267]. Dennoch standen sowohl diese IR-Analysen als auch die Schichtdicken- und Kontaktwinkelmessungen in dieser Arbeit in guter Übereinstimmung mit weiteren Studien [32, 57, 60, 267-271]. Die Charakterisierung der präparierten EG-SAMs ist in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Oberflächeneigenschaften von Ethylen-Glykol-(EG_xOH)-terminierten SAMs (x = 1, 3, 6, 44). Die Schichtdicke wurde mittels Ellipsometrie bestimmt. Fehler der Kontaktwinkel- bzw. Ellipsometriemessungen: $\pm 3^\circ$ bzw. $\pm 3 \text{ \AA}$.

Oberflächenchemie	Label	Kontaktwinkel/ $^\circ$	Schichtdicke/ \AA
HS-(CH ₂) ₁₁ -OH	HUdT	33	13
HS-(CH ₂) ₁₁ -(O-(CH ₂) ₂)-OH	EG₁OH	28	15
HS-(CH ₂) ₁₁ -(O-(CH ₂) ₂) ₃ -OH	EG₃OH	30	22
HS-(CH ₂) ₁₁ -(O-(CH ₂) ₂) ₆ -OH	EG₆OH	32	25
HS-(CH ₂) ₂ -(O-(CH ₂) ₂) ₄₄ -OH	PEG	30	33

5.4.2. Adhäsionsassays

Abbildung 77 a verdeutlicht, dass auf den EG-SAMs, wie auch auf den zuvor untersuchten SAMs (FUdT, DDT, AUdT, HUdT im Kapitel 5.2.2, S. 86), keine signifikanten Unterschiede in den adhärenen Zellanteilen der Diatomeen bestanden (91-99%, $1 < p > 0,5$). Der anschließende Vergleich der kritischen Scherströmungen τ_{50} zwischen HUdT und den EG-SAMs in Abbildung 77 b bestätigt die Annahme, dass eine bestimmte Benetzungseigenschaft einer Oberfläche nicht allein ausschlaggebend für die Adhäsionsstärkeabnahme ist. HUdT wies, verglichen mit der maximal gemessenen kritischen Scherströmung in der EG-Serie (EG₁OH: $\tau_{50} = 136 \pm 30 \text{ dyn/cm}^2$), mit einem kritischen Scherströmungswert von $276 \pm 51 \text{ dyn/cm}^2$ einen doppelt so hohen Wert auf. Angefangen bei EG₁OH folgte für EG₃OH eine weitere Abnahme der kritischen Scherströmung um mehr als 50 % ($\tau_{50} = 50 \pm 13 \text{ dyn/cm}^2$). EG₆OH wies mit $\tau_{50} = 26 \pm 3 \text{ dyn/cm}^2$ die niedrigsten kritischen Scherströmungswerte in der Oligomeren-Reihe auf. PEG als polymeres Homolog befand sich mit $\tau_{50} = 6 \pm 2 \text{ dyn/cm}^2$ im untersten Adhäsionsstärkebereich der Diatomeen.

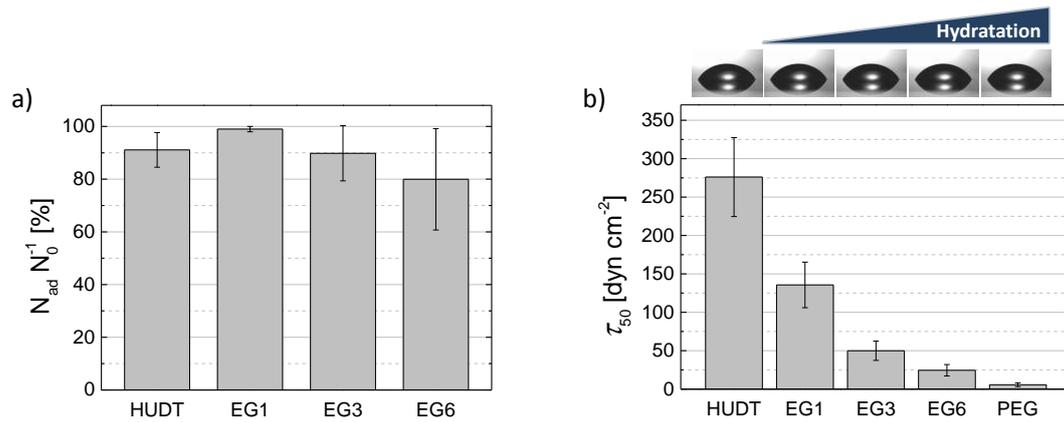


Abbildung 77: Adhäsion von *N. perminuta* auf SAMs unterschiedlicher Hydratationsgrade und auf HUDT als nicht hydratisierten SAM; a) adhärenter Zellanteil der Diatomeen $N_{ad} N_0^{-1}$ (nicht adhäririerte Algenzellen assemblierten auf PEG zu Klumpen, weshalb der N_0 -Wert nicht erfassbar war); b) Durchschnittswerte von vier Messungen der kritischen Scherströmungen τ_{50} . Wassertropfen in b illustrieren die gleichen Benetzungseigenschaften der SAMs. Die angegebenen Fehler zeigen die Standardabweichung ($n = 4$).

Die Abrissverhalten der Diatomeen im Detail werden anhand von Abbildung 78 a-e verdeutlicht. Die Durchschnittskurven in Abbildung 78 f geben eine zusammengefasste Übersicht. Die Adhäsion der Diatomeen auf HUDT war relativ stark, die ersten Zellen lösten sich nicht vor 36 ± 8 dyn/cm² von der Oberfläche ab. Auf EG₁OH und EG₃OH hingegen setzten die initialen Ablöseprozesse bei Scherströmungen von $6,5 \pm 3,7$ dyn/cm² ein, auf EG₆OH bereits bei $1,5 \pm 0,9$ dyn/cm². Mit Werten von $0,7 \pm 0,2$ dyn/cm² lösten sich die Diatomeen um ein vielfaches früher von der PEG-Oberfläche verglichen mit den ersten abgelösten Zellen auf HUDT.

Durchgeführte ANOVA- und ergänzende paarweise Tukey-Tests machten deutlich, dass zwischen HUDT und der gesamten EG-Serie bzw. PEG eine hohe statistische Signifikanz zwischen den τ_{50} -Werten besteht ($p < 0,001$). Zudem wiesen ebenso die τ_{50} -Werte der EG₁OH-SAMs einen hohen signifikanten Unterschied zu denen von EG₃OH und EG₆OH auf ($p < 0,001$).

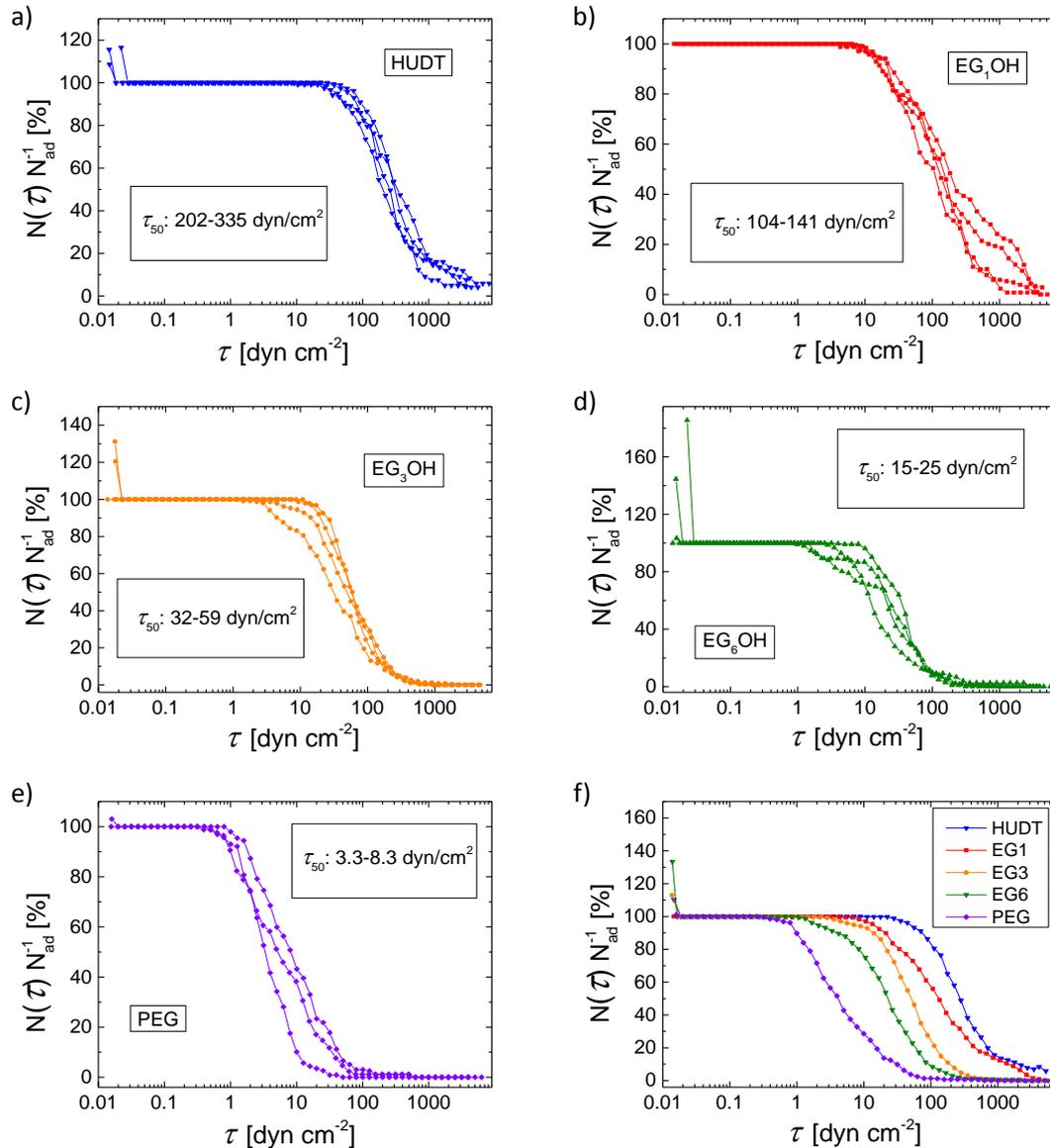


Abbildung 78: Abrisskurven der *N. perminuta* von HUDT und EG-SAMs mit unterschiedlichen Hydratationsgraden; a) HUDT; b) EG₁OH; c) EG₃OH; d) EG₆OH; e) PEG; f) Durchschnittskurven der Abrisskurven aus a-e. Angegebener Fehler zeigt die Standardabweichung. Die Absolutzahlen der adhärenen Diatomeen (N_{ad}) im Sichtfeld des Experiments: 119-186 (HUDT), 129-240 (EG₁OH), 154-290 (EG₃OH), 144-461 (AUDT), und 141-197 (PEG).

5.4.3. Zusammenfassung

Die Adhäsionsstärke der Diatomee *N. perminuta* wurde auf einer Serie von (EG_xOH)-SAMs mit zunehmenden EG-Einheiten (x) und sich dadurch ändernden Hydratationseigenschaften quantifiziert. Dabei sollte die Hypothese abnehmender Adhäsionsstärke in Bezug auf eine zunehmende Fähigkeit der SAMs Wassermoleküle an der Grenzfläche und im Inneren ihrer Strukturen zu speichern getestet werden.

Es erfolgte der Vergleich einer Ethylen-Glykol-Serie (EG₁OH, EG₃OH und EG₆OH und PEG) mit HUDT als ebenfalls hydroxylterminierten SAM gleicher Benetzungscharakters, jedoch fehlender Fähigkeit Wassermoleküle in seiner Struktur einzulagern.

Die erlangten Resultate bestätigten die Annahme, dass die Adhäsionsstärke der Diatomeen nicht allein durch die Benetzungseigenschaften einer Oberfläche bestimmt wird. Bereits der signifikante Unterschied der Adhäsionsstärken der Kieselalgen auf HUDT und EG₁OH wies darauf hin, dass bereits eine Ethylen-Glykol-Einheit eine Veränderung in den Oberflächeneigenschaften herbeiführt. In der Struktur unterscheidet sich EG₁OH von HUDT (-S-(CH₂)₁₁-OH) lediglich durch ein weiteres Sauerstoffatom, welches getrennt durch zwei Methyleinheiten im Inneren der Oberfläche liegt (-S-(CH₂)₁₁-(O-(CH₂)₂)-OH). Dieser Unterschied war offensichtlich ausschlaggebend dafür, dass die Adhäsionsstärke der Diatomeen auf EG₁OH um die Hälfte abnahm. Die weitere Zunahme an EG-Einheiten (x = 3, 6) folgte dem Trend einer verminderten Adhäsion aufgrund zunehmender Anzahl an Wassermolekülen in der Struktur. Die adhärenen Zellanteile ($N_{ad} N_0^{-1}$) der Diatomeen wurden durch die variierenden Hydratationseigenschaften der EG-Serie nicht in dem Maße, wie bei ihrer Adhäsionsstärke beobachtet, beeinflusst.

Ein Gesamtvergleich von der EG-Serie mit zuvor vermessenen SAMs unterschiedlicher Benetzungen (FUDT, DDT, AUDT und HUDT) zeigte eine deutliche Reduktion der Adhäsionsstärke der Diatomeen. Die maximalen kritischen Scherströmungen der EG-Serie lagen im Mittel bei geringen 140 dyn/cm² (EG₁OH). Im Vergleich dazu wurden bei den SAMs unterschiedlicher Benetzungen kritische Scherströmungen bis 1800 dyn/cm² gemessen (hydrophobe SAMs).

Der erhaltene Adhäsionsstärketrend von *N. perminuta* auf der aufgeführten EG-Reihe und PEG kann somit mit der großen Relevanz von Hydratation für eine inerte Oberfläche gekoppelt werden. Die Bedeutsamkeit von Hydratation für die Adhäsion von Diatomeen folgt einem generellen Trend der auch bereits für andere Spezies, nämlich Grünalgen [57], eukaryotische Zellen [32], marine Bakterien [265] sowie Proteinabsorption [56], beobachtet wurde.

5.5. Adhäsion der Diatomeen auf Polysaccharid-Oberflächen

5.5.1. Eigenschaften von Polysacchariden-Oberflächen

Immobilisierte Polysaccharide weisen ähnlich wie OEG-Oberflächen die Fähigkeit Wasser zu speichern und damit *anti-fouling* Potential auf [181-182]. Die Einlagerung von Wassermolekülen wird hierbei durch die zahlreichen Wasserstoffbrückenbindungen, welche spezielle strukturelle Effekte mit sich ziehen, und durch elektrostatische Wechselwirkungen bewirkt [63, 183-184].

In Untersuchungen mit biologischen Systemen wiesen Polysaccharide in immobilisierter Form Resistenz gegenüber fibroblastischen Zellen, Süßwasserbakterien, unspezifischer Proteinadsorption sowie hämatopoetischen Zellen auf [63, 180].

Im Hinblick auf die Wechselwirkung mit marinen Organismen wie *Ulva linza* und *Balanus amphitrite* zeigten diese Oberflächen jedoch vermindertes Resistenzverhalten [180]. Zurückgeführt wurde dieser Effekt auf Calcium(II)- und andere bivalente Ionen in mariner Salzwasserumgebung ($c_{\text{Ca(II)}} = 412 \text{ ppm}$ [272]; der in dieser Arbeit verwendete Seewasserersatz *Instant Ocean*[®] besitzt eine Ca(II)-Ionen-Konzentration von 400 ppm^1). Die beim pH-Wert des Meerwassers deprotoniert vorliegenden Carboxylgruppen der Polysaccharide lagern Calcium(II)-Ionen in ihrer Struktur ein, worauf ein *Kollaps* der Hydrogelstruktur eintritt und eine Entwässerung (Synerese) eintritt [185-187].

Durch die Blockade der Carboxylgruppen mittels TFEA (Trifluorethylamin) kann der Strukturkollaps unterdrückt werden [187]. Zudem werden den Polysacchariden durch die Einführung der hydrophoben TFEA-Gruppe amphiphile Eigenschaften verliehen [49, 139, 150-152] (Kapitel 2.3.2, S. 19).

In diesem Abschnitt sollte der Einfluss von TFEA-modifizierten Hyaluronsäure- und Alginsäureoberflächen (HA bzw. AA) auf die Adhäsion von *N. perminuta* untersucht werden. Als Vergleich erfolgte die Analyse der Adhäsionsstärke der Kieselalgen auf den beiden Polysaccharidoberflächen in ihrer ursprünglichen, unmodifizierten Form. Tabelle 12 fasst die Eigenschaften der verwendeten Polysaccharide zusammen. Wie aus den Kontaktwinkeln ersichtlich ist, waren HA und AA in ihrem unmodifizierten Zustand stark hydrophil ($\approx 10^\circ$). Durch die Modifizierung mit TFEA stiegen die Kontaktwinkel um das Doppelte an ($\approx 20\text{-}25^\circ$). Die Schichtdicke war bei un- sowie modifizierten Oberflächen mit ungefähr 25 \AA ähnlich [180, 187]. Bis zur ihrer Verwendung wurden die Polysaccharide in Milli-Q[®]-Wasser aufbewahrt, um ihre hydratisierte Struktur für die Adhäsionsstärkemessungen vollständig zu erhalten.

Tabelle 12: Oberflächeneigenschaften der verwendeten Polysaccharide. Die Schichtdicken wurden mittels Ellipsometrie bestimmt.

Oberfläche	HA	HA+TFEA	AA	AA+TFEA
Kontaktwinkel/ $^\circ$	10 ± 3	20 ± 5	11 ± 3	23 ± 3
Schichtdicke/ \AA	27 ± 7	28 ± 5	27 ± 3	28 ± 3

Strukturell unterscheidet sich Alginsäure durch eine zusätzliche Carboxylgruppe von der Hyaluronsäure, die Einlagerung von Ca(II)-Ionen ist somit ausgeprägter (Abbildung 14, S. 21) [273]. Die Modifizierung sollte daher bei AA einen stärkeren Effekt auf die Diatomeen-Haftstärke haben.

¹ Information erhalten auf Anfrage bei www.instantocean.com.

5.5.2. Adhäsionsassays

Die Resultate aus den durchgeführten mikrofluidischen Adhäsionsstudien, illustriert in Abbildung 79 a, lassen keine eindeutige Aussage über den Trend in der Adhäsionsstärke der Diatomeen auf HA und AA bzw. ihren und TFEA-blockierten Homologen zu. Die Werte der kritischen Scherströmungen τ_{50} schwankten auf einzelnen Oberflächen um bis zu 75 %. Insgesamt betrachtet wurden innerhalb der Fehlergrenzen auf allen Polysacchariden ähnliche kritische Scherströmungen gemessen. Dies wird durch statistische Vergleiche der τ_{50} -Werte (ANOVA/Tukey) deutlich ($1 \geq p > 0,5$). Neben den Adhäsionsstärken wurden ebenso die adhärenen Zellanteile ermittelt (Abbildung 79 b). Diese waren auf fast allen Oberflächen mit bis zu 100 % ähnlich hoch. Die einzige Ausnahme ließ die modifizierte AA-Oberfläche erkennen, auf der sich der adhärenente Diatomeenanteil zwischen 70-100 % bewegte. Jedoch war dieser Effekt innerhalb der Fehlergrenzen ebenso nicht signifikant ($1 > p > 0,5$).

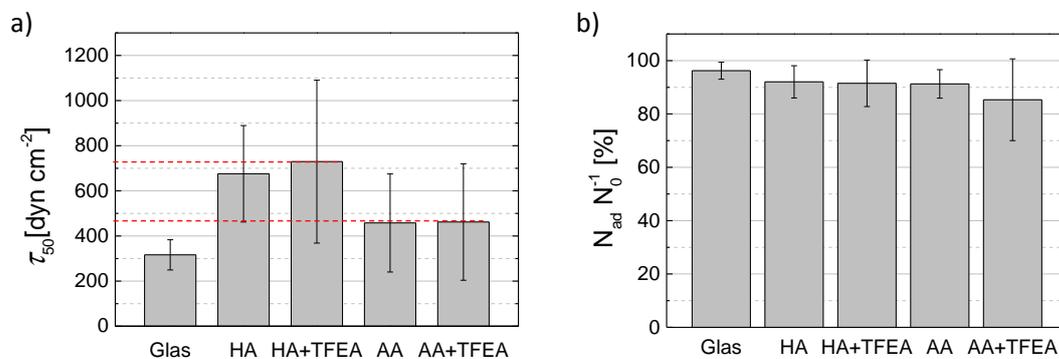


Abbildung 79: Adhäsion von *N. perminuta* auf unmodifizierten Polysacchariden HA und AA und ihren modifizierten Homologen HA+TFEA und AA+TFEA; a) kritische Scherströmungen τ_{50} ; b) adhärenente Zellanteile der Diatomeen. Die angegebenen Fehler zeigen die Standardabweichung ($n = 4$).

Die Abrisskurven in Abbildung 80 a-d zeigen zudem, dass der Zellabriss, durchschnittlich beginnend bei 10 dyn/cm^2 , über einen breiten Bereich der Scherströmung erfolgte.

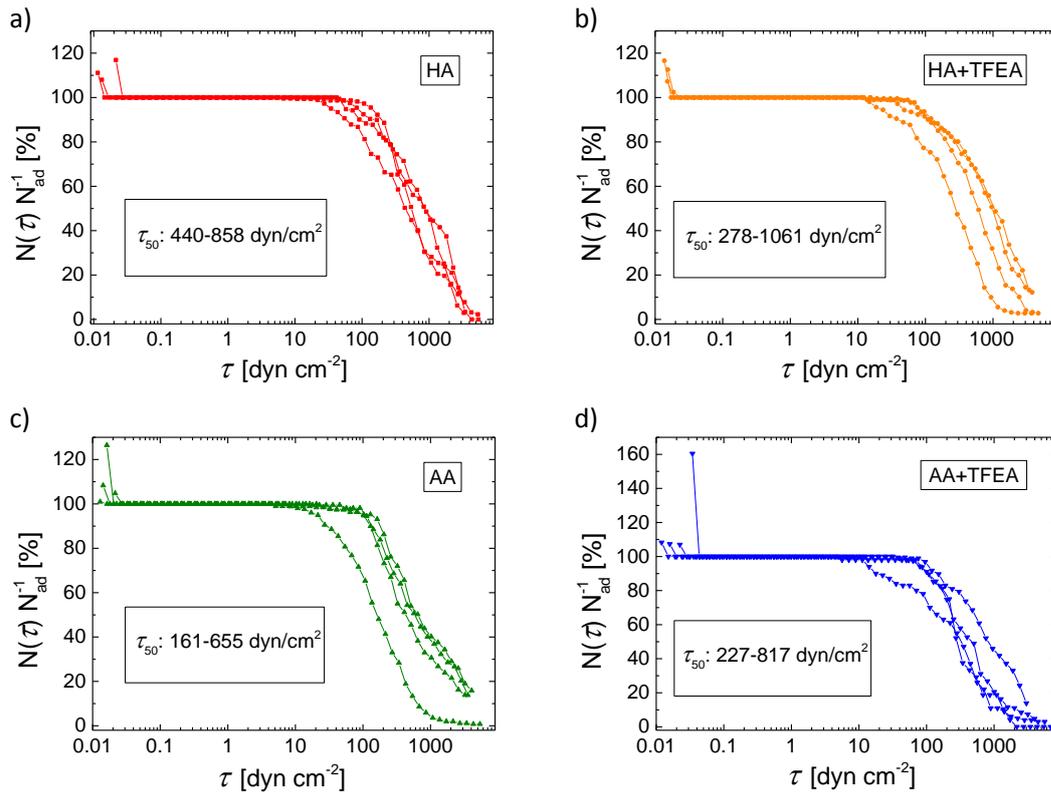


Abbildung 80: Abrisskurven der *N. perminuta* von un- und modifizierten Polysacchariden; a) HA; b) HA+TFEA; c) AA; d) AA+TFEA.

5.5.3. Zusammenfassung

In diesem Teil der Arbeit wurden die auf Glas immobilisierten Polysaccharide HA und AA und deren modifizierten Homologen auf ihre eventuelle Resistenz gegenüber den Diatomeen *N. perminuta* untersucht. Immobilisierte Polysaccharide weisen ähnlich wie Oligo(Ethylen-Glykol) Oberflächen eine starke Hydratisierung auf, welche eine Resistenz gegen Proteine und Süßwasser-Mikroorganismen bewirkt. Dieser Sachverhalt ändert sich bei der Adhäsion von Organismen aus mariner Wasserumgebung, denn die Anwesenheit von bivalenten Ionen wie zum Beispiel zweiwertigen Calciumionen kann das für die Resistenz verantwortliche Quellverhalten und die daraus resultierende Hydrogelstruktur von Polysacchariden aufheben. Verantwortlich für die Koordination der Ca(II)-Ionen sind die Carboxylgruppen der Moleküle. Durch eine Blockierung dieser Gruppen kann ein Kollaps der Struktur bei Anwesenheit bivalenter Ionen verhindert werden.

Die Blockierung der Carboxylgruppen erfolgte in diesem Fall durch die Kopplung von Trifluorethylamin (TFEA). Da sich AA durch eine zusätzliche Carboxylgruppe von HA unterscheidet, wurde als Folge der Blockierung der Carboxylgruppen durch TFEA bei AA ein größerer Effekt auf die Adhäsion der Diatomeen erwartet.

Die mikrofluidischen Adhäsionsstudien resultierten in einem schwach ausgeprägten Trend in der Haftstärke der Diatomeen auf den unblockierten Alginsäure- bzw.

Hyaluronsäureoberflächen. Weiterhin zeigte die anschließende Modifizierung der Oberflächen durch TFEA sowohl bei HA als auch bei AA ebenso keinen nennbaren Einfluss auf die Adhäsion der Diatomeen.

Einen Ansatz für die Erklärung dieser unveränderten Adhäsionsstärken liefern Geesey und Cooksey *et al.*: Sie berichteten über die Wichtigkeit von zweiwertigen Calciumionen für die Adhäsion und Chemotaxis von Diatomeen [274-275]. Im Allgemeinen sind Calciumionen ein bedeutsamer Faktor in biologischen Prozessen. Ihre Funktion beruht hierbei auf der Fähigkeit an andere Moleküle auf verschiedenste Weise zu binden und deren Funktion zu verändern. Die wesentliche Eigenschaft von Ca(II)-Ionen bei der Diatomeenadhäsion ist die Wechselwirkung zwischen Proteinen sowie Polysacchariden als Extrazelluläre-Polymer-Substanzen mit einer Oberfläche zu fördern. Ebenso ist Calcium z. B. bei unspezifischen Interaktionen wie der Neutralisation der elektrischen Doppelschicht zwischen Zell- und Substratoberfläche beteiligt. Bezogen auf diese Arbeit entstand damit die Vermutung, dass die durch die Blockade der Carboxylgruppen freigesetzten Ca(II)-Ionen den Adhäsionsprozess der Kieselalgen auf der anderen Ebene förderten, so dass der positive Struktureffekt der calciumfreien (HA/AA+TFEA)-Oberflächen aufgehoben wurde.

Durch den Vergleich der hier vorliegenden Studie mit bereits erhaltenen Resultaten (SAMs unterschiedlicher Benetzbarkeit, EG-Serie) zeigte sich, dass die gemessenen Adhäsionsstärken innerhalb der Fehlergrenzen beinahe den gesamten τ_{50} -Bereich abdeckten, der für SAMs mit unterschiedlichen Benetzungseigenschaften beschrieben worden ist. Dieser befand sich zwischen 280-2060 dyn/cm². Die τ_{50} -Werte der Polysaccharide schwanken im enormen Bereich von 160-1060 dyn/cm². Die Vermutung die getesteten Polysaccharide würden ähnliche *fouling-release* Eigenschaften wie die EG-Serie ($\tau_{50} = 6-136$ dyn/cm²) aufzeigen, konnte somit nicht bestätigt werden.

Das in dieser Arbeit beschriebene Resistenzverhalten von *N. perminuta* auf Polysaccharid-Oberflächen ist in Übereinstimmung mit früheren Adhäsionsuntersuchungen auf HA, AA und PA (Polygalakturonsäure) nach Aussetzen der Algenzellen in einer Scherströmung von 53 Pa (530 dyn/cm²) (Universität Birmingham). Auch in diesen biologischen Analysen zeigten die Diatomeen keine auffallenden Adhäsionsunterschiede auf den drei verschiedenen Polysacchariden [273].

5.6. Einfluss von Oberflächenladung auf die Adhäsion von Diatomeen

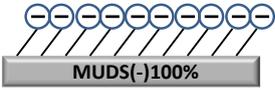
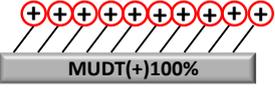
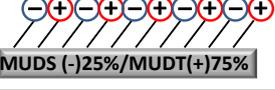
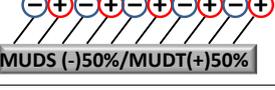
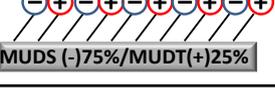
5.6.1. Geladene und zwitterionische SAMs und ihre Eigenschaften

Wie bei Poly(Ethylen-Glykol)- und Oligo(Ethylen-Glykol)-Oberflächen wird bei zwitterionischen Oberflächen die Bindung von Wassermolekülen an der Grenzfläche als Grund für ihre *foul-release* Eigenschaften vermutet [65, 197, 276]. Anders als bei PEG/OEG SAMs, bei denen die Flexibilität der OEG-Einheiten bei den Wassermolekülinteraktion eine große Rolle spielt [59-60], wird angenommen, dass diese ausgeprägten Interaktionen bei zwitterionischen Oberflächen durch elektrostatische Wechselwirkungen verursacht werden [68]. Holmlin *et al.* zeigten, dass die unspezifische Adsorption von Proteinen auf diversen zwitterionischen SAM-Systemen vergleichbar mit der auf gut bekannten OEG-SAM-Systemen war [65]. Diese Resultate und andere Studien deuteten darauf hin, dass nicht nur die konformative Flexibilität einer OEG-SAM-Molekülstruktur Voraussetzung für Proteinresistenz ist, sondern in erster Linie die Hydratation an sich, die ebenso durch elektrostatische Faktoren hervorgerufen werden kann [276-277]. Die unterschiedliche Natur der Hydratation bei OEG-SAMs und zwitterionischen SAMs wurde am Beispiel von Phosphorylcholin(PC)-SAMs im Vergleich zu OEG-SAMs mittels molekularen Simulationen verglichen. Dabei wurde die Orientierung von Wassermolekülen anhand der Ausrichtung ihrer Dipolvektoren zu der Oberflächennormalen untersucht. Während die PC-SAMs aufgrund des ionischen Charakters ihrer Kopfgruppen Wassermoleküle mit ungerichteten Dipolvektoren oberhalb der Grenzfläche aufwiesen, nahmen die Dipolvektoren bei OEG-SAMs bevorzugte Stellungen in bestimmte Richtungen an [198].

Unter anderem untersuchten Holmlin *et al.* die auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten zwitterionischen SAMs, bestehend aus $-\text{SO}_3^-$ -terminierten bzw. $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ -terminierten Alkanthiolen (MUDS(-) bzw. MUdT(+)). Als Referenzsysteme für die Leistung der zwitterionischen Oberflächen wurden SAMs der gleichnamig geladenen Homologen MUDS(-)100 % und MUdT(+)-100 % eingesetzt.

Die verwendeten Oberflächen und ihre Eigenschaften sind in Tabelle 13 aufgeführt. Diese wurden von Dipl. Chemikerin S. Bauer aus unserem Arbeitskreis hergestellt. Für die SAM-Präparation der zwitterionischen Zweikomponenten-SAMs, wurden die ethanolschen Lösungen in verschiedenen Verhältnissen gemischt (MUDS(-)/MUdT(+): 25/75 %, 50/50 % und 75/25 %). Da der Assemblierungsprozess auf dem Goldsubstrat ladungsgesteuert erfolgt, sollten diese drei Basislösungen gemischt geladene SAMs in einem Verhältnis von 1:1 liefern [277]. Dies wurde nach Darstellung der Oberflächen vorab durch exakt gleiche Kontaktwinkel unterstützt und schließlich durch eine identische chemische Komposition XP-spektroskopisch bestätigt [278].

Tabelle 13: Oberflächeneigenschaften der gleichnamig und gemischt- geladenen SAMs. Die Schichtdicke wurde mittels Ellipsometrie bestimmt. Die angegebenen Verhältnisse von negativen und positiven SAMs geben die Verhältnisse der ursprünglich angesetzten SAM-Lösungen an. Fehler der Kontaktwinkel- bzw. Ellipsometriemessungen: $\pm 3^\circ$ bzw. $\pm 3 \text{ \AA}$.

SAM/% angesetzte SAM Lsg.	Oberflächenchemie	Kontaktwinkel/ $^\circ$	Schichtdicke/ \AA
 MUDS(-)100%	$\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_3^-$	50	19
 MUDT(+100%	$\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$	35	15
 MUDS (-)25%/MUDT(+75%	$\text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_3^- / \text{HS}-(\text{CH}_2)_{11}\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$	< 10	14
 MUDS (-)50%/MUDT(+50%			
 MUDS (-)75%/MUDT(+25%			

Im Vergleich zu den reinen Komponenten-SAMs waren die zwitterionischen SAMs extrem hydrophil (Kontaktwinkel $< 10^\circ$). Die Schichtdicken waren mit 14-19 \AA charakteristisch für SAMs mit $-(\text{CH}_2)_{11}$ -Methylenspacern und sich ebenso vergleichbar mit publizierten Werten [65].

Auch in diesem Fall erfolgten die die mikrofluidischen Adhäsionsmessungen für jeden SAM viermal. Als Versuchsparameter dienten eine 4-stündige Inkubationsphase und eine 26 %/5 s Scherströmungsrate.

5.6.2. Adhäsionsassays auf negativen und positiven SAMs

Zunächst erfolgten die Adhäsionsstudien auf den gleichnamig geladenen SAMs MUDS(-)100 % und MUDT(+100 %.

Abbildung 81 a zeigt, dass der adhärenente Anteil $N_{\text{ad}}N_0^{-1}$ der Kieselalgen auf dem negativen SAM MUDS zwischen 66 % und 100 % schwankte. Auf dem positiven SAM MUDT hingegen belief sich der adhärenente Zellanteil auf fast 100 %. Auch wenn sich die $N_{\text{ad}}N_0^{-1}$ -Werte innerhalb der Fehlerbalken nicht signifikant unterschieden ($0,5 > p > 0,1$), ist der leicht reduzierte Mittelwert dennoch bereits ein erster Hinweis darauf, dass elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den negativ geladenen Diatomeen und den geladenen Oberflächen die Adhäsionsstärke beeinflussten.

Deutlich größere Unterschiede wurden zwischen den gemessenen Adhäsionsstärken der Kieselalgen auf den SAMs sichtbar (Abbildung 81 b). Diese hafteten wesentlich stärker auf den positiven MUDT(+) ($\tau_{50} = 865 \pm 172 \text{ dyn/cm}^2$) als auf dem negativen MUDS(-)

($\tau_{50} = 429 \pm 93 \text{ dyn/cm}^2$). Die statistische Signifikanz wurde mittels eines durchgeführten T-Test zwischen den τ_{50} -Werten der unterschiedlich geladenen Oberflächen MUDT(+) und MUDS(-) bestätigt ($0,001 < p \leq 0,01$).

Zudem wies die breitere Abrissverteilung der Zellen auf dem negativen SAM (Beginn Zellabriss $\varnothing 30 \text{ dyn/cm}^2$) in Abbildung 81 c darauf hin, dass sich die Adhäsion einzelner Diatomeen auf dieser Oberfläche von der auf der positiven Oberfläche unterschied. Dort fand der gesamte Abriss der Zellen (Beginn Zellabriss: $\varnothing 90 \text{ dyn/cm}^2$) in einem engeren Scherströmungsbereich statt (Abbildung 81 d).

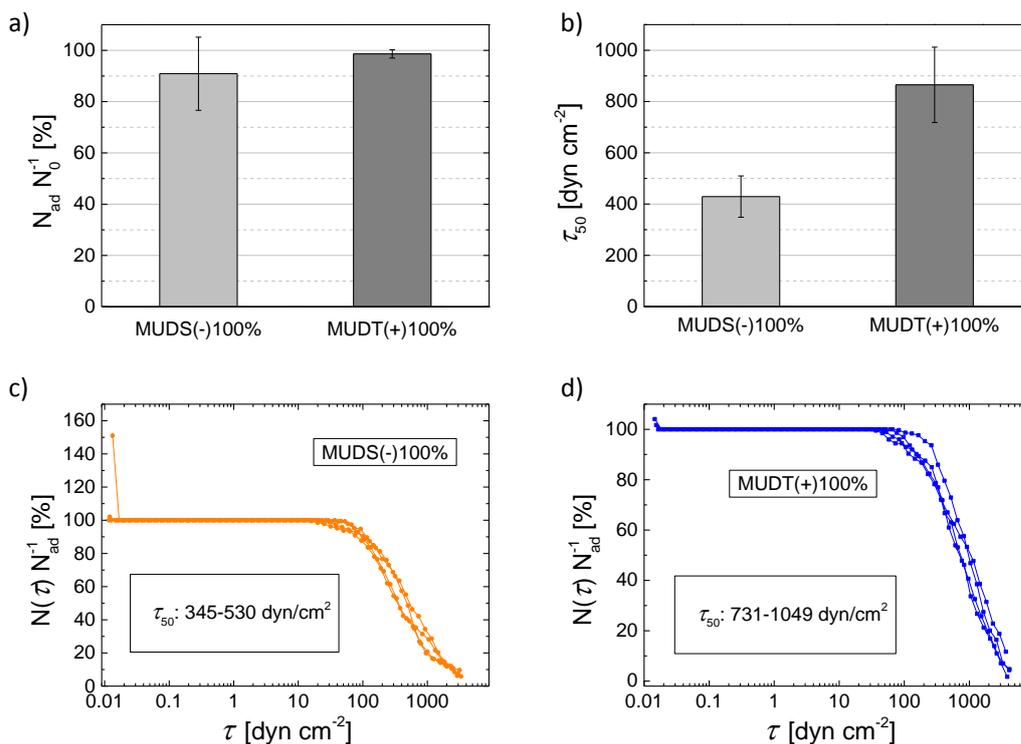


Abbildung 81: Adhäsion von *N. perminuta* auf dem negativ bzw. positiv geladenen SAM MUDS(-)100 % bzw. MUDT(+100 %; a) adhärenente Zellanteile; b) kritische Scherströmungen, die nötig sind 50 % der adhärenenten Diatomeen von den SAMs zu entfernen; c) und d) Abrisskurven der Diatomeen. Die angegebenen Fehler zeigen die Standardabweichung.

5.6.3. Adhäsionsassays auf zwitterionischen SAMs

Die Resultate aus Kapitel 5.6.2 (S. 105) zeigten eindeutig, dass die Ladung einer Oberfläche einen deutlichen Einfluss auf die Adhäsionsstärke der Kieselalgen hatte: die Adhäsion der Diatomeen war auf dem positiven SAM deutlich stärker als auf dem negativen SAM. Im nächsten Schritt sollte zusätzlich untersucht werden, welchen Effekt die gemischten zwitterionischen SAMs auf die Adhäsionsstärke der Diatomeen ausüben. Es wurde vermutet, dass eine durch starke elektrostatische Kräfte hervorgerufene Wechselwirkung mit Wassermolekülen mit der Grenzfläche der SAMs eine zusätzliche Abnahme der Adhäsionsstärke der Kieselalgen bewirken würde.

Anhand von Abbildung 82 a bzw. des Detailgraphs ist deutlich ersichtlich, dass die Adhäsionsstärke der Diatomeen auf den zwitterionischen SAMs im Vergleich zu den gleichnamig geladenen Homologen abnahm.

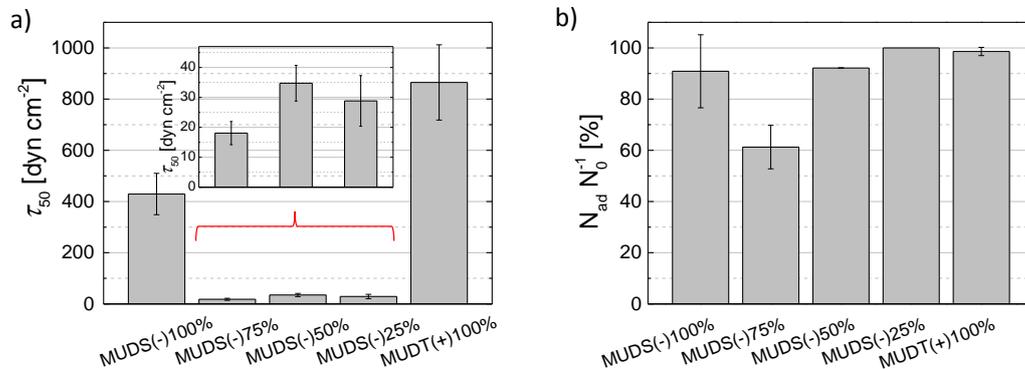


Abbildung 82: Adhäsion von *N. perminuta* auf geladenen SAMs MUDS(-), MUdT(+) und auf gemischten zwitterionischen SAMs MUDS(-)25 %, -50 % und -75 %; a) durchschnittliche kritische Scherströmungen τ_{50} aus vier Messungen; b) adhärenente Zellanteile. Die angegebenen Fehler zeigen die Standardabweichung.

Der höchste Mittelwert der kritischen Scherströmung τ_{50} belief sich bei der zwitterionischen Serie auf $35 \pm 7 \text{ dyn/cm}^2$ (MUDS(-)50 %), welcher lediglich 5 % des Mittelwerts von MUdT(+100 % entsprach ($\tau_{50} = 865 \pm 172 \text{ dyn/cm}^2$). Auf MUDS(-) 25% war die vermessene kritische Scherströmung mit $29 \pm 8 \text{ dyn/cm}^2$ ähnlich. MUDS(-)75 % ergab als Ausnahme eine zusätzlich um die Hälfte reduzierte Adhäsionsstärke der Kieselalgen ($\tau_{50} = 18 \pm 4 \text{ dyn/cm}^2$). Ebenso deutete bereits der adhärenente Zellanteil auf diesem SAM das von MUDS(-)25 % und MUDS(-)50 % verschiedene Adhäsionsverhalten der Diatomeen an. Dieser war mit $61 \pm 8 \%$ signifikant niedriger ($N_{ad} N_0^{-1} = 100 \%$ (MUDS(-)25 %) bzw. $92 \pm 3 \%$ (MUDS(-)50 %)). Ein durchgeführter ANOVA/Tukey-Test diesbezüglich zeigte eine hohe statistische Signifikanz zwischen den $N_{ad} N_0^{-1}$ -Werten der Paare MUDS(-)25 %/75 % und MUDS(-)50 %/75 % ($p < 0,0001$).

Die kritischen Scherströmungen τ_{50} der zwitterionischen Serie ähnelten den Werten von EG₆OH ($25 \pm 7 \text{ dyn/cm}^2$). Dieser SAM war Teil der untersuchten EG-Serie (Kapitel 5.4, S. 95), auf der insgesamt eine schwache Adhäsion der Kieselalgen festgestellt wurde ($\tau_{50} = 6\text{-}136 \text{ dyn/cm}^2$; PEG < EG₆ < EG₃ < EG₁). Das Abrissverhalten der Diatomeen ließ sich ebenfalls mit dem auf der EG-Serie vergleichen. Hierzu werden die einzelnen Zellablöseprozesse durch die Abrisskurven in Abbildung 83 a-c verdeutlicht.

Auf MUDS(-)25 % und MUDS(-)50 % lösten sich die ersten Zellen bei Scherströmungen von $4 \pm 2 \text{ dyn/cm}^2$ bzw. $3 \pm 1 \text{ dyn/cm}^2$ von der Oberfläche (Abbildung 83 a bzw. b). Dies entsprach in etwa den Werten auf EG₁OH bzw. EG₃OH ($7 \pm 4 \text{ dyn/cm}^2$). Auf MUDS(-)75 % war der durchschnittliche Wert für die erste Zellablösung wie auch die kritische Scherströmung selbst um 50 % geringer und lag bei 1 dyn/cm^2 (Abbildung 83 c) Dieser Bereich wurde ebenso auf EG₆OH beobachtet ($1,5 \pm 0,9 \text{ dyn/cm}^2$).

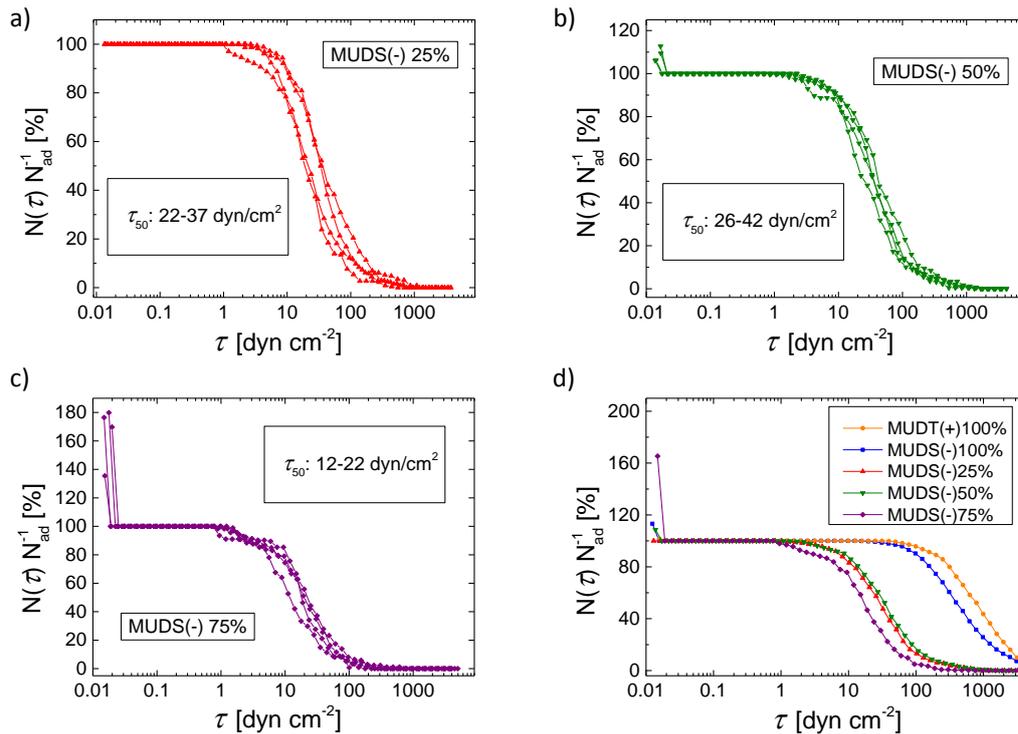


Abbildung 83: Abrisskurven der Diatomeen auf den zwitterionischen SAMs; a) MUDS(-)25 %; b) MUDS(-)50 %; c) MUDS(-)75 %; d) Durchschnittswerte von MUDT(+100 %, MUDS(-) 100 % sowie MUDS(-)25-100 %.

5.6.4. Zusammenfassung

In diesem Teil der Arbeit erfolgte die Quantifizierung der Adhäsionsstärke von *N. perminuta* auf gleichnamig geladenen bzw. zwitterionischen SAMs. Es sind vor allem die zwitterionischen Oberflächen, denen aufgrund ihres hohen Hydratisierungsgrades, hervorgerufen durch elektrostatische Wechselwirkungen, ein hohes Potential als *fouling-release*-Materialien zugesprochen wird [65-68].

Als positiv geladene Oberfläche wurde ein $N(CH_3)_3^+$ -terminierter SAM gewählt (MUDT(+100 %), die negative Oberfläche wurde aus SO_3^- -terminierten Organothiolen dargestellt (MUDS(-)100 %). Die zwitterionischen SAMs wurden aus jeweils unterschiedlichen Lösungsverhältnissen der oben genannten Organothiolen im Verhältnis von 1:1 präpariert. Dementsprechend sollten die Diatomeen auf allen zwitterionischen SAMs ähnliche Adhäsionsverhalten bzw. -stärken aufweisen. Auf den gleichnamig geladenen SAMs wurde eine Beeinflussung der Adhäsionsstärke durch elektrostatische Wechselwirkungen mit den Klebstoffen erwartet, da die extrazellulären Polymersubstanzen (EPS) hauptsächlich aus Polysacchariden bestehend, beim bestehenden pH von 8,2 negativ geladen sind [279].

Diese Annahme wurde dadurch bestätigt, dass die Diatomeen mit einem signifikanten Unterschied eine doppelt so starke Adhäsion auf dem positiven als auf dem negativen

SAM aufwiesen. Bereits der leicht reduzierte Mittelwert der adhärennten Zellfraktion von *N. perminuta* auf MUDS(-) hatte auf die Beeinflussung der Adhäsionsstärke durch elektrostatische Wechselwirkungen hingewiesen. Einen elektrostatischen Effekt bei der Adhäsion von Diatomeen an geladene Oberflächen hatten ebenso Li *et al.* beobachtet, während sie *Nitzschia closterium* auf kationisch-modifizierten Phosphorylcholin-Copolymerfilmen untersuchten [279].

An dieser Stelle soll daran erinnert werden, dass in zuvor durchgeführten Studien (Kapitel 5.2, S. 85), die Diatomeen unabhängig von den Benetzungen (Kontaktwinkel: 33-112°) der unterschiedlich terminierten SAMs stets zu annähernd 100 % an diese adhärten. Dies bestätigt wiederholt, dass in dem hier vorliegenden Fall offensichtlich die Ladung der ebenso unterschiedlich terminierten Oberflächen (MUDS(-): $-\text{SO}_3^- = 50^\circ$, MUDT(+): $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+ = 35^\circ$) eine wichtige Rolle für den permanenten Adhäsionsprozess aufgrund unterschiedlicher Wechselwirkung mit den ausgesonderten extrazellulären Polymer-substanzen gespielt haben muss.

Einen ähnlichen oder sogar ausgeprägteren Adhäsionstrend ergaben kürzlich durchgeführte Besiedlungsstudien auf identischen SAMs durch die Grünalge *Ulva* (Zeta-Potential: -19,3 mV [21]). Diese siedelte ebenso vermehrt auf dem positiven MUDT(+) 100 %, auf der negativen Oberfläche MUDS(-) 100 % adhärte nur eine geringe Anzahl von Algensporen permanent [278]. Eine elektrostatische Beeinflussung der Algenspore *Ulva linza* durch geladene Oberflächen wurden bereits in anderen Studien beobachtet [21, 45].

Auf den zwitterionischen Zweikomponenten-SAMs MUDS(-)25 %, MUDS(-)50 % und MUDS(-)75 % ergaben die Adhäsionsstärkemessungen mit *N. perminuta* eine deutliche Adhäsionsstärkeabnahme verglichen zu den gleichnamig geladenen Homologen (96-98 %). Die zusätzliche Abnahme der Adhäsionsstärken der Diatomeen ließ vermuten, dass die Adhäsion nicht ausschließlich durch die Einzelladungen beeinflusst wurde, sondern ein *fouling-release* Effekt durch die gemischten Ladungen in den zwitterionischen SAMs auftrat. Da bei zwitterionischen Oberflächen die elektrostatische Wechselwirkungen mit Wassermolekülen im Zusammenhang mit einer Protein- und Bakterienresistenz diskutiert wird, bestand in diesem Fall die Annahme, die schwache Adhäsionsstärke von *N. perminuta* auf MUDS(-)25 %, MUDS(-)50 % und MUDS(-)75 % könnte auf einen Hydratationseffekt zurückzuführen sein. Die gemessenen kritischen Scherströmungswerte der zwitterionischen Serie (18-35 dyn/cm²) befanden sich zudem im Bereich der zuvor getesteten OEG-SAMs EG₆OH ($\tau_{50} = 25 \pm 7$ dyn/cm²), welche aufgrund der (Ethylen-Glykol)-Einheiten einen hohen Hydratationsgrad aufweisen.

Bei der näheren Betrachtung der untersuchten zwitterionischen Serie war auffällig, dass vor allem die Adhäsionsstärke der Kieselalgen auf MUDS(-)75 % im Bezug auf MUDS(-)25 % und MUDS(-)50 % zusätzlich um die Hälfte reduziert war. Ebenfalls nahm der adhärennte Anteil auf diesem SAM signifikant ab. Ähnliche Ergebnisse ergaben Adhäsionsstudien von *Ulva linza* auf identischen SAMs. Diese siedelten zu ähnlichen Anteilen auf MUDS(+)25 % und MUDS(-)50 %, der MUDS(-)75 % SAM wurde jedoch

schwächer besiedelt [278]. Eine schwankende Oberflächenfilmqualität der SAMs konnte durch diese Korrelation zunächst ausgeschlossen werden. Eine Erklärung würde eine Variation der Oberflächenhomogenität liefern, die zu Ladungsdomänen auf den SAMs führen könnte. Mit Sicherheit kann jedoch nicht gesagt werden, ob sich die Inhomogenitäten auf dem MUDS(-)75 % ausbildeten oder auf den anderen beiden SAMs, auf denen die Diatomeen ähnliche kritische Scherströmungswerte zeigten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die beschriebene Untersuchung gezeigt werden konnte, dass geladene Oberflächen eine eindeutige Wirkung auf die Adhäsionsstärke von *N. perminuta* hatten. Einen analogen *fouling-release* Effekt wie ihn OEG-Oberflächen in dieser Arbeit aufwiesen, zeigten zudem gemischte zwitterionische SAMs. Unterstützt wurden die erhaltenen Resultate durch Zhang *et al.*, welche ebenfalls einen abweisenden Effekt zwitterionischer Oberflächen (Poly(Sulfobetainmethacrylat)) bei Besiedlungsstudien mit *N. perminuta* feststellten [67]. Im Zusammenhang dieser Arbeit kann noch nicht vollständig geklärt werden, ob die starke Adhäsionsabnahme der Diatomeen auf den zwitterionischen SAMs durch Hydratation hervorgerufen wurde. Lediglich die ähnlichen Adhäsionsstärken der Diatomeen auf der EG-Serie sowie die chemische Natur der zwitterionischen SAMs lassen vermuten, dass die Anlagerungen von Wassermolekülen an die Grenzfläche der Oberflächen bedingt durch elektrostatische Wechselwirkungen eine Rolle gespielt haben kann.

5.7. Mikrofluidische Messungen in Feldversuchen

Um die Leistungsfähigkeit einer Oberfläche oder Beschichtung im Hinblick auf ihre Biofoulingeneigenschaften zu prüfen, ist neben Untersuchungen auf Laborebene das Verhalten dieser Oberflächen im natürlichen aquatischen Raum von großer Wichtigkeit. Erst der Kontakt mit einer realen Umgebung und den dort herrschenden Bedingungen verrät, ob eine potentielle *foul-release* Beschichtung ihre volle Kapazität über einen bestimmten Zeitraum aufrechterhalten kann. Auf dieser Ebene wurden in den letzten Dekaden bereits unzählige Studien durchgeführt. Zeiträume, in denen Untersuchungsobjekte in Seewasser ausgesetzt waren, variierten hierbei von Wochen, über Monate und bis hin zu einigen wenigen Jahren [52, 70-71, 73, 280].

Über die Adhäsionsprozesse in den ersten Stunden im Feld ist jedoch nur wenig bekannt. Interessant in dieser Hinsicht war die Leistungsfähigkeit der bereits im Labor untersuchten Oberflächen in Kontakt mit natürlichem Seewasser und in diesem Medium lebenden Mikroorganismen zu analysieren. Dies wurde zur gleichen Zeit in parallel durchgeführten Besiedlungsstudien diverser Oberflächen durchgeführt. Die Auswertungen ergaben, dass die Artenvielfalt und deren Häufigkeit stark von den vorherrschenden Luft- und Wassertemperaturen abhingen. Die zuvor in Laborversuchen gemachten Beobachtungen wie zum Beispiel die größere Bedeutung von Hydratation der Oberflächen im Gegensatz zu ihrer Benetzbarkeit konnte ebenso in Feldanalysen bestätigt werden [246].

Das Augenmerk der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen lag auf mikrofluidischen Adhäsionsstärkemessungen der im Ozean vorkommenden Arten. Hierzu wurde der gleiche mikrofluidische Aufbau wie zuvor verwendet. Eine genaue Durchführung der Experimente im Feld wurde in Kapitel 3.6 (S. 51) gegeben. Die verwendeten Oberflächen und ihre Eigenschaften sind in Tabelle 14 aufgelistet. Diese deckten unterschiedliche Benetzungs- und Hydratationseigenschaften ab und wurden bereits zuvor bei Adhäsionsstudien, beschrieben in Kapitel 5.2.1 und 5.4.1 verwendet.

Tabelle 14: Eigenschaften der verwendeten SAMs in den Feldmessungen. Sie stellen Oberflächen mit unterschiedlichen Benetzungs- und Hydratationsgraden dar. Die Schichtdicken wurden mittels Ellipsometrie bestimmt. Fehler der Kontaktwinkel- bzw. Ellipsometriemessungen: $\pm 3^\circ$ bzw. $\pm 3 \text{ \AA}$.

Oberflächenchemie	Label	Kontaktwinkel/$^\circ$	Schichtdicke/\AA
HS-(CH ₂) ₁₁ -O-(CH ₂) ₂ -(CF ₂) ₅ -CF ₃	FUDT	112	16
HS-(CH ₂) ₁₁ -CH ₃	DDT	104	13
HS-(CH ₂) ₁₁ -NH ₂	AUDT	55	16
HS-(CH ₂) ₁₁ -OH	HUOT	33	13
HS-(CH ₂) ₁₁ -(O-(CH ₂) ₂)-OH	EG₁OH	28	15
HS-(CH ₂) ₁₁ -(O-(CH ₂) ₂) ₆ -OH	EG₆OH	30	22
HS-(CH ₂) ₂ -(O-(CH ₂) ₂) ₄₄ -OH	PEG	30	33

Abbildung 84 gibt zudem eine visuelle Vorstellung des Versuchsgeländes und des Labors während den durchgeführten Feldmessungen. Durch die Messungen im freien Gelände bestand stets die Gefahr, dass die empfindlichen mikrofluidischen Messungen durch natürliche Wetterbedingungen, vor allen Dingen Windböen, gestört wurden. Da ebenso andere Messungen im mobilen Labor durchgeführt wurden, musste darauf geachtet werden keine Erschütterungen während der Inkubationszeit zu verursachen. Hinzu kamen sich ändernden Temperaturen innerhalb eines Tageszyklus. Diese lagen während der Messzeiten zwischen 19-24°C. Zusätzlich konnte durch intensive Sonneneinstrahlung auf den Messaufbau zu Temperaturerhöhungen im System während der Inkubationsphase kommen. In allen Fällen wurde versucht während der Inkubationszeit stets Schatten mittels der Wagentüren zu gewährleisten. Die Glasfenster wurden hierbei durch Tücher abgedeckt. Ein weiterer Faktor stellten die injizierten Mikroorganismen dar. Als Teil einer gemischten Population im Ozean, hin die Zusammensetzung dieser tagtäglich von den Umgebungs- und Wassertemperaturen ab, so dass identische Bedingungen diesbezüglich nicht zu erwarten waren [246]. Die Identifizierung der Organismen durch das benutzte Objektiv (10x) und zum Teil unzureichenden Kontrastverhältnissen war während der Messungen nicht möglich. Dies behinderte die Messungen nicht, da ohnehin die gesamte Population betrachtet werden sollte. Durch diese Einschränkung war lediglich die Bestimmung der adhärenen Zellfraktionen ($N_{ad}N_0^{-1}$) auf den Oberflächen nicht möglich, da nicht unterschieden werden konnte, ob es sich bei den sofort entfernten Objekten bei $\tau \leq 0.05 \text{ dyn/cm}^2$ um Mikroorganismen oder auch um kleinste Sedimentpartikel handelte.



Abbildung 84: Versuchsgelände und mikrofluidischer Aufbau im Feld des FIT/Florida, USA.

5.7.1. Adhäsionsstudien

Bevor Adhäsionsstudien durchgeführt wurden, wurden zwei Inkubationszeiten getestet. Diese waren 2 h und 4 h. Abbildung 85 zeigt diesbezüglich die Resultate. Es ist eindeutig zu erkennen, dass die Adhäsionsstärke der Mikroorganismen nicht stark variierte. Die kritische Scherströmung nach 2 h betrug 323 dyn/cm^2 , nach 4 h 375 dyn/cm^2 . Die Wahl einer Inkubationszeit für weitere Experimente fiel auf 4 h, da die im Labor durchgeführten Untersuchungen ebenso nach einer 4-stündigen Inkubationszeit erfolgten.

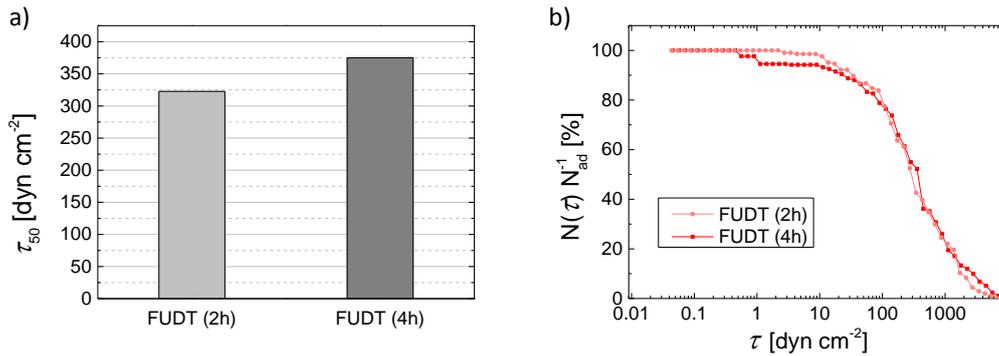


Abbildung 85: Adhäsionsstärke diverser Mikroorganismen auf FUDT nach Inkubationszeiten von 2 h bzw. 4 h. a) Kritische Scherströmung τ_{50} ; b) Abrisskurven.

Anschließende Adhäsionsstärkeuntersuchungen auf den ausgewählten Oberflächen sind in Abbildung 86 dargestellt.

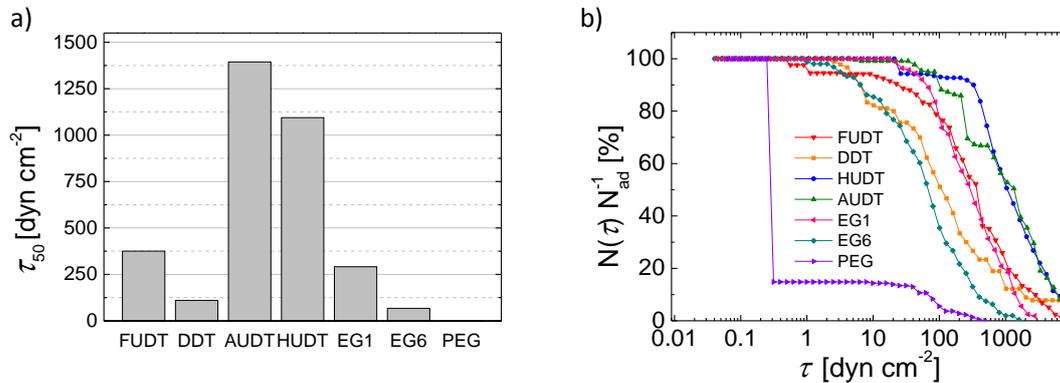


Abbildung 86: Abrissexperimente von *N. perminuta* auf diversen SAMs in Felduntersuchungen. a) Kritische Scherströmungen τ_{50} ; b) Abrissverhalten der gemischten Population von den Oberflächen.

Auf den hydrophoben SAMs FUDT und DDT zeigten die Mikroorganismen kritische Scherströmungen von 375 dyn/cm^2 bzw. 111 dyn/cm^2 . AUDT wies mit 1394 dyn/cm^2 den höchsten gemessenen τ_{50} -Wert der untersuchten Oberflächen auf. HUDT folgte mit $\tau_{50} = 1094 \text{ dyn/cm}^2$. Auf EG_1OH wurde eine Abnahme der kritischen Scherströmung auf 291 dyn/cm^2 festgestellt. Dieser abnehmende Trend wurde weiter von EG_6OH verfolgt, auf dem die Mikroorganismen nur noch einen τ_{50} -Wert von 67 dyn/cm^2 aufwiesen. Mit $\tau_{50} = 0,3 \text{ dyn/cm}^2$ hafteten die Mikroorganismen auf PEG annähernd nicht.

Beim Vergleich der Werte mit Resultaten aus dem Labor waren zum einen ähnliche Adhäsionstrends zu erkennen, zum anderen zeichneten sich deutliche Unterschiede ab (Abbildung 87). Hierzu zählten überraschenderweise die hydrophoben SAMs FUDT und DDT, welche bei den Adhäsionsstärkeuntersuchungen von *N. perminuta* die höchsten Werte zeigten ($\tau_{50} = 1823 \text{ dyn/cm}^2$ bzw. 1386 dyn/cm^2). Ebenso wies der hydrophile SAM HUDT eine enorm von den Laborwerten abweichende kritische Scherströmung auf ($\tau_{50} = 1094 \text{ dyn/cm}^2$ versus $\tau_{50} = 276 \text{ dyn/cm}^2$) und befand sich eher im τ_{50} -Bereich, welcher schlussfolgernd aus den Labortests als charakteristisch für hydrophobe SAMs

bezeichnet wurde. Auf AUDT wurden im Feld als auch im Labor ähnliche kritische Scherströmungswerte gemessen ($\tau_{50} = 1394 \text{ dyn/cm}^2$ versus $\tau_{50} = 1260 \text{ dyn/cm}^2$). Mit den Laboruntersuchungen übereinstimmend reichten sich die EG-SAMs in den Feldtests ebenso im unteren Bereich der kritischen Scherströmungswerte τ_{50} ein.

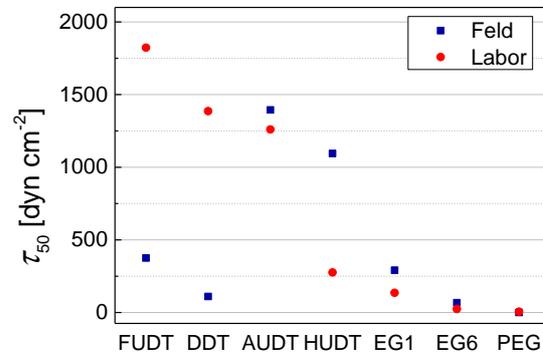


Abbildung 87: Vergleich von τ_{50} -Werten zwischen mikrofluidischen Feld- und Laboruntersuchungen.

Die Vermutung, dass schwach haftende Organismen tagesabhängig auftauchten, konnte durch die Korrelation einzelner Tage widerlegt werden. Die Analysen zweier Tage zeigten hohe als auch niedrige kritische Scherströmungen (Abbildung 88). Tag 1 konnte zudem mit gleichzeitig durchgeführten Besiedlungsstudien (statisch dem Ozean ausgesetzte Proben für 48 h) korreliert werden [246]. An diesem Tag wurden auf den FUDT, DDT und AUDT-SAMs hauptsächlich *Peritrich* gefunden (FUDT/DDT: 700 Zellen/ cm^2 , AUDT: 900 Zellen/ cm^2). Da AUDT eine viel höhere kritische Scherströmung aufwies als FUDT und DDT, können somit die unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften als Grund für die unterschiedliche Haftstärke genannt werden.

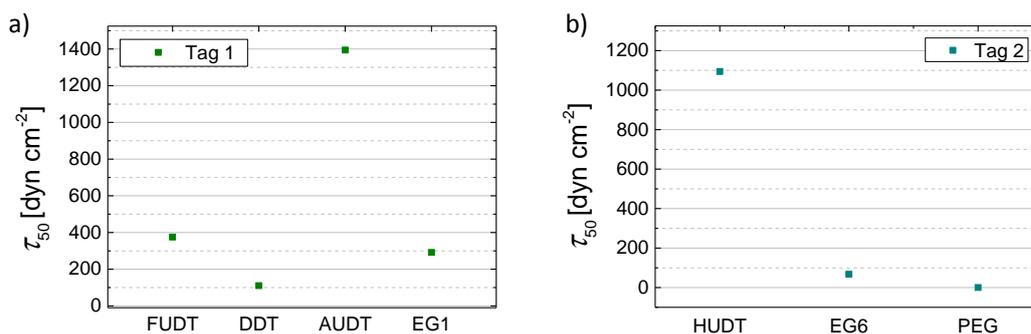


Abbildung 88: a) Messungen von FUDT, DDT, AUDT und EG₁OH am Tag 1; b) Messungen von HUDT, EG₆OH und PEG am Tag 2. Tagesunabhängig wurden schwach und stark haftende auf den Oberflächen Mikroorganismen beobachtet.

5.7.2. Zusammenfassung

Um die im Labor gewonnenen Adhäsionserkenntnisse einer Diatomeen-Spezies mit denen einer gemischten Population unter natürlichen Bedingungen zu vergleichen, erfolgten mikrofluidischen Feldmessungen auf dem marinen Versuchsgelände des *Florida Institute of Technology*. Die verwendeten Oberflächen in diesen Studien deckten den Bereich unterschiedlicher Benetzungs- und Hydratationseigenschaften (FUDT, DDT, AUDT, HUDT bzw. EG₁OH, EG₆OH, PEG) ab. Die Inkubationsdauer der Mikroorganismen auf den Oberflächen betrug wie auch in den Laborexperimenten 4 h.

Die Resultate zeigten im Gegensatz zu denen im Labor erhaltenen Ergebnissen wesentlich schwächere Adhäsionen der Organismen auf stark hydrophoben SAMs FUDT und DDT (Kontaktwinkel: 104-112°), auf dem hydrophilen HUDT (Kontaktwinkel: 33°) hingegen wurde eine deutlich höhere Adhäsionsstärke gemessen. AUDT mit dazwischenliegenden Benetzungseigenschaften (Kontaktwinkel: 55°) verhielt sich im Feld ähnlich wie im Labor. Ebenso in Übereinstimmung mit den Laborergebnissen lagen die Adhäsionsstärken der Mikroorganismen auf den hydratisierten EG-SAMs (Kontaktwinkel: 28-30°) im niedrigeren Bereich der kritischen Scherströmungen. Innerhalb dieser Serie (EG₁OH, EG₆OH und PEG) war sogar der Einfluss zunehmenden Ethylen-Glykol Einheiten ersichtlich. Somit kann die Hydratation einer Oberfläche wie auch bei den Laboruntersuchungen als ein wichtiger Faktor für eine schwache Adhäsion gewertet werden. Der beobachtete Trend auf den hydrophoben SAMs FUDT und DDT kann durch den Gesamtvergleich aller Oberflächen nicht gänzlich erklärt werden. Da sich die τ_{50} -Werte der unbenetzbaren hydrophoben SAMs zum einen weit unter dem τ_{50} -Wert des hydrophilen SAMs HUDT lagen, zum anderen jedoch mit denen der hydrophilen EG-Serie überschritten, ist eine Korrelation zwischen Kontaktwinkel und Adhäsionsstärke nicht gerechtfertigt. Die nicht übereinstimmenden Messgrößen können in erster Linie mit der gemischten Population im Ozean in Verbindung gebracht werden. In dieser Hinsicht wurde im Allgemeinen durch statische Besiedlungsstudien auf analogen Oberflächen gezeigt, dass die Artenvielfalt und deren Zusammensetzung z. B. abhängig von der Wassertemperatur variierte [246]. Da nicht für beide Tage der mikrofluidischen Feldstudien Besiedlungsergebnisse vorlagen, konnte keine direkte Korrelation mit der Population erfolgen.

Insgesamt sind die vorliegenden Ergebnisse mit Vorsicht zu betrachten, da sich diese auf jeweils nur eine Messung stützen. Es erfolgten vor Ort mehrere Experimente, viele mussten jedoch bei Auswertungsversuchen aufgrund Kontrastmangels als mangelhaft eingestuft werden. Der unzureichende Kontrast konnte auch durch diverse Bearbeitungen der Aufnahmen nicht verbessert werden, wiederholte Zählversuche der Organismen führten zu einer hohen Fehlerquote. Andere Messungen wiederum wurden direkt vor Ort durch äußere Effekte negativ beeinflusst oder abgebrochen: Erschütterungen durch Windböen oder des Labor-Vans durch äußere Einwirkungen führten zum vorzeitigen Abriss der Mikroorganismen von den Oberflächen. Zwar wurde die Mehrzahl der Tubings des Setups stets mit Hilfe von Klebeband fixiert, bedingt durch die benötigte Flexibilität des

Mikroskop-Objekttisches (xy-Bewegung von Kanal zu Kanal) musste ein Spielraum für die Bewegungen vorhanden sein. Als weiterer Fehlerfaktor kann die benutzte Luftdruckgasflasche für die Überdruckgenerierung von 0,7 bar genannt werden. Wiederholt musste festgestellt werden, dass der eingestellte Vordruck nicht gehalten werden konnte. In wie weit die vorsichtige Nachregelung des Drucks die Organismen während der Inkubationszeit in ihrem Adhäsionsprozess beeinflusste oder eventuell nicht sichtbare Druckpulse den Abriss von Organismen während laufender Messungen verfälscht haben, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden.

5.8. Fehlerdiskussion

Auf Basis der quantitativen Analyse im Kapitel 4: Optimierung des mikrofluidischen Systems (S 53ff), können nun die in dieser Arbeit erhaltenen biologischen Evaluationen diskutiert werden. Tabelle 15 gibt hierfür eine Übersicht über die kritischen Scherströmungsbereiche der Diatomeen auf Oberflächen mit unterschiedlichen Eigenschaften und die prozentualen Schwankungen der τ_{50} -Werte. Die Streuungen in den verschiedenen Messungen auf einer Oberfläche lagen bis auf einzelne Ausnahmen (Polysaccharide) zwischen 12 % und 44 %. Sie waren somit in der gleichen Größenordnung wie die Abweichungen, die mit den Partikelmodellsystemen nach wiederholten Reassemblierungen gemessen wurden (3-61 %). Da bei den Messungen mit *N. perminuta* eine Oberfläche stets nur einmal verwendet wurde, mussten von Experiment zu Experiment (Messungen erfolgten vier Mal je Oberfläche) erneute Reassemblierungen der Kanalsysteme vorgenommen werden. Daher ist davon auszugehen, dass die Fehler maßgeblich durch Unzulänglichkeiten des mikrofluidischen Systems und weniger durch die biologische Variabilität der Diatomeen verursacht wurden.

Wenn man zudem die Abweichungen der Messwerte als Absolutwerte betrachtet, so ist hieraus ersichtlich, dass diese bei größeren kritischen Scherströmungen höher waren. Dies wiederum deckt sich mit der Vermutung, dass die Kompressionen der Kanäle durch den Sog der Pumpe bei zunehmenden Scherströmungen zunahm und somit stark haftende Diatomeen durch diese Tatsache stärker betroffen waren.

Tabelle 15: Bereich der τ_{50} -Werte und Standardabweichungen (Absolutwerte bzw. %) von den kritischen Scherströmungen für Diatomeen auf Oberflächen unterschiedlicher Eigenschaften.

Oberflächen	τ_{50} -Bereich [dyn/cm ²]	Abweichungen [dyn/cm ²]	Abweichungen [%]
SAMs mit unterschiedlichen Benetzungsgraden	276-1823	59-224	12-21
Konditionierte SAMs	722-1921	250-288	18-40
EG-SAMs mit unterschiedlichen Hydratationsgraden	6-136	3-30	21-44
Polysaccharide	458-729	214-361	32-56
Geladene SAMs	429-865	81-147	20-22
Zwitterionische SAMs	18-35	4-8	20-25

Trotz der Abweichungen sind die Unterschiede zwischen einigen Oberflächen (z. B. Benetzung versus Hydratation) anhand der τ_{50} -Werte deutlich, während beim Vergleich von Oberflächen mit geringem Unterschied der kritischen Scherströmungen (z. B. EG-Serie, zwitterionische SAMs) die Genauigkeit des Experiments nicht ausreichte, um etwaige Änderungen herauszuarbeiten,

Insgesamt betrachtet erstreckten sich bei allen gemessenen Oberflächen die τ_{50} -Werte über drei Größenordnungen (6-1823 dyn/cm²). Damit waren die wesentlichen, als statistisch signifikant eingestufteten Erkenntnisse im Ergebnisteil, wie z. B. stärkere Adhäsion auf hydrophoben Oberflächen (FU DT, DD T, AU DT) und schwache Adhäsion auf hydrophilen Oberflächen (HU DT, EG₁OH, EG₃OH, EG₆OH, PEG) auch im Rahmen der charakterisierten Schwankungsbreite des Experiments verlässlich. Unterstützt wurde diese Aussage durch den Vergleich einer hydrophilen Oberfläche ohne Hydratationseigenschaften (HU DT) mit hydratisierten Oberflächen (EG₁OH, EG₃OH, EG₆OH, PEG). In diesem Fall wurde anhand von statistisch signifikanten Unterschieden bestätigt, dass die Benetzung einer Oberfläche nach Hydratation eine zweitrangige Stellung für die Adhäsion von *N. perminuta* hatte. Weiterhin konnten signifikante Unterschiede von gemischten zwitterionischen SAMs zum einen zu ihren gleichnamig geladenen Homologen (MU DS(-) und MU DT(+)) und zum anderen zu SAMs mit unterschiedlichen Benetzungen (FU DT, DD T, AU DT, HU DT) ausgearbeitet werden. Dies wird durch die Abbildung 96 (S. 129) im zusammenfassenden Teil dieser Arbeit verdeutlicht.

6. Motilitätsanalyse von *N. perminuta*

N. perminuta ist im planktischen Zustand eine nicht motile Kieselalge. Dies bedeutet, dass sie nicht im Stande ist durch aktives Schwimmen an eine Oberfläche zu gelangen. Als *passive* Organismen sinken sie folglich durch Gravitation auf eine Oberfläche ab oder bleiben nach Einwirken einer Strömung an Substraten haften. Haben Algenzellen den Kontakt zu einer Oberfläche über eine ihrer Raphen hergestellt, sind diese zu Bewegungen, dem sogenannten Gleiten oder Kriechen, befähigt. Diese durch Actin-Filament-assoziierte Motorproteine bewerkstelligte Bewegung wird über einer der Raphen der Diatomee (Antriebsraphe) vollzogen (Kapitel 2.1.1, S. 8 f). Die Bewegungsgeschwindigkeiten, können abhängig von der Spezies und Umweltbedingungen zwischen 0.1 und 25 μm pro Sekunde variieren. Im Allgemeinen dienen die Kriechbewegungen in natürlichen Gewässern dazu, um an Orte mit günstigeren Lichtverhältnissen oder besserem Nährstoff- bzw. Strömungsaufkommen zu gelangen [75]. Grundlegende Studien auf dem Gebiet der Diatomeen-Motilität erfolgten bereits zahlreich und finden sich zusammengefasst in Reviews oder anderweitiger Literatur [75-76, 131, 134]. Das Augenmerk dieser Untersuchungen richtet sich hauptsächlich auf die Entschlüsselung des Bewegungsmechanismus, damit verbundener Polymeraussonderung (EPS) und die Zusammensetzung bzw. mechanische Beschaffenheit dieser Polymersubstanzen. Was Kriechgeschwindigkeiten betrifft, so wurden diese bereits in Abhängigkeit steigender Temperaturen und Bestrahlung durch Licht untersucht [79, 125] oder durch Zugabe von Salzen beeinflusst [77]. Ebenso wurde die Reaktion von Diatomeen auf die Einwirkung elektromagnetischer Felder beobachtet [80]. Murase *et al.* führten in ihrer Studie eine Kurzzeitanalyse (bis 600 s) der Geschwindigkeiten von *Navicula sp.* durch und stellten zudem fest, dass sich die Zellen ungerichtet auf dem Substrat fortbewegten [281].

Gezielte Vergleiche von motilen Diatomeen auf Oberflächen mit unterschiedlichen Eigenschaften sind selten. Holland *et al.* berichteten, dass sich bei den Kriechprozessen von Diatomeen dreier Gattungen, jeweils auf hydrophilem Glas und hydrophobem PDMS analysiert, bei *Amphora* und *Craspedostouros* kaum Unterschiede auf den Oberflächen zeigten [126]. Bei *Navicula* hingegen wurde in den ersten 30 min vermehrte Motilität auf Glas (70 %) als auf PDMS (30 %) festgestellt. Nach 2,5 h betrug der Unterschied nur noch ca. 10 % (Glas: 20 %, PDMS: 5 %). In weiteren 2,5 h nahm die Motilität weiter ab (Glas: 5 %, PDMS: 2 %). Nach 24 h bewegten sich die Zellen zu gleichen 10 % auf beiden Oberflächen. Sie betrachteten zwar die Anteile (%) von motilen Kieselalgen, jedoch fand keine exakte Untersuchung der Geschwindigkeit statt.

Wigglesworth-Cooksey *et al* untersuchten *Amorpha coffeaeformis* zu einem auf einer hydrophilen Oberfläche (Glas) und zum anderen auf einem Glassubstrat mit einem Kontaktwinkelgradienten (ca. 35°-105°). Im letzteren Fall fanden sie, dass die Diatomeen lediglich auf der hydrophilen Seite der Oberfläche motil waren, während die Zellen beim Übergang der Zellen auf die hydrophobe Seite der Oberfläche ihre Bewegungen einstellten. Eine durchgehende Motilität wurde hingegen auf der rein hydrophilen Ober-

fläche beobachtet. Die Untersuchungsdauer belief sich auf 4,5 h, wobei durchgehende gleichmäßige Motilität verzeichnet wurde. Die Geschwindigkeitsangaben mit 2-5 μm wurden als Durchschnittswert für die gesamten 4,5 h angegeben, es fand keine exakte Korrelation der Geschwindigkeiten über die Zeit statt.

Die grundlegende Motilitätsstudie dieser Arbeit richtete sich auf die Geschwindigkeitsanalyse von *N. perminuta* auf einem hydrophoben (DDT, Kontaktwinkel von 104°) und einem hydrophilen (HUDT, Kontaktwinkel von 33°) SAM in einen Zeitraum von über 4 h. In den vorangegangenen Kapiteln wurde bereits gezeigt (Kapitel 5.2, S. 85f), dass sich die Haftstärke der Diatomeen auf diesen beiden Oberflächen stark unterschied ($\tau_{50(\text{DDT})} = 1386 \pm 176 \text{ dyn/cm}^2$ bzw. $\tau_{50(\text{HUDT})} = 276 \pm 59 \text{ dyn/cm}^2$). Es stellte sich folglich die Frage, ob *N. perminuta* auch bei ihren Kriechprozessen zwischen diesen SAM unterscheiden können. Als passender Vergleichsfaktor bieten sich in diesem Zusammenhang z. B. die Geschwindigkeit oder eine Gegenüberstellung der Bewegungsmuster im Allgemeinen an.

Die Untersuchungen der Diatomeen erfolgten jeweils in einem festen Sichtfeld in einem mikrofluidischen Kanal, um äußere Einflüsse wie z. B. Konvektionen zu vermeiden. Beide Oberflächen wurden alternierend vermessen, um gleiche Bedingungen zu gewährleisten. Es erfolgten jeweils fünfminütig Aufnahmen in individuellen Zeitabständen.

6.1. Bewegungsmuster und Geschwindigkeitsanalysen

Zunächst sollten die Bewegungen von *N. perminuta* auf den SAMs DDT und HUDT im Allgemeinen veranschaulicht werden. Hierzu wurden unmittelbar nach dem ersten Kontakt mit den Oberflächen die Bewegungsmuster der Diatomeen beobachtet und visualisiert. Die Kriechspuren einzelner motiler Diatomeen zeigt Abbildung 89. Es waren zahlreiche Ausführungen von geradlinigen, kurvenreichen sowie umkehrenden Bewegungen vorhanden. Interessanterweise erfolgten die Bewegungsmuster unabhängig von den Benetzungseigenschaften des SAMs.

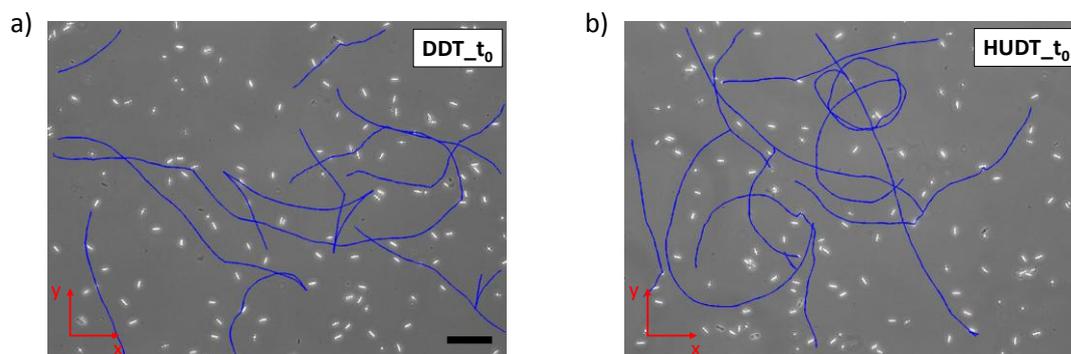


Abbildung 89: Kriechspuren von *N. perminuta* auf a) DDT (hydrophob); b) HUDT (hydrophil) zum Zeitpunkt t_0 d.h. unmittelbar nach dem ersten Kontakt mit der Oberfläche. Skala: 40 μm .

Geschwindigkeiten versus Benetzungseigenschaften

Desweiteren stellte sich die Frage, ob die Geschwindigkeiten motiler Diatomeen von den Benetzungseigenschaften abhängen. Interessant ist ebenfalls, ob die Geschwindigkeiten während einzelner Kriechprozeduren variieren. Die exakten Geschwindigkeiten der Algenzellen sind in Abbildung 90 (DDT) bzw. in Abbildung 91 (HU DT) in Geschwindigkeitsverteilungs-Histogrammen dargestellt. Diese wurden in Form von Durchschnittsgeschwindigkeiten aller motiler Diatomeen im Sichtfeld ($1001 \times 750 \mu\text{m}$) erfasst. Die Geschwindigkeitsklassen wurden über einen Bereich von $0\text{-}35 \mu\text{m/s}$ aufgetragen. Die Bestimmung der wahrscheinlichsten Geschwindigkeit erfolgt mittels einer Fitfunktion einer Maxwell- Geschwindigkeitsverteilung. Die Werte der wahrscheinlichsten Geschwindigkeiten v_w , die sich in den einzelner Aufnahmen mit fortschreitender Zeit ergaben und die Halbwertsbreiten der Fits (für Full Width at Half Maximum), sind jeweils in den Graphen vermerkt.

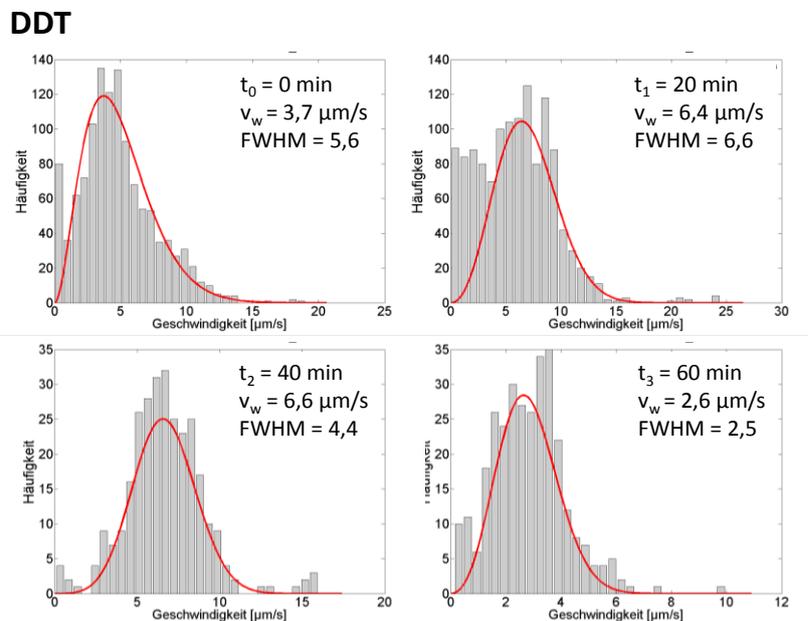


Abbildung 90: Geschwindigkeitsverteilungshistogramm aller in einem Sichtfenster motilen *N. perminuta* auf DDT über einen Zeitraum von 60 min. Die Maxima geben die wahrscheinlichste Geschwindigkeit v_w an, FWHM die Halbwertsbreiten (für Full Width at Half Maximum) der Fits.

HUdT

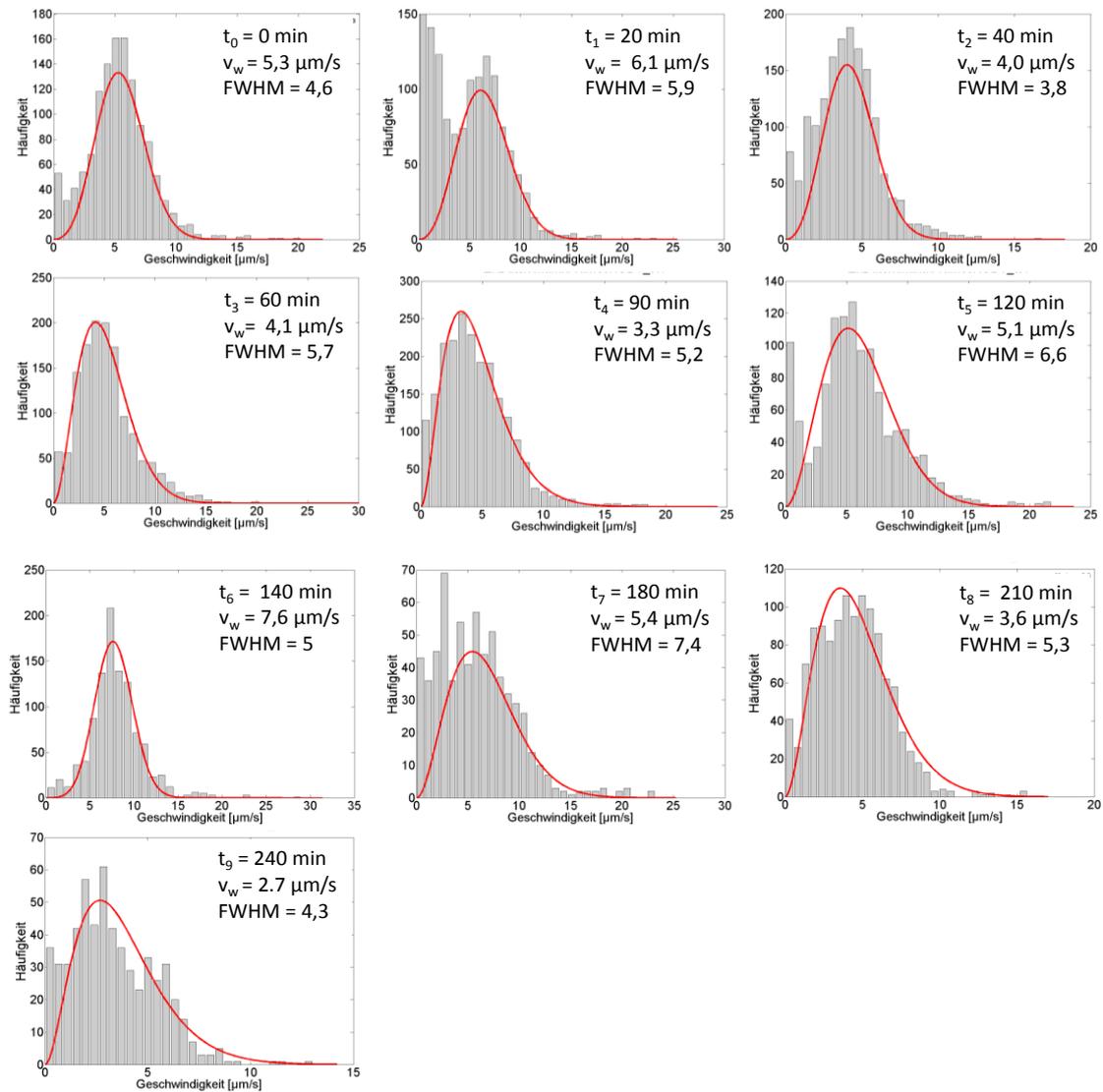


Abbildung 91: Geschwindigkeitsverteilungshistogramm über alle motilen *N. perminuta* auf HUdT über einen Zeitraum von 240 min. Die Maxima geben die wahrscheinlichste Geschwindigkeit v_w an, FWHM die Halbwertsbreiten (für Full Width at Half Maximum) der Fits.

Ersichtlich aus den Geschwindigkeitsverteilungshistogrammen, traten im Fall von DDT als auch von HUdT Geschwindigkeiten am Nullpunkt und nahe diesem auf. Diese Tatsache rührte vom gelegentlichen Bewegungsstillstand der Diatomeen während ihrer Kriechprozesse. In den Fits der Histogramme blieben diese Stillstände unberücksichtigt, da ausschließlich Geschwindigkeiten motiler Zellen in die Analysen fließen sollten. Bei der weiteren Analyse der wahrscheinlichsten Geschwindigkeiten der Diatomeen auf dem hydrophoben bzw. hydrophilen SAM konnte festgestellt werden, dass die motilen Diatomeen deutlich schneller auf dem hydrophoben SAM DDT in die permanente Adhäsion übergangen als es dies auf dem hydrophilen SAM HUdT eintrat (60 min bzw. 240 min) (Abbildung 92). Aus Abbildung 92 ist ersichtlich, dass die Geschwindigkeit der Diatomeen auf DDT durchschnittlich von einem Startwert von $3,7 \mu\text{m/s}$ auf $6,6 \mu\text{m/s}$ anstieg (t_0 - t_2 : 0-40 min), um schließlich innerhalb weiterer 20 min auf ein Minimum

von $2,6 \mu\text{m/s}$ abzufallen (t_4). Innerhalb weiterer 20 min (t_5) kam es zum Stillstand der Bewegung und die permanente Adhäsion trat ein.

Auf HUDT hingegen war die initiale Geschwindigkeit nach dem ersten Kontakt mit der Oberfläche (t_0) im Durchschnitt sogleich höher ($5,3 \mu\text{m/s}$) und erreichte schließlich nach ca. 1,5 h (t_6) einen Maximalwert von ca. $7,6 \mu\text{m/s}$. Währenddessen wurden stufenweise Zu- und Abnahmen und eine insgesamt breitere Verteilung der Geschwindigkeiten beobachtet (t_0 - t_5). Zum Schluss (t_9) folgte eine Abnahme der Geschwindigkeit auf $2,7 \mu\text{m/s}$, bevor in den nächsten 20 min (t_{10}) die permanente Adhäsion eintrat und keine motilen Diatomeen mehr zu beobachten waren.

Die höchste erfasste Geschwindigkeit betrug sowohl auf DDT als auch auf HUDT ca. $24 \mu\text{m/s}$. Auch wenn die Häufigkeit einer solch schnellen Bewegung äußerst gering war (Abbildung 90 bzw. Abbildung 91), bedeutet es dennoch, dass *N. perminuta* fähig sind in nur einem einzelnen „Gleitschritt“ das Doppelte ihrer Körperlänge zurückzulegen.

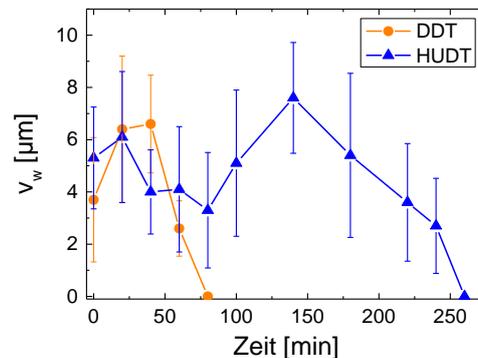


Abbildung 92: Durchschnittliche wahrscheinlichste Geschwindigkeiten v_w motiler Diatomeen auf DDT und HUDT mit zunehmender Zeit. Standardabweichung SA lässt sich über $\text{FWHM} = 2,355 \times \text{SA}$ bestimmen.

Bewegungsmuster versus Geschwindigkeiten

Abbildung 89 deutete bereits darauf hin, dass die Kriechbewegungen von *N. perminuta* eine hohe Diversität aufwiesen. Folgend sollen besonders auffällige Muster charakterisiert und in Zusammenhang mit den Geschwindigkeiten gebracht werden. Wie in anderen Untersuchungen beschrieben, wurde oft beobachtet, dass motile Zellen ihre Richtung rasch ändern können [123, 281]. Abbildung 93 a zeigt beispielhafte Umkehrbewegungen, von denen gewisse ausgesprochen abrupt erfolgten. Die Betrachtung der dazugehörigen Geschwindigkeiten zeigt eindeutig, dass an den jeweiligen Umkehrpunkten die Geschwindigkeit abnahm bzw. die Diatomeen vollkommen zum Stillstand kamen, bevor sich diese in die entgegengesetzte Richtung weiterbewegten. Zudem ist ersichtlich, dass die Geschwindigkeit ebenso während eines einzelnen Kriechprozesses variierte.

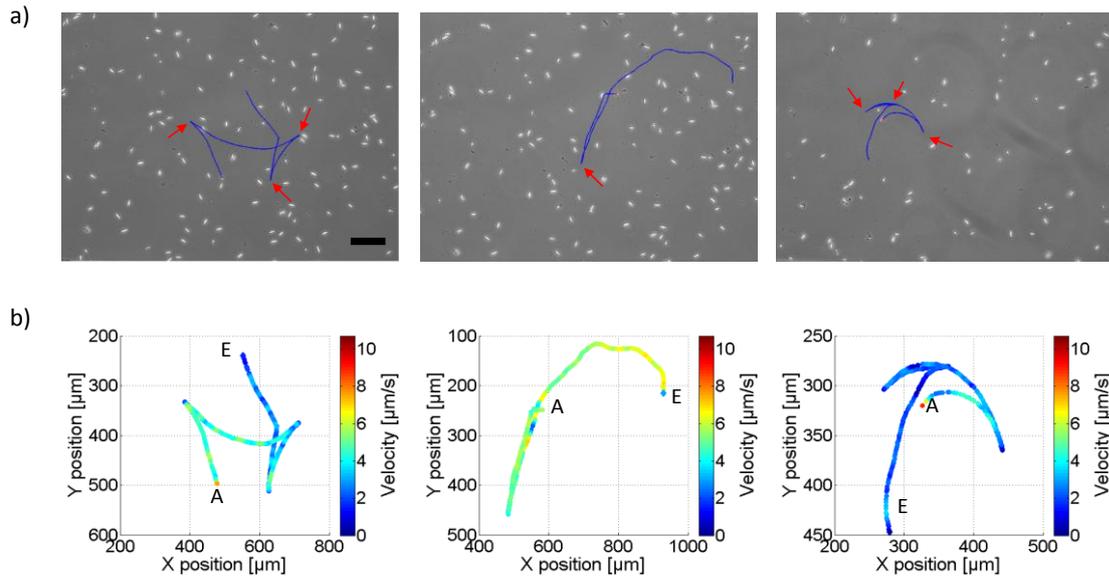


Abbildung 93: a) Richtungswechsel (rote Pfeile) von *N. perminuta* wurden unabhängig von der Benetzungseigenschaft der Oberfläche beobachtet. Skala: 40 μm ; b) dazugehörige Geschwindigkeitsanalysen. Die Farbkodierung repräsentiert die Geschwindigkeit einer Diatomee an einer bestimmten Position xy (Rot: hohe Geschwindigkeit, blau: niedrige Geschwindigkeit); A = Anfang, E = Ende der Bewegung.

Als Gleitspuren waren ebenso zahlreiche andere Muster vorhanden (Abbildung 94).

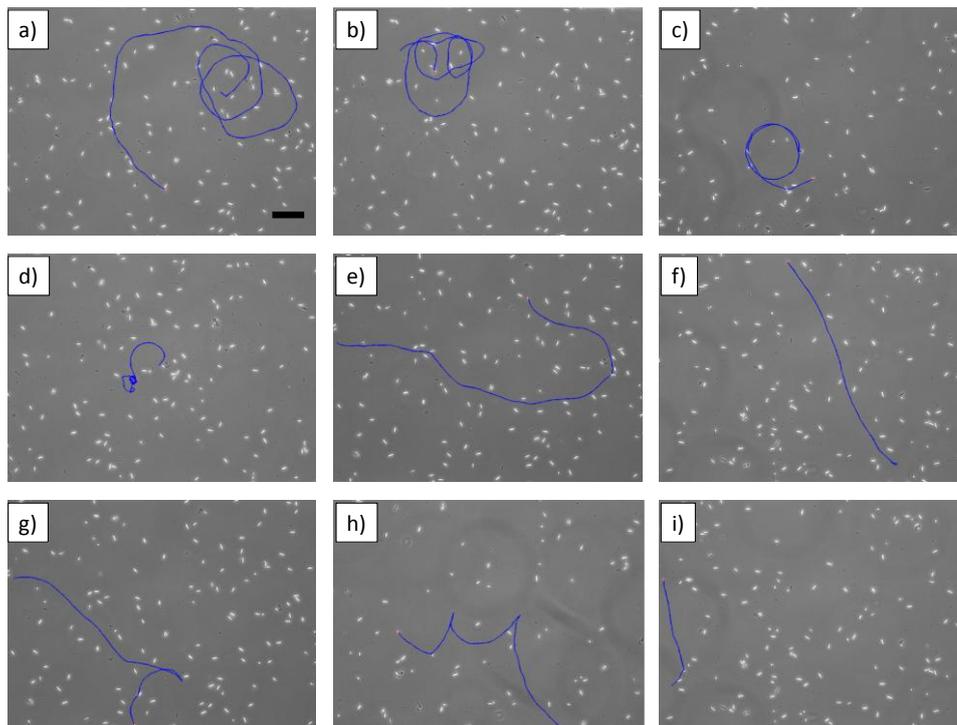


Abbildung 94: Vielfältige Bewegungsbahnen von *N. perminuta* auf DDT und HUDT. a-b) Spiralförmige Kriechbewegungen; c-d) kreisförmige Bewegungen mit großem und kleinem Radius; e) Bewegung mit breiter Kurve; f) geradlinige Bewegung; g-i) Kriechbewegungen, die sowie geradlinige Passagen, Kurven, sowie abrupte Umkehrungen bzw. plötzliches Abbiegen beinhalten. Skala: 40 μm .

Hierrunter zählten große und kleinere Spiralen (Abbildung 94 a/b), kreisförmige Bewegungen in unterschiedlichen Radien (Abbildung 94 c/d), breitere Kurven (Abbildung 94 e), längere geradlinige Spuren (Abbildung 94 f) oder Bahnen, die mehrere Muster vereinten (Umkehrungen, Kurven, gerade Bahnen, Abbildung 94 g-i). Da die illustrierten Bewegungsmuster auf beiden SAMs gleichermaßen beobachtet wurden, wurde folgender Abbildung kein Bezug auf eine Oberfläche im Speziellen genommen.

Die zu den Bewegungsmustern aus Abbildung 94 gehörigen Geschwindigkeitsanalysen deuten daraufhin, dass den diversen Gleitbewegungen der Diatomeen keine speziellen Geschwindigkeitsbereiche zugeordnet werden können. Die spiralförmigen Bewegungen erfolgten sowohl schnell mit mehr als $12 \mu\text{m/s}$ als auch in teilweise langsameren Zügen mit $2\text{-}7 \mu\text{m/s}$ (Abbildung 95 a/b). Dies galt ebenso für die kreisförmigen Bewegungen, die entweder insgesamt sehr langsam erfolgten ($\approx 2 \mu\text{m/s}$) oder Gleitschritten mit $10 \mu\text{m/s}$ aufwiesen (Abbildung 95 c/d). Die breite Kurve und die gradlinige Gleitbewegung in Abbildung 95 e und f gehörten mit durchschnittlich ca. $12 \mu\text{m/s}$ bzw. ca. $8 \mu\text{m/s}$ zu sehr schnellen Bewegungen. Jedoch kann nicht gesagt werden, dass diese eher weitläufigen Gleitbewegungen stets die höchsten Geschwindigkeiten aufwiesen, da z. B. die geraden Passagen in Abbildung 95 g-i langsam erfolgten ($\approx 4\text{-}5 \mu\text{m/s}$).

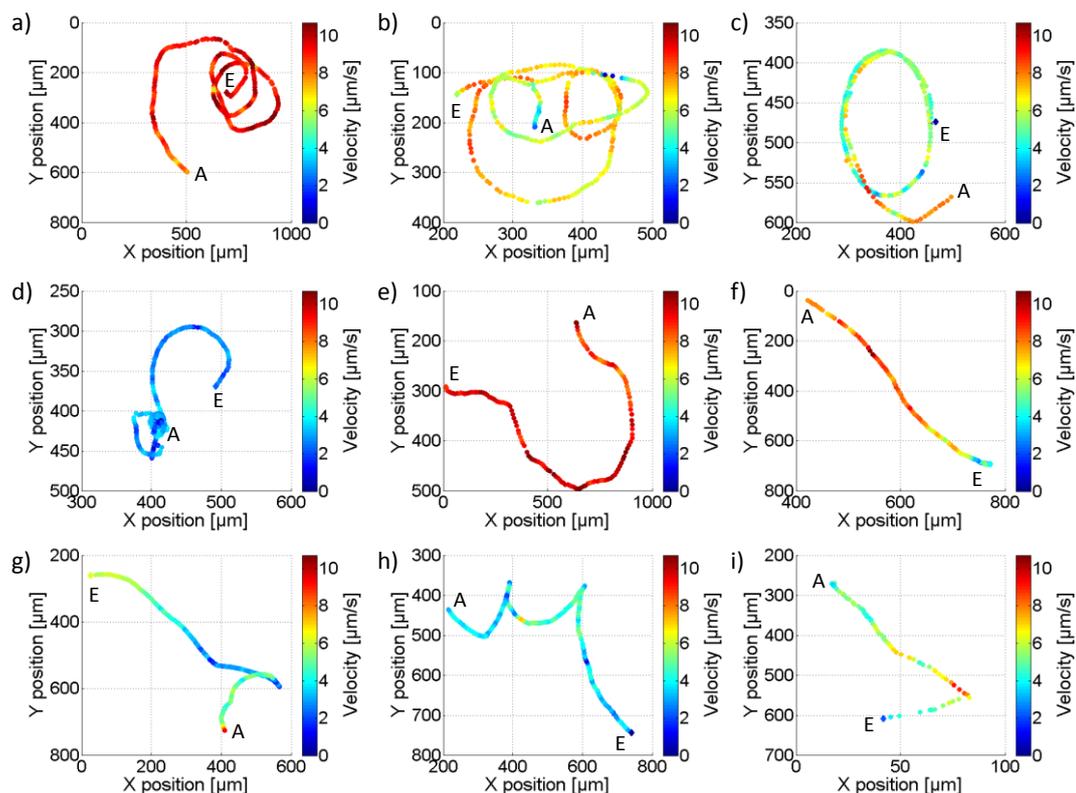


Abbildung 95: Geschwindigkeitsanalysen von den in Abbildung 94 illustrierten Bewegungsbahnen. Die Farbkodierung repräsentiert die Geschwindigkeit einer Diatomee an einer bestimmten Position xy (Rot: hohe Geschwindigkeit, blau: niedrige Geschwindigkeit); A = Anfang, E = Ende der Bewegung.

6.2. Zusammenfassung

Es erfolgte eine grundlegende Untersuchung zu der Motilität von *N. perminuta* auf zwei SAMs mit unterschiedlichen Benetzungseigenschaften. DDT besitzt einen hydrophoben Charakter (Kontaktwinkel 104°), während HUDT hydrophil ist (Kontaktwinkel 33°). Da die Diatomeen auf diesen Oberflächen in zuvor durchgeführten Adhäsionsstudien stark unterschiedliche Adhäsionsstärken aufwiesen ($\tau_{50(\text{DDT})} = 1386 \pm 176 \text{ dyn/cm}^2$, $\tau_{50(\text{HUDT})} = 276 \pm 59 \text{ dyn/cm}^2$), bestand das Interesse darin, die Hypothese zu verfolgen die Algenzellen würden ebenfalls in ihrem Bewegungsverhalten durch diese Oberflächen beeinflusst.

Eine Tatsache, welche in den vorliegenden Motilitätsstudien eine offensichtliche Abhängigkeit von den Benetzungseigenschaften der SAMs aufwies, war die jeweilige Dauer der Bewegungen auf DDT und HUDT. Motile Algenzellen wurden deutlich länger auf HUDT beobachtet. Während sich auf DDT nach 90 min nur noch eine Algenzelle von initialen elf motilen Algen fand, wurden motile Algenzellen auf HUDT bis zu 240 min lang erfasst. Geschwindigkeitsverteilungen in diesen Zeiträumen zeigten, dass sich die Bewegungen von *N. perminuta* auf beiden Oberflächen in unterschiedlichen Zeitfenstern abspielten. Die Tatsache, dass motile Diatomeen über eine längere Dauer auf HUDT beobachtet wurden, kann mit der deutlich schwächeren Adhäsion von *N. perminuta* auf diesem SAM korreliert werden. Eine Studie von Wigglesworth-Cooksey berichtete von einem extremeren Fall auf Oberflächen mit Kontaktwinkelgradienten. Die von ihnen beobachteten Diatomeen (*Amphora*) zeigten absolut keine Motilität auf Oberflächenbereichen mit einem Kontaktwinkel um 105° , auf hydrophilen Bereichen ($< 40^\circ$) nahm die Motilität jedoch schlagartig zu [54].

Weitere Ergebnisse der vorliegenden Bewegungsanalysen zeigten, dass sich die Algenzellen der Oberfläche ungerichtet auf den Oberflächen bewegten. Dieses Verhalten wurde bereits für andere Diatomeen beschrieben [54, 281]. Unter die zahlreichen Bewegungsspuren fielen Spiralen, kreisförmige und geradlinige Bewegungen, breite und enge Kurven sowie abrupte Umkehrbewegungen, sogenannte Hairpins. Bei der Betrachtung der Geschwindigkeiten der unterschiedlichen Bewegungsmuster konnten sowohl auf hydrophoben als auch dem hydrophilen SAM keine besonderen Merkmale festgestellt werden. Lediglich bei der Durchführung von Hairpins konnte ein stets ähnliches Verhalten beobachtet werden. Dort zeigte sich, dass die Diatomeen vor einer Umkehrung langsamer wurden oder ganz zum Stillstand kamen, bevor sie sich weiter bewegten.

Diese beobachteten Bewegungsmuster lassen sich nur bedingt durch bestehende Modelle erklären. Die Regulation von geradlinigen Bewegungen kann durch das bestehende Edgar-Modell entsprechend begründet werden (Kapitel 2.1.1, Abbildung 8, S. 11), die große Variation von kurvenreichem Gleiten über eine Oberfläche und die zufälligen abrupten Richtungswechsel sind bis heute nicht gänzlich geklärt und können anhand von dem vereinfachten Mechanismusmodell nach Edgar nicht hinreichend abgeleitet werden [124]. Theoretisch betrachtet können Richtungswechsel bewerkstelligt werden, indem der Bewegungsapparat den entgegengesetzten Lauf antritt. Der Mechanismus hierfür ist

jedoch bis heute unbekannt, ebenso wenig die Gründe für solche plötzlichen Umkehrungen. Wang *et al.* postulierten ein Bewegungsmodell, in dem sich Diatomeen (*Navicula sp.*) über sogenannte Pseudopodien (Scheinfüßchen) fortbewegen. Verantwortlich für diese Bewegungen wurden zwei zirkulare Strukturen beschrieben, die jeweils an beiden Enden einer Diatomee lokalisiert und reich an Actin sind. Actin wiederum wurde bereits durch Edgar *et al.* als bedeutsames Funktionsglied für die Kriechbewegungen identifiziert. Wieso bei Wangs Studien lediglich 6.5 % der motilen Diatomeen diese zirkularen Strukturen aufwiesen war unklar [135].

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass bei den hier aufgeführten Beobachtungen während des gesamten Oberflächenkontakts qualitativ betrachtet keine Unterschiede in den Bewegungsmustern auf den unterschiedlichen Oberflächen festgestellt werden konnten. Ebenfalls traten keine einheitlichen Geschwindigkeitsschemata bei den unterschiedlichen Bewegungsmustern auf. Es zeigte sich jedoch offensichtlich, dass die Diatomeen länger auf der hydrophilen als auf der hydrophoben Oberfläche motil blieben.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Im Verlauf dieser Arbeit wurde der Effekt unterschiedlicher Oberflächeneigenschaften, welche Relevanz für Biofouling besitzen, untersucht. Die verwendeten Proben deckten hierbei einen weiten Bereich von Oberflächeneigenschaften wie Benetzung, Hydratation und Ladung ab. Die Adhäsionsstärkeuntersuchungen der Diatomee *N. perminuta* auf den Oberflächen erfolgten mit einem mikrofluidischen Flusssystem, welches einer Parallelplatten-Flussskammer entspricht. Im verwendeten System konnten hydrodynamische Strömungen zwischen $0,01 \text{ dyn/cm}^2$ und 5500 dyn/cm^2 generiert werden. Auf diese Weise ließen sich nach einer bestimmten Adhäsionsphase festhaftende Kieselalgenzellen im darauffolgenden Abrissexperiment untersuchen, indem man sie während einer stufenweise zunehmenden Scherströmung während des Abrissvorgangs quantifizierte. Der daraus resultierende Kurvengraph lieferten zwei charakteristische Kenngrößen: zum einen die kritische Scherströmung τ_{50} als Punkt, an dem 50 % der adhärenen Zellen von der Oberfläche entfernt waren und zum anderen die adhärenente Zellfraktion ($N_{ad}N_0^{-1}$ [%]). Diese entsprach den permanent adhärenierten Diatomeen

Speziell für die marine Diatomee *Navicula perminuta* wurden zunächst die mikrofluidischen Versuchsparameter Inkubationszeit und die Erhöhung der Flussrate getestet und optimiert. Dabei ergaben sich eine Adhäsionsdauer von 4 h und eine Flussraten-erhöhung von 26 % alle 5 s als geeignet. Die Untersuchung der Adhäsionsstärke der Diatomeen in drei verschiedenen Adhäsionsorientierungen ergab keinen signifikanten Unterschied, worauf alle Zellen bei den biologischen Evaluationen gleich gewertet wurden (Kapitel 5.1). Abbildung 96 gibt einen Überblick der in der vorliegenden Arbeit getesteten Oberflächeneigenschaften und deren Auswirkung auf die Adhäsionsstärke von *N. perminuta*. Mittels dieser Gegenüberstellung wird der jeweilige Einfluss einer Oberflächeneigenschaft auf die Adhäsionsstärke der Diatomeen unmittelbar deutlich.

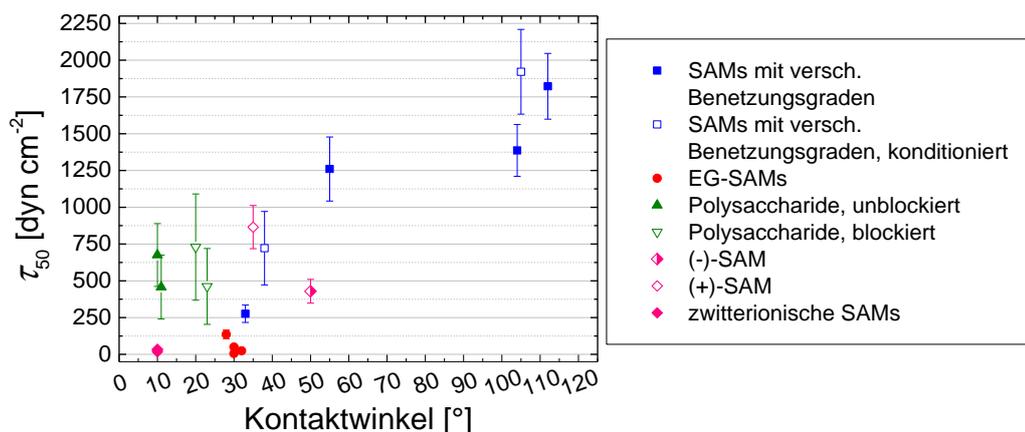


Abbildung 96: Adhäsionsstärke von *N. perminuta* in Abhängigkeit des Kontaktwinkels einer Oberfläche.

Die Untersuchung der Diatomeen auf SAMs unterschiedlicher Benetzung (■ = FUDT, DDT, AUDT, HUDT) und Hydratation (● = EG₁OH, EG₃OH, EG₆OH, PEG) zeigte, dass die Hydratation einer Oberfläche einen wichtigeren Faktor als die Benetzung bei der permanenten Adhäsion von *N. perminuta* darstellte. Hierbei wurde eine stetige Schwächung der Adhäsion mit einer zunehmenden Anzahl an Ethylen-Glykol (EG) Einheiten beobachtet. Dennoch waren die Diatomeen im Hinblick auf die Benetzung einer Oberfläche ebenfalls imstande zwischen einem hydrophoben und hydrophilen SAM signifikant zu unterscheiden. Die Vorkonditionierung (□) eines hydrophilen (HUDT) und hydrophoben (FUDT) SAMs hingegen nahm keinen signifikanten Einfluss auf die Adhäsion. Da immobilisierte Polysaccharide ähnlich wie OEG-Oberflächen die Fähigkeit Wasser zu speichern und damit Resistenz gegen Proteine, eukaryotische Zellen sowie Süßwasserbakterien aufweisen, wurden in diesem Zusammenhang die Polysaccharide (PS) Hyaluronsäure und Alginsäure (▲ = HA, AA) untersucht. Für das Resistenzverhalten von PS wird ihre Struktur in hydratisierter Form verantwortlich gemacht. Dabei spielen Wasserstoffbrückenbindungen eine sehr wichtige Rolle. Bivalente Ionen wie Calcium(II) in der marinen Umgebung können durch die Koordinierung an die Carboxylgruppen der Polysaccharide das typische Quellverhalten aufheben (Synerese). Als Maßnahme wurde daraufhin bei HA als auch bei AA eine Blockierung der Carboxylgruppen mittels Trifluoethylamin (TFEA) bewirkt (▽ = HA+TFEA, AA+TFEA). In darauffolgenden Untersuchungen von *N. perminuta* auf den blockierten sowie unblockierten PS zeigte sich, dass diese im Vergleich zu der EG-Serie weitaus höhere Adhäsionsstärken der Kieselalgen bewirkten. Zudem konnten innerhalb der Fehlergrenzen keine Unterschiede zwischen der blockierten und unblockierten PS festgestellt werden. Als Grund hierfür lag die Vermutung nahe, dass die freigesetzten Calciumionen aus den Strukturen von HA und AA die Diatomeenadhäsion auf einer anderen Ebene förderten und somit der positive Struktureffekt der blockierten PS aufgehoben wurde. Ähnlich schwache Adhäsionsstärken wie auf den EG-SAMs wurden auf zwitterionischen SAMs (◆) festgestellt. Diese bestanden aus negativ bzw. positiv geladenen Sulfonat(MUDS(-))- bzw. Ammonium-(MUDT(+))-terminierten Alkanthiolen. Bei diesen SAMs wurde angenommen, dass die schwache Adhäsion durch elektrostatische Wechselwirkungen hervorgerufene Hydratation bewirkt wurde. Im Gegensatz dazu ist bei OEG SAMs die konformative Flexibilität der OEG-Einheiten für die Wassermolekülinteraktionen von Bedeutung. In Verbindung mit den zwitterionischen SAMs wurden ebenfalls die gleichnamig geladenen Homologen MUDT(+) (◇) und MUDS(-) (◆) untersucht, welche eine weitaus stärkere Adhäsion im Vergleich zu den zwitterionischen SAMs (bis hin zu 98 %) aufwiesen. Die gleichnamig geladenen SAMs wiesen zudem darauf hin, dass die Ladung einer Oberfläche eine wichtigere Rolle als der Kontaktwinkel für die Adhäsion spielt (Kapitel 5.2-Kapitel 5.5).

Bezüglich der ermittelten adhärennten Zellfraktionen der Diatomeen ($N_{ad}N_0^{-1}$) wird anhand von Abbildung 97 deutlich, dass im Großteil der beschriebenen Fälle die Oberflächeneigenschaften keinen großen Einfluss auf die Anzahl der permanent adhärennten Diatomeen hatten.

einen Grund für die Reproduzierschwierigkeiten darstellt, denn Abweichungen in den kritischen Scherströmungen wurden ebenfalls beim Carboxybead/HA-System festgestellt. Als eine wesentliche Ursache für die Schwankungen wurden Kanaldeformationen bedingt durch Druckabfälle bei zunehmenden Scherströmungen vermutet. Durch die Erweiterung des Setups durch die Verwendung von Abstandshaltern, sogenannten Spacern, konnte die Verlässlichkeit der Messungen innerhalb der einzelnen Kanäle deutlich verbessert werden. Eine Herausforderung stellt weiterhin die Reproduzierbarkeit der kritischen Scherströmung zwischen den vier Kanälen dar. Die erhaltenen Resultate deuteten darauf hin, dass die Reassemblierung der vier Kanalsysteme von Messung zu Messung unbekannte Fehlerfaktoren birgt, die bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht immer verhindert werden konnten.

Auf Basis dieser Charakterisierungen des mikrofluidischen Systems konnten die biologischen Evaluationen dieser Arbeit eingeordnet und die wesentlichen Trends als statistisch signifikant bewertet werden, denn die ermittelten Unterschiede zwischen den kritischen Scherströmungen diverser Oberflächen befanden sich prozentual betrachtet in Größenordnungen, die die Standardabweichungen (%) der Messwerte auf den einzelnen Oberflächen deutlich überstiegen. Die Abweichungen waren zudem nicht höher als die Fehlerquoten, die mit den Partikelmodellsystemen erhalten wurden. Da es sich bei Diatomeen im Gegensatz zu starren Partikeln dennoch um individuelle Organismen handelt, werden biologische Variabilitäten eine Rolle gespielt haben, jedoch vermutlich im geringeren Umfang als die vom mikrofluidischen System verursachten Schwankungen.

In Zukunft wäre hinsichtlich der Adhäsion von *N. perminuta* die Betrachtung weiterer Oberflächeneigenschaften interessant. Morphologie wäre zum Beispiel ein interessanter Faktor. Bei der Analyse motiler Diatomeen sollten der Einfluss weiterer Benetzungseigenschaften genauer betrachtet werden. Der Übergang von SAMs mit einem ausschließlich hydrophilen Charakter (wie der untersuchte HUDT-SAM) zu Oberflächen mit zusätzlichen Hydratationseigenschaften (EG-SAMs) könnte, wie bereits zuvor bei Adhäsionsstärken der Diatomeen festgestellt, ebenso einen Effekt auf die Bewegungen haben. Die Optimierung des mikrofluidischen Systems sollte auch weiterhin erfolgen. Nachdem die Verlässlichkeit der kritischen Scherströmungen innerhalb der einzelnen vier Kanalsysteme durch die Einführung von Spacern deutlich gesteigert werden konnte, sollte nun in Zukunft der Fokus auf der Reproduzierbarkeit zwischen den vier Kanalsystemen liegen. Durch die Ermittlung vorkommender Fehlerfaktoren bei der Reassemblierung der Systeme, könnte damit die Leistungsfähigkeit des Systems komplettiert werden.

8. Anhang

8.1. Publikationen

- M. Alles, A. Rosenhahn
*Quantification of the adhesion strength of the diatom *Navicula perminuta* in a microfluidic assay, in Vorbereitung.*

8.2. Konferenzen

- 18.-20. Mai 2010, Heidelberg, Deutschland, *Seacoat Advanced Training Course 1* (Surface Engineering).
- 12.-14. Juli 2010, Zürich, Schweiz, *Seacoat Advanced Training Course 2* (Surface Analytic).
- 25.-29. Juli 2010, Newcastle, UK, *15th International Congress of Marine Corrosion and Fouling*.
- 7.-9. September 2010, Birmingham, UK, *Seacoat Advanced Training Course 3* (Bioadhesion).
- 2.-4. Juni 2011, Berlin, Deutschland, *110. Bunsentagung, Posterpräsentation.*
- 12.-14. Oktober 2011, Heidelberg, Deutschland, *Bunsenkolloquium/-diskussionstagung 2011, Posterpräsentation.*
- 4.-7. Dezember 2011, Las Vegas, NV, USA, *Biofouling International Workshop for Young Investigators*, Office of Naval Research (ONR)/Seacoat, **Posterpräsentation.**
- 24.-28. Juni 2012, Seattle, WA, USA, *16th International Congress of Marine Corrosion and Fouling, Posterpräsentation.*
- 27. Oktober-1. November 2013, Long Beach, CA, USA, *AVS 60th International Symposium and Exhibition. Posterpräsentation.*

8.3. Zusammensetzung Guillard's F/2 Medium

Stammlösungen: (alle aufgeführten Salze sowie HCl (für molekulare Biologie) wurden von Sigma Aldrich bezogen)

- $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Stammlösung:

(12,5 g $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in 400 ml dest. Wasser lösen, mit HCl (BioReagent) auf pH 2.0 einstellen, auf 500 ml auffüllen)

- NaNO_3 Stammlösung:

(7,4 g NaNO_3 in 100 ml dest. Wasser lösen)

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Stammlösung:

(0,566 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 100 ml dest. Wasser lösen)

- Stammlösung Spurenelemente:

11,5 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

89 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$

18,5 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$

7 mg of $\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

5 mg of $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

(in 500 ml dest. Wasser lösen)

- Fe/EDTA Stammlösung:

(0,392 g Eisen(III)citrat und 0,393 g EDTA in 100 ml dest. Wasser lösen)

- Trizma[®] (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) Stammlösung:

(12,4 g Trizma in 100 ml dest. Wasser lösen)

- B₁₂/Biotin (Vitamin B₇) Stammlösung:

(1 mg Biotin und 1 mg Vitamin B₁₂ in 100 ml Milli-Q[®]-Wasser im zuvor sterilisierten Maßkolben lösen)

- Thiamin (Vitamin B₁) Stammlösung:

(10 mg Thiamin in 100 ml Milli-Q[®]-Wasser im zuvor sterilisierten Maßkolben lösen, mit HCl pH 4 einstellen)

Guillard's Medium:

In 1 l künstliches Seewasser (33,4 g Instant Ocean[®]/l Milli-Q[®]-Wasser) wurden die folgenden Volumina der oben beschriebenen Stammlösungen gegeben:

8,0 ml/l $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Stammlösung

1,0 ml/l NaNO_3 Stammlösung

1,0 ml/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Stammlösung

1,0 ml/l Spurenelemente Stammlösung

1,0 ml/l Fe/EDTA Stammlösung

1,0 ml/l Tris Stammlösung

Das so erhaltene Medium wurde zunächst nach biologischen Richtlinien sterilisiert (Dampfsterilisation, 120°C). Anschließend wurden die Stammlösungen der hitzeempfindlichen Vitamine (50 µl/l B₁₂/Biotin und 1,0 ml/l Thiamin-HCl) dazugegeben und der pH-Wert mit HCl auf 8,2 eingestellt (pH-Meter).

8.4. Abkürzungsverzeichnis

AA	Alginsäure (<i>engl.</i> alginic acid)
AD	Außendurchmesser
AUDT	11-Aminoundecanthiol
Au	Gold
ASW	künstliches Seewasser (<i>engl.</i> artificial seawater)
APTMS	3-Aminopropyltrimethoxysilan
CA	Celluloseacetat
cm	Centimeter
d	Tag
DDT	Dodecanthiol
dest.	destilliert
DLVO	Derjagin, Landau, Verwey, Overbeek
dyn	10^{-5} N = 0,1 Pa
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EG	Ethylen-Glykol
EPS	extrazelluläre Polymersubstanzen
Et	Ethyl
FUDT	11-(Tridecafluorooctyloxy)-undecanthiol
HA	Hyaluronsäure (<i>engl.</i> hyaluronic acid)
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HUDT	11-Hydroxy-1-undecanthiol
h	Stunde
ID	Innendurchmesser
IR	Infrarot
kg	Kilogramm
kn	Knoten
Lsg	Lösung
m	Meter
Me	Methyl
MOF	Metall-Organisches Gerüst (<i>engl.</i> Metal-Organic Framework)
min	Minute
ml	Milliliter

N	Newton
NA	Numerische Apertur
<i>N. perminuta</i>	<i>Navicula perminuta</i>
<i>N. incerta</i>	<i>Navicula incerta</i>
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
OD ₄₄₄	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 444 nm
Pa	Pascal
PA	Polygalakturonsäure (<i>engl.</i> polygalacturonic acid)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>engl.</i> Phosphat Buffered Saline)
PDMS	Polydimethoxysiloxan
PEG	Poly(Ethylen-Glykol)
Pr	Propyl
px	Pixel
PVDF	Polyvinylidenfluorid
µm	Mikrometer
Re	Reynolds Nummer
REM	Raster-Elektronen-Mikroskopie
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAM	Selbst-Aggregierende-Monolage
<i>sp.</i>	eine nicht näher bezeichnete Spezies
TBT	Tributylzinn (<i>engl.</i> Tributyltin)
TFEA	2,2,2-Triflourethylamin
UV	ultraviolett
Vis	sichtbar (<i>engl.</i> visible)
XPS	Röntgenphotoelektronenspektroskopie (<i>engl.</i> X-ray photoelectron spectroscopy)

8.5. Literaturverzeichnis

1. Edyvean, R., S. Dürr, and J. Thomason, editors, *Consequences of fouling on shipping*. Biofouling, 2010: p. 217-223.
2. Corbett, J.J. and H.W. Koehler, *Updated emissions from ocean shipping*. Journal of Geophysical Research-Atmospheres, 2003. **108**(D20).
3. Almeida, E., T.C. Diamantino, and O. de Sousa, *Marine paints: The particular case of antifouling paints*. Progress in Organic Coatings, 2007. **59**(1): p. 2-20.
4. Kiil, S., et al., *Marine biofouling protection: design of controlled release antifouling paints*. Computer Aided Chemical Engineering, 2007. **23**: p. 181-238.
5. Alberte, R.S., et al., *Biofouling research needs for the United States Navy: program history and goals*. Biofouling, 1992. **6**(2): p. 91-95.
6. Yebra, D.M., S. Kiil, and K. Dam-Johansen, *Antifouling technology - past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings*. Progress in Organic Coatings, 2004. **50**(2): p. 75-104.
7. Magin, C.M., S.P. Cooper, and A.B. Brennan, *Non-toxic antifouling strategies*. Materials Today, 2010. **13**(4): p. 36-44.
8. Callow, J.A. and M.E. Callow, *Trends in the development of environmentally friendly fouling-resistant marine coatings*. Nat Commun, 2011. **2**: p. 244.
9. Schultz, M.P., et al., *Economic impact of biofouling on a naval surface ship*. Biofouling, 2011. **27**(1): p. 87-98.
10. Reise, K., S. Gollasch, and W. Wolff, *Introduced marine species of the North Sea coasts*. Helgoland Marine Research, 1998. **52**(3): p. 219-234.
11. Evans, S.M., E. Kerrigan, and N. Palmer, *Causes of imposex in the dogwhelk *Nucella lapillus* (L.) and its use as a biological indicator of tributyltin contamination*. Marine Pollution Bulletin, 2000. **40**(3): p. 212-219.
12. Hartl, M.G.J., S. Hutchinson, and L.E. Hawkins, *Reduced blood osmolality in freshwater-adapted European O-group flounder, *Platichthys flesus* (L.), exposed to environmental levels of sediment-associated tributyl- and triphenyltin*. Marine Pollution Bulletin, 2000. **40**(9): p. 792-794.
13. Terlizzi, A., et al., *Environmental impact of antifouling technologies: state of the art and perspectives*. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems, 2001. **11**(4): p. 311-317.
14. Evans, S.M., T. Leksono, and P.D. McKinnell, *Tributyltin pollution - a diminishing problem following legislation limiting the use of tbt-based anti-fouling paints*. Marine Pollution Bulletin, 1995. **30**(1): p. 14-21.
15. Stewen, U., U. Gerigk, and U. Schneider, *The present status of tributyltin copolymer antifouling paints versus tributyltin-free technology*. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 1998. **215**: p. U579-U579.
16. Champ, M.A. *The status of the treaty to ban TBT in marine antifouling paints and alternatives*. in *Proceedings of the 24th UJNR (US/Japan) Marine Facilities Panel Meeting in Hawaii*. 2001.
17. Wright, P.N., E.P. Terrace, and S. Walmsley, *Organotins in the Marine Environment-A review of work since 2000*. 2004, WWF-UK.
18. Buskens, P., et al., *A brief review of environmentally benign antifouling and foul-release coatings for marine applications*. Journal of Coatings Technology and Research, 2013. **10**(1): p. 29-36.
19. Herrwerth, S., et al., *Factors that determine the protein resistance of oligoether self-assembled monolayers - Internal hydrophilicity, terminal hydrophilicity, and lateral*

-
- packing density*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(31): p. 9359-9366.
20. Rosenhahn, A., et al., *The role of "inert" surface chemistry in marine biofouling prevention*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2010. **12**(17): p. 4275-4286.
 21. Rosenhahn, A., et al., *Zeta potential of motile spores of the green alga *Ulva linza* and the influence of electrostatic interactions on spore settlement and adhesion strength*. Biointerphases, 2009. **4**(1): p. 7-11.
 22. Schumacher, J.F., et al., *Engineered antifouling microtopographies - effect of feature size, geometry, and roughness on settlement of zoospores of the green alga *Ulva**. Biofouling, 2007. **23**(1): p. 55-62.
 23. Krishnan, S., C.J. Weinman, and C.K. Ober, *Advances in polymers for anti-biofouling surfaces*. Journal of Materials Chemistry, 2008. **18**(29): p. 3405-3413.
 24. Christ, K.V. and K.T. Turner, *Methods to Measure the Strength of Cell Adhesion to Substrates*. Journal of Adhesion Science and Technology, 2010. **24**(13-14): p. 2027-2058.
 25. Horbett, T.A., et al., *Cell-Adhesion to a series of hydrophilic-hydrophobic copolymers studied with a spinning disk apparatus*. Journal of Biomedical Materials Research, 1988. **22**(5): p. 383-404.
 26. Vankooten, T.G., et al., *Development and use of a parallel-plate flow chamber for studying cellular adhesion to solid-surfaces*. Journal of Biomedical Materials Research, 1992. **26**(6): p. 725-738.
 27. Oh, Y.J., et al., *Effects of substrates on biofilm formation observed by atomic force microscopy*. Ultramicroscopy, 2009. **109**(8): p. 874-880.
 28. Weder, G., et al., *Use of Force Spectroscopy to Investigate the Adhesion of Living Adherent Cells*. Langmuir, 2010. **26**(11): p. 8180-8186.
 29. Lu, H., et al., *Microfluidic shear devices for quantitative analysis of cell adhesion*. Analytical Chemistry, 2004. **76**(18): p. 5257-5264.
 30. Burns, M.A., et al., *An integrated nanoliter DNA analysis device*. Science, 1998. **282**(5388): p. 484-487.
 31. Young, E.W.K., A.R. Wheeler, and C.A. Simmons, *Matrix-dependent adhesion of vascular and valvular endothelial cells in microfluidic channels*. Lab on a Chip, 2007. **7**(12): p. 1759-1766.
 32. Christophis, C., M. Grunze, and A. Rosenhahn, *Quantification of the adhesion strength of fibroblast cells on ethylene glycol terminated self-assembled monolayers by a microfluidic shear force assay*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2010. **12**(17): p. 4498-4504.
 33. Christophis, C., et al., *Fibroblast adhesion on unidirectional polymeric nanofilms*. Biointerphases, 2011. **6**(4): p. 158-163.
 34. Christophis, C., et al., *Shear Stress Regulates Adhesion and Rolling of CD44+ Leukemic and Hematopoietic Progenitor Cells on Hyaluronan*. Biophysical Journal, 2011. **101**(3): p. 585-593.
 35. Hanke, M., et al., *Differences between healthy hematopoietic progenitors and leukemia cells with respect to CD44 mediated rolling versus adherence behavior on hyaluronic acid coated surfaces*. Biomaterials, 2013.
 36. Arpa-Sancet, M., C. Christophis, and A. Rosenhahn, *Microfluidic Assay to Quantify the Adhesion of Marine Bacteria*. Biointerphases, 2012. **7**: p. 26.
 37. Hanke, M., et al., *The Biocompatibility of Metal-Organic Framework Coatings: An Investigation on the Stability of SURMOFs with Regard to Water and Selected Cell Culture Media*. Langmuir, 2012. **28**(17): p. 6877-6884.

38. Ulman, A., *Formation and structure of self-assembled monolayers*. Chemical Reviews, 1996. **96**(4): p. 1533-1554.
39. Kind, M. and C. Woell, *Organic surfaces exposed by self-assembled organothiol monolayers: Preparation, characterization, and application*. Progress in Surface Science, 2009. **84**(7-8): p. 230-278.
40. Love, J.C., et al., *Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology*. Chemical Reviews, 2005. **105**(4): p. 1103-1169.
41. Haussler, S. and M.R. Parsek, *Biofilms 2009: New Perspectives at the Heart of Surface-Associated Microbial Communities*. Journal of Bacteriology, 2010. **192**(12): p. 2941-2949.
42. Chelmowski, R., et al., *Peptide-Based SAMs that Resist the Adsorption of Proteins*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(45): p. 14952-+.
43. Hall-Stoodley, L., J.W. Costerton, and P. Stoodley, *Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases*. Nature Reviews Microbiology, 2004. **2**(2): p. 95-108.
44. Prime, K.L. and G.M. Whitesides, *Self-assembled organic monolayers - model systems for studying adsorption of proteins at surfaces*. Science, 1991. **252**(5009): p. 1164-1167.
45. Ista, L.K., et al., *Effect of substratum surface chemistry and surface energy on attachment of marine bacteria and algal spores*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. **70**(7): p. 4151-4157.
46. Ederth, T., et al., *Resistance of Galactoside-Terminated Alkanethiol Self-Assembled Monolayers to Marine Fouling Organisms*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2011. **3**(10): p. 3890-3901.
47. Callow, M.E., et al., *Use of self-assembled monolayers of different wettabilities to study surface selection and primary adhesion processes of green algal (Enteromorpha) zoospores*. Applied and Environmental Microbiology, 2000. **66**(8): p. 3249-3254.
48. Schilp, S., et al., *Settlement and adhesion of algal cells to hexa (ethylene glycol)-containing self-assembled monolayers with systematically changed wetting properties*. Biointerphases, 2007. **2**(4): p. 143-150.
49. Krishnan, S., et al., *Comparison of the fouling release properties of hydrophobic fluorinated and hydrophilic PEGylated block copolymer surfaces: Attachment strength of the diatom Navicula and the green alga Ulva*. Biomacromolecules, 2006. **7**(5): p. 1449-1462.
50. Bowen, J., et al., *The influence of surface lubricity on the adhesion of Navicula perminuta and Ulva linza to alkanethiol self-assembled monolayers*. Journal of the Royal Society Interface, 2007. **4**(14): p. 473-477.
51. Finlay, J.A., et al., *A novel biofilm channel for evaluating the adhesion of diatoms to non-biocidal coatings*. Biofouling, 2013. **29**(4): p. 401-411.
52. Zargiel, K.A., J.S. Coogan, and G.W. Swain, *Diatom community structure on commercially available ship hull coatings*. Biofouling, 2011. **27**(9): p. 955-965.
53. Finlay, J.A., et al., *Settlement of Ulva zoospores on patterned fluorinated and PEGylated monolayer surfaces*. Langmuir, 2008. **24**(2): p. 503-510.
54. Wigglesworth-Cooksey, B., et al., *The influence of surface chemistry on the control of cellular behavior: studies with a marine diatom and a wettability gradient*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 1999. **15**(1): p. 71-80.
55. Rosenhahn, A. and G.H. Sendra, *Surface sensing and settlement strategies of marine biofouling organisms*. Biointerphases, 2012. **7**(1-4): p. 63-63.

-
56. Prime, K.L. and G.M. Whitesides, *Adsorption of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide)- a model system using self-assembled monolayers*. Journal of the American Chemical Society, 1993. **115**(23): p. 10714-10721.
 57. Schilp, S., et al., *Physicochemical Properties of (Ethylene Glycol)-Containing Self-Assembled Monolayers Relevant for Protein and Algal Cell Resistance*. Langmuir, 2009. **25**(17): p. 10077-10082.
 58. Ostuni, E., et al., *Self-assembled monolayers that resist the adsorption of proteins and the adhesion of bacterial and mammalian cells*. Langmuir, 2001. **17**(20): p. 6336-6343.
 59. Wang, R.L.C., H.J. Kreuzer, and M. Grunze, *Molecular conformation and solvation of oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers and their resistance to protein adsorption*. Journal of Physical Chemistry B, 1997. **101**(47): p. 9767-9773.
 60. Harder, P., et al., *Molecular conformation in oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers on gold and silver surfaces determines their ability to resist protein adsorption*. Journal of Physical Chemistry B, 1998. **102**(2): p. 426-436.
 61. Pertsin, A.J. and M. Grunze, *Computer simulation of water near the surface of oligo(ethylene glycol)-terminated alkanethiol self-assembled monolayers*. Langmuir, 2000. **16**(23): p. 8829-8841.
 62. Kreuzer, H.J. and M. Grunze, *Stretching of single polymer strands: A first-principles theory*. Europhysics Letters, 2001. **55**(5): p. 640-646.
 63. Morra, M. and C. Cassineli, *Non-fouling properties of polysaccharide-coated surfaces*. Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition, 1999. **10**(10): p. 1107-1124.
 64. Ederth, T., et al., *Anomalous settlement behavior of Ulva linza zoospores on cationic oligopeptide surfaces*. Biofouling, 2008. **24**(4): p. 303-312.
 65. Holmlin, R.E., et al., *Zwitterionic SAMs that resist nonspecific adsorption of protein from aqueous buffer*. Langmuir, 2001. **17**(9): p. 2841-2850.
 66. Chen, S. and S. Jiang, *A new avenue to nonfouling materials*. Advanced Materials, 2008. **20**(2): p. 335-+.
 67. Zhang, Z., et al., *Polysulfobetaine-Grafted Surfaces as Environmentally Benign Ultralow Fouling Marine Coatings*. Langmuir, 2009. **25**(23): p. 13516-13521.
 68. Jiang, S.Y. and Z.Q. Cao, *Ultralow-Fouling, Functionalizable, and Hydrolyzable Zwitterionic Materials and Their Derivatives for Biological Applications*. Advanced Materials, 2010. **22**(9): p. 920-932.
 69. Thome, I., et al., *Conditioning of surfaces by macromolecules and its implication for the settlement of zoospores of the green alga Ulva linza*. Biofouling, 2012. **28**(5): p. 501-510.
 70. Cooksey, K.E. and B. Wigglesworthcooksey, *Adhesion of bacteria and diatoms to surfaces in the sea- a review*. Aquatic Microbial Ecology, 1995. **9**(1): p. 87-96.
 71. Terlizzi, A., et al., *Biological succession on silicone fouling-release surfaces: Long-term exposure tests in the harbour of Ischia, Italy*. Biofouling, 2000. **15**(4): p. 327-342.
 72. Swain, G., et al., *Biofouling and barnacle adhesion data for fouling-release coatings subjected to static immersion at seven marine sites*. Biofouling, 2000. **16**(2-4): p. 331-344.
 73. Casse, F. and G.W. Swain, *The development of microfouling on four commercial antifouling coatings under static and dynamic immersion*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2006. **57**(3): p. 179-185.
 74. Wetherbee, R., et al., *The first kiss: Establishment and control of initial adhesion by raphid diatoms*. Journal of Phycology, 1998. **34**(1): p. 9-15.
 75. Chiovitti, A., T.M. Dugdale, and R. Wetherbee, *Diatom adhesives: Molecular and mechanical properties*. Biological Adhesives, ed. A.M.C.J.A. Smith. 2006: Springer. 79-103.

76. Molino, P.J. and R. Wetherbee, *The biology of biofouling diatoms and their role in the development of microbial slimes*. Biofouling, 2008. **24**(5): p. 365-379.
77. Cooksey, B. and K.E. Cooksey, *Calcium is necessary for motility in the diatom *Amphora coffeaeformis**. Plant Physiology, 1980. **65**(1): p. 129-131.
78. Apoya-Horton, M.D., et al., *Movement modalities and responses to environmental changes of the mudflat diatom *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae)*. Journal of Phycology, 2006. **42**(2): p. 379-390.
79. Cohn, S.A., et al., *Characterisation of the diatom photophobic response to high irradiance*. Diatom Research, 2004. **19**(2): p. 167-179.
80. Clarkson, N., M.S. Davies, and R. Dixey, *Diatom motility and low frequency electromagnetic fields - A new technique in the search for independent replication of results*. Bioelectromagnetics, 1999. **20**(2): p. 94-100.
81. Round, F.E., R.M. Crawford, and D.G. Mann, *Diatoms: biology and morphology of the genera*. 1990: Cambridge University Press.
82. Ussing, A.P., et al., *The Colonial Diatom "Bacillaria Paradoxa": Chaotic Gliding Motility, Lindenmeyer Model of Colonial Morphogenesis, and Bibliography, with Translation of OF Müller (1783), "About a Peculiar Being in the Beach-water"*. Vol. 5. 2005: Gantner.
83. <http://www.pmbio.icbm.de/mikrobiologischer-garten/de/dephy01.htm>.
84. Allen, A.E., et al., *Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms*. Nature, 2011. **473**(7346): p. 203-207.
85. <http://www.sciencedaily.com/releases/2011/05/110511133553.htm>. 2011.
86. Brunner, E., et al., *Analytical studies of silica biomineralization: towards an understanding of silica processing by diatoms*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009. **84**(4): p. 607-616.
87. De Stefano, M., L. De Stefano, and R. Congestri, *Functional morphology of micro- and nanostructures in two distinct diatom frustules*. Superlattices and Microstructures, 2009. **46**(1): p. 64-68.
88. Bentley, K., E.J. Cox, and P.J. Bentley, *Nature's batik: A computer evolution model of diatom valve morphogenesis*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2005. **5**(1): p. 25-34.
89. Garcia, A.P. and M.J. Buehler, *Bioinspired nanoporous silicon provides great toughness at great deformability*. Computational Materials Science, 2010. **48**(2): p. 303-309.
90. Lauterborn, R., *Untersuchungen über Bau, Kernteilung und Bewegung der Diatomeen*. 1896: W. Engelmann.
91. Pickett-Heaps, J.D., M. Schmid A-M, and D.H. Tippit, *Cell Division in Diatoms*. Protoplasma, 1984. **120**(1-2): p. 132-154.
92. Pickett-Heaps, J., M. Schmid A-M, and L.A. Edgar, *The Cell Biology of Diatom Valve Formation*, in Round, F. E. And D. J. Chapman. 1990. p. 1-168.
93. http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/d44_2/diatom.htm.
94. Norton, T.A., M. Melkonian, and R.A. Andersen, *Algal biodiversity**. Phycologia, 1996. **35**(4): p. 308-326.
95. Van den Hoek, C., *Algae: an introduction to phycology*. 1995: Cambridge University Press.
96. Patrick, R., *Ecology of freshwater diatoms and diatom communities*, in *The biology of diatoms*. 1977, University of California Press, Los Angeles. p. 284-332.
97. Hutchinson, G.E., *A Treatise on Limnology: Introduction to lake biology and the limnoplankton*. 1967: Wiley.

-
98. Reynolds, C., *Phytoplankton periodicity: the interactions of form, function and environmental variability*. *Freshwater Biology*, 1984. **14**(2): p. 111-142.
 99. Sommer, U., et al., *Hutchinson's heritage: the diversity-disturbance relationship in phytoplankton*. *Hydrobiologia*, 1993. **249**(1-3): p. 1-7.
 100. Hays, G.C., A.J. Richardson, and C. Robinson, *Climate change and marine plankton*. *Trends in Ecology & Evolution*, 2005. **20**(6): p. 337-344.
 101. Smetacek, V., *Diatoms and the ocean carbon cycle*. *Protist*, 1999. **150**(1): p. 25-32.
 102. Chisholm, S.W., *Oceanography - Stirring times in the Southern Ocean*. *Nature*, 2000. **407**(6805): p. 685-687.
 103. Geider, R.J., et al., *Primary productivity of planet earth: biological determinants and physical constraints in terrestrial and aquatic habitats*. *Global Change Biology*, 2001. **7**(8): p. 849-882.
 104. Litchman, E., C.A. Klausmeier, and K. Yoshiyama, *Contrasting size evolution in marine and freshwater diatoms*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009. **106**(8): p. 2665-2670.
 105. Strecker, A.L., T.P. Cobb, and R.D. Vinebrooke, *Effects of experimental greenhouse warming on phytoplankton and zooplankton communities in fishless alpine ponds*. *Limnology and Oceanography*, 2004. **49**(4): p. 1182-1190.
 106. Patrick, R., *The effects of increasing light and temperature on the structure of diatom communities*. *Limnology and Oceanography*, 1971. **16**(2): p. 405-421.
 107. Moss, B., *The Influence of Environmental Factors on the Distribution of Freshwater Algae: An Experimental Study: III. Effects of Temperature, Vitamin Requirements and Inorganic Nitrogen Compounds on Growth*. *The Journal of Ecology*, 1973: p. 179-192.
 108. Goldman, J.C. and E.J. Carpenter, *A kinetic approach to the effect of temperature on algal growth*. *Limnology and Oceanography*, 1974. **19**(5): p. 756-766.
 109. Moss, B., *The influence of environmental factors on the distribution of freshwater algae: an experimental study: I. Introduction and the influence of calcium concentration*. *The Journal of Ecology*, 1972: p. 917-932.
 110. Moss, B., *The influence of environmental factors on the distribution of freshwater algae: an experimental study: II. The role of pH and the carbon dioxide-bicarbonate system*. *The Journal of Ecology*, 1973: p. 157-177.
 111. Moss, B., *The Influence of Environmental Factors on the Distribution of Freshwater Algae: An Experimental Study: IV. Growth of Test Species in Natural Lake Waters, and Conclusion*. *The Journal of Ecology*, 1973: p. 193-211.
 112. Briand, J.-F., et al., *Pioneer marine biofilms on artificial surfaces including antifouling coatings immersed in two contrasting French Mediterranean coast sites*. *Biofouling*, 2012. **28**(5): p. 453-463.
 113. Hoagland, K.D., et al., *Diatom extracellular polymeric substances- function, fine-structure, chemistry, and physiology*. *Journal of Phycology*, 1993. **29**(5): p. 537-566.
 114. Lind, J.L., et al., *Substratum adhesion and gliding in a diatom are mediated by extracellular proteoglycans*. *Planta*, 1997. **203**(2): p. 213-221.
 115. Wustman, B.A., et al., *Extracellular matrix assembly in diatoms - (Bacillariophyceae) - III. Organization of fucoglucuronogalactans within the adhesive stalks of *Achnanthes longipes**. *Plant Physiology*, 1998. **116**(4): p. 1431-1441.
 116. Chiovitti, A., et al., *The complex polysaccharides of the raphid diatom *Pinnularia viridis* (Bacillariophyceae)*. *Journal of Phycology*, 2003. **39**(3): p. 543-554.
 117. Pettitt, M.E., et al., *Activity of commercial enzymes on settlement and adhesion of cypris larvae of the barnacle *Balanus amphitrite*, spores of the green alga *Ulva linza*, and the diatom *Navicula perminuta**. *Biofouling*, 2004. **20**(6): p. 299-311.

118. Chiovitti, A., et al., *The glucans extracted with warm water from diatoms are mainly derived from intracellular chrysolaminaran and not extracellular polysaccharides*. European Journal of Phycology, 2004. **39**(2): p. 117-128.
119. Cooksey, B. and K.E. Cooksey, *Chemical Signal-Response in Diatoms of the Genus Amphora*. Journal of Cell Science, 1988. **91**: p. 523-529.
120. Moroz, A.L., et al., *The impact of ultraviolet-B radiation on the motility of the freshwater epipellic diatom Nitzschia lineariz*. Global Change Biology, 1999. **5**(2): p. 191-199.
121. Smith, D.J. and G.J.C. Underwood, *Exopolymer production by intertidal epipellic diatoms*. Limnology and Oceanography, 1998. **43**(7): p. 1578-1591.
122. Higgins, M.J., et al., *The structure and nanomechanical properties of the adhesive mucilage that mediates diatom-substratum adhesion and motility*. Journal of Phycology, 2003. **39**(6): p. 1181-1193.
123. Kooistra, W., et al., *Phylogenetic position of Toxarium, a pennate-like lineage within centric diatoms (Bacillariophyceae)*. Journal of Phycology, 2003. **39**(1): p. 185-197.
124. Aumeier, C. and D. Menzel, *Secretion in the Diatoms*, in *Secretions and Exudates in Biological Systems*, J.M. Vivanco and F. Baluška, Editors. 2012, Springer Berlin Heidelberg. p. 221-250.
125. Cohn, S.A., et al., *The effect of temperature and mixed species composition on diatom motility and adhesion*. Diatom Research, 2003. **18**(2): p. 225-243.
126. Holland, R., et al., *Adhesion and motility of fouling diatoms on a silicone elastomer*. Biofouling, 2004. **20**(6): p. 323-329.
127. Higgins, M.J., et al., *The topography of soft, adhesive diatom 'trails' as observed by atomic force microscopy*. Biofouling, 2000. **16**(2-4): p. 133-139.
128. Higgins, M.J., et al., *Characterization of the adhesive mucilages secreted by live diatom cells using atomic force microscopy*. Protist, 2002. **153**(1): p. 25-38.
129. Edgar, L.A. and J.D. Pickett-Heaps, *The Mechanism of Diatom Locomotion. I. An Ultrastructural Study of the Motility Apparatus*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 1983. **218**(1212): p. 331-343.
130. Edgar, L.A. and M. Zavortink, *The Mechanism of Diatom Locomotion. II. Identification of Actin*. Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences, 1983. **218**(1212): p. 345-348.
131. Edgar, L.A. and J.D. Pickett-Heaps, *Diatom locomotion*. Progress in phycological research, 1984. **3**: p. 47-88.
132. Poulsen, N.C., et al., *Diatom gliding is the result of an actin-myosin motility system*. Cell Motility and the Cytoskeleton, 1999. **44**(1): p. 23-33.
133. Molino, P.J., et al., *The quartz crystal microbalance: a new tool for the investigation of the bioadhesion of diatoms to surfaces of differing surface energies*. Langmuir, 2008. **24**(13): p. 6730-6737.
134. Menzel, D. and O. Vugrek, *Muskelproteine in Pflanzenzellen*. Biologie in unserer Zeit, 1997. **27**(3): p. 195-203.
135. Wang, J., et al., *Underwater locomotion strategy by a benthic pennate diatom Navicula sp.* Protoplasma, 2013. **250**(5): p. 1203-1212.
136. Arce, F.T., et al., *A live bioprobe for studying diatom-surface interactions*. Biophysical Journal, 2004. **87**(6): p. 4284-4297.
137. Linne von Berg, K. and M. Melkonian, *Der Kosmos Algenführer: Die wichtigsten Süßwasser-algen im Mikroskop*. Kosmos Verlags, Stuttgart, 2004.
138. Bennett, S.M., et al., *The role of surface energy and water wettability in aminoalkyl/fluorocarbon/hydrocarbon-modified xerogel surfaces in the control of marine biofouling*. Biofouling, 2010. **26**(2): p. 235-246.

-
139. Krishnan, S., et al., *Anti-Biofouling Properties of Comblike Block Copolymers with Amphiphilic Side Chains*. Langmuir, 2006. **22**(11): p. 5075-5086.
 140. Evans, S.D. and A. Ulman, *Surface potential studies of alkyl-thiol monolayers adsorbed on gold*. Chemical Physics Letters, 1990. **170**(5): p. 462-466.
 141. Evans, S.D., et al., *Self-assembled monolayers of alkanethiols containing a polar aromatic group: effects of the dipole position on molecular packing, orientation, and surface wetting properties*. Journal of the American Chemical Society, 1991. **113**(11): p. 4121-4131.
 142. Leggett, G.J., *Friction force microscopy of self-assembled monolayers: probing molecular organisation at the nanometre scale*. Analytica chimica acta, 2003. **479**(1): p. 17-38.
 143. Tribou, M. and G. Swain, *The use of proactive in-water grooming to improve the performance of ship hull antifouling coatings*. Biofouling, 2010. **26**(1): p. 47-56.
 144. Chapman, R.G., et al., *Preparation of mixed self-assembled monolayers (SAMs) that resist adsorption of proteins using the reaction of amines with a SAM that presents interchain carboxylic anhydride groups*. Langmuir, 2000. **16**(17): p. 6927-6936.
 145. Ekblad, T., et al., *Lateral Control of Protein Adsorption on Charged Polymer Gradients*. Langmuir, 2009. **25**(6): p. 3755-3762.
 146. Dobretsov, S. and J.C. Thomason, *The development of marine biofilms on two commercial non-biocidal coatings: a comparison between silicone and fluoropolymer technologies*. Biofouling, 2011. **27**(8): p. 869-880.
 147. Statz, A., et al., *Algal antifouling and fouling-release properties of metal surfaces coated with a polymer inspired by marine mussels*. Biofouling, 2006. **22**(6): p. 391-399.
 148. Holm, E.R., et al., *Evaluation of hydrodynamic drag on experimental fouling-release surfaces, using rotating disks*. Biofouling, 2004. **20**(4-5): p. 219-226.
 149. Luk, Y.Y., M. Kato, and M. Mrksich, *Self-assembled monolayers of alkanethiolates presenting mannitol groups are inert to protein adsorption and cell attachment*. Langmuir, 2000. **16**(24): p. 9604-9608.
 150. Gudipati, C.S., et al., *The antifouling and fouling-release performance of hyperbranched fluoropolymer (HBFP)-poly(ethylene glycol) (PEG) composite coatings evaluated by adsorption of biomacromolecules and the green fouling alga Ulva*. Langmuir, 2005. **21**(7): p. 3044-3053.
 151. Sundaram, H.S., et al., *Fluorinated Amphiphilic Polymers and Their Blends for Fouling-Release Applications: The Benefits of a Triblock Copolymer Surface*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2011. **3**(9): p. 3366-3374.
 152. Dimitriou, M.D., et al., *A General Approach to Controlling the Surface Composition of Poly(ethylene oxide)-Based Block Copolymers for Antifouling Coatings*. Langmuir, 2011. **27**(22): p. 13762-13772.
 153. <http://www.international-marine.com/intersleek900/Pages/Intersleek-900-Home.aspx>.
 154. Kirschner, C.M. and A.B. Brennan, *Bio-Inspired Antifouling Strategies*, in *Annual Review of Materials Research, Vol 42*, D.R. Clarke, Editor. 2012. p. 211-229.
 155. Ralston, E. and G. Swain, *Bioinspiration - the solution for biofouling control?* Bioinspiration & Biomimetics, 2009. **4**(1): p. 1-9.
 156. <http://www.sharklet.com/technology/>.
 157. Bischof, C. and W. Possart, *Adhäsion—Theoretische und experimentelle Grundlagen 1983*. Akademie-Verlag, Berlin. 1983.
 158. Fox, H.W. and W.A. Zisman, *The spreading of liquids on low energy surfaces. I. polytetrafluoroethylene*. Journal of Colloid Science, 1950. **5**(6): p. 514-531.

159. Kabza, K.G., J.E. Gestwicki, and J.L. McGrath, *Contact Angle Goniometry as a Tool for Surface Tension Measurements of Solids, Using Zisman Plot Method. A Physical Chemistry Experiment*. Journal of Chemical Education, 2000. **77**(1): p. 63.
160. Hodson, O.M., et al., *Novel whole cell adhesion assays of three isolates of the fouling diatom Amphora coffeaeformis reveal diverse responses to surfaces of different wettability*. Biofouling, 2012. **28**(4): p. 381-393.
161. Swain, G.W. and M.P. Schultz, *The testing and evaluation of non-toxic antifouling coatings*. Biofouling, 1996. **10**(1-3): p. 187-197.
162. Swain, G.W., W.G. Nelson, and S. Preedeeakanit, *The influence of biofouling adhesion and biotic disturbance on the development of fouling communities on non-toxic surfaces*. Biofouling, 1998. **12**(1-3): p. 257-269.
163. Swain, G., et al., *Short-term testing of antifouling surfaces: the importance of colour*. Biofouling, 2006. **22**(6): p. 425-429.
164. Baier, R.E., *Surface properties influencing biological adhesion*. Adhesion in biological systems, 1970: p. 15-48.
165. Baier, R.E., *Surface behaviour of biomaterials: The theta surface for biocompatibility*. Journal of Materials Science-Materials in Medicine, 2006. **17**(11): p. 1057-1062.
166. Brady, R.F., *Properties which influence marine fouling resistance in polymers containing silicon and fluorine*. Progress in Organic Coatings, 1999. **35**(1-4): p. 31-35.
167. Callow, M.E. and R.L. Fletcher, *The influence of low surface-energy materials on bioadhesion- a review*. International Biodeterioration & Biodegradation, 1994. **34**(3-4): p. 333-348.
168. Ista, L.K., S. Mendez, and G.P. Lopez, *Attachment and detachment of bacteria on surfaces with tunable and switchable wettability*. Biofouling, 2010. **26**(1): p. 111-118.
169. Nuzzo, R.G. and D.L. Allara, *Adsorption of bifunctional organic Disulfides on Gold Surfaces*. Journal of the American Chemical Society, 1983. **105**(13): p. 4481-4483.
170. Scotchford, C.A., et al., *Growth of human osteoblast-like cells on alkanethiol on gold self-assembled monolayers: The effect of surface chemistry*. Journal of Biomedical Materials Research, 1998. **41**(3): p. 431-442.
171. Andrade, J. and V. Hlady, *Protein adsorption and materials biocompatibility: a tutorial review and suggested hypotheses*, in *Biopolymers/Non-Exclusion HPLC*. 1986, Springer. p. 1-63.
172. Jeon, S., et al., *Protein—surface interactions in the presence of polyethylene oxide: I. Simplified theory*. Journal of Colloid and Interface Science, 1991. **142**(1): p. 149-158.
173. Zheng, J., et al., *Molecular simulation study of water interactions with oligo (ethylene glycol)-terminated alkanethiol self-assembled monolayers*. Langmuir, 2004. **20**(20): p. 8931-8938.
174. Zolk, M., et al., *Solvation of oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers studied by vibrational sum frequency spectroscopy*. Langmuir, 2000. **16**(14): p. 5849-5852.
175. Fick, J., et al., *Swelling behavior of self-assembled monolayers of alkanethiol-terminated poly(ethylene glycol): A neutron reflectometry study*. Langmuir, 2004. **20**(10): p. 3848-3853.
176. Wang, R.Y., et al., *Interaction of self-assembled monolayers of oligo(ethylene glycol)-terminated alkanethiols with water studied by vibrational sum-frequency generation*. Journal of Chemical Physics, 2005. **122**(16).
177. Ista, L.K., et al., *Attachment of bacteria to model solid surfaces: Oligo(ethylene glycol) surfaces inhibit bacterial attachment*. Fems Microbiology Letters, 1996. **142**(1): p. 59-63.

-
178. Christophis, C., *Quantification of cell adhesion strength on artificial surfaces with a microfluidic shear force device*. 2011, University of Heidelberg.
 179. Fraser, J.R.E., T.C. Laurent, and U.B.G. Laurent, *Hyaluronan: Its nature, distribution, functions and turnover*. *Journal of Internal Medicine*, 1997. **242**(1): p. 27-33.
 180. Cao, X., et al., *Resistance of Polysaccharide Coatings to Proteins, Hematopoietic Cells, and Marine Organisms*. *Biomacromolecules*, 2009. **10**(4): p. 907-915.
 181. Almond, A., A. Brass, and J.K. Sheehan, *Oligosaccharides as model systems for understanding water-biopolymer interaction: Hydrated dynamics of a hyaluronan decamer*. *Journal of Physical Chemistry B*, 2000. **104**(23): p. 5634-5640.
 182. Despond, S., et al., *Hydration mechanism of polysaccharides: A comparative study*. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 2005. **43**(1): p. 48-58.
 183. Scott, J.E. and F. Heatley, *Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: a ¹³C NMR study*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999. **96**(9): p. 4850-4855.
 184. McArthur, S.L., et al., *Effect of polysaccharide structure on protein adsorption*. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2000. **17**(1): p. 37-48.
 185. Grant, G.T., et al., *Biological interactions between poly saccharides and divalent cations the egg box model*. *Febs Letters*, 1973. **32**(1): p. 195-198.
 186. Braccini, I. and S. Perez, *Molecular basis of Ca²⁺-induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited*. *Biomacromolecules*, 2001. **2**(4): p. 1089-1096.
 187. Bauer, S., et al., *Adhesion of Marine Fouling Organisms on Hydrophilic and Amphiphilic Polysaccharides*. *Langmuir*, 2013. **29**(12): p. 4039-4047.
 188. Van Loosdrecht, M.C.M., et al., *Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987. **53**(8): p. 1898-1901.
 189. Hogt, A.H., J. Dankert, and J. Feijen, *Adhesion of coagulase-negative staphylococci to methacrylate polymers and copolymers*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1986. **20**(4): p. 533-545.
 190. Harkes, G., J. Feijen, and J. Dankert, *Adhesion of Escherichia-coli on to a series of poly(methacrylates) differing in charge and hydrophobicity*. *Biomaterials*, 1991. **12**(9): p. 853-860.
 191. Van Der Mei, H.C., et al., *Influence of electrostatic interactions on the deposition efficiencies of coagulase-negative staphylococci to collector surfaces in a parallel plate flow chamber*. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 1992. **13**(4): p. 447-458.
 192. Jansen, B. and W. Kohnen, *Prevention of Biofilm Formation by Polymer Modification*. *Journal of Industrial Microbiology*, 1995. **15**(4): p. 391-396.
 193. Busscher, H.J., R. Bos, and H.C. Vandermei, *Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion*. *Fems Microbiology Letters*, 1995. **128**(3): p. 229-234.
 194. Gottenbos, B., et al., *Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering Gram-positive and Gram-negative bacteria*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001. **48**(1): p. 7-13.
 195. Hermansson, M., *The DLVO theory in microbial adhesion*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1999. **14**(1-4): p. 105-119.
 196. Boström, M., D.R.M. Williams, and B.W. Ninham, *Specific Ion Effects: Why DLVO Theory Fails for Biology and Colloid Systems*. *Physical Review Letters*, 2001. **87**(16): p. 168103.
 197. Chen, S.F., et al., *Strong resistance of phosphorylcholine self-assembled monolayers to protein adsorption: Insights into nonfouling properties of zwitterionic materials*. *Journal of the American Chemical Society*, 2005. **127**(41): p. 14473-14478.

198. He, Y., et al., *Molecular simulation studies of protein interactions with zwitterionic phosphorylcholine self-assembled monolayers in the presence of water*. Langmuir, 2008. **24**(18): p. 10358-10364.
199. Kudaibergenov, S., W. Jaeger, and A. Laschewsky, *Polymeric betaines: Synthesis, characterization, and application*, in *Supramolecular Polymers Polymeric Betains Oligomers*, B. Donnio, et al., Editors. 2006. p. 157-224.
200. Zhang, Z., S. Chen, and S. Jiang, *Dual-functional biomimetic materials: Nonfouling poly(carboxybetaine) with active functional groups for protein immobilization*. Biomacromolecules, 2006. **7**(12): p. 3311-3315.
201. Ueda, T., et al., *Preparation of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine copolymers with alkyl methacrylates and their blood compatibility*. Polymer Journal, 1992. **24**(11): p. 1259-1269.
202. Hayward, J.A. and D. Chapman, *Bio membrane surfaces as models for polymer design the potential for hemo compability*. Biomaterials, 1984. **5**(3): p. 135-142.
203. Cao, Z., L. Zhang, and S. Jiang, *Superhydrophilic Zwitterionic Polymers Stabilize Liposomes*. Langmuir, 2012. **28**(31): p. 11625-11632.
204. Zhang, L., et al., *Zwitterionic hydrogels implanted in mice resist the foreign-body reaction*. Nat Biotech, 2013. **31**(6): p. 553-556.
205. Sinclair, A., et al., *Engineering Buffering and Hydrolytic or Photolabile Charge Shifting in a Polycarboxybetaine Ester Gene Delivery Platform*. Biomacromolecules, 2013. **14**(5): p. 1587-1593.
206. Huxtable, R.J., *Physiological Actions of Taurine*. Physiological Reviews, 1992. **72**(1): p. 101-163.
207. Craig, S.A., *Betaine in human nutrition*. The American journal of clinical nutrition, 2004. **80**(3): p. 539-549.
208. Cheng, G., et al., *Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces*. Biomaterials, 2007. **28**(29): p. 4192-4199.
209. Finlay, J.A., et al., *Adhesion strength of settled spores of the green alga Enteromorpha*. Biofouling, 2002. **18**(4): p. 251-256.
210. Cassé, F., et al., *Combinatorial materials research applied to the development of new surface coatings V. Application of a spinning water-jet for the semi-high throughput assessment of the attachment strength of marine fouling algae*. Biofouling, 2007. **23**(2): p. 121-130.
211. Vig, J.R., *UV/ozone cleaning of surfaces*. Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films, 1985. **3**(3): p. 1027-1034.
212. Hermanson, G.T., *Bioconjugate techniques*. 1996: Academic press.
213. Stile, R.A., et al., *Sequential robust design methodology and X-ray photoelectron spectroscopy to analyze the grafting of hyaluronic acid to glass substrates*. Journal of Biomedical Materials Research, 2002. **61**(3): p. 391-398.
214. Kester, D.R., Duedall, I. W., Connors, D. N., and Pytkowic, R. M., *Preparation of artificial seawater*. Limnology and Oceanography, 1967. **12**(1): p. 176-179.
215. <http://www.av.ph.tum.de/Experiment/3000/Beschreibungen/ver3064.php>.
216. http://www.nikoninstruments.com/en_DE/.
217. www.zeiss.de.
218. Schmidt, W., *Optische Spektroskopie*. 2000: VCH Weinheim.
219. Woollam, J.A., Johs, B., Herzinger, C. M., Hilfiker, J., Synowicki, R., Bungay, C. L., *Overview of Variable Angle Spectroscopic Ellipsometry (VASE), Part I: Basic Theory and Typical Applications*. Critical Reviews of Optical Science and Technology 1999. **72**: p. 1-28.
220. http://www.jawoollam.com/tutorial_1.html.

-
221. <http://www.pil.uni-stuttgart.de/forschung/methoden/ellipsometrie.html>.
222. Wasserman, S.R., et al., *The structure of self-assembled monolayers of alkylsiloxanes on silicon - A comparison of results from ellipsometry and low-angle x-ray reflectivity*. Journal of the American Chemical Society, 1989. **111**(15): p. 5852-5861.
223. Wolf, H., et al., *End-group-dominated molecular order in self-assembled monolayers*. Journal of Physical Chemistry, 1995. **99**(18): p. 7102-7107.
224. Yuan Y., L., T.R., *Contact Angle and Wetting Properties*, in *Surface Science Techniques*. 2013, Springer. p. 3-34.
225. Young, T., *An essay on the cohesion of fluids*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 1805. **95**: p. 65-87.
226. Marmur, A., *Super-hydrophobicity fundamentals: implications to biofouling prevention*. Biofouling, 2006. **22**(02): p. 107-115.
227. Wenzel, R.N., *Resistance of solid surfaces to wetting by water*. Industrial & Engineering Chemistry, 1936. **28**(8): p. 988-994.
228. Palzer, S., et al., *Influence of roughness of a solid surface on the angle of contact*. Chemie Ingenieur Technik, 2001. **73**(8): p. 1032-1038.
229. Wenzel, R.N., *Surface Roughness and Contact Angle*. The Journal of Physical and Colloid Chemistry, 1949. **53**(9): p. 1466-1467.
230. Busscher, H.J., et al., *The effect of surface roughening of polymers on measured contact angles of liquids*. Colloids and Surfaces, 1984. **9**(4): p. 319-331.
231. Cassie, A.B.D. and S. Baxter, *Wettability of porous surfaces*. Transactions of the Faraday Society, 1944. **40**(0): p. 546-551.
232. Marmur, A., *Contact angle equilibrium: the intrinsic contact angle*. Journal of Adhesion Science and Technology, 1992. **6**(6): p. 689-701.
233. Marmur, A., *Thermodynamic aspects of contact angle hysteresis*. Advances in colloid and interface science, 1994. **50**: p. 121-141.
234. Marmur, A., *Equilibrium contact angles: theory and measurement*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 1996. **116**(1-2): p. 55-61.
235. Marmur, A., *Wetting on hydrophobic rough surfaces: to be heterogeneous or not to be?* Langmuir, 2003. **19**(20): p. 8343-8348.
236. Extrand, C. and Y. Kumagai, *An experimental study of contact angle hysteresis*. Journal of Colloid and Interface Science, 1997. **191**(2): p. 378-383.
237. Extrand, C., *Contact angles and their hysteresis as a measure of liquid-solid adhesion*. Langmuir, 2004. **20**(10): p. 4017-4021.
238. Reimer, L., Pfefferkorn, G., *Raster-Elektronenmikroskopie*. 1977: Springer.
239. Strain, H.H., W.M. Manning, and G. Hardin, *Chlorophyll c (chlorofucine) of diatoms and dinoflagellates*. Journal of Biological Chemistry, 1943. **148**(3): p. 655-668.
240. Guillard, R.R.L. and J.H. Ryther, *Studies of marine planktonic diatoms: I. cyclotella nana hustedt, and detonula confervacea (cleve) gran.* Canadian Journal of Microbiology, 1962. **8**(2): p. 229-239.
241. Schlichting, H., Gersten, K., *Grenzschicht-Theorie*. Vol. 10. 2006: Springer.
242. Happel, J. and H. Brenner, *Low Reynolds number hydrodynamics: with special applications to particulate media*. Vol. 1. 1965: Springer.
243. Deen, W.M., *Analysis of Transport Phenomena (Topics in Chemical Engineering)*. Vol. 3. 1998: Oxford University Press, New York.
244. Schweizer, A. http://www.schweizer-fn.de/stoff/seewasser/seewasser_stoff.php.
245. Schultz, M.P., et al., *Three models to relate detachment of low form fouling at laboratory and ship scale*. Biofouling, 2003. **19**: p. 17-26.
246. Arpa-Sancet, M.P., *Influence of surface properties on adhesion of Cobetia marina and accumulation of marine microfoulers in the ocean*. 2013, University of Heidelberg.

247. Zhang, X.Y., Y.X. Zhu, and S. Granick, *Hydrophobicity at a Janus interface*. Science, 2002. **295**(5555): p. 663-666.
248. Pertsin, A. and M. Grunze, *Computer simulation of adhesion between hydrophilic and hydrophobic self-assembled monolayers in water*. Journal of Chemical Physics, 2012. **137**(5).
249. Schultz, M.P., et al., *A turbulent channel flow apparatus for the determination of the adhesion strength of microfouling organisms*. Biofouling, 2000. **15**(4): p. 243-+.
250. Davies, P.F., *Flow-mediated endothelial mechanotransduction*. Physiological Reviews, 1995. **75**(3): p. 519-560.
251. Schultz, M.P., C.J. Kavanagh, and G.W. Swain, *Hydrodynamic forces on barnacles: Implications on detachment from fouling-release surfaces*. Biofouling, 1999. **13**(4): p. 323-335.
252. Dale, W.A. and V.U.S.o. Medicine, *Management of arterial occlusive disease*. 1971: Year Book Medical Publishers.
253. Bain, C.D., et al., *Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold*. Journal of the American Chemical Society, 1989. **111**(1): p. 321-335.
254. Ekblad, T., et al., *Poly(ethylene glycol)-Containing Hydrogel Surfaces for Antifouling Applications in Marine and Freshwater Environments*. Biomacromolecules, 2008. **9**(10): p. 2775-2783.
255. Baier, R., *Influence of the initial surface condition of materials on bioadhesion*, in *Proceedings of the Third International Congress on Marine Corrosion and Fouling*. 1973, Northwestern University Press, Evanston IL. p. 633-639.
256. Loeb George, I., Neihof Rex, A., *Marine Conditioning Films*, in *Applied Chemistry at Protein Interfaces*. 1975, American Chemical Society. p. 319-335.
257. Garg, A., A. Jain, and N.B. Bhosle, *Chemical characterization of a marine conditioning film*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2009. **63**(1): p. 7-11.
258. Taylor, G.T., et al., *Influence of surface properties on accumulation of conditioning films and marine bacteria on substrata exposed to oligotrophic waters*. Biofouling, 1997. **11**(1): p. 31-57.
259. Bakker, D.P., et al., *Multiple linear regression analysis of bacterial deposition to polyurethane coating after conditioning film formation in the marine environment*. Microbiology-Sgm, 2004. **150**: p. 1779-1784.
260. Compere, C., et al., *Kinetics of conditioning layer formation on stainless steel immersed in seawater*. Biofouling, 2001. **17**(2): p. 129-145.
261. Zaidi, B.R., R.F. Bard, and T.R. Tosteson, *Microbial specificity of metallic surfaces exposed to ambient seawater*. Applied and Environmental Microbiology, 1984. **48**(3): p. 519-524.
262. Maki, J.S., et al., *Biofilm formation on metal surfaces in antarctic waters*. Biofouling, 1990. **2**(1): p. 27-38.
263. Thome, I., *Influence of surface conditioning and morphology on biofouling*. 2013, University of Heidelberg.
264. Pratt-Terpstra, I.H., A.H. Weerkamp, and H.J. Busscher, *Adhesion of oral streptococci from a flowing suspension to uncoated and albumin-coated surfaces*. Journal of general microbiology, 1987. **133**(11): p. 3199-3206.
265. Ista, L.K., et al., *Attachment of bacteria to model solid surfaces: Oligo(ethylene glycol) surfaces inhibit bacterial attachment*. Fems Microbiology Letters, 1996. **142**(1): p. 59.
266. Himmelhaus, M., et al., *Growth of a dense polymer brush layer from solution*. Europhysics Letters, 2003. **64**(3): p. 378-384.

-
267. Valiokas, R., et al., *Self-assembled monolayers of oligo(ethylene glycol)-terminated and amide group containing alkanethiolates on gold*. Langmuir, 1999. **15**(10): p. 3390-3394.
268. Harder, P., *Oligo(ethylenglykol)-terminierte Alkanthiolatmonolagen auf Gold und Silber*. 1999, University of Heidelberg.
269. Nuzzo, R.G., L.H. Dubois, and D.L. Allara, *Fundamental-studies of microscopic wetting on organic-surfaces.1. Formation and structural characterization of a self-consistent series of polyfunctional organic monolayers*. Journal of the American Chemical Society, 1990. **112**(2): p. 558-569.
270. Bailey, F.J., *Poly (ethylene oxide)*. 1976: Academic Press.
271. Dubois, L.H., B.R. Zegarski, and R.G. Nuzzo, *Fundamental studies of microscopic wetting on organic surfaces. 2. Interaction of secondary adsorbates with chemically textured organic monolayers*. Journal of the American Chemical Society, 1990. **112**(2): p. 570-579.
272. Pilson, M.E., *An Introduction to the Chemistry of the Sea*. 2012: Cambridge University Press.
273. Cao, X., *Antifouling properties of smooth and structured polyelectrolyte thin films*. 2008, University of Heidelberg.
274. Geesey, G.G., B. Wigglesworth - Cooksey, and K. Cooksey, *Influence of calcium and other cations on surface adhesion of bacteria and diatoms: a review*. Biofouling, 2000. **15**(1-3): p. 195-205.
275. Cooksey, K.E., *Requirement for calcium in adhesion of a fouling diatom to glass*. Applied and Environmental Microbiology, 1981. **41**(6): p. 1378-1382.
276. Chen, S., et al., *Surface hydration: Principles and applications toward low-fouling/nonfouling biomaterials*. Polymer, 2010. **51**(23): p. 5283-5293.
277. Chen, S., et al., *Strong Resistance of a Thin Crystalline Layer of Balanced Charged Groups to Protein Adsorption*. Langmuir, 2006. **22**(19): p. 8186-8191.
278. Bauer, S., *Charged SAMs as Model Surfaces to Understand Anti-fouling Properties of Zwitterionic Coatings*, in *AVS 60th International Symposium & Exhibition*. 2013: Long Beach, California.
279. Li, Y., et al., *Adhesion behavior of marine benthic diatom Nitzschia closterium MMDL533 on cationically modified phosphorylcholine copolymer films*. Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering, 2013: p. n/a-n/a.
280. Trentin, I., et al., *Quick test methods for marine antifouling paints*. Progress in Organic Coatings, 2001. **42**(1-2): p. 15-19.
281. Murase, A., et al., *Two-dimensional trajectory analysis of the diatom Navicula sp using a micro chamber*. Journal of Microbiological Methods, 2011. **87**(3): p. 316-319.

Danksagung

Nun, da alles fast vorbei ist, bin ich voller Dank, für alle, die mich während meines Studiums und der Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben. 10 Jahre!

Ein großes Danke geht an Prof. Dr. Michael Grunze für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und meine interdisziplinäre Themenstellung. Die Gelegenheiten, vor allem die internationalen Kontakte, die sich mir innerhalb meiner Doktorandenzeit boten, waren einmalig und motivierend.

Prof. Dr. Axel Rosenhahn gilt mein Dank für die Betreuung dieser Arbeit, die vielen Anregungen und Diskussionen, auch wenn es mal nicht voranging. Die internationalen Konferenzen und Workshops werden mir stets im Gedächtnis bleiben. Für die zahlreichen Korrekturen mit den konstruktiven Verbesserungsvorschlägen danke ich ebenfalls sehr. Ich wünsche dir alles Gute für deinen Start in Bochum.

Thanks to Dr. Maureen Callow, John Finlay, Gemma Cone and Michala Pettitt from the School of Biosciences of the University of Birmingham for sending of diatom cultures throughout the years and especially for the help and advice in diatom issues.

I want to thank Prof. Dr. Swain and his group, especially Kelli Zargiel, Abe Stephens and Emily Ralston from the Florida Institute of Technology for supporting us during our work in the field.

Thanks to Prof. Lamb and Dr. Alex Wu from the University of Melbourne in Australia for having us in your lab for a few days. The chance to see the *home of my Navicula* in the lab of Prof. Wetherbee was great. Big Thanks also to the family of Prof. Lamb, I will never forget the fantastic and authentic chinese food.

Danke unseren Technikern Günter Meinusch und Peter Jeschka, insbesondere für den Umbau unserer Geräte für die Florida-Messungen.

Swetlana Duchnay, Karin Jordan und Benjamin Scherke, ein großes Dankeschön, dass sie sich immer und unmittelbar um alles Bürokratische gekümmert haben. Ich bin immer gerne hoch.

Stella Bauer, Dr. Katharina Mark, Dr. Isabel Thomé, Birte Seiffert, Dr. Piluca Arpa Sancet, Max Hanke, Jessica Sledge, Frau Fryson, Dr. Lena Daumann und Natalie Hofmann, ohne euer Korrekturlesen wäre dieses Werk nie vollbracht worden.

Meinen Forschungspraktikanten Julia Gmeiner und Marie-Luise Morkos danke ich für den aktiven Einsatz für meine Forschung und die lustige Abwechslung im Labor. In dir Julia habe ich eine Freundin fürs Leben gefunden.

Den Florida-Mädels Piluca Arpa, Isabel Thomé und Svenja Vater danke ich für den heroischen Messeinsatz bei Tag und Nacht. Diese vier Wochen zähle ich zu den schönsten meiner Doktorarbeit. An dieser Stelle auch ein Dankeschön an Herrn Grunze für die zeitweise Unterstützung vor Ort und die kulinarische Verköstigung. My pleasure!

Ein außerordentlicher Dank gilt meinem bunten AK: Horsts, Nachrichtentechniker, Hexen, Engländer und Chemiegesindel. Um die Namen zu nennen, Thomas Gorniak, Tobias Senkbeil, Stojan Maleschlijski, Svenja Vater, Maria Pilar Arpa Sancet alias Piluca, Max Hanke, Stella Bauer, Andreas Buck, Isabel Thome, Tawheed Mohamed und Linlin Xiao. Danke für den Zusammenhalt und den Zuspruch bei Problemen, die fröhlichen Bürostunden und die unzähligen Grillabende, die gemeinsamen Konferenzen und für das Schicken meiner vielen gelöschten Emails. Ein besonderes dankeschön an dich Stojan für das Tracing für meine Motilitätsanalyse, die vielen Graphen und deine aufopferungsvolle Art mir zu helfen. Danke Stella und Isabel, dass ihr euch um meine Algen gekümmert habt wenn ich mal nicht konnte. Lieben Dank an dich Max, für die Unterstützung und den Austausch auf „meinem letzten Weg“, der Kalibration. Dem Adoptiv-AK-Mitglied Dr. Niko Meyerbröker: danke, du bist mein Allwissen-Guru.

Ich danke auch meinen ehemaligen Kollegen, Christof Christophis, Matthias Heydt, Christina Leinweber, Mike Beckers, Hernan Sendra und Sebastian Weiße für die herzliche Aufnahme in die Gruppe und die wunderschöne Zeit in Heidelberg. Dankeschön Dr. Toffi(fee) für das Weitergeben deines Mikrofluidik- und Mikroskopwissens.

Pilu, dankeschön für die unvergessliche Zeit in Florida, auf den Bahamas und in Australien. Für deine Hilfe und moralische Unterstützung bei meiner Arbeit bin ich mehr als nur dankbar. Meiner Boulder-Crew: Birte Seiffert, Maik Niehoff, Rostislav Vasinov, Marko Witt, Urs Heck, Evren Erkol und Andrea Wurm danke ich für die Kletterei und vieles mehr. Ihr bringt mich stets zum Lachen. Dir Birte ein Extra-Dankeschön!

Stella Bauer, Leopold Pöttinger, Thomas Kriesche und Nikolaus Meyerbröker, das 2.OG hat zusammengebracht was zusammengehört. Danke für die Kochabenteuer, die Roadtrips, die fachliche Hilfe und vor allem die Unterstützung in Zeiten der Frustration. Maria Halbig, unser neues Findelkind, ich danke dir für die vielen Aufmunterungen in letzter Zeit. Ich bin froh, dass du in Heidelberg bleibst.

Meinen *hyperalten* Freunden: Tina Hessenauer und Christina Litau. So schnell ging der Sprung vom Sandkasten ins wahre Leben. Es ist schön, dass wir uns immer noch haben. Auch ein großes Dankeschön an Jessica Sledge, trotz der weiten Entfernung bist du bei mir.

Außer der Chemie hat mir das Studium so viel mehr gegeben: Lena Daumann, Katharina Mark, Michael Morgen, Arina Rybina und Georg Meseck, ich bin dankbar, dass ihr immer für mich da seid.

Der größte Dank gilt meiner Familie, meiner Mutter, Alexander, Omi und meinem Bruder, danke, dass ihr euch so sehr um mich sorgt und kümmert. Ohne euren Rückhalt in jeglicher Hinsicht wäre ich nicht da wo ich jetzt bin. Erika, *Schwesterherz*, mit dir gehe ich seit ich denken kann jeden Schritt meines Lebens. Vor allem die letzten vier Jahre gleichen Schicksals haben mir sehr viel Kraft gegeben. Danke für Alles!

