

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen

Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Stella Valery Bauer

geboren am 7.7.1986 in Lich

Tag der mündlichen Prüfung

19.12.2014

**Hydratation und *Antifouling*-Oberflächen:
Modellsysteme auf Basis zwitterionischer
SAMs und Polysaccharide**

Gutachter:

Prof. Dr. Axel Rosenhahn

apl. Prof. Reiner Dahint

KURZFASSUNG

Der Bewuchs künstlicher Oberflächen im Kontakt mit Meerwasser, das marine *Biofouling*, stellt aufgrund seiner ökonomischen und ökologischen Folgen seit jeher ein Problem für die Marineindustrie dar. Aufgrund des Verbotes ehemals erfolgreicher aber hochtoxischer Biozide und einem zunehmenden Umweltbewusstsein ist die Entwicklung umweltverträglicher Beschichtungen, die die initiale Anlagerung der entsprechenden Organismen beeinflussen, in den Fokus der Forschung gerückt. Da die Adhäsionsprozesse der so genannten *Fouler* von einer großen Bandbreite an Oberflächeneigenschaften beeinflusst werden, macht man sich in diesem Zusammenhang Modellsysteme mit reduzierter Komplexität zunutze, um selektiv einzelne Variablen untersuchen zu können. Gegenstand dieser Arbeit war die Präparation und Charakterisierung stark hydratisierter Modelloberflächen und die biologische Evaluierung ihrer *Fouling*-Resistenz. Als biologische Modellsysteme wiederum dienten stellvertretende Spezies aus allen Stadien des komplexen *Biofouling*-Prozesses: *Cobetia marina* für marine, biofilm-bildende Bakterien; Diatomeen für die schleimbildenden *Mikrofouler*; Zoosporen der Grünalge *Ulva linza* für weiche *Makrofouler* und Cyprislarven der Seepocke *Balanus amphitrite* für die harten *Makrofouler*. Da im realen marinen Umfeld eine Vielzahl von Faktoren ineinander greifen, wurden außerdem Feldstudien durchgeführt, um einen Überblick über diese zu gewinnen.

Zwitterionische Substanzen werden aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen der vorhandenen entgegengesetzten Ladungen hydratisiert. Um den Einfluss verschiedener Ladungen und ihrer Kombination auf die biologischen Modellsysteme näher zu analysieren, wurden selbst-assemblierende Monolagen (SAMs) aus Mischungen von Alkanthiolen mit unterschiedlichen geladenen Gruppen auf Gold präpariert. Die Adsorption von Testproteinen und die Anzahl adhärenter Organismen im Feldexperiment wurden durch die gleichzeitige Präsenz der entgegengesetzten Ladungsträger an unterschiedlichen Molekülen reduziert; die Ablösbarkeit der Kieselalgen erhöht. Zoosporen der Grünalge *Ulva linza* wiesen dagegen komplexere Adhäsionspräferenzen auf, die von der exakten Terminierung der Oberflächen abhängen.

Polysaccharide sind hydrophile Biopolymere, deren Hydratation über Wasserstoffbrückenbindungen zustande kommt. Drei strukturell leicht variierende Vertreter dieser Klasse, Alginsäure (AA), Hyaluronsäure (HA) und Chondroitinsulfat (CS), wurden kovalent auf Oberflächen immobilisiert und anschließend an ihren Säuregruppen mit einem fluorierten Amin modifiziert. Dadurch wurden einerseits freie Carboxylgruppen für die Wechselwirkung mit zweiwertigen Kationen blockiert und andererseits amphiphile Eigenschaften in den hydrophilen Polymernetzwerken etabliert. Die zugrundeliegende Hypothese, dass die verminderte Fähigkeit zur Komplexierung von Ca(II)-Ionen die inerten Eigenschaften der Polysaccharidfilme im marinen Medium verbessert, konnte für AA und HA für die Adhäsion von *C. marina*, das Besiedlungsverhalten von *U. linza* und *B. amphitrite* und im Feldversuch bestätigt werden. Entgegengesetzt dazu verfügte das sulfatierte Polysaccharid CS im unmodifizierten Zustand über bessere antiadhäsive Eigenschaften.

Als dritte Materialklasse wurden Poly(Hydroxyethylmethacrylat)-Filme, die ebenfalls durch ihr chemisches Grundgerüst eine wasserstoffbrückenbasierte Hydratation aufweisen, charakterisiert und bezüglich ihrer Proteinresistenz getestet. Für die durch oberflächeninitiierte RAFT-Polymerisation hergestellten Substrate wurde eine Schichtdickenabhängigkeit der Resistenzeigenschaften demonstriert.

ABSTRACT

Marine biofouling, the accumulation of biomass on man-made surfaces in contact with seawater, causes enormous economic and ecological damage and has, therefore, always been a major problem of marine industries. Due to the ban of highly toxic biocides and an increase in ecological awareness, the development of environmentally benign coatings is now in the focus of surface science research. These shall inhibit or influence the adhesion of the relevant organisms. The subject of this thesis was the preparation, characterization and biological evaluation of model surfaces, which had a strong hydration in common. As biological model systems representative species from every stage of the complex biofouling process were selected: *Cobetia marina* as biofilm building marine bacteria, two diatom species for the slime producing microfoulers, zoospores of the green alga *Ulva linza* represented the soft macrofoulers and cyprid larvae of the barnacle *Balanus amphitrite* the hard macrofoulers. Additionally, field studies were conducted to evaluate the influence of the interplay of various species found in the real marine environment, which cannot be studied under laboratory conditions.

Due to electrostatic interactions of simultaneously present oppositely charged groups, zwitterionic materials are strongly hydrated. To evaluate the influence of different charge-carriers and their combinations on the biological model systems, self-assembled monolayers (SAMs) from mixtures of charge-terminated alkanethiols were prepared on gold. It could be demonstrated, that the simultaneous presence of opposite charges on different molecules reduced the adsorbed amount of proteins and the number of adherent organisms in the field study, while the removability of the diatoms was increased. Zoospores of *Ulva linza* in contrast exhibited more complex adhesion preferences, guided by the exact surface termination.

Polysaccharides are hydrophilic biopolymers, whose hydration is caused by hydrogen bonding. Three structurally similar representatives for this class of materials, alginic acid (AA), hyaluronic acid (HA) and chondroitin sulfate (CS) were covalently immobilized on surfaces and subsequently modified with a hydrophobic fluorinated amine. By this strategy, free carboxy-groups could be blocked for the interaction with bivalent cations and additionally, amphiphilic properties could be introduced into the hydrophilic polymer network. The underlying hypothesis, that a reduced ability to complex Ca(II) ions from seawater would enhance the inert properties of the polysaccharide films could be confirmed for the adhesion of *C. marina*, settlement of *U. linza* and *B. amphitrite* and a field test for AA and HA. CS, in contrast, showed an inverse behavior. The anti-adhesive properties of the sulfated polysaccharide were superior in the unmodified condition.

As a third class of materials, poly(hydroxyethylmethacrylat) films, which are also strongly hydrated due to their chemical structure, were characterized and evaluated towards their protein resistance. It could be shown, that the resistance properties of the RAFT-polymerized substrates were dependent on their film thickness.

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----|
| Kurzfassung | I |
| Abstract | III |
| Inhaltsverzeichnis | IV |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 2 Theoretische Grundlagen | 5 |
| 2.1 Biofouling..... | 5 |
| 2.1.1 Evaluierung von Biofouling auf inerten Oberflächen | 6 |
| 2.1.2 Modellorganismen | 8 |
| 2.2 Selbst-assemblierte Monolagen (SAMs) | 12 |
| 2.3 Inerte Oberflächen | 15 |
| 2.3.1 Oberflächenenergie und Benetzbarkeit | 16 |
| 2.3.2 Hydratation..... | 18 |
| 2.3.3 Ladung | 19 |
| 2.3.4 Topographie | 20 |
| 2.3.5 Beispiele potentiell inerter Substanzklassen..... | 21 |
| 2.3.6 Oberflächen-initiierte radikalische Polymerisationen..... | 26 |
| 2.4 Analytische Methoden | 27 |
| 2.4.1 Kontaktwinkelmessung | 27 |
| 2.4.2 Ellipsometrie..... | 28 |
| 2.4.3 Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS)..... | 30 |
| 2.4.4 Rasterkraftmikroskopie | 34 |
| 3 Material und Methoden | 35 |
| 3.1 Herstellung von Lösungen | 35 |
| 3.2 Oberflächenpräparation..... | 36 |
| 3.2.1 Selbst-assemblierte Monolagen (SAMs) | 36 |
| 3.2.2 Polysaccharide | 38 |
| 3.2.3 pHEMA-Beschichtung durch RAFT-Polymerisation | 39 |
| 3.3 Charakterisierung | 40 |
| 3.3.1 Kontaktwinkel-Goniometrie..... | 40 |
| 3.3.2 Spektrale Ellipsometrie..... | 40 |

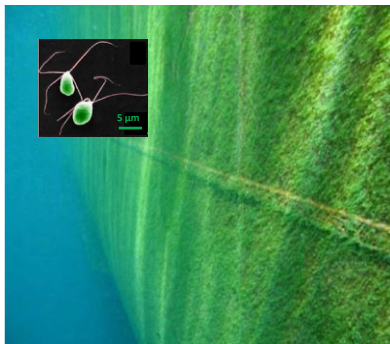
| | | |
|-------|--|-----|
| 3.3.3 | Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS) | 41 |
| 3.3.4 | AFM | 42 |
| 3.4 | Biologische Experimente | 42 |
| 3.4.1 | Stabilitätstests | 42 |
| 3.4.2 | Proteinadsorption | 43 |
| 3.4.3 | Mikrofluidische Scherspannungsmessungen | 43 |
| 3.4.4 | Besiedlung und Haftstärke von <i>Navicula incerta</i> | 47 |
| 3.4.5 | Besiedlung und Haftstärke von <i>Ulva linza</i> | 48 |
| 3.4.6 | Besiedlungsverhalten von <i>Balanus amphitrite</i> | 50 |
| 3.4.7 | Feldstudien | 51 |
| 3.5 | Statistische Analyse | 54 |
| 4 | Ergebnisse und Diskussion | 55 |
| 4.1 | Geladene und zwitterionische SAMs | 56 |
| 4.1.1 | Charakterisierung | 57 |
| 4.1.2 | Vergleich der Assemblierungsmechanismen und -konzentrationen | 76 |
| 4.1.3 | Stabilität unter marinen Bedingungen | 78 |
| 4.1.4 | Wechselwirkung der zwitterionischen SAMs mit biologischen Systemen | 80 |
| 4.1.5 | Vergleich und Diskussion der biologischen Experimente | 94 |
| 4.1.6 | Zusammenfassung | 98 |
| 4.2 | Hydrophile und amphiphile Polysaccharide | 100 |
| 4.2.1 | Charakterisierung von Polysaccharidoberflächen | 101 |
| 4.2.2 | Ca ²⁺ -Komplexierung aus marinem Medium | 110 |
| 4.2.3 | Stabilität der Polysaccharidfilme unter marinen Bedingungen | 111 |
| 4.2.4 | Wechselwirkung der Polysaccharid-Oberflächen mit biologischen Systemen | 112 |
| 4.2.5 | Vergleich und Diskussion der biologischen Experimente | 123 |
| 4.2.6 | Zusammenfassung | 128 |
| 4.3 | pHEMA-Oberflächen durch RAFT-Polymerisation | 131 |
| 4.3.1 | Charakterisierung der pHEMA-Oberflächen | 132 |
| 4.3.2 | Stabilität der pHEMA-Filme | 136 |
| 4.3.3 | Proteinadsorption auf pHEMA-Oberflächen | 137 |
| 4.3.4 | Zusammenfassung | 138 |
| 5 | Vergleiche, Zusammenfassung und Ausblick | 139 |

| | | |
|-----|--------------------------------|-----|
| 6 | Literaturverzeichnis..... | 147 |
| 7 | Anhang..... | 164 |
| 7.1 | Publikationsliste | 164 |
| 7.2 | Konferenzliste..... | 165 |
| 7.3 | Finanzielle Unterstützung..... | 165 |
| 7.4 | Verwendete Chemikalien | 166 |
| 7.5 | Abkürzungsverzeichnis | 168 |

1 EINLEITUNG

Im Lebenszyklus vieler mariner Organismen ist die permanente Adhäsion eines frühen Entwicklungsstadiums an eine Oberfläche der entscheidende Schritt beim Heranwachsen zur adulten Lebensform.¹ Handelt es sich bei diesen Siedlungsplätzen um natürliche Strukturen spricht man von *Epibiose*, im Fall von künstlichen Oberflächen ist der Begriff des *Biofouling*s gebräuchlich.²⁻³ Die erwachsenen Organismen und mit ihnen verbundenen makroskopischen Auswirkungen sind meist leicht zu erkennen, die im Ansiedlungsprozess aktiven Organismen haben jedoch nur mikroskopische Ausmaße (Abbildung 1).⁴

A.



B.



Abbildung 1. A. Mit Algen bewachsene Schiffshülle und eingefärbtes Elektronenmikroskopiebild von Sporen der Grünalge *Ulva linza*. B. Mit Seepocken bewachsener Schiffsrumpf und lichtmikroskopische Aufnahme einer Seepockenlarve.⁵⁻⁶

Dass diese natürlichen Bewüchse ein Problem darstellen wird deutlich, wenn man die Geschichte des *Antifouling*s, der Verhinderung solcher Biomassenakkumulationen, betrachtet.^{1,7-8} Schon vor über 2000 Jahren ummantelten beispielsweise die Phönizier ihre Schiffe mit Blei oder Kupfer. Im Laufe der Jahrhunderte kamen unzählige Materialien wie Pech, Teer, Talg oder auch Tierfelle zum Einsatz. Kupfer, dessen Wirkung auf dem langsamen Auflösen des Metalls und der bioziden Wirkung der Ionen basiert, stellte sich dabei als eines der erfolgreichsten Mittel heraus. Mit dem Aufkommen von Eisen als Schiffsbaumaterial wurde der Gebrauch aufgrund der korrosionsfördernden Wirkung des elementaren Edelmetalls aber problematisch, was ab der Mitte des 18. Jahrhunderts die Entwicklung von Alternativen vorantrieb. Zunächst handelte es sich dabei hauptsächlich um toxische Komponenten, wie Kupfer-, Arsen- oder Quecksilberverbindungen, die in einer Polymermatrix, beispielsweise Kolophonium oder Schellack, auf die Oberflächen aufgebracht wurden.⁹

Mit der Entdeckung des effektiven Biozids Tributylzinn (*engl. tributyltin*, TBT) und analoger Organozinnverbindungen hielt man Mitte des 20. Jahrhunderts das *Biofouling*-Problem für gelöst. Ungefähr 20 Jahre nach der Markteinführung wurde jedoch klar, dass die entsprechenden Beschichtungen massive ökologische Probleme verursachten. Beispiele für direkte Auswirkungen sind die Störung der Kalzifizierung von Austernschalen oder die Unfruchtbarkeit von Purpurschnecken.¹⁰⁻¹¹ Durch die Akkumulation in Fischen gelangte die hormonaktive Substanz außerdem bis in die menschliche Nahrungskette.¹² Nach schrittweisen Einschränkungen wurde TBT daher 2008 endgültig für die Anwendung in Schiffsfarben verboten.^{5,7}

Das Verbot und die striktere Reglementierung solcher Zusätze machte es erforderlich, alternative effektive und umweltfreundliche Oberflächenbeschichtungen zu entwickeln. Die Relevanz zeigt sich beispielsweise am Jahresumsatz der *Antifouling*-Industrie, die 2009 mit vier Milliarden US-Dollar beziffert wurde.⁸

Als inerte Materialien bezeichnet man solche, die für die Besiedlung durch Organismen unattraktiv oder abstoßend sind. Für die Entwicklung solcher Oberflächenbeschichtungen ist es grundlegend, die verschiedenen wechselwirkenden Einflüsse, die die *Fouling*-Organismen in ihrem Besiedlungsverhalten beeinflussen, zu verstehen. Hierzu zählen unter anderem physikalische und chemische Parameter, wie die Ladung, die Morphologie, die Oberflächenenergie oder die mechanische Beschaffenheit.^{4-5,13} Um diese Vielzahl an Eigenschaften gezielt untersuchen zu können, macht man sich Modelloberflächen mit reduzierter Komplexität zunutze. Im Anwendungsfeld der chemischen Funktionalitäten haben sich besonders selbst-assemblierte Monolagen (SAMs) bewährt. Diese zeichnen sich trotz einer einfachen Präparation durch eine hohe Flexibilität, Variabilität und Reproduzierbarkeit aus.¹⁴ Solche Systeme beruhen auf der spezifischen Affinität einer funktionellen Einheit zu einem passenden Substrat, wie etwa der Thiolgruppe zu Gold. Durch zusätzliche Wechselwirkungen der Moleküle untereinander entstehen hochgeordnete Substrate, deren chemische Eigenschaften durch die Endgruppen der Thiolmoleküle bestimmt werden.¹⁵ SAMs stellen daher ein ideales System dar, um die Auswirkungen variierender Oberflächeneigenschaften auf marine Organismen zu untersuchen.¹⁶⁻¹⁸ Basierend auf Alkanthiolen mit Ethylenglykol-Terminierung konnte auf diese Weise die zentrale Rolle der Hydratation – der Bindung von Wassermolekülen im Inneren der Endgruppenstrukturen – als Eigenschaft inerte Oberflächen identifiziert werden.¹⁹⁻²²

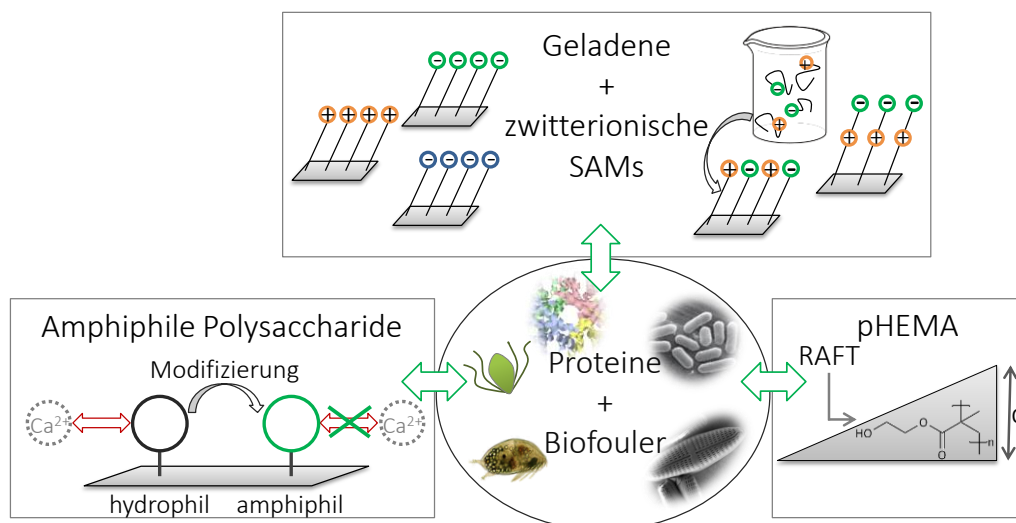


Abbildung 2. Übersicht der Struktur dieser Arbeit: Geladene und zwitterionische SAMs, amphiphile Polysaccharide und pHEMA-Filme wurden präpariert und charakterisiert. Im Anschluss wurden die Auswirkungen dieser Oberflächen mit spezifisch variierenden Eigenschaften auf *Fouling*-Systeme evaluiert.

Gegenstand dieser Arbeit war die Präparation, Analytik und biologische Evaluierung der *Antifouling*-Eigenschaften von Modelloberflächen, denen eine solche Hydratation gemein war. In Abbildung 2 sind die unterschiedlichen Substanzklassen und Präparationsansätze, die dabei verwendet wurden, schematisch zusammengefasst. Die Komplexität dieser Systeme nahm dabei von Monolagen, über dünne Polymerfilme zu höhermolekularen Schichten zu.

Bei zwitterionischen Systemen – das heißt solchen, die bei gleichzeitiger Anwesenheit entgegengesetzter Ladungen nach außen elektrisch neutral sind – beruht die ausgeprägte Interaktion mit Wasser auf elektrostatischen Wechselwirkungen.²³ Anhand von ladungsträgerterminierten SAMs wurden die Effekte der Präsenz reiner und zwitterionischer Ladungen auf marine Modellsysteme untersucht. Zu ihrer Herstellung wurden Kombinationen aus einem positiv geladenen Alkanthiol mit drei variierenden anionischen Komponenten verwendet.

Polysaccharide bilden durch ihre chemische Struktur eine Klasse von Biopolymeren, deren Hydratation über Wasserstoffbrückenbindungen gegeben ist. Ihre Eignung als resistentes Material für inerte Beschichtungen zeigt sich schon in ihrer Anwendung im biomedizinischen Bereich.²⁴⁻²⁵ In Studien von auf Oberflächen immobilisierten, sauren Kohlenhydraten konnte dagegen eine erwartete Verminderung der Besiedlung mariner Organismen nicht beobachtet werden. Dies wurde auf die Wechselwirkung der Oberflächenbeschichtungen mit zweiwertigen Kationen aus dem Medium zurückgeführt.²⁶ Darauf beruhend wurde die Hypothese entwickelt, dass die Modifikation des Polymergerüsts diese zum Kollaps der Filme führende Interaktion mindern kann. Zusätzlich konnten durch die Verwendung eines hydrophoben Bausteins amphiphile Eigenschaften im hydrophilen Polymernetzwerk etabliert werden. Amphiphilie ist eine weitere Eigenschaft, die im Kontext inerter Oberflächen als vielversprechend gilt.²⁷⁻²⁹

Poly(Hydroxyethylmethacrylat) (p(HEMA)) ist ähnlich wie Polysaccharide ein hydrophiles Polymermaterial, das im biomedizinischen Bereich beispielsweise zur Herstellung von Kontaktlinsen Anwendung findet.³⁰⁻³¹ Typischerweise sind die Resistenzeigenschaften solcher Polymerbeschichtung abhängig von ihrer Schichtdicke,³² weshalb dieser Einflussparameter näher analysiert wurde.

Zur Untersuchung der Resistenzeigenschaften der präparierten Oberflächen dienten biologische Modellsysteme, die repräsentativ für verschiedene Stadien und Größenordnungen des komplexen *Biofouling*-Prozess waren. Für sie wurden die unterschiedlichen charakteristischen Parameter, die in ihrem Adhäsionsprozess relevant sind, analysiert. Die Proteinresistenz diente dabei als ein erster Indikator für die generellere Eignung als inertes Material, da die Haftstoffe, die viele marine Organismen für die Herstellung des Oberflächenkontaktes verwenden, hauptsächlich aus solchen Makromolekülen bestehen.³³⁻³⁶ Des Weiteren gehören Proteine zu den ersten Substanzen, die sich beim Eintauchen einer Oberfläche auf dieser ablagern.¹³ Repräsentativ für marine Bakterien wurde das Adhäsionsverhalten von *Cobetia marina* untersucht, welche häufig zu den ersten Organismen gehören, die ein Substrat besiedeln.³⁷ Ebenfalls zu dieser Gruppe schleimbildender Organismen werden Diatomeen gezählt, für die *Navicula* repräsentativ sind.³⁸⁻³⁹ Diese Einzeller sind planktonisch nicht motil und erreichen ihren Adhäsionsort passiv, weshalb auch für sie vor allem ihre Ablösbarkeit nach der permanenten Adhäsion von Interesse war. Im Gegensatz dazu können sich Zoosporen der weltweit vorkommenden Grünalge *Ulva linza* aufgrund ihrer Flagellen selbstständig fortbewegen und weisen ein aktives Explorations- und Siedlungsverhalten auf.⁴⁰ Sie sind im Kontext des *Biofouling*s relevant, da die ausgewachsenen Pflanzen zu den Hauptbewüchsen von Schiffen zählen.⁴¹ Auch die größeren und komplexeren Cyprislarven der Seepockenart *Balanus amphitrite* untersuchen ein Substrat vor der permanenten Adhäsion.^{35,42} Für die letztgenannten Organismen war daher in erster Linie die vergleichende Quantifizierung ihrer Besiedlungstendenzen von Interesse.

Untersuchungen mit Einzelspezies spiegeln die Präferenzen individueller Organismen wieder, können aber nicht die wechselwirkenden Einflüsse unter realen Bedingungen erfassen. Bekannt ist beispielsweise, dass ein vorhandener Biofilm das Adhäsionsverhalten nachfolgender Spezies verändern kann.⁴³⁻⁴⁴ Feldstudien in tatsächlicher Meeresumgebung stellen daher eine wichtige Ergänzung zu Laborexperimenten dar.⁴⁵ Eine Auswahl der Modelloberflächen wurde daher einer realen marinen Population ausgesetzt.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

In den folgenden Abschnitten werden die für diese Arbeit relevanten Grundlagen vorgestellt. Es soll zunächst anhand der aktuellen Literatur ein Überblick über das Phänomen des „*Biofoulings*“ und die in diesem Zusammenhang in der Forschung verwendeten Modellorganismen gegeben werden. Im Anschluss werden die mit Hilfe dieser Organismen gewonnenen Erkenntnisse über Oberflächeneigenschaften diskutiert, die deren Adhäsionsverhalten in Richtung einer Bewuchsresistenz verändern. Schließlich werden die theoretischen Grundlagen der verwendeten analytischen Techniken beschrieben.

2.1 Biofouling

Der Begriff des *Fouling* definiert allgemein die unerwünschte Anlagerung von Materialien, wie Metalloxiden oder Proteinen, aus der Umgebung an benetzte Oberflächen. Im Fall des *Biofouling* handelt es sich bei diesen Ablagerungen um Organismen und deren Ausscheidungen wie extrapolymere Substanzen (EPS) oder Metaboliten.¹³ Das Phänomen verursacht zum einen Probleme im biomedizinischen Bereich, wo Proteine oder Biofilm-bildende Mikroorganismen an Kathetern, Implantaten oder Kontaktlinsen unerwünschte Immunantworten und Entzündungen verursachen.⁴⁶⁻⁴⁷ Zum anderen sind auch im marinen Bereich, beispielsweise an Schiffsrümpfen, Sensoren oder in der Aquakultur, die Ansiedlung von Organismen wie Bakterien, Algen und Schwämmen nachteilig. Ökonomischer Schaden entsteht durch notwendig werdende Reinigungsmaßnahmen und Neubeschichtungen, sowie erhöhten Treibstoffverbrauch durch die zunehmende Reibung an Schiffsrümpfen.⁴⁸ Es wird geschätzt, dass allein bei der US Navy pro Jahr 56 Millionen Dollar Kosten durch *Biofouling* auf Schiffsrümpfen anfallen.⁴⁹ Auf der ökologischen Seite verursacht der erhöhte Treibstoffverbrauch höhere Schadstoffemissionen und ganze Ökosysteme werden durch die Verschleppung invasiver Spezies ge- und im schlimmsten Fall zerstört.⁵⁰⁻⁵¹ Zur Verhinderung dieser Akkumulationen gibt es prinzipiell zwei Ansätze: Als „*Antifouling*“-Beschichtungen werden solche bezeichnet, die die Anlagerung von Organismen von Anfang an verhindern, was durch toxische Inhaltsstoffe oder die physikalisch-chemischen Eigenschaften erreicht werden kann.³ „*Fouling-Release*“-Beschichtungen erlauben dagegen die initiale Anlagerung, sind aber selbstreinigend unter Operationsbedingungen – bei Schiffen etwa durch die Fahrströmung.⁵²

Die makroskopischen Auswirkungen des *Biofouling*s sind oft leicht in Form von Algenbewüchsen und Muscheln zu erkennen. Die initialen Prozesse, die dazu führen, finden allerdings meist auf mikroskopischer Ebene statt, die beteiligten Organismen haben typischerweise eine Größe von (1 - 100) μm .⁵ Abbildung 3 fasst schematisch und beispielhaft verschiedene Spezies, ihre Größen und Besiedlungszeiten zusammen.

Sobald eine Oberfläche in Kontakt mit Meerwasser kommt, beginnt ein komplexer Prozess, bei dem Organismen verschiedener Größenordnungen zu verschiedenen Zeitpunkten eine Rolle spielen. Mehr als 4000 Spezies wurden auf bewachsenen Oberflächen identifiziert.⁹ Der genaue Ablauf ist von vielen Faktoren wie der Verfügbarkeit von Organismen, der Oberfläche, der geographischen Lage und der Jahreszeit abhängig.⁵³ Innerhalb der ersten Sekunden bis Minuten findet eine Konditionierung

der Oberfläche statt. Der sogenannte Konditionierungsfilm besteht aus gelösten organischen und anorganischen Material- wie Polysacchariden, Proteinen und Metalloxiden.⁵⁴⁻⁵⁵ Bei der Bildung spielen hauptsächlich Van der Waals- und elektrostatische Wechselwirkungen eine Rolle.^{13,56} Schon dieser Film verändert die physiko-chemischen Eigenschaften einer Oberfläche und kann Einfluss auf die folgenden Schritte haben.^{54,57}

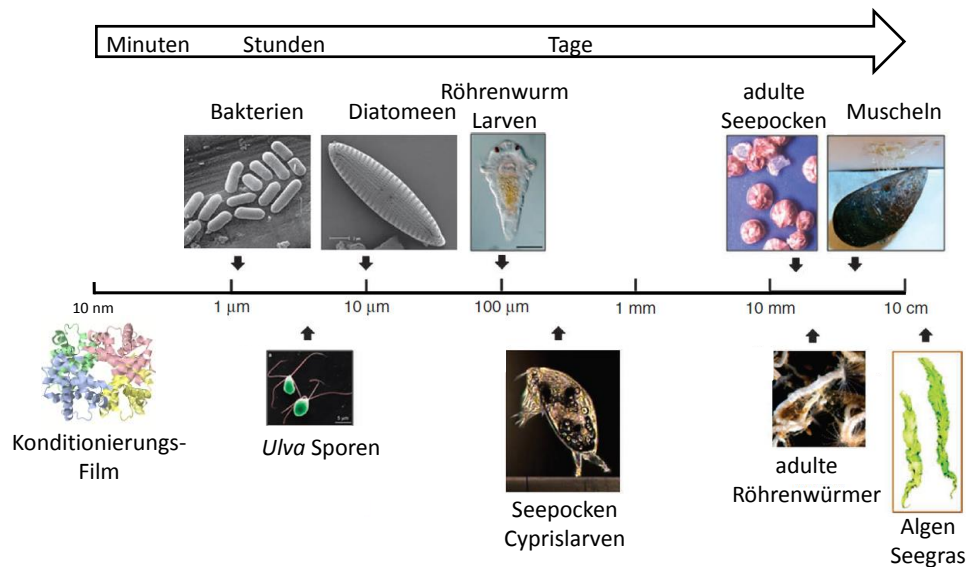


Abbildung 3. Schematische Zusammenfassung der initialen *Biofouling*-Schritte mit Beispielorganismen. Abbildung angelehnt an Callow *et al.*, *Nature Communications* 2011.⁵³

Bakterien gehören zu den ersten Organismen, die innerhalb von Minuten bis Stunden eine Oberfläche besiedeln. Diese „*Mikrofouler*“, zu denen auch Diatomeen und Protozoen gehören, bilden zusammen mit ihren EPS einen komplexen „*Biofilm*“.⁵⁸ Auch dieser kann wiederum Einfluss auf das Besiedlungsverhalten nachfolgender Organismen haben.^{44,59} Es wird häufig zwischen „*weichen Makrofouler*“, zu denen die Sporen und Larven von Algen und Schwämmen zählen und „*harten Makrofouler*“, wie Larven von Seepocken und Muscheln, unterschieden. Im oft beschriebenen „*linearen Modell*“ siedeln diese *Makrofouler* innerhalb von Tagen bis Wochen. Dieses Modell suggeriert eine gewisse Kausalität der aufeinanderfolgenden Schritte, die aber nicht gegeben ist. Sie können parallel oder überlappend erfolgen und *Makrofouler* können innerhalb von Minuten siedeln. Auch die Annahme, dass die Blockierung der ersten Schritte automatisch die „*später*“ folgenden verhindert erweist sich als unzutreffend.^{40,60}

2.1.1 Evaluierung von Biofouling auf inerten Oberflächen

Bei der Untersuchung des Besiedlungsprozesses von Organismen auf potentiell inerten Oberflächen stellen sich, wie in Abbildung 4 illustriert, die drei Fragen WIE? der Prozess im Detail abläuft, WIE VIELE? der Organismen siedeln und WIE FEST? die Adhäsion auf der Oberfläche ist. Bei der Anwendung von toxischen Substanzen wie Bioziden muss außerdem deren Wirkung auf die verschiedenen involvierten Organismen aufgeklärt werden.

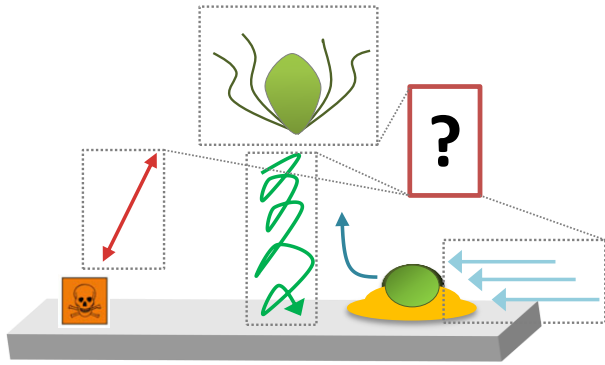


Abbildung 4. Illustration der möglichen Parameter, die zur *Biofouling*-Evaluierung herangezogen werden können: Toxizität einer Beschichtung, Verhalten des Organismus in unmittelbarer Nähe zur Oberfläche, Anzahl der siedelnden Organismen und deren Adhäsionsstärke.

Als inerte Oberflächen sind solche definiert, die durch unterschiedliche Mechanismen den *Biofouling*-Prozess verhindern. Auf der einen Seite stehen bioaktive Substanzen als Beschichtungen oder Zusätze, die die beteiligten Organismen abtöten oder ihr Verhalten durch Eingreifen in den Metabolismus beeinflussen.⁶¹ Auf der anderen Seite stehen Materialien, die die Ansiedlung durch andere Mechanismen verhindern (*Antifouling*) oder die Haftstärke abschwächen (*Fouling-Release*).⁶²

Um die Leistung verschiedener Beschichtungsklassen miteinander vergleichen zu können und die ihnen zugrunde liegenden Wechselwirkungen zu charakterisieren, sind standardisierte Experimente notwendig. Außerdem sind zahlreiche Spezies mit individuellen Adhäsionsmechanismen und Präferenzen involviert. Um diese zu verstehen- und um potentielle inerte Beschichtungen zu testen- werden Modellorganismen untersucht, die repräsentativ für ihre Gruppe der *Fouler* stehen.

LABOREXPERIMENTE MIT EINZELSPEZIES

Die Untersuchung von Beschichtungen und Modelloberflächen im Labor mit Einzelspezies-Kulturen ist ein etabliertes Vorgehen. Dabei wird die zu testende Oberfläche kurzzeitig unter definierten Bedingungen der zu untersuchenden Spezies ausgesetzt. Solche Experimente bieten vor allem die Vorteile einer kontrollierbaren und gleichbleibenden Umgebung und einer garantierten Qualität der verwendeten Organismen. Dabei können verschiedene Faktoren evaluiert werden: Toxizität, Besiedlungsquantität und -kinetik, sowie Adhäsionsstärke sind die hauptsächlich untersuchten Parameter.³

VERHALTENS- UND MOTILITÄTSANALYSEN

Besiedlungs- und Adhäsionsstärkeexperimente geben Aufschluss über die Effizienz des Besiedlungsvorgangs von Organismen auf den jeweiligen Testoberflächen. Da viele Spezies im relevanten Stadium motil sind, sind ihr Verhalten und die Bewegungsmuster in der Nähe der Oberfläche, vor allem kurz vor der permanenten Adhäsion, aufschlussreich. Beispielsweise bei den Extremfällen von vollständiger Bedeckung oder keiner Besiedlung können so Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus der betreffenden Oberfläche gezogen werden. Je nach Größe und Geschwindigkeit des untersuchten Organismus und der angestrebten Informationstiefe (2- oder 3-D) stellt die Verfolgung der Bewegungsmuster in der Nähe eines potentiellen Siedlungssubstrates hohe experimentelle Anforderungen. Einfache Videomikroskopie erlaubt nur die Verfolgung von Bewegungen in der Projektion (2-D), findet aber dennoch Anwendung um grundlegende Bewegungsmuster zu identifizieren.^{40,63-64} Zur Verfolgung 3-dimensionaler Bewegungen gibt es

verschiedene Ansätze. Stereoskopische Untersuchungen sind für größere Organismen geeignet und wurden unter anderem zu Untersuchungen des Explorationsverhaltens von Seepocken-Larven verwendet.⁶⁵ Für kleinere Spezies kommt diese Methode aufgrund der Auflösungsgrenze nicht mehr in Frage. Eine geeignete Alternative ist die holographische Videomikroskopie, die beispielsweise schon Anwendung bei der Bewegungsanalyse von *Ulva* Sporen fand.⁶⁶

FELDEXPERIMENTE

Die Wechselwirkung zwischen Spezies entscheidet über die reale Dynamik des *Biofouling*-Vorgangs.⁶⁷ Da diese in Laborexperimenten nur sehr selektiv untersucht werden kann, sind Experimente unter realen Bedingungen, bei denen auch schwankende Faktoren wie Temperatur, Salinität und pH-Wert mit einfließen, für eine abschließende Beurteilung einer Oberfläche notwendig. Allerdings müssen auch diese Untersuchungen standardisiert sein, um eine ausreichende Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Dafür bieten sich etablierte Testgelände an, bei denen Spezies-Variabilität und saisonale Schwankungen genau charakterisiert sind.⁶⁸⁻⁶⁹ In solchen Feldexperimenten kann auch die Langzeitstabilität von Testbeschichtungen und die geographische Variabilität von *Fouler*-Gemeinschaften evaluiert werden.⁷⁰⁻⁷¹

2.1.2 Modellorganismen

Die folgenden Abschnitte stellen etablierte Modellorganismen vor, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Jede repräsentiert eine Gruppe von *Foulern*, die bei der unvoreilhaften Besiedlung von künstlichen Oberflächen unter marinen Bedingungen eine Rolle spielen.

2.1.2.1 Marine Bakterien: *Cobetia marina*

Das marine Bakterium *Cobetia marina* wurde ursprünglich aus einem Biofilm isoliert und dient seither in der *Biofouling*-Forschung als Modellorganismus für die schleimbildenden, marinen Organismen.

Die stäbchenförmigen (1 - 2) μm großen Bakterien wachsen bei (10 - 42) °C und pH-Werten von (5 - 10), wofür sie hohe Salzkonzentrationen benötigen.⁷² Es ist bekannt, dass vorhandene Bakterienkolonien die Ansiedlung weiterer mariner Spezies wie Algen fördern können, was ihre Relevanz im Kontext der *Biofouling*-Forschung verdeutlicht.³⁷

C. marina kommt, wie andere Bakterien auch, in zwei verschiedenen Phänotypen vor: dem planktonischen, frei schwimmenden oder dem sessilen, biofilm-bildenden. Biofilme auf festen Substraten bieten ihnen erhöhte Resistenz gegen äußere Einflüsse wie Scherkräfte oder chemische Substanzen. So erhöht sich beispielsweise im klinischen Bereich die Antibiotikaresistenz. Die einzelnen Schritte der Bildung eines Bakterien-Biofilms sind in Abbildung 5 illustriert.⁷³

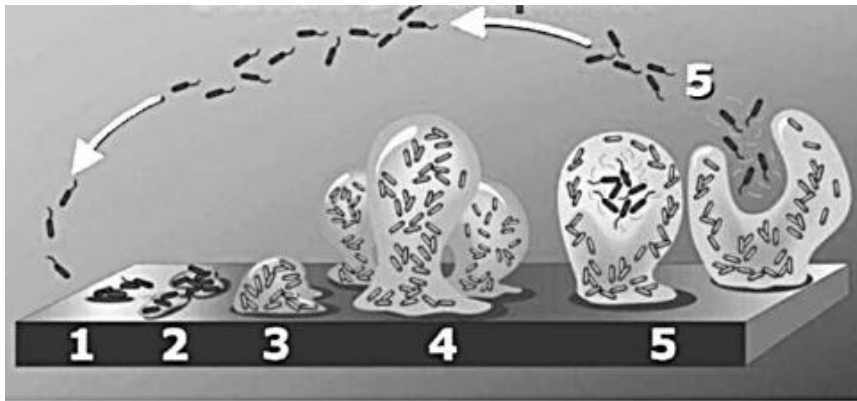


Abbildung 5. Illustration des fünfstufigen Biofilm Bildungs- und Reifungsprozesses. Aus Stoodley *et al.*, *Annual Reviews of Microbiology* 2002.⁷³

Zunächst lagern sich einzelne planktonische Bakterien reversibel an die Oberfläche an (Phase 1), wo sie sich selbstständig fortbewegen können. Anschließend bilden sie Aggregate und beginnen mit der Produktion und Ausscheidung von EPS, die die Matrix für den sich bildenden Biofilm schafft. Dieser irreversible Übergang von der planktonischen in die sessile Lebensform wird von einer Veränderung der Genexpression begleitet, die unter anderem die Alginatbildung hochreguliert. In den nächsten beiden Reifungs- und Wachstumsphasen findet die Strukturierung des Gerüsts statt, das die Nährstoffversorgung der unteren Biofilm-Bereiche gewährleistet. In der fünften Phase erfolgt die Ausbreitung des Films auf unbesiedelte Oberflächenareale. Dafür werden einzelne Bakterien oder ganze Aggregate aus der Gemeinschaft freigesetzt.⁷³

2.1.2.2 Diatomeen: *Navicula*

Diatomeen (Kieselalgen) gehören zu den schleimbildenden Mikroorganismen. Diese Gruppe von Mikroalgen zeichnet sich durch ihre komplexe Hülle aus amorphem Silikat aus. Es sind über 10.000 Spezies bekannt, von denen jedoch nur 8 - 10 Gattungen im Zusammenhang mit dem Bewuchs künstlicher Oberflächen gebracht werden.³⁸ Sie bilden durch ihre Fähigkeit zur CO₂-Fixierung die erste Stufe des Nahrungskreislaufs in Gewässern.⁷⁴ Planktonische Diatomeen sind nicht motil, sie werden vor der Adhäsion passiv durch Wasserbewegungen und Gravitation fortbewegt. Bei Kontakt mit einem Substrat erfolgt ein zweistufiger Adhäsionsprozess: Zunächst wird zur primären Adhäsion durch linienförmige Spalten, den Raphen, EPS abgesondert. Zusammen mit einem komplexen Bewegungsapparat können die Einzeller sich dann gleitend mit $(0,1 - 25) \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ auf dem Substrat fortbewegen.¹ Anschließend kann es durch die Ausscheidung weiterer EPS zur permanenten, sekundären Adhäsion kommen.³⁴

Navicula ist eine schiffchenförmige Gattung, die zu den Pennalen zählt und etwa 250 Arten umfasst, welche $(5 - 170) \mu\text{m}$ groß sind.⁷⁵ Die in dieser Arbeit verwendete Spezies *N. perminuta* ist $(10 - 13) \mu\text{m}$ lang, *N. incerta* ist etwas größer.³⁹ Äußerlich unterscheiden sich die beiden Spezies lediglich durch ihre minimal unterschiedliche Größe.^{39,76} Abbildung 6 zeigt die Aufnahmen adhärenter *N. perminuta*. Im Lichtmikroskopiebild (A) sind die beiden Chloroplasten zu erkennen, die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 6 B und C) zeigen die beiden ineinandergreifenden Schalenhälften (Hypotheka und Epitheka) der Hülle (Frustel), die schlitzförmigen Raphen in der Zellmitte und die Porenstruktur.

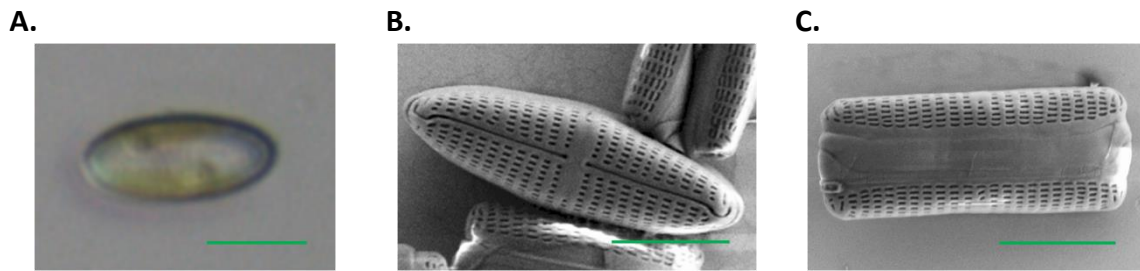


Abbildung 6. Mikroskopieaufnahmen von *N. perminuta*. A. Lichtbild der Raphenansicht B. REM-Aufnahme der Raphenansicht. C. REM-Aufnahme der Seitenansicht. Der Maßstab entspricht jeweils 5 µm.⁷⁶

Diatomeen wurden auf einer Vielzahl *Antifouling*- und *Fouling*-Release-Beschichtungen identifiziert, die erfolgreich gegen andere Spezies waren, was das große Interesse an dieser Gattung erklärt.^{38,69}

2.1.2.3 Grünalgen: *Ulva linza*

Die Grünalge *Ulva linza* ist in den Gezeitenzonen von Küsten auf der ganzen Welt zu finden, wo sie sowohl Felsen und Steine als auch künstliche Oberflächen bewächst. Sie ist tolerant gegenüber einer großen Bandbreite von Salinitäten und Wasserqualitäten und zählt zu den am häufigsten vorkommenden *Makrofaulern* auf Schiffen.⁴⁰ Die hell- bis dunkelgrünen Pflanzen sind in ihrer ausgewachsenen Form sessil, der Lebenszyklus beinhaltet allerdings auch motile Stadien (Abbildung 7).⁷⁷

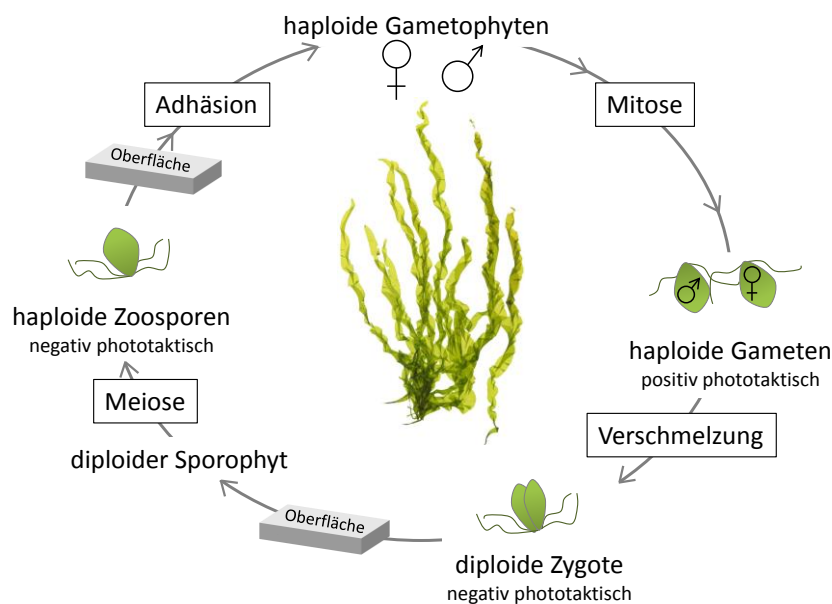


Abbildung 7. Lebenszyklus von *Ulva linza*. Die Gametophyten setzen Gameten frei, die zu Zygoten verschmelzen und nach der Adhäsion zu einem Sporophyt heranwachsen. Diese setzen wiederum Zoosporen frei, die nach eine motilen Phase auf einer Oberfläche anwachsen und durch die Entwicklung zum erwachsenen Pflanze den Lebenszyklus abschließen.⁷⁷

Die sessile Form existiert in zwei Lebensstadien, das geschlechtliche der Gametophyten und das ungeschlechtliche der Sporophyten. Die haploiden Gametophyten produzieren durch Mitose Gameten, die über zwei Flagellen verfügen. Durch die Verschmelzung einer männlichen und einer weiblichen Gamete entstehen diploide Zygoten, die an feste Substrate adhärirt zu Sporophyten heranwachsen. Diese produzieren zur Vermehrung Zoosporen. Die quadriflagellierten Zellen siedeln ebenfalls auf festen Oberflächen, an denen sie sich zu Gametophyten weiterentwickeln und so den Kreislauf schließen. Untypischerweise verfügen sowohl die Zoosporen als auch die Zygoten über

keine Zellwand. Die Freisetzung beider motiler Formen wird vom Mondzyklus bestimmt. Das für den Besiedlungsprozess relevanteste und daher am besten untersuchte Stadium ist das der (7 - 10) μm großen Zoospore (Abbildung 8 A). Diese Form wird in den standardisierten Laborexperimenten zur Evaluierung von Oberflächeneigenschaften verwendet. Durch ihre Motilität sind sie zur aktiven Diskriminierung von Oberflächen fähig, wobei der Annäherungs- und Adhäsionsprozess im Detail untersucht wurde.^{40,66} Die Stadien, die bei der Adhäsion durchlaufen werden, sind in Abbildung 8 B gezeigt.⁷⁸ Bei der Annäherung an eine Oberfläche ändert sich das Bewegungsmuster von schwimmenden Zoosporen (Abbildung 8 B.I) von einer ziellosen zu einer gerichteten Bewegung. Beim Kontakt (B.II) drehen sich die Sporen im Uhrzeigersinn um die eigene Achse („*spinning*“), wobei sie eine kleine Menge eines primären Haftmittels ausscheiden. Anschließend können sie das Substrat verlassen oder die permanente, irreversible Adhäsion einleiten. Dafür wird ein weiteres Haftmittel, bestehend aus selbst-aggregierenden hydrophilen Glykoproteinen und Polysacchariden, ausgeschieden (B.III), das eine Art Kissen für den Kontakt zwischen Oberfläche und Spore bildet.³³ Im Folgenden verändert sich die Morphologie von birnenförmig zu rund (Abbildung 8 C), die Flagellen werden in den Sporenkörper eingezogen und es bildet sich eine Zellwand aus (B.IV). Dieser Prozess, bei dem die Kontaktfläche zwischen Substrat und Sporenkörper maximiert wird, dauert nur etwa zwei Minuten.⁴⁰

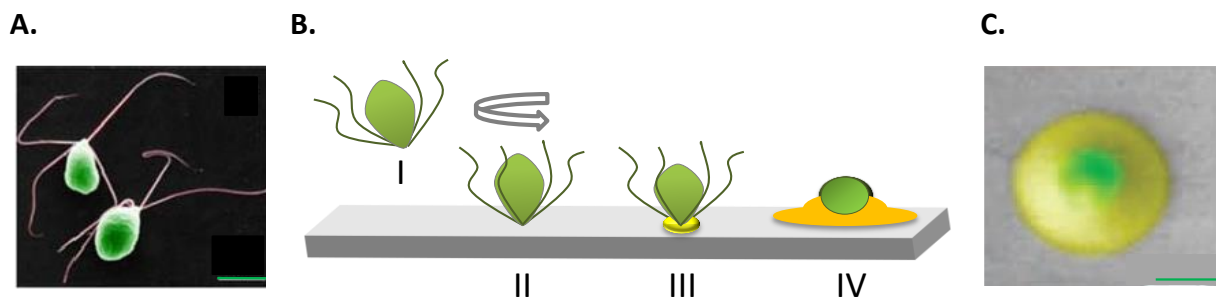


Abbildung 8. A. ESEM-Aufnahme von schwimmenden *U. linza* Zoosporen. B. Illustration des Besiedlungs- und Adhäsionsprozesses der Zoosporen (nach Callow, *Biologist* 2002)⁴¹. C. ESEM-Aufnahme einer adhärenen *Ulva* Spore. Der Maßstab bei A und C entspricht 5 μm , beide ESEM-Aufnahmen aus Callow *et al.*, *Nature Communications* 2011.⁵³

2.1.2.4 Seepocken: *Balanus amphitrite*

Seepocken gehören zur Klasse der harten *Makrofouler*. Sie kommen hauptsächlich im Gezeitenbereich von Küsten vor. Obwohl die erwachsene Form sessil ist, spielen motile Formen im Lebenszyklus dieser Krebstiere eine entscheidende Rolle.⁷⁹ Die Spezies *Balanus amphitrite* wird durch ihr weltweites Vorkommen oft als Modellorganismus in Labor- und Feldstudien herangezogen. Die erwachsene Form ist in Abbildung 9 A gezeigt. Die Vermehrung von Seepocken beginnt mit der Freisetzung von Nauplius-Larven durch einen erwachsenen Organismus (Abbildung 9 B). Diese durchlaufen verschiedene planktotrophe Stadien. Bei *B. amphitrite* dauert dieses Lebensstadium unter Laborbedingungen fünf Tage. Im Anschluss erfolgt die Metamorphose in Cyprislarven. Diese sind ebenfalls motil, können aber keine Nahrung mehr aufnehmen. Sie zehren von den im Nauplius-Stadium aufgebauten Energiereserven, was die Zeitspanne, die ihnen zur Identifikation eines möglichen Siedlungsplatzes zur Verfügung steht, begrenzt.⁸⁰ Dennoch zeigen sie ein komplexes und höchst selektives Explorationsverhalten.

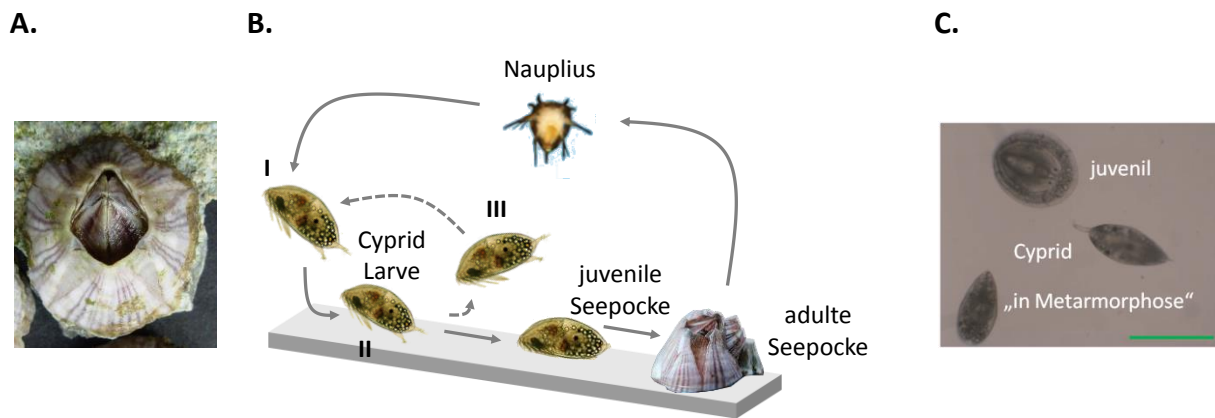


Abbildung 9. A. Ausgewachsene Seepocke der Spezies *B. amphitrite*.⁸¹ B. Vereinfachte Illustration des Lebenszyklus von Seepocken, angepasst von Aldred *et al.*, Biofouling 2002.⁷⁹ C. Lichtmikroskopiebild der drei Stadien, die eine Cyprislarve beim Adhäsionsprozess durchläuft, der Maßstab entspricht 500 µm.⁸⁰

Die Cyprislarven sind typischerweise ca. (500 - 600) µm lang und (200 - 300) µm breit (Abbildung 9 C) und verfügen über hochentwickelte Schwimm- und Sensororgane. Diese ermöglichen ihnen eine hohe Motilität und einen komplexen Explorations- und Adhäsionsmechanismus.⁸² Beim ersten Kontakt mit einem Substrat wird zunächst ein temporäres Haftmittel ausgeschieden.⁸³ Außerdem können sich die Larven „zweifüßig laufend“ fortbewegen, wobei sie nachweisbare „Fußspuren“ aus Haftmittel auf der Oberfläche hinterlassen.³⁶ Während dieser Explorationsphase können die Organismen das Substrat jederzeit wieder verlassen und einen besser geeigneten Platz zur Adhäsion suchen.^{35,79}

Wenn es zur permanenten Adhäsion kommt, setzen sie einen „Zement“ frei, der sie fest mit der Oberfläche verbindet. Innerhalb der nächsten zwölf Stunden findet eine erneute Metamorphose in die sogenannte „juvenile Seepocke“ statt, bei der die Kalzifizierung der Schale einsetzt. In der folgenden, den Lebenszyklus abschließenden Phase, entwickelt sich dieses Stadium weiter zur erwachsenen Form.^{79,84} Bei allen genannten Stadien vermitteln unterschiedliche Adhäsive die nötige Haftung zwischen Organismus und Substrat.⁷⁹

2.2 Selbst-assemblierte Monolagen (SAMs)

Die Wechselwirkung eines Festkörpers mit seiner Umgebung wird hauptsächlich durch die Eigenschaften seiner Oberfläche bestimmt, zu der vor allem die äußeren (5 - 10) Å zählen. Um die zahlreichen damit verbundenen Phänomene wie Haftung, Benetzbarkeit oder katalytische Aktivität untersuchen zu können, sind einheitliche und gut charakterisierte Grenzflächen notwendig. Geordnete Monolagen bieten dafür im Bereich organischer Oberflächen etablierte Modellsysteme. Zur Präparation gibt es verschiedene Ansätze: Bei der Langmuir-Blodgett-Methode wird eine an einer Lösungsmittel-Luft-Grenzfläche geordnete (Mono-)Schicht von Molekülen durch Bewegen eines festen Substrates durch diese auf das Substrat übertragen.⁸⁵ Der präparative Aufwand bei der Herstellung qualitativ hochwertiger Filme dieser Technik ist allerdings hoch. Selbst-assemblierende Systeme scheiden sich dagegen direkt aus einer Lösung geordnet auf dem Substrat ab, bzw. können auch aus der Gasphase abgeschieden werden.

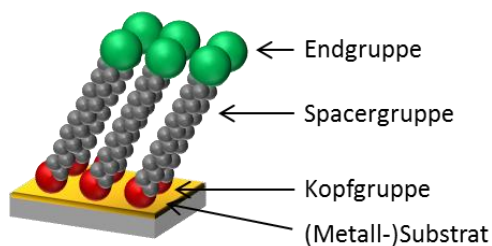
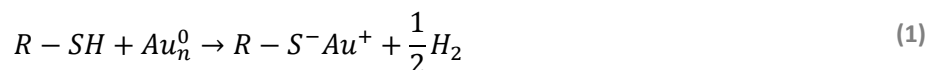


Abbildung 10. Selbst-assemblierende Monolage auf einem Metallsubstrat. Abbildung angelehnt an Love *et al.*, *Chemical Reviews* 2005.¹⁴

Solche assemblierenden Moleküle verfügen typischerweise über drei funktionelle Untereinheiten (Abbildung 10): Eine Kopfgruppe, die möglichst selektiv und mit hoher Affinität mit dem Substrat reagiert, die Spacergruppe, die für die Orientierung und Stabilität der Filme verantwortlich ist und die Endgruppe, die die Eigenschaften der präparierten Oberfläche bestimmt.

In den 1970er-Jahren wurde entdeckt, dass Organotrithlorsilane (OTS) auf Glas stabile Monolagen bilden.⁸⁶ Sie beruhen auf der Bildung stabiler Si-O-Bindungen und erlaubten erstmals die Präparation funktionalisierter Monolagen. Ein noch heute weit verbreitetes und flexibleres System wurde 1983 erstmals von Nuzzo und Allara beschrieben.⁸⁷ Sie zeigten, dass langkettige Disulfide auf Gold hochgeordnete und dichtgepackte Schichten bildeten. Qualitativ noch hochwertigere Filme bilden Thiole auf Gold, die seitdem die wichtigsten und am besten charakterisierten selbstassemblierenden Substrat-Adsorbat-Systeme darstellen. Diese Paarung bietet gegenüber anderen SAM-bildenden Systemen den Vorteil, dass Thiole als weiche Nucleophile eine hohe Affinität zu Gold aufweisen, die Bindungsenergie beträgt $\sim 300 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.⁸⁸ Harte funktionelle Gruppen werden dagegen nur schwach adsorbiert (HSAB-Prinzip),⁸⁷ für Amine beispielsweise liegt die Bindungsenergie bei vergleichsweise geringen $\sim 20 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.⁸⁹ Des Weiteren lassen sich die Goldfilme durch Vakuumbedampfung relativ einfach präparieren. Diese Filme bilden durch die Inertheit von Gold an Luft keine Oxidschichten wie andere Münzmetalle und erlauben es, ohne Inertgasatmosphäre zu arbeiten.⁹⁰ Neben der einfachen Präparation solcher monomolekularer Schichten durch Eintauchen der Oberfläche in eine Lösung des gewünschten Sulfids (oder auch Disulfids) bietet diese Methodik hohe Packungsdichten, Stabilität und chemische Uniformität.

Die Kinetik des Assemblierungsprozesses in Lösung verläuft in drei Schritten (Abbildung 11).⁹¹ Zunächst adsorbieren die Thiole ungeordnet bis zur Sättigung der Oberfläche. Dieser Schritt kann durch die Langmuir-Isothermen beschrieben werden und findet innerhalb von Sekunden bis Minuten statt.⁹² Der genaue Mechanismus dieser Chemisorption ist nach wie vor nicht gänzlich aufgeklärt. Formal lässt er sich jedoch als oxidative Addition von Au^0 an die Thiolbindung beschreiben, der die reduktive Eliminierung von H_2 folgt:



Anschließend und deutlich langsamer wandern die „liegenden“ Moleküle auf ihre Gitterplätze und richten sich auf. Im letzten, langsamsten Schritt findet die abschließende Ordnung in eine *all-trans*-Konformation statt.⁹³ Van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten sind die Triebkräfte, die die Umordnung zu dichtgepackten kristallinen Filmen vorantreiben.

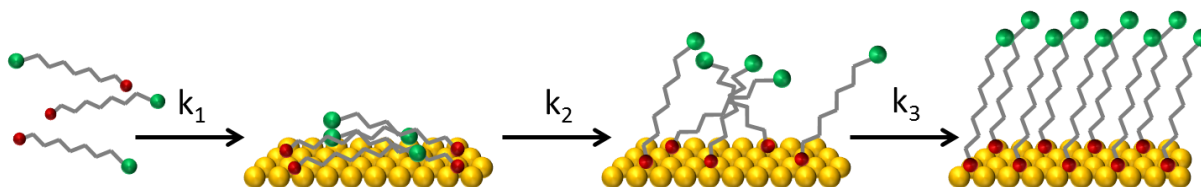


Abbildung 11. Dreistufiger Assemblierungsprozess von Alkanthiolen auf Gold. Abbildung angelehnt an Schwartz *et al.*, Annual Review of Physical Chemistry 2001.⁹³

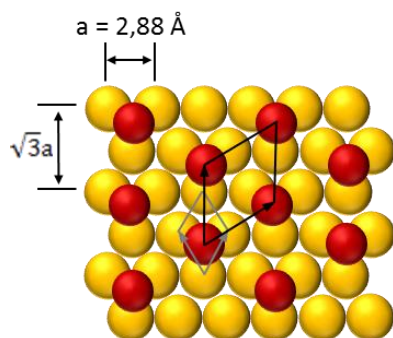


Abbildung 12. Gitterstruktur von Thiol-Molekülen (rot) auf einer Gold(111)-Oberfläche (gelb). Die grauen Pfeile zeigen die Basisvektoren und Einheitszelle der Goldstruktur, die schwarzen Pfeile die der Thiolatüberstruktur. Abbildung angelehnt an Ulman *et al.*, Chemical Reviews 1996.⁹⁴

Die hochsymmetrische Struktur der Thiolate auf Au(111)-Oberflächen wurde durch eine Vielzahl von Methoden wie Elektronenbeugung und STM bestimmt (Abbildung 12). Sie lässt sich nach Wood'scher Notation als $(\sqrt{3}\times\sqrt{3})R30^\circ$ -Überstruktur beschreiben. Die Schwefelatome sitzen dabei in den Lücken („*hollow*“-Positionen) des Au-Gitters, womit ihr Abstand mit $4,99 \text{ \AA}$ deutlich größer als ihr Van der Waals-Radius ($1,85 \text{ \AA}$) und dem optimalen Abstand der Alkyl-Ketten ($4,6 \text{ \AA}$) ist.⁹⁴⁻⁹⁶ Um die Van der Waals-Wechselwirkungen zu maximieren, sind die Alkylketten daher um $\sim 30^\circ$ bezüglich der Oberflächennormalen geneigt, was beispielsweise durch IRRAS und NEXAFS-Messungen nachgewiesen werden konnte.⁹⁶ Für die beschriebene

Struktur nimmt jedes Thiolmolekül eine Fläche von $21,4 \text{ \AA}^2$ ein, was einer Packungsdichte von $4,7 \text{ Molekülen}\cdot\text{nm}^{-2}$ entspricht.^{20,97-98} Bei Ag(111)-Oberflächen, deren Gitterstruktur ähnlich zur Au(111)-Oberfläche ist (Abstand der Ag- und Au-Atome $2,89 \text{ \AA}$ bzw. $2,88 \text{ \AA}$) beträgt der Abstand zwischen den S-Atomen nur $4,54 \text{ \AA}$. Alkanthiole können sich dadurch sehr ähnlich zu ihrer idealen Kristallstruktur anordnen und zeigen auf diesen Gittern nahezu keinen Kippwinkel,^{94,99} auch die Packungsdichte ist mit $5,2 \text{ Molekülen}\cdot\text{nm}^{-2}$ höher.²⁰

Im Großteil der publizierten Studien zur Struktur von selbst-assemblierten Thiolen auf Gold wurde die Au(111) Kristallebene untersucht.¹⁰⁰ Auf den anderen möglichen Netzebenen weicht die exakte Struktur der assemblierten Moleküle ab.¹⁴ Bei polykristallinen Goldsubstraten, die bei der Bedampfung von Oberflächen mit dem Edelmetall entstehen, wird es hauptsächlich in Au(111)-Körnern abgeschieden, die durch atomare Terrassen voneinander abgesetzt sind.¹⁰¹ An diesen Stufen kommt es zu Defekten in der hochgeordneten SAM-Struktur.^{100,102}

GEMISCHTE SAMs

SAMs müssen nicht nur aus einer Thiolspezies bestehen, sie können auch aus Molekülen mit verschiedenen Endgruppen zusammengesetzt sein. Solche gemischten SAMs bieten die Möglichkeit, auch Monolagen mit Endgruppen zu assemblieren, die beispielsweise aufgrund ihrer Größe im reinen Zustand keine geordneten Schichten bilden.¹⁰³ Außerdem können durch die Variation der Zusammensetzung die Oberflächeneigenschaften gezielt und systematisch modifiziert werden. Zur Präparation solcher gemischter SAMs gibt es prinzipiell drei Ansätze: Die Assemblierung von

asymmetrischen Disulfiden (R-SS-R'), die Adsorption von asymmetrischen Dialkylsulfiden (R-S-R') oder die Assemblierung aus einer Lösung, die eine Mischung von Thiolen enthält (R-SH + R'SH).¹⁴ Bei der letztgenannten Methode entspricht die resultierende Zusammensetzung der Monolage nicht zwangsweise der der Thiole in der Lösung, denn Lösungsmittel, Kettenlängen und Endgruppen der verwendeten Thiole beeinflussen den genauen Assemblierungsmechanismus.¹⁰⁴⁻¹⁰⁷ Außerdem kann es bei zu großen Unterschieden zwischen den verschiedenen Spezies zur Phasentrennung kommen.¹⁰⁸ Grundsätzlich konnten drei Typen von Assemblierungsverhalten klassifiziert werden, abhängig von der Kombination der verwendeten Komponenten.¹⁰⁹ Bei Thiolen mit neutraler Terminierung, wie beispielsweise Methyl- und Hydroxylgruppen, kann die Zusammensetzung der assemblierten Monolage nahezu linear von ihrem Verhältnis in der Lösung abhängen.¹⁰⁴ Bei der Mischung einer neutralen mit einer geladenen Komponente dagegen ist die Adsorption der ungeladenen Komponente favorisiert.¹⁰⁹⁻¹¹² Im Fall geladener Endgruppen wurde eine ladungsgesteuerte Assemblierung beobachtet, die nahezu unabhängig von der ursprünglichen Lösungszusammensetzung in neutralen Monolagen mit gleichen Anteilen der Bausteine und damit zwitterionischen Eigenschaften resultierte.¹¹³⁻¹¹⁴ Diese „ideale Nichtidealität“ ist von einer Reihe von Thiolkombinationen bekannt.¹⁰⁹ Anhand von Ethanhiolen mit Amino- und Sulfonsäureterminierung beschrieben Ooi *et al.* den Mechanismus erstmals umfassender.¹¹³ Daraufhin wurde auch das Assemblierungsverhalten von längerkettigen Thiolen aus wässriger Pufferlösung detaillierter charakterisiert.¹¹⁴ Es konnte gezeigt werden, dass die Kombination eines ammoniumterminierten Moleküls mit einwertigen Säurethiolen (Sulfon- und Carbonsäure) ebenfalls nahezu unabhängig von der Lösungszusammensetzung zu neutralen Monolagen führte. Auch für die Paarung des Sulfonsäurethiols mit einem aminoterminierten Molekül wurde für DMSO als Lösungsmittel eine analoge Beobachtung dokumentiert.¹¹⁵ Des Weiteren ist die Assemblierung aus Ethanol mit Säurebehandlung im Reinigungsschritt bekannt.¹¹⁶ Für die Sulfonat- mit Ammoniumkombination wurde erneut eine lösungsunabhängige ausgeglichene Zusammensetzung der resultierenden Monolage beschrieben, wogegen im Fall einer Phosphonsäureterminierung als Säurekomponente diese überwog.¹¹⁶

2.3 Inerte Oberflächen

In der Natur gibt es eine Reihe von biologischen Oberflächen, sowohl im marinen als auch im biomedizinischen Bereich, die dem Befall durch *Biofouling* in jeglicher Form widerstehen können. In den meisten dieser Fälle ist es eine Kombination von verschiedenen Abwehrstrategien auf Verhaltens-, mechanischer, physikalischer und chemischer Ebene die den Erfolg ausmacht.^{13,117} Die Grundlage bietet häufig eine Strukturierung der jeweiligen Oberfläche, einige von vielen Beispielen sind Hai- und Walhaut, Muschelschalen oder Algenoberflächen.¹¹⁸ Zusätzlich zu solchen physikalischen Aspekten kommen oft bioaktive Substanzen zum Einsatz.¹¹⁹ Die Haut des Pilotwals *Globicephala melas* ist ein anschauliches Beispiel für die effektive Kombination verschiedener *Antifouling*-Faktoren: Sie weist eine nanoporöse Strukturierung auf, deren Dimensionen die Anhaftung verschiedener Organismen reduziert. Außerdem sind die Zwischenräume mit einem Gel gefüllt, das die Adhäsive von anhaftenden Mikroorganismen hydrolysiert.¹¹⁸

Um erfolgreiche Strategien in kommerziellen Beschichtungen umsetzen zu können, müssen sie im Detail verstanden werden. Modelloberflächen wie SAMs sind in diesem Zusammenhang ein wichtiges Werkzeug, da sie es erlauben, den Einfluss einzelner systematisch variierbarer Parameter bei Konstanz aller anderen zu untersuchen. Anhand dieser vereinfachten Modellsysteme konnte die Rolle einer Reihe von Oberflächeneigenschaften im Zusammenhang mit Resistenzeigenschaften identifiziert werden. Grundlegende Arbeiten dazu fanden in den 1990er-Jahren in der Whitesides-Gruppe statt, welche hauptsächlich auf die Proteinresistenz fokussiert waren.^{19,120-121} Es wurde festgestellt, dass Oberflächen potentiell inert sind, wenn sie (i) hydrophil sind, (ii) über Wasserstoffbrücken-Akzeptoren aber (iii) keine Wasserstoffbrücken-Donoren verfügen und (iv) insgesamt elektrisch neutral sind.¹²² Auch wenn diese „Design-Regeln“ weite Bereiche abdecken, treffen sie nicht immer vollständig zu.

In den folgenden Abschnitten wird zunächst der Einfluss einiger einzelner Oberflächeneigenschaften detaillierter im Kontext des *Biofouling*s erläutert. Im Anschluss werden Stoffklassen vorgestellt, deren inerte Eigenschaften bekannt sind und die die Basis für die in dieser Arbeit verwendeten Modellsysteme bilden.

2.3.1 Oberflächenenergie und Benetzbarkeit

Die charakteristische freie Oberflächenenergie eines Festkörpers resultiert aus der exponierten Lage der Oberflächenmoleküle, die weniger Bindungspartner haben als die Moleküle im unterliegenden Festkörper.¹²³ Sie lässt sich nicht direkt messen, ist jedoch über die Benetzbarkeit durch Flüssigkeiten bestimmbar. Anschaulicher ist die ihr entsprechende Oberflächenspannung bei Flüssigkeiten, die die Arbeit beschreibt, die zur Vergrößerung der Flüssigkeitsoberfläche notwendig ist.

Baier fasste 1970 empirische Daten zwischen Biokompatibilität und Oberflächenspannung in der nach ihm benannten „Baier-Kurve“ zusammen (Abbildung 13 A).¹²⁴ Aus ihr wird ersichtlich, dass die Oberflächenspannung einen starken Einfluss ausübt und die akkumulierte Biomasse bei Werten um $\sim 30 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-1}$ minimal wird. Später wurde der zugehörige Wasserkontaktwinkel von $\sim \theta = 65^\circ$ als „Berg-Limit“ definiert.¹²⁵⁻¹²⁶ In diesem Bereich ist die Oberflächenenergie der dispersiven Komponente von Wasser sehr ähnlich, d.h. die Verdrängung des Wassers durch die Haftmittel eines Organismus führt zu keinem Energiegewinn mehr.¹³ Diese frühen Erkenntnisse finden auch Entsprechung im *Biofouling*-Bereich. Abbildung 13 B zeigt beispielhaft die Ergebnisse von Proteinadsorptions- und Algen-Besiedlungsexperimenten auf verschiedenen terminierten SAMs. Auch hier zeigt sich der von Baier beobachtete nicht-lineare Verlauf, allerdings mit einem Minimum bei einem Kontaktwinkel von $\sim 30^\circ$.⁶²

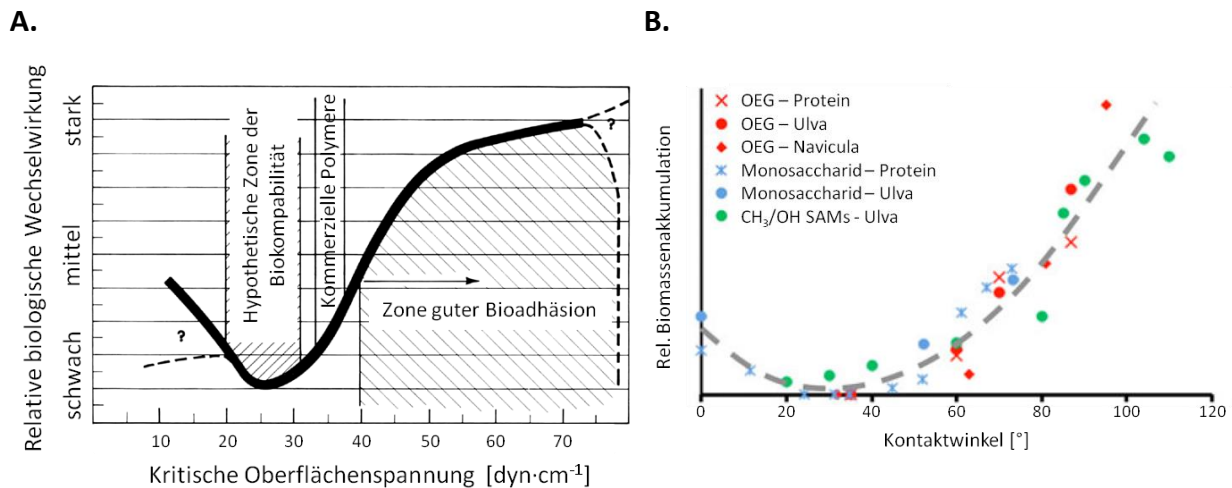


Abbildung 13. A. Baier-Kurve, der empirische Zusammenhang zwischen akkumulierter Biomasse und Oberflächenspannung. Abbildung angepasst aus Baier *et al.*, Management of occlusive arterial disease, 1971.¹²⁴ **B.** Zusammenhang zwischen dem Kontaktwinkel verschieden terminierter SAMs und der Biomassenakkumulation in Form von Proteinen, *Ulva*-Sporen und *Navicula*. Abbildung angepasst aus Rosenhahn *et al.*, Biointerphases 2012.⁶²

Auch für marine Bakterien zeigte sich, dass die Tendenz zur Adhäsion mit zunehmender Hydrophobizität zunimmt.¹⁷ In analogen Studien, basierend auf SAMs mit systematisch variierender Benetzbarkeit, wurde ein entsprechendes Verhalten auch für *Ulva* Sporen beobachtet. Diese hafteten jedoch auf den stärker besiedelten hydrophoben Substraten schwächer als auf hydrophilen, auf denen die Adhäsion vermindert war.^{16,127} Als Ursache für diese Abschwächung der Haftstärke wurde der kleinere Kontaktwinkel zwischen dem Adhäsiv und den hydrophilen Oberflächen angenommen, wodurch die Kontaktfläche maximiert wird und eine stärkere Bindung ermöglicht.¹²⁸ Für Diatomeen der Gattung *Amphora* wurde dagegen auf einer ähnlichen Proben-Matrix das umgekehrte Verhalten beobachtet. Auf hydrophilen Substraten war die Besiedlungsdichte höher, während die Adhäsionsstärke auf hydrophoben stärker war.¹⁶ Auch auf polymeren Beschichtungen konnte diese entgegengesetzte Haftstärketendenz von *Ulva* und Diatomeen beobachtet werden.¹²⁹ Im Fall von Seepocken-Larven gibt es zahlreiche, zum Teil aber widersprüchliche Aussagen in der Literatur, abhängig von der Natur des verwendeten Probenotyps.¹³⁰ Im Fall der oben erwähnten einfachen Alkanthiole konnte im Vergleich allerdings eine Präferenz für die hydrophobe Terminierung für die Spezies *B. amphitrite* dokumentiert werden.¹³¹

Die Benetzbarkeit ist offensichtlich also ein wichtiger, aber nicht zwingend entscheidender Faktor für die Speziesantwort auf ein Substrat. Ista *et al.* untersuchten beispielsweise das Adhäsionsverhalten von *Ulva*-Sporen auf gemischten SAMs aus einem hydrophoben und unterschiedlichen hydrophilen Bausteinen (hydroxy- oder carboxylterminiert). Auf Substraten mit gleicher Benetzbarkeit, aber unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung zeigten die Algenzellen ein differenzierbares Besiedlungsverhalten. Diese Beobachtungen deuteten auf weitere Einflussfaktoren, wie beispielsweise die Ladung deprotonierter Säuregruppen, hin.¹⁷ Zu ähnlichen Ergebnissen führten analoge Untersuchungen, die Saccharid-terminierte SAMs mit aliphatischen gemischten Monolagen verglichen. Auch hier zeigten Bakterien, *Ulva* Sporen und Seepockenlarven auf Oberflächen mit gleichen Kontaktwinkeln unterschiedliche Besiedlungsverhalten.¹³²

2.3.1.1 Amphiphile Oberflächen

Amphiphile (von altgriechisch ἀμφί *amphí* „auf beiden Seiten“ sowie φίλος *philos* „liebend“) Systeme sind solche, die gleichzeitig über hydrophile und hydrophobe Komponenten verfügen. Da hydrophile Beschichtungen oft antiadhäsiv, hydrophobe dagegen adhäsionsstärkemindernd wirken und außerdem verschiedene Spezies unterschiedliche Präferenzen aufweisen, liegt es nahe, beide Bausteine in einem optimalen Verhältnis zu kombinieren.¹²⁹ Als Wirkmechanismus für diese doppelt-funktionellen Beschichtungen wird vermutet, dass sie ihre Konformation umgebungsabhängig ändern können und somit für die Haftstoffe der Organismen „uneindeutige“ Eigenschaften präsentieren, was ihre permanente Adhäsion verhindert.^{28-29,133} Zahlreiche polymerbasierte Studien zeigten den Erfolg dieses Konzepts:¹³⁴ Gudipati *et al.* beispielsweise präparierten fluorierte PEG-Polymere, die sich durch hohe Proteinresistenz und gute „Fouling-Release“-Eigenschaften auszeichneten.²⁷ Auch amphiphile Block-Copolymere zeigten vielversprechende Eigenschaften: sie reduzierten Besiedlungsdichte und Adhäsionsstärke von sowohl *Ulva* Sporen und jungen Pflanzen als auch *Navicula*, zwei Spezies, die auf Beschichtungen gleicher Benetzbarkeit sonst entgegengesetzte Präferenzen aufweisen.^{28-29,129,133}

2.3.2 Hydratation

Anhand von Poly(Ethylenglykol)-basierten (PEG) Beschichtungen wurde die Fähigkeit zur Hydratation als wichtige Eigenschaft für proteinresistente Oberflächen identifiziert. Da solche Polymere jedoch eine Vielzahl von Parametern aufweisen (z.B. Kettenlänge, Kopplungsdichte), die ihre Wechselwirkungen mit der Umgebung bestimmen, wurde der alleinige Einfluss der Hydratation durch systematische Untersuchungen von SAMs mit variablen Endgruppen untersucht. Das Grundgerüst der SAMs bestand aus einer Thiol-Ankergruppe und einem Alkylgerüst konstanter Kettenlänge. Ausgehend von dieser Grundstruktur konnte dann zum einen die Anzahl endständiger an Ethylenglykol-(EG)-Einheiten und zum anderen, bedingt durch das verwendete Substrat oder die Mischung mit anderen SAMs, die Packungsdichte solcher EG-SAMs variiert werden.^{19-20,135} Diese Präparationsvarianten boten die Möglichkeit, den Grad der Hydratation innerhalb der EG-Terminierung zu bestimmen und minimierten den Einfluss der „sterischen Repulsion“ für die Proteinresistenz.¹³⁶ Dabei korrelierte die Fähigkeit, Wasser fest in tieferen Bereichen als nur der Oberfläche einzulagern, mit der Anzahl der EG-Einheiten und der molekularen Konformation der Oligomere.¹³⁵⁻¹³⁷

Ob die Anlagerung von Proteinen oder den EPS von *Biofoulern* irreversibel ist, hängt dann davon ab, ob die Verdrängung des Hydratationswassers an der Grenzfläche ein energetisch günstiger Prozess ist.^{4,138} Theoretische Studien untermauerten diese Hypothese. Es konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu aliphatischen Endgruppen nur hydratisierte Oligoethylenglykol-(OEG)-SAMs repulsive Kräfte auf Proteine ausübten,¹³⁹ die durch die Wechselwirkungen zwischen Wassermolekülen und Protein verursacht wurden.¹⁴⁰ Schilp *et al.* verifizierte diesen Zusammenhang anhand der Adhäsion von Proteinen und *Ulva*-Sporen.²² Eine Mindestanzahl von zwei EG-Einheiten war zu deren Reduzierung notwendig. Mit zunehmender EG-Kettenlänge nahmen außerdem die adsorbierte Proteinschicht und Sporendichte bis zur vollständigen Resistenz weiter ab. Eine genauere Analyse des

Adhäsionsverhaltens der Sporen ergab, dass sie unabhängig von der Länge der EG-Einheiten den vollständigen Adhäsionsprozess durchliefen. Die permanente Adhäsion war jedoch nur bei Endgruppen mit nur einer EG-Einheit stark genug, um irreversibel zu sein. In einer analogen Studie mit marinen Bakterien wurde die gleiche Tendenz zu schwächer werdenden Haftstärken mit zunehmenden EG-Einheiten beobachtet.¹⁴¹

In verwandten Studien wurde untersucht, ob ein hoher Hydratationsgrad allein ausreicht, um ausgeprägte Resistenzeigenschaften zu bewirken. Ausgehend von einem SAM-System mit konstanter Anzahl von EG-Einheiten, also gleichbleibender Hydratation, wurden deren Endgruppe und damit die Benetzbarkeit variiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Proteinresistenz mit steigendem Kontaktwinkel abnahm.²⁰ Ein analoges Verhalten wurde bei der Besiedlung von *Ulva* Sporen und *Navicula* beobachtet.²¹ Zur „vollständigen“ Resistenz muss eine OF also augenscheinlich sowohl über „interne“ Hydrophilie in Form einer starken Hydratation und „externer“ Hydrophilie durch eine hohe freie Oberflächenenergie verfügen.

Wie eingangs beschrieben, ist die Hydratation auch bei anderen Substanzklassen als Ethylenglykolen der vermutlich entscheidende Parameter für die beobachteten Resistenzen. Saccharidbasierte Systeme sind ein weiteres Beispiel für durch Wasserstoffbrücken stark hydratisierte Materialien. Die genaue Stärke der Wechselwirkungen mit Wasser hängt dabei empfindlich von der exakten Struktur der einzelnen Bausteine und deren Anordnung auf der Oberfläche ab.^{132,142}

Außer durch Wasserstoffbrücken kann eine starke Hydratisierung auch durch elektrostatische Wechselwirkungen verursacht werden, was bei zwitterionischen Verbindungen der Fall ist.¹⁴³⁻¹⁴⁴ In diesem Zusammenhang konnte durch theoretische Berechnungen gezeigt werden, dass die Hydratationsenergie zwitterionischer Moleküle deutlich höher ist als bei vergleichbaren OEGs.¹⁴⁵

2.3.3 Ladung

Schon in den von der Whitesides-Gruppe gefundenen Design-Regeln für inerte Oberflächen ist festgehalten, dass elektrische Neutralität sich positiv auf ihre Biokompatibilität ausübt. Dieses Prinzip wurde im Fall der Proteinresistenz gegenüber einer Reihe von Testproteinen auf Polymeroberflächen mit Ladungsgradienten bestätigt. Die minimale Adsorption der Proteine wurde in der Zone elektrischer Neutralität gefunden.¹⁴⁶ Auch auf SAMs basierende Arbeiten bestätigten, dass die gleichzeitige und ausgeglichene Anwesenheit von positiven und negativen Ladungsträgern, in diesem Fall eine zwitterionische Oberfläche, die Proteinresistenz maximierte.¹⁴⁷

Die meisten marinen Organismen weisen aufgrund der sie umgebenden EPS in ihrem physiologischen Bereich eine negative Nettoladung auf,¹⁴⁸ weshalb elektrostatische Wechselwirkung zwischen einer geladenen Oberfläche und den Organismen naheliegend ist. In Medien hoher Salinität haben solche Wechselwirkungen allerdings nur eine kurze Reichweite. Für Meerwasser wird beispielsweise für den Abstand zur Oberfläche, in der deren Potential auf $1/e$ abgenommen hat, eine Debye-Länge von 4 Å angenommen.¹⁴⁸

Dennoch gibt es eine Reihe von Studien, die darlegen, dass Oberflächenladungen beim Besiedlungsprozess eine Rolle spielen können. Die Dichte gesiedelter *U. linza*-Sporen wurde beispielsweise durch die Anwesenheit negativer Ladungsträger auf Testoberflächen reduziert.^{17,148}

Das durch die sie umhüllende EPS verursachte negative Zeta-Potential der Zellen deutete auf eine dominierende Rolle elektrostatischer Wechselwirkungen hin.¹⁵³ Ein besiedlungsfördernder Einfluss positiver Ladungen wiederum wurde auf kationischen Peptid-SAMs gezeigt. Allerdings muss bei diesen Ergebnissen die potentielle biologische Aktivität dieser Substanzklasse beachtet werden. Auf einer Serie von Peptiden mit zunehmendem Anteil an positivem Arginin nahm auch die Besiedlungsdichte immer mehr zu.¹⁴⁹ Auf die Diatomee *N. perminuta* konnte ein analoger Einfluss nicht beobachtet werden.¹⁵⁰ Auch für das Bakterium *C. marina* konnte der besiedlungsreduzierende Effekt negativer SAMs, der bei *U. linza* beobachtet wurde, nicht nachgewiesen werden.¹⁷ Für Cyprislarven von *B. amphitrite* hingegen konnte wieder ein Einfluss der Oberflächenladung nachgewiesen werden, sie siedelten bevorzugt auf SAMs mit negativer Terminierung.¹³⁰

2.3.4 Topographie

Die einleitend schon beschriebene Resistenz von natürlichen, strukturierten Oberflächen war die Basis für die sogenannte „Angriffspunkt-Theorie“ (engl. „attachment-point theory“).¹⁵¹⁻¹⁵² Diese besagt, dass die Anzahl möglicher Anhaftungspunkte, die den Mikroorganismen einer Topographie zur Verfügung stehen, entscheidend für deren Adhäsionswahrscheinlichkeit und -stärke ist. Grundsätzlich bieten glatte Oberflächen durch ihre größere Kontaktfläche andere Angriffspunkte als strukturierte (Abbildung 14). Morphologien, deren Dimensionen kleiner bzw. in der Größenordnung des betreffenden Organismus sind (Abbildung 14 B+C), reduzieren mögliche Anhaftungsstellen. Größere Strukturen bieten neben mehr Anhaftungspunkten außerdem Schutz gegenüber den Einwirkungen von hydrodynamischen Kräften (Abbildung 14 D).

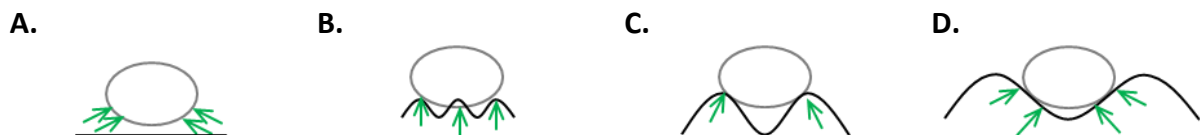


Abbildung 14. Schematische Zusammenfassung der Angriffspunkt-Theorie für Oberflächen mit zunehmender Strukturgröße A. Organismus auf einer glatten Oberfläche B. + C. Strukturen, die kleiner als der Organismus sind bieten weniger Adhäsionspunkte. D. Organismus in einer Struktur idealer Größe mit mehreren Angriffspunkten. Abbildung angelehnt an Scardino *et al.*, Biofouling 2006.¹⁵²

Demnach gibt es für Organismen verschiedener Größen auch verschiedene Strukturdimensionen, die ihre Ansiedlung fördern oder verhindern. Grob gilt, dass solche Dimensionen zur Adhäsionsprävention am effektivsten sind, die (50 - 90) % der Organismengröße entsprechen.¹⁵³ Studien von Scardino *et. al.* verifizierten diese Theorie anhand des Adhäsionsverhaltens von Kieselalgen verschiedener Größe auf mikrostrukturierten, von einer gewellten Muschelstruktur inspirierten, Polyimid-Oberflächen.¹⁵² Die Besiedlung war auf Strukturen, deren Hügelabstand etwas kleiner als die Zellen war, stark reduziert. Auch für *Ulva*-Sporen mit einem Durchmesser von (5 - 7) μm konnte gezeigt werden, dass ihre Besiedlungsdichte auf strukturierten PDMS-Substraten der Größenordnung 2 μm minimal wird.¹⁵⁴ Bei Larven von *B. amphitrite* dagegen waren Strukturen der Größenordnung 20 μm am effektivsten, die zwar deutlich kleiner als der Organismus an sich sind, aber in etwa der Größe der Tastantennen ($\sim 15 \mu\text{m}$) entsprechen.¹⁵⁵ Zusammenfassend zeigte sich ein Verhältnis von Höhe zu Abstand der Strukturelemente von 2 : 1 für beide Spezies am effektivsten.¹⁵⁵

Diese mit verschiedenen Modellorganismen gewonnenen Ergebnisse verdeutlichen, dass Oberflächenstrukturen mehrere Größenordnungen abdecken müssen, um eine universelle Lösung darzustellen.¹¹⁸ Die am *Biofouling*-Prozess beteiligten Organismen umspannen Größenordnungen von wenigen hundert Nanometern (z.B. Bakterien) bis zu einigen hundert Mikrometern (z.B. Seepockenlarven). Hierarchisch aufgebaute Strukturen sind daher auf der Topographie-Seite der vielversprechendste Ansatz zur Entwicklung bewuchsresistenter Oberflächen.¹⁵⁶

2.3.5 Beispiele potentiell inerter Substanzklassen

2.3.5.1 Poly(Ethylenglykol) (PEG)

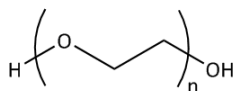


Abbildung 15. Struktur des Ethylenglykolgrundbausteins von PEGs.

Poly(Ethylenglykole) (PEG, Abbildung 15) sind eine Klasse von Polymeren, deren Resistenzeigenschaften vor allem im biomedizinischen Bereich bereits lange bekannt sind und dort beispielsweise als Beschichtung von Implantaten breite Anwendung finden.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ Sie sind nicht-toxisch, wasserlöslich und in einem breiten Molmassenbereich verfügbar.¹⁵⁷ Eine besonders ausgeprägte Wechselwirkung mit Wasser wird vor allem im Vergleich mit nah verwandten Polyetherhomologen mit einer größeren Zahl an aliphatischen Einheiten wie Poly(Propylenglykol) deutlich, die wesentlich schlechter löslich sind.¹⁶⁰ Diese Fähigkeit zur Hydratisierung der meist hydrogelartigen Beschichtungen ist ein Faktor für ihre ausgeprägte Resistenz gegen eine Reihe von Makromolekülen und Organismen. Durch die hohe Hydratationsenergie wird das Verdrängen der gebundenen Wasserschicht durch potentielle Adhäsive verhindert. Vor allem bei hochmolekularen, oberflächengebundenen PEGs kommt ein entropischer Faktor hinzu. Die „sterische Repulsions-Theorie“ erklärt, dass ein Verlust der sterischen Freiheiten der Polymerketten bei einer solchen Adsorption zusätzlich zur unvorteilhaften Energiebilanz dieses Prozesses beiträgt.¹⁶¹

Die Anwendungsgrenzen dieser Substanzklasse liegen in der Instabilität, welche aus der Neigung zur oxidativen Spaltung der Etherbindungen in Anwesenheit von Sauerstoff oder Übergangsmetallionen resultiert.¹⁶²⁻¹⁶³ Daher ist die Identifizierung weiterer Substanzklassen mit vergleichbaren Eigenschaften von großem Interesse.

2.3.5.1 Zwitterionische Polymere

Zwitterionische Materialien zeichnen sich durch funktionelle Gruppen aus, die gleichzeitig positive und negative Ladungsträger aufweisen.¹⁶⁴ Phosphorylcholine (PC, Abbildung 16 A) sind ein Beispiel für biomimetische Anwendungen, sie finden sich auf der äußeren Zellmembran und werden für deren nicht-thrombogene Eigenschaften verantwortlich gemacht.¹⁶⁵ Davon ausgehend wurden PC-modifizierte Polymere entwickelt, die sich durch hohe Proteinresistenz auszeichnen und beispielsweise Anwendung als Implantatbeschichtungen finden.¹⁶⁶⁻¹⁶⁸ Weitere Beispiele zwitterionischer Polymere sind Carboxy- und Sulfobetaine (CB und SB, Abbildung 16 B und C).

Im Vergleich zu PC-Polymeren sind sie einfacher zu synthetisieren, leichter in der Handhabung und stabiler.¹⁶⁹ Die Bandbreite von Anwendungsstudien reicht von Protein- und Plasmaresistenztests¹⁷⁰⁻

¹⁷¹ über Bakterienstudien,¹⁷² biomedizinische Anwendungen¹⁷³ bis zu einer Reihe von Experimenten mit marinen *Biofoulern*.^{168,174-175}

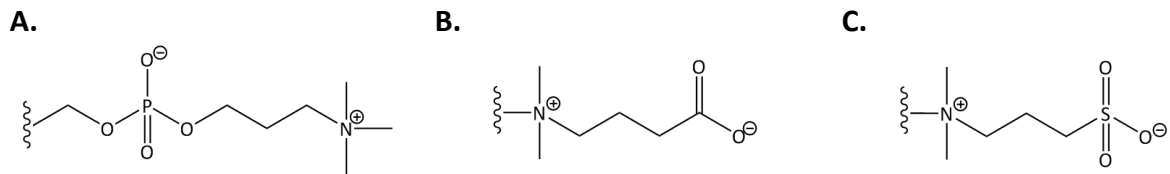


Abbildung 16. Strukturen von A. Phosphorylcholinen B. Carboxybetainen und C. Sulfobetainen.

Wie bei PEG-basierten Beschichtungen wird die hohe Resistenz dieser Substanzklasse auf ihre ausgeprägte Hydratisierung zurückgeführt. Allerdings wurden nicht Wasserstoffbrückenbindungen als Ursache für die Anbindung der Wassermoleküle identifiziert, sondern elektrostatische Wechselwirkungen.^{144,176-179}

DIE HOFMEISTER-SERIE

Ende des 19. Jahrhunderts untersuchte Franz Hofmeister die proteinfällende Wirkung verschiedener Salze.¹⁸⁰ Die nach ihm benannten „Hofmeister-Serien“ ordnen seitdem Anionen und Kationen nach ihrer Wirkung auf wässrige Lösungen von Biomolekülen:

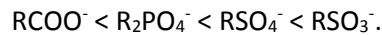
Tabelle 1. Hofmeister-Serie von Anionen und Kationen.¹⁸¹⁻¹⁸² Von links nach rechts nimmt die Fähigkeit, Proteine aus einer wässrigen Lösung auszufällen, ab.

| | | |
|--------------------------------|---|----------------------------------|
| Chaotrop | SCN ⁻ - ClO ₄ ⁻ - I ⁻ - NO ₃ ⁻ - Br ⁻ - Cl ⁻ - F ⁻ - H ₂ PO ₄ ⁻ - S ₂ O ₃ ²⁻ - SO ₄ ²⁻ - CO ₃ ²⁻ | Kosmotrop |
| Kosmotrop | Al ³⁺ - Mg ²⁺ - Ca ²⁺ - Ba ²⁺ - Li ⁺ - Ag ⁺ - Na ⁺ - K ⁺ - NH ₄ ⁺ - NMe ₄ ⁺ | Chaotrop |
| Stabilisierend (aussalzend) | Wirkung auf Proteine in Lösung | destabilisierend (einsalzend) |

Große, einfach geladene Anionen (mit entsprechend niedriger Ladungsdichte) wirken auf Wasserstoffbrücken „strukturbrechend“. Dies wird auf eine schwächere Wechselwirkung zwischen Wasser und den Ionen als der Ionen untereinander zurückgeführt, was eine Freisetzung der Wassermoleküle und damit eine Erhöhung der Entropie zur Folge hat. Diese Anionen werden als chaotrop bezeichnet.^{181,183} Im Gegensatz dazu wechselwirken Ionen mit einer hohen Ladungsdichte (klein, Mehrfachladung), stark mit Wasser und brechen so intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen auf. Solche Anionen nennt man kosmotrop.¹⁸³⁻¹⁸⁴ Sie verstärken vorhandene hydrophobe Effekte und führen somit durch Proteinaggregation zu deren Ausfällen. Diese von Hofmeister noch als „Wasseranziehungsvermögen“ beschriebene Eigenschaft entspricht neuen Studien zufolge der Hydratisierung, die direkt die Ordnung innerhalb der Reihe bestimmt. Anders als früher angenommen, beeinflusst dieser Ioneneffekt nicht das gesamte Volumen, sondern lediglich deren direkte Umgebung.^{182,185} Entsprechend erklärten Collins *et al.*, dass kosmotrope Ionen eine geordnete Hülle aus fest gebundenen Wassermolekülen ausbilden, während chaotrope nur schwach hydratisiert sind und keinen Ordnungseffekt auf ihre direkte Umgebung ausüben.¹⁸⁶

Neben der Proteinlöslichkeit konnte gezeigt werden, dass auch andere Effekte dieser Abhängigkeit unterliegen.¹⁸⁷ Die empirischen Beziehungen finden beispielsweise auch im Kontext von Reibungsphänomenen, Löslichkeiten, Elektrolytaktivitäten, Polymer- und Oberflächenchemie Anwendung.¹⁸⁸⁻¹⁸⁹

Während die klassische Hofmeister-Serie nur anorganische Ionen umfasste, konnten durch Simulationen auch organische Ladungsträger nach den angewandten Kriterien qualifiziert werden.¹⁸⁷



Carboxylat ist demnach als kosmotropes, Sulfonat als chaotropes Ion einzuordnen. Diese Unterschiede zeigten sich auch in Berechnungen zur Hydratation von Betainen, die sich in der anionischen Endgruppe unterschieden. Der negative Teil von Carboxybetaine interagiert stärker mit vorhandenen Wassermolekülen, die Sulfonatgruppen von Sulfobetainen wurden von mehr, aber nur schwach wechselwirkenden Molekülen umgeben.¹⁴⁵

Im Zusammenhang mit proteinresistenten Oberflächen entwickelte die Whitesides-Gruppe die Hypothese, dass Moleküle, die in wässriger Lösung von der Oberfläche eines Proteins ausgeschlossen werden (Kosmotrope), sich als Basis für solche eignen.¹⁹⁰

Auch bei ionischen Flüssigkeiten spielt die Wechselwirkung zwischen Ionen, Wasser und Proteinen eine große Rolle.¹⁹¹ Diese organischen Salze sind im Gegensatz zu klassischen anorganischen Salzen bei Raumtemperatur flüssig.¹⁹² Durch ihren niedrigen Dampfdruck, geringe Entzündbarkeit und hohe thermische Stabilität sind sie den klassischen organischen Lösungsmittel häufig überlegen.^{191,193-194} Sie werden nach ihrer Mischbarkeit mit Wasser in hydrophil und hydrophob klassifiziert.¹⁹⁵ Eine große Variabilität von möglichen Ionenkombinationen ermöglicht es außerdem, die spezifischen Eigenschaften wie Viskosität, elektrische Leitfähigkeit oder Löslichkeit einzustellen.¹⁸⁴ Sie werden daher beispielsweise als hochspezifische Lösungsmittel für Enzymreaktionen verwendet, in denen die Stabilisierung dieser Biomakromoleküle wesentlich ist.¹⁹³ In diesem Zusammenhang konnten ebenfalls Hofmeister-Effekte auf Aktivität und Stabilität beobachtet werden.¹⁸⁴ Dieser Exkurs über ionische Flüssigkeiten soll vor allem die Rolle von Ladungsträgern und ihrer unterschiedlichen Auswirkungen auf die Stabilität von Proteinen deutlich machen, die auch im *Biofouling*-Zusammenhang relevant ist.

2.3.5.2 Polysaccharide

Polysaccharide (PS) sind natürliche, biokompatible Polymere, die oft wie PEG Hydratations- und Quelleigenschaften besitzen. Sie erfüllen eine Vielzahl von biochemischen und biomechanischen Aufgaben und sind daher von Natur aus auf spezifische Funktionen ausgelegt. Viele davon haben mit der selektiven Wechselwirkung mit Proteinen oder der Fähigkeit Wasser zu binden zu tun.^{24,196} Diese Eigenschaften machen sie zu Kandidaten für die Beschichtung von biomedizinischen Implantaten. Heparin beispielsweise wird bereits dafür angewendet.¹⁹⁷ Beschichtungen auf Basis von Algin- und Hyaluronsäure zeigen vielversprechende Resultate bei der Resistenz gegen Proteine, Säugetierzellen und Bakterien.²⁴ Auch im marinen Bereich gibt es unzählige Beispiele für die biologische Funktion und Aktivität von PS. Unter anderem wird ihnen eine Bedeutung in Immunfunktionen, Reproduktionsmechanismen und Adhäsiven zugeschrieben.¹⁹⁸ Durch die Vielzahl an möglichen Monomeren in

Kombination mit den unterschiedlichen Verknüpfungsmöglichkeiten und Kettenlängen bieten Polysaccharide einen riesigen Baukasten für potentielle Biomaterialien. Zur Beschichtung von Oberflächen eignen sich vor allem solche, die eine funktionelle Gruppe aufweisen, welche selektiv zur Verankerung mit anderen Gruppen reagieren kann.

Als Grundlage für die schon erwähnten Resistenzen immobilisierter PS gegenüber Proteinen, Bakterien und Zellen werden die auf Wasserstoffbrücken basierenden starken Wechselwirkungen mit Wasser angenommen.^{24,26,199-201} In einer auf diesen Erkenntnissen aufbauende Studie mit marinen Organismen konnte die erwartete Resistenz allerdings nicht gezeigt werden.²⁶ Die bekannte starke Wechselwirkung von sauren PS mit Ca(II)-Ionen, die im verwendeten marinen Medium vorhanden waren, wurde als Grund für diesen Befund identifiziert.

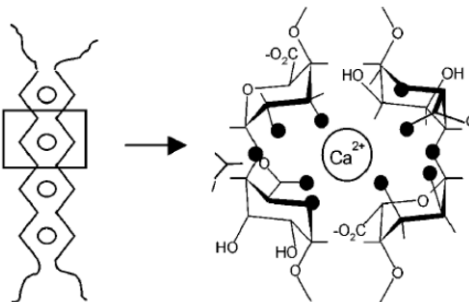


Abbildung 17. Schematische Darstellung des „egg-box –Modells“ am Beispiel der Komplexbildung von Ca(II)-Ionen durch Alginate. Durch die Komplexbildung der zweiwertigen Ionen werden Alginateketten verbrückt und ihre Struktur versteift sich. Abbildung aus Braccini *et al.*, *Biomacromolecules* 2001.²⁰²

Bei der Komplexbildung von zweiwertigen Ionen im PS-Netzwerk, beschrieben durch das sog. „egg-box“-Modell (Abbildung 17),²⁰³ versteift sich die Struktur der Polymerketten durch die verbrückende Wirkung der Kationen. Die Kationen werden durch diese Ordnung in die Strukturen eingebettet und verdrängen das gebundene Hydratwasser. Dieser als Synärese bezeichnete Prozess vermindert somit die Hydratisierung des Systems.

ALGINSÄURE

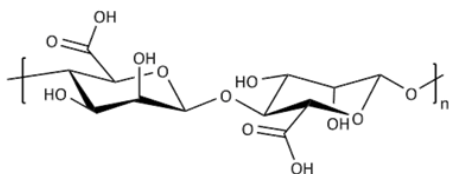


Abbildung 18. Struktur einer AA-Disaccharideinheit aus 2 M-Einheiten.

Alginsäure (AA, Abbildung 18) ist ein natürliches Polymer, das in der Zellwand von Braunalgen vorkommt und als extrazelluläre polymere Substanz (EPS) eine wichtige Rolle in der Matrixbildung von Biofilmen spielt.²⁰⁴ Es ist aus zwei Monosaccharideinheiten aufgebaut, β -D-Mannuronsäure (M-Einheit) und α -L-Guluronsäure (G-Einheit), die wiederum in verschiedenen Verhältnissen 1,4-glykosidisch verknüpft sein können.

HYALURONSÄURE

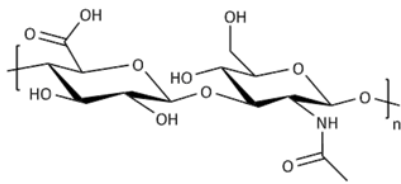


Abbildung 19. Struktur der HA-Disaccharideinheit.

Hyaluronsäure (HA, Abbildung 19) ist ein lineares PS, das zur Gruppe der Glykosaminoglykane (GAGs) gehört. Es kommt ubiquitär in der extrazellulären Matrix von Wirbeltieren vor, wobei es vor allem im Bindegewebe, Knochen und Knorpeln akkumuliert ist.²⁰⁵ Der Glaskörper des Auges besteht zu 2 % aus HA und bis zu 98 % aus Wasser, was die hydrogeltypische Fähigkeit große Wassermengen zu binden demonstriert.²⁰⁶

1934 wurde das PS erstmals aus dem Glaskörper von Rinderaugen isoliert, die Struktur konnte aber erst 20 Jahre später aufgeklärt werden.²⁰⁷ Die Disaccharideinheiten sind aus D-Glucuronsäure und *N*-Acetyl-D-glucosamin aufgebaut, die abwechselnd β -1,3- und β -1,4-glykosidisch verknüpft sind. Trotz der relativ einfachen Struktur weist HA eine Vielzahl von physiologischen Funktionen auf, wie der Rolle als Schmiermittel in Gelenken, der Matrixbildung in der Zellteilung oder in der Wundheilung.^{205,208} Der pK_s -Wert der Säuregruppen beträgt 3,4.²⁰⁹ Beim physiologischen pH von 7,4 sind die Polymerketten durch die dann deprotonierten Carboxylgruppen negativ geladen.²¹⁰

CHONDROITINSULFAT

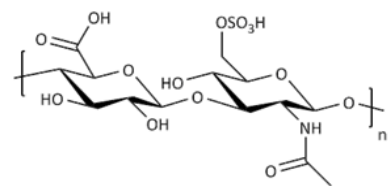


Abbildung 20. Struktur der CS-Disaccharideinheit, sulfatiert in 6-Position.

Chondroitinsulfat (CS, Abbildung 20) gehört wie HA zur Gruppe der Muco-PS. Das sulfatierte GAG ist aus *N*-Acetyl-D-Galaktosamin (GalNAc) und Glucuronsäure aufgebaut, die Position und Anzahl der Sulfatgruppen variiert je nach Gewebeart und Synthesebedingungen.²¹¹⁻²¹² Gewöhnlich liegt es an Proteine gebunden als Teil eines Proteoglykans vor. Wie HA kommt CS ubiquitär in der extrazellulären Matrix von Menschen und anderen Säugetieren vor,²¹³ außerdem findet

es sich im Knorpelgewebe, auf Zelloberflächen und in Zellorganellen und wurde als wichtiger Faktor in der Wundheilung identifiziert.²¹⁴ Es wurde außerdem aus einer Reihe von marinen Organismen und aus der schleimigen Schutzhülle von Fischen isoliert.^{198,215}

2.3.5.3 Poly(Hydroxyethylmethacrylat) (pHEMA)

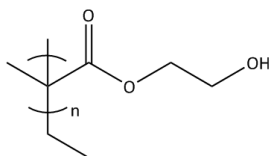


Abbildung 21. Struktur von Poly(HEMA).

Polymere aus Hydroxyethylmethacrylat (HEMA, Abbildung 21) sind hydrophile Materialien, die stark quellbare Hydrogele bilden.^{30,216} Sie werden in Kombination mit anderen Polymerbausteinen (als Copolymere) beispielsweise zur Herstellung von Kontaktlinsen verwendet.²¹⁷ Bei der Herstellung kommen meist

radikalische Polymerisationen zum Einsatz.²¹⁸⁻²¹⁹ Neben ausgeprägten Proteinresistenzigenschaften weisen sie im Vergleich zu PEG eine höhere Stabilität auf. Außerdem sind sie biokompatibel, was sie zu geeigneten Werkstoffen für biomedizinische Anwendungen macht.²¹⁸

2.3.6 Oberflächen-initiierte radikalische Polymerisationen

Zur kovalenten Anbindung von Polymeren an Oberflächen existiert eine große Bandbreite an Methoden. Dabei unterscheidet man prinzipiell zwischen „*grafting-to*“, der Anbindung eines Makromoleküls an eine vorfunktionalisierte Oberfläche und „*grafting-from*“, bei dem das Polymer erst auf der Oberfläche synthetisiert wird.²²⁰⁻²²¹

Bei der Anbindung eines „fertigen“ funktionalisierten Polymers an eine Oberfläche ist die erreichbare Kopplungsdichte durch limitierte Diffusionsraten und ungünstige entropische Faktoren, bedingt durch die notwendige Aufrichtung der Polymerketten, meist beschränkt. Bei Oberflächen-initiierten Polymerisationen dagegen, mit denen Polymere mit gut kontrollierbaren Eigenschaften synthetisiert werden können, spielen diese Faktoren eine sekundäre Rolle.²²²

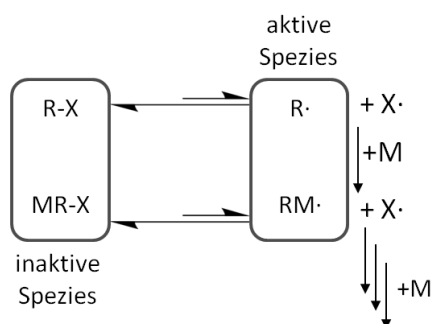


Abbildung 22. Genereller Mechanismus kontrollierter radikalischer Polymerisationen. Abbildung nach Schilp, Dissertation 2009.²²³

Als Beispiele solcher Reaktionen lassen sich kontrollierte radikalische Polymerisationen nennen. Zu ihnen gehören NMP (engl. „*nitroxide mediated free radical polymerization*, Nitroxid-vermittelte Polymerisation), ATRP („Atom Transfer Radikal Polymerisation“), und RAFT (engl. „*reversible addition-fragmentation chain transfer*“, reversibler Additions-Fragmentierungs-Kettentransfer).²²⁴

In Abbildung 22 ist der generelle Mechanismus solcher radikalischer Polymerisationen gezeigt: Durch einen Initiator entsteht im ersten Schritt ein Radikal, welches anschließend an die Doppelbindung eines Monomers bindet. Das um eine Monomereinheit verlängerte Radikal kann in Kettenwachstumsschritten an weitere Monomere addieren. Zum Kettenabbruch kommt es entweder durch Disproportionierung oder der Rekombination zweier Radikale. Für eine kontrollierte radikalische Polymerisation ist eine niedrige Konzentration von aktiven Spezies und ein Gleichgewicht dieser mit den inaktiven Spezies entscheidend, da dadurch vorzeitige Kettenabbruchreaktionen minimiert werden. Idealerweise starten alle Ketten gleichzeitig und wachsen gleichmäßig, woraus eine schmale Molmassenverteilung resultiert. Es kommt nicht zu Kettenabbruch- oder Übertragungsreaktionen, weshalb die reaktive Gruppe immer die gewachsene Polymerkette terminiert. Dadurch kann auch nach Verbrauch der zunächst vorhandenen Monomere die Reaktion neu gestartet werden, was beispielsweise zur Synthese von Blockpolymeren mit unterschiedlichen Abschnitten genutzt wird.²²⁵

NMP-Methoden erfordern meist extreme Reaktionsbedingungen und ATRP beruht auf Katalysatoren, oft Kupfer-basiert, weshalb sie im Zusammenhang mit der Präparation von Biomaterialien selten in Frage kommen.²²⁶ RAFT-Polymerisationen dagegen laufen schon bei milden Bedingungen und bei Anwesenheit nicht-toxischer, metallfreier Katalysatoren ab, zudem kann eine große Bibliothek an Monomeren verwendet werden.²²⁷ Kettenübertragungsreagenzien (CTA, von engl. „*chain transfer agent*“), auch RAFT-Reagenzien genannt, meist in Form von Dithioestern,²²⁸ moderieren die Reaktion dabei in einem entscheidenden Gleichgewicht von reversiblen Kettenübertragungen (Abbildung 23).

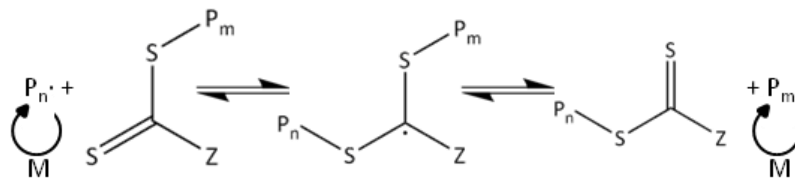


Abbildung 23. Zentrales Gleichgewicht im Mechanismus der RAFT-Polymerisation (M-Monomer, P-propagierendes Radikal).²²⁹

Die Initialisierung ist wie bei allen radikalischen Polymerisationen die Bildung des Initiatorradikals, das mit der ersten Monomereinheit reagiert. Dieses propagierende Radikal $P\cdot$ addiert an weitere Monomereinheiten, wodurch das Kettenwachstum stattfindet. Nach weiteren Gleichgewichtsschritten findet der zur Kontrolle entscheidende Schritt statt. Zunächst addiert eins der aktiven propagierenden Radikale an eine „ruhende“ Dithioester-Spezies. In den folgenden Gleichgewichtsreaktionen verteilt sich der radikalische Charakter auf die Spezies, bei denen noch kein Kettenabbruch stattgefunden hat. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit zum Kettenwachstum gleichmäßig verteilt, was eine schmale Polydispersität der entstehenden Produkte zur Folge hat.²²⁷

2.4 Analytische Methoden

In den folgenden Abschnitten werden die Grundlagen der verwendeten analytischen Methoden vorgestellt, die zur Charakterisierung der physiko-chemischen Eigenschaften, der chemischen Zusammensetzung und der Topographie der präparierten Testoberflächen verwendet wurden.

2.4.1 Kontaktwinkelmessung

Die Messung des Kontaktwinkels gibt Aufschluss über die Benetzbarkeit einer Oberfläche, mit der sich ihre Oberflächenenergie bestimmen lässt. Der Kontaktwinkel θ ist definiert als der Winkel, der zwischen einer an einen Flüssigkeitstropfen angelegten Tangente und einer Oberfläche gebildet wird. Wenn es sich bei der benetzenden Flüssigkeit um Wasser handelt, spricht man von hydrophilen oder hydrophoben Eigenschaften. In Abbildung 24 sind verschiedene Möglichkeiten illustriert, wie sich ein Wassertropfen auf einer Oberfläche verhalten kann. Eine einheitliche Definition von hydrophil und hydrophob ist in der Literatur nicht vorhanden.^{125,230} Vogler *et al.* beispielsweise bezeichneten Oberflächen mit Kontaktwinkeln $\theta < 65^\circ$ als hydrophil und solche mit $\theta > 65^\circ$ als hydrophob.¹²⁵

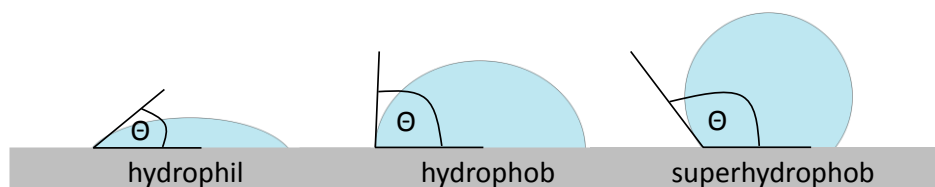


Abbildung 24. Wassertropfen auf einer hydrophilen, einer hydrophoben und einer superhydrophoben Oberfläche.

Der Kontaktwinkel wird von den beteiligten Grenzflächenspannungen zwischen Feststoff und Flüssigkeit γ_{SL} , Feststoff und Gasphase γ_{SV} , und Flüssigkeit und Gasphase γ_{LV} bestimmt. Die Young-Gleichung (2) beschreibt den Zusammenhang zwischen diesen Größen und dem Kontaktwinkel θ_Y unter Gleichgewichtsbedingungen.²³¹

$$\cos\theta_Y = \frac{\gamma_{SL} - \gamma_{SV}}{\gamma_{LV}} \quad (2)$$

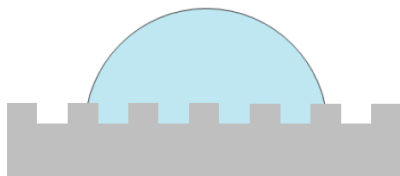
Diese Gleichung gilt nur für eine ideale Oberfläche, die glatt, chemisch homogen, inelastisch, unlöslich und inert ist. Nicht ideal sind beispielsweise strukturierte Oberflächen, bei denen die Rauigkeit der Oberfläche berücksichtigt werden muss. Ein Zusammenhang zwischen dem Young-Kontaktwinkel und dem Faktor r , der bei strukturierten Substraten das Verhältnis von tatsächlicher zu projizierter Oberfläche beschreibt, wurde von Wenzel gefunden:²³²

$$\cos\theta_W = r \cdot \cos\theta_Y \quad (3)$$

Für glatte Oberflächen gilt $r = 1$, für alle rauen wird $r < 1$. Aus der Gleichung wird ersichtlich, dass für hydrophobe Materialien ($\theta_Y > 90^\circ$) der makroskopische Kontaktwinkel mit wachsender Rauigkeit zunimmt, während für $\theta_Y < 90^\circ$ eine Abnahme erfolgt.

Diese Zusammenhänge gelten nur dann, wenn die Flüssigkeit die Oberfläche vollständig benetzt, dieses homogene Benetzungsverhalten ist in Abbildung 25 A gezeigt.

A.



B.

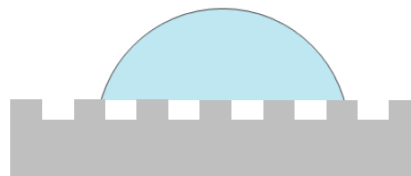


Abbildung 25. Veranschaulichung der Benetzung von rauen Oberflächen. A. Beim Wenzel-Modell wird die Luft aus den Zwischenräumen verdrängt und die gesamte Oberfläche benetzt. B. Beim Cassie-Baxter-Modell bleibt die Luft in den Zwischenräumen erhalten.

Bei heterogenem Benetzungsverhalten, bei dem die Flüssigkeit die Luft zwischen den Strukturen, wie in Abbildung 25 B gezeigt, nicht verdrängt, gilt für den Kontaktwinkel nach Cassie-Baxter:²³³

$$\cos\theta_{CB} = r \cdot f_{sl} \cdot \cos\theta_Y - (1 - f_{sl}). \quad (4)$$

Die Anteile des Festkörpers unter der Flüssigkeit f_{sl} werden hier separat von den unbenetzten Anteilen f_2 betrachtet, es gilt $f_2 + f_{sl} = 1$.

2.4.2 Ellipsometrie

Die Ellipsometrie ist ein Verfahren zur Bestimmung der optischen Eigenschaften von dünnen Filmen auf reflektierenden Substraten und beruht auf der Änderung der Polarisation von Licht beim Durchgang durch Materie. Durch deren Abhängigkeit von der durch das Material zurückgelegten Weglänge können die Schichtdicken solcher Filme bestimmt werden.

Licht kann als elektromagnetische Welle beschrieben werden, deren elektrische und magnetische Feldvektoren senkrecht zur Ausbreitungsrichtung und orthogonal zueinander orientiert sind. Im Folgenden ist es ausreichend, nur den elektrischen Feldvektor (E-Feldvektor) zu betrachten. Bei unpolarisiertem Licht haben die E-Feldvektoren verschiedener Wellen und deren Phasen keine feste Beziehung zueinander. In der Ellipsometrie wird linear polarisiertes Licht verwendet, das wiederum aus zwei senkrecht zueinander stehenden linear polarisierten Teilstrahlen E_s und E_p gleicher Phase dargestellt werden kann (Abbildung 26 A). Sind die Phasen von E_s und E_p bei gleicher Amplitude um

90° verschoben, ist die Polarisation der auslaufenden Welle zirkular. Bei jeder anderen Phasenverschiebung spricht man von einer elliptischen Polarisation, was zur Namensgebung der Ellipsometrie führte.

Bei der Wechselwirkung von Licht mit Materie wird ein Teil reflektiert und ein Teil transmittiert, wie in Abbildung 26 B gezeigt. Die Fresnel'schen Reflexionskoeffizienten beschreiben das Verhältnis von reflektierter zu einfallender Amplitude eines Lichtstrahls, der unter dem Einfallswinkel θ_1 auf die Oberfläche trifft und mit dem Winkel θ_2 im Material gebrochen wird. Dabei wird in den parallelen (r_p) und senkrechten (r_s) Anteil separiert, n_x sind dabei die Brechungsindizes des jeweiligen Materials:

$$r_p = \frac{n_2 \cdot \cos \theta_1 - n_1 \cdot \cos \theta_2}{n_2 \cdot \cos \theta_1 + n_1 \cdot \cos \theta_2}, \quad r_s = \frac{n_1 \cdot \cos \theta_1 - n_2 \cdot \cos \theta_2}{n_1 \cdot \cos \theta_1 + n_2 \cdot \cos \theta_2} \quad (5, 6)$$

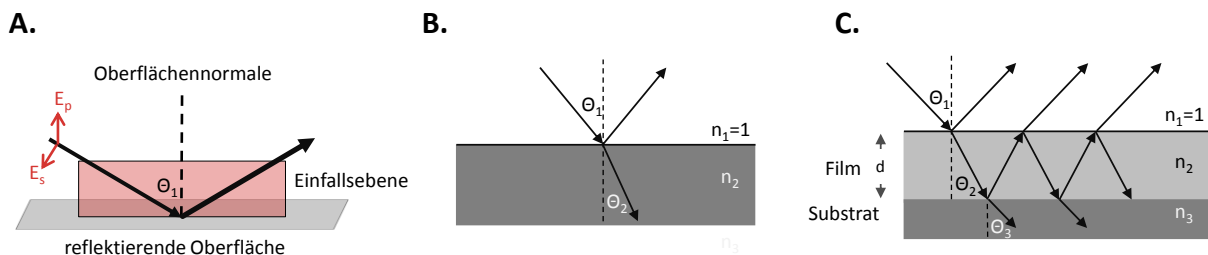


Abbildung 26. Modell der Reflexion und Transmission an A. an einer idealen reflektierenden Grenzfläche mit Kennzeichnung der Oberflächennormalen und der Einfallsebene, B. einer realen Grenzfläche und C. einem Film auf einem Substrat. Bilder in Anlehnung an Tompkins, A User's Guide to Ellipsometry, 1993.²³⁴

Handelt es sich um ein Mehrschichtensystem, kommt es an jeder Grenzfläche zu Reflexion und Transmission (Abbildung 26 C) und zur Wechselwirkung der verschiedenen reflektierten Wellen. Unter Berücksichtigung der Reflexionskoeffizienten zwischen den Materialien x und y (der r_p^{xy} und r_s^{xy}) beschreiben die totalen Reflexionskoeffizienten

$$R_p = \frac{r_p^{12} + r_p^{23} \cdot e^{-i2\beta}}{1 + r_p^{12} r_p^{23} \cdot e^{-i2\beta}}, \quad R_s = \frac{r_s^{12} + r_s^{23} \cdot e^{-i2\beta}}{1 + r_s^{12} r_s^{23} \cdot e^{-i2\beta}} \quad (7, 8)$$

wieder das Verhältnis von einfallender zu reflektierter Amplitude. Die Filmphasendicke β

$$\beta = 2\pi \left(\frac{d}{\lambda} \right) n_2 \cdot \cos \theta_2 \quad (9)$$

enthält die gesuchte Schichtdicke d .

Senkrecht und parallel zur Einfallsebene polarisiertes Licht wird also materialabhängig unterschiedlich reflektiert, was man sich in der Ellipsometrie zu Nutze macht. Gemessen werden die Änderung der Phasendifferenz zwischen einfallendem und reflektiertem Licht Δ und das Verhältnis der in senkrechten und parallelen Anteil separierten Amplitudenanteile $\tan(\Psi) = \frac{|R_p|}{|R_s|}$. In der Grundgleichung der Ellipsometrie

$$\rho = \tan(\psi) \cdot e^{i\Delta} \quad (10)$$

wird das Verhältnis dieser beiden Messgrößen beschrieben. Über die totalen Reflexionskoeffizienten ist darin die Information über die optischen Eigenschaften des untersuchten Films enthalten.

Die zugänglichen physikalischen Größen werden in Modellrechnungen so angepasst, dass der wellenlängenabhängige gemessene Verlauf beschrieben wird. Prinzipiell können dadurch die optischen Eigenschaften (Brechungsindex und Extinktionskoeffizient) und Schichtdicke eines Films bestimmt werden. Bei sehr dünnen Filmen ($< 50 \text{ \AA}$) müssen dafür zunächst Annahmen zu einem der beiden Parameter gemacht werden, um den anderen bestimmen zu können. Im Fall von transparenten (Extinktionskoeffizient $k=0$) organischen Medien wird für den wellenlängenabhängigen Verlauf des Brechungsindex $n(\lambda)$ häufig das Cauchy-Modell zugrunde gelegt:²³⁵

$$n(\lambda) = A + \frac{B}{\lambda^2} + \frac{C}{\lambda^4} \quad (11)$$

Im Fall organischer Monolagen kann für $A = 1,45$ angenommen werden, dieser Wert liegt im Bereich der typischen Brechungsindizes von Alkanthiolen.²³⁶ Für die anderen beiden Cauchy-Parameter wurden in dieser Arbeit $B = 0,01$ und für $C = 0$ angenommen.

In Abbildung 27 ist schematisch der typische Messaufbau eines Ellipsometers mit rotierendem Analysator gezeigt. Das von der Quelle erzeugte Licht ist zunächst unpolarisiert. In einem Polarisator wird es linear polarisiert und anschließend auf der Probe reflektiert. Der Polarisationszustand des reflektierten Strahls wird von einem rotierenden Polarisationsfilter analysiert und anschließend detektiert.

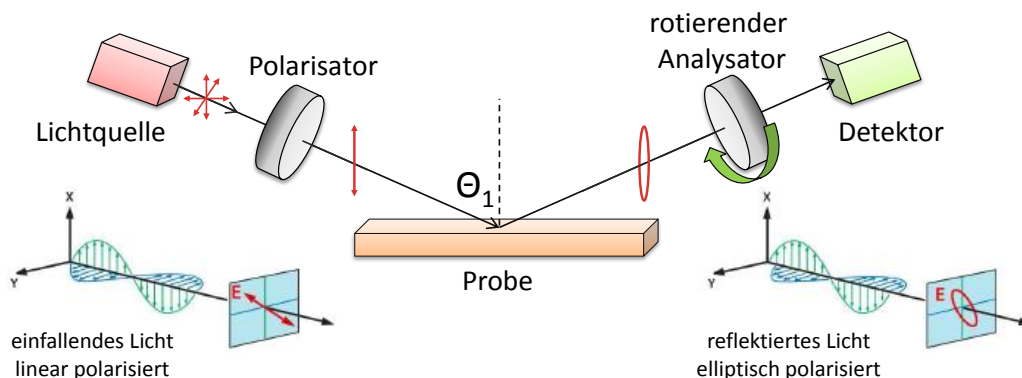


Abbildung 27. Schematischer Aufbau eines Ellipsometers. Angelehnt an J.A. Woollam, Ellipsometry Tutorial.²³⁷

2.4.3 Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS)

Die Röntgenphotoelektronenspektroskopie (engl. *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*, XPS) ist eine analytische Technik zur Untersuchung der elementaren Zusammensetzung von Oberflächen. Sie basiert auf dem 1905 von Einstein erklärten äußeren photoelektrischen Effekt, der darauf beruht, dass elektromagnetische Strahlung geeigneter Wellenlänge Photoelektronen aus Materialien herauslösen kann. Die kinetische Energie E_{kin} , über die diese emittierten Elektronen dann verfügen, ist charakteristisch für das Elementorbital aus dem sie stammen. Der Zusammenhang mit der Bindungsenergie E_B des Orbitals und der Anregungsenergie $h\nu$ wird durch die Einstein-Gleichung beschrieben:

$$E_B = h\nu - E_{kin} \quad (12)$$

Neben dem Elementorbital hängt die genaue Bindungsenergie außerdem von der chemischen Umgebung des jeweiligen Atoms ab. Oxidationsstufe, Hybridisierungszustand und Bindungspartner beeinflussen diese chemische Verschiebung, die sich in der Bezeichnung ESCA (*engl. electron spectroscopy for chemical analysis*, Elektronenspektroskopie zur chemischen Analyse), wie die XP-Spektroskopie auch genannt wird, zeigt. Durch die Verwendung weicher Röntgenstrahlung im Bereich weniger keV wird die Oberflächensensitivität der Methode gewährleistet. Die begrenzte mittlere freie Weglänge von Elektronen in Festkörpern bestimmt die Informationstiefe, die typischerweise ~ 10 nm beträgt.

In Abbildung 28 sind die beteiligten Energieniveaus eines Atoms bei der Wechselwirkung mit einem Röntgenphoton schematisch zusammengefasst. Außerdem werden die Energien der möglichen emittierten Teilchen und weitere dadurch mögliche Spektroskopiemethoden gezeigt. Der primäre Prozess ist die Emission eines Photoelektrons (Abbildung 28 A). Dessen kinetische Energie ist bei der XP-Spektroskopie noch um die Austrittsarbeit des Gerätes Φ vermindert. Der zurückbleibende angeregte Zustand hat nur eine kurze Lebensdauer, die Relaxation kann durch Röntgenfluoreszenz (Abbildung 28 B) oder die Emission eines sog. Auger-Elektrons (Abbildung 28 C), erfolgen. Die Röntgenfluoreszenz macht man sich bei der Röntgenfluoreszenzanalyse (RFA) zunutze, die im Gegensatz zur Photoelektronenspektroskopie nicht oberflächensensitiv ist. Beim Auger-Prozess sind neben dem ursprünglich emittierten Photoelektron noch 2 weitere Elektronen beteiligt. Das anfangs entstandene Loch in der Elektronenkonfiguration wird durch ein Elektron aus einem höheren Niveau aufgefüllt. Die dabei frei werdende Energie ΔE_A wird auf ein weiteres, höher liegendes Elektron übertragen. Die kinetische Energie E_{Aug} dieses Auger-Elektrons ist demnach, im Gegensatz zu den primär emittierten Photoelektronen, unabhängig von der ursprünglichen Anregungsenergie. Auch die Auger-Elektronenspektroskopie (AES) kann zur oberflächensensitiven Identifizierung der elementaren Zusammensetzung herangezogen werden.

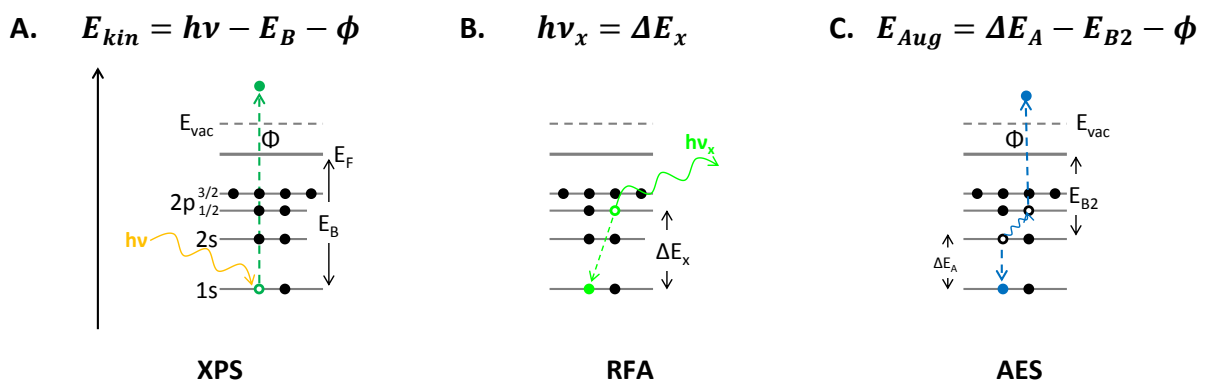


Abbildung 28. Beteiligte Energieniveaus bei Anregung (A) und Relaxation (B und C) eines Atoms durch Röntgenstrahlung und deren spektroskopische Anwendung. A. Anregung eines Photoelektrons durch ein Röntgenquant, die Photoelektronen werden bei der XP-Spektroskopie (XPS) detektiert B. Relaxation durch Röntgenfluoreszenz, genutzt bei der Röntgenfluoreszenzanalyse (RFA) C. Relaxation durch Emission eines Auger-Elektrons, genutzt bei der Auger-Elektronenspektroskopie (AES). E_F – Fermi-Energieniveau, E_{vac} – Vakuumenergie. Abbildung nach Meyerbröcker, Dissertation 2012.²³⁸

Die Energie der Photoelektronen dagegen nimmt bei steigender Anregungsenergie nach Gleichung (12) zu. Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit, durch variierende Anregungsenergien unterschiedliche Oberflächensensitivitäten zu erreichen, da die Informationstiefe mit abnehmender

Energie der Elektronen ebenfalls abnimmt. Diese wird nicht durch die relativ große Eindringtiefe der Röntgenstrahlung bestimmt ($1\ \mu\text{m}$ und mehr im verwendeten Energiebereich), sondern durch die deutlich geringe mittlere freie Weglänge der Elektronen im Material. Die typische Informationstiefe bei der XPS liegt dadurch im Bereich von $10\ \text{nm}$.

Energieniveaus, deren Bindungsenergie kleiner als die verwendete Anregungsstrahlung ist, können angeregt werden. Allerdings ist für das Entstehen eines Signals nicht nur die Anwesenheit eines Elements, sondern auch der Wirkungsquerschnitt σ des jeweiligen Energieniveaus von Bedeutung. Diese Wahrscheinlichkeit der Wechselwirkung des einfallenden Photons mit dem kernnahen Elektron ist prinzipiell umso größer, je ähnlicher sich die Energien von Röntgenquant und Orbitalniveau sind. In XP-Spektren sind daher nicht alle möglichen Photoelektronen sichtbar.

Ein weiterer Effekt, der bei der Auswertung von aufgenommenen Spektren beachtet werden muss, ist die durch die Spin-Bahn-Kopplung verursachte Multiplett-Aufspaltung von Signalen aus Energieniveaus mit Bahndrehimpulsquantenzahlen $L > 0$ (sprich p-, d- und f-Orbitalen). Durch die zwei möglichen Spinzustände s sind solche Niveaus in zwei energetisch unterschiedliche Zustände aufgespalten. Da ihre Besetzung nicht entartet ist, sind die resultierenden Signale unterschiedlich intensiv. Die Größe der L - s -Kopplung hängt von der Kernladungszahl ab und ist daher für leichte Elemente oft zu klein, um aufgelöst zu werden.

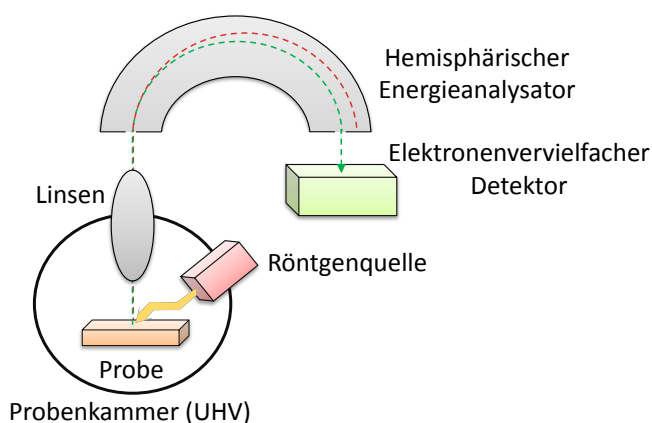


Abbildung 29. Schematischer Aufbau eines XP-Spektrometers. Röntgenstrahlung erzeugt in der Probe Photoelektronen, die durch ein Linsensystem in den hemisphärischen Energieanalysator fokussiert werden. Nur Elektronen mit bestimmter kinetischer Energie können den Analysator passieren und detektiert werden.

Der generelle Aufbau eines XP-Spektrometers ist in Abbildung 29 skizziert. Die zu untersuchende Probe befindet sich im Ultrahochvakuum (Druck typischerweise $< 10^{-7}$ mbar), um einerseits eine Probenkontamination und die Wechselwirkung der Photoelektronen mit der Umgebungsluft zu verhindern und zum anderen den Betrieb der Röntgenquelle zu ermöglichen. Als Anregungsstrahlung werden häufig die K_{α} -Linien von Magnesium ($1253,6\ \text{eV}$) oder Aluminium ($1486,6\ \text{eV}$) verwendet, deren geringe Energie eine hohe Oberflächensensitivität gewährleistet. Die emittierten Photo-

elektronen werden durch eine Elektronenoptik in den Energieanalysator fokussiert. Dieser besteht häufig aus zwei konzentrischen Halbkugeln, zwischen denen ein elektrisches Feld herrscht. Dadurch werden die Elektronen auf Kreisbahnen gelenkt, deren Radius von ihrer kinetischen Energie abhängt. Nur Elektronen einer bestimmten kinetischen Energie (Passenergie) können den Ausgangsschlitz passieren und gelangen zum Detektor. Dort wird die energieabhängige Anzahl der auftreffenden Elektronen detektiert.

Neben der qualitativen Identifikation von Elementen erlaubt die XPS auch quantitative Analysen zur stöchiometrischen Zusammensetzung und Schichtdicke eines Films. Eine wichtige Größe in der

quantitativen Auswertung ist die experimentell bestimmbare Abschwächlänge λ (*engl. attenuation length*). Diese gibt an, nach welcher zurückgelegten Wegstrecke die Intensität der Photoelektronen auf $1/e$ abgeschwächt wird. Sie ist zum einen von der Energie der Elektronen und zum anderen von der Art des Materials abhängig. Hier spielen Struktur und Dichte des Materials eine Rolle. Für die Abschwächung durch dünne organische Filme kann sie aus der von Seah ermittelten empirischen Gleichung berechnet werden:²³⁹

$$\lambda = 49 \cdot E_{kin}^{-2} + 0,11 \sqrt{E_{kin}} \quad (13)$$

Alternativ kann sie aus dem Vergleich der Orbitalsignale eines Elementes bei Abschwächung durch verschiedene Filme bekannter Schichtdicken ermittelt werden. Dafür bieten sich beispielsweise SAMs mit unterschiedlich langen Alkylketten auf Gold an, bei denen dann die Intensitäten der 4p-, 4f- und 4d-Orbitalsignale vermessen werden können.²⁴⁰

Die Intensität I eines Signals j des Elementes i ist neben der Konzentration n von einer Reihe weiterer Größen abhängig:

$$I_{ij} = KT(E_{kin})L_{ij}(\gamma)\sigma_{ij} \int_0^d (n_i(z) e^{\frac{-z}{\lambda_{ij} \cos \vartheta}}) dz \quad (14)$$

K ist eine Gerätekonstante, T die energieabhängige Transmissionsfunktion des Analysators, L ein Orbitalsymmetriefaktor des jeweiligen Energieniveaus, z der Abstand zur Oberfläche, λ die mittlere freie Weglänge und ϑ der Austrittswinkel relativ zur Oberflächennormalen. Meist wird nicht die absolute Konzentration eines einzelnen Elementes bestimmt, sondern das Verhältnis zweier Elemente A und B mit den Konzentrationen N_A und N_B . Im Fall der gleichmäßigen Verteilung in der untersuchten Schicht lässt sich dieses Verhältnis mit

$$\frac{N_A}{N_B} = \frac{I_A}{I_B} \cdot \frac{\sigma_B}{\sigma_A} \cdot \frac{\lambda_B}{\lambda_A} \quad (15)$$

beschreiben. Die Signalintensitäten I_x werden dafür mit den Wirkungsquerschnitten σ_x und Abschwächlängen λ_x korrigiert. Im Fall von geordneten Schichten, wie beispielsweise SAMs, muss neben der Selbstabschwächung auch die Abschwächung darüber liegender Schichten beachtet werden:

$$\frac{N_A}{N_B} = \frac{I_A}{I_B} \cdot \frac{\sigma_B}{\sigma_A} \cdot \frac{d_A}{\lambda_A} \cdot \frac{e^{\left(-\frac{d_A}{\lambda_B}\right)}}{1 - e^{\left(-\frac{d_A}{\lambda_A}\right)}} \quad (16)$$

Wenn ein Film, der dünner ist als die zur Verfügung stehende Informationstiefe, sich auf einem deutlich dickeren Substrat befindet, kann durch die filmbedingte Abschwächung des Substratsignals dessen Schichtdicke d bestimmt werden. Die Dicke eines Films

$$d = \lambda \cdot \cos \vartheta \cdot \ln \frac{I_0}{I(d)} \quad (17)$$

kann nach Lambert Beer mit dem Signal des unbeschichteten Substrates I_0 und der Signalintensität $I(d)$ mit Film in Beziehung gesetzt werden. ϑ beschreibt in diesem Fall den Winkel zwischen der Oberflächennormalen und dem Detektor.

2.4.4 Rasterkraftmikroskopie

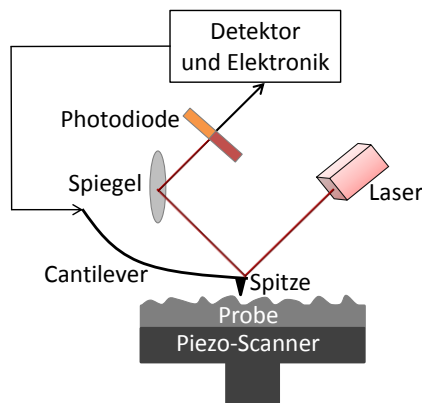


Abbildung 30. Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops.

Die Rasterkraftmikroskopie (engl. „atomic force microscopy“, AFM) ist ein bildgebendes Rastersondenverfahren, mit dem die Topographie von Oberflächen mit Nanometer-Auflösung abgebildet werden kann.

Im Gegensatz zur verwandten Rastertunnelmikroskopie (engl. „scanning tunneling microscopy“, STM) können auch nichtleitende Proben untersucht werden, was das Anwendungsspektrum stark erweitert.²⁴¹⁻²⁴²

Der prinzipielle Aufbau ist in Abbildung 30 gezeigt. Mit einer feinen an einem Träger befestigten Spitze (Cantilever), wird die zu untersuchende Oberfläche in geringem Abstand abgerastert. Probe und Cantilever werden dabei von piezoelektrischen Elementen bewegt. Auf den Cantilever ist ein Laser gerichtet, dessen Reflektion von einer Photodiode detektiert wird. Dieses Signal wird zur Bestimmung der Auslenkung des Cantilevers und damit der Spitzenposition genutzt.

Bei der Annäherung der Spitze an die Probe wirken zunächst attraktive, bei kleiner werdendem Abstand dominieren abstoßende Kräfte, beschrieben durch das Lennard-Jones-Potential.

Zur Untersuchung der Topographie einer Oberfläche existieren verschiedene Messmodi. Beim Kontaktmodus wird die Spitze im Bereich der abstoßenden Wechselwirkungen über die Oberfläche geführt. Dabei unterscheidet man zwischen dem Festhalten der z-Position („constant height“-Modus), wobei topographische Änderungen direkt zu einer Veränderung der Höhenposition der Spitze führen und dem „constant force“-Modus, bei dem die Wechselwirkung zwischen Spitze und Oberfläche über eine automatische Nachregelungs-Schleife konstant gehalten werden. In beiden Fällen besteht ein permanenter physischer Kontakt, was bei empfindlichen Proben zu Beschädigungen führen kann. Um diese Berührung zu minimieren, aber dennoch nicht im Bereich sehr schwacher Wechselwirkungen operieren zu müssen, kann der „tapping“-Modus genutzt werden, bei dem die Spitze nahe ihrer Eigenfrequenz zum Schwingen angeregt wird und die Oberfläche nur leicht am Umkehrpunkt der Schwingung berührt. Durch die Wechselwirkungen mit der Probe wird die Schwingungsamplitude gedämpft. Die Detektion der Topographie erfolgt durch das Konstanthalten dieser Amplitude durch Nachregelung der z-Position der Spitze. Neben der topographischen Information ist dabei auch der Phasenunterschied zwischen Anregungs- und Cantileverfrequenz zugänglich, der Informationen über die Wechselwirkungen zwischen Probe und Spitze enthält. So können beispielsweise unterschiedliche Viskoelastizitäten einer Probe im Phasenbild sichtbar gemacht werden.²⁴¹

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Herstellung von Lösungen

Deionisiertes Wasser wurde zusätzlich mit einem Milli-Q® Plus System (Millipore, Schwalbach, Deutschland) gereinigt.

Zur Herstellung einer 10 mM-Lösung von 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) wurden 2,38 g des Salzes in 1 L Milli-Q®-Wasser gelöst.

10× konzentriertes PBS wurde von gibco (life technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) bezogen und 10× verdünnt.

Zur Herstellung von kommerziellem künstlichem Meerwasser (*engl. „artificial seawater“, ASW*) wurde den Herstellerangaben folgend 33,4 g Instant Ocean-Salz (Instant Ocean, Blacksburg, VA, USA) in 1 L Milli-Q® Wasser gelöst.

Künstliches Seewasser (*engl. „seawater“, SW*) wurde nach dem Rezept von Kester hergestellt (Tabelle 2).²⁴³ Die Salze wurden dafür in 1 L Milli-Q®-Wasser gelöst. Vor Verwendung wurde das SW durch einen Spritzenfilter (0,45 µm Porengröße) gefiltert.

Tabelle 2. Mengen der verwendeten Salze zur Herstellung von künstlichem Seewasser (SW) nach Kester *et al.*²⁴³

| Salz | [g·l ⁻¹] |
|--|----------------------|
| Natriumchlorid (NaCl) | 23,93 |
| Natriumsulfat (Na ₂ SO ₄) | 4,01 |
| Kaliumchlorid (KCl) | 0,67 |
| Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃) | 0,20 |
| Kaliumbromid (KBr) | 0,10 |
| Magnesiumdichlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ ·6H ₂ O) | 10,80 |
| Calciumdichlorid-Dihydrat (CaCl ₂ ·2H ₂ O) | 1,47 |

CASO Bouillon wurde den Herstellerangaben (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) folgend hergestellt, das fertige Kulturmedium enthielt die folgenden Bestandteile:

Tabelle 3. Bestandteile der CASO Bouillon.

| | [g·l ⁻¹] |
|---|----------------------|
| Pepton aus Casein | 17 |
| Pepton aus Soja | 3 |
| Natriumchlorid (NaCl) | 5 |
| Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄) | 2,5 |
| Glukose-Monohydrat | 2,5 |

M9 Medium wurde durch Lösen der in Tabelle 4 angegebenen Bestandteile in Milli-Q®-Wasser hergestellt. Sowohl CASO als auch M9-Medien wurden nach der Herstellung sterilisiert.

Tabelle 4. Bestandteile des M9-Mediums.

| | [g·l ⁻¹] |
|---|----------------------|
| Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) | 6 |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) | 3 |
| Natriumchlorid (NaCl) | 0,5 |
| Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl) | 1 |
| Glukose | 0,4 |
| Magnesiumsulfat (MgSO ₄) | 0,12 |
| Calciumchlorid (CaCl ₂) | 0,01 |

3.2 Oberflächenpräparation

3.2.1 Selbst-assemblierte Monolagen (SAMs)

Selbst-assemblierte Monolagen (SAMs) wurden auf Gold (Au)-Substraten (G. ALBERT, PVD-Beschichtungen, Silz, Deutschland) präpariert. Je nach späterer Verwendung wurden dafür Si-Wafer oder ultraglatte Glassubstrate (Nexterion®, Schott, Mainz, Deutschland) verwendet. Für die Au-Beschichtung wurden im Hochvakuum (2×10^{-7} mbar) zunächst 5 nm Titan als Haftvermittler aufgedampft, anschließend folgten mit einer Abscheiderate von $0,5 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$ 30 nm polykristallines Au (99,9 % Reinheit). Die Rauigkeit der so erhaltenen Goldoberfläche war im quadratischen Mittelwert nicht größer als 1 nm. Bis zur Verwendung wurden sie in einer Ar-Atmosphäre aufbewahrt.

Unmittelbar vor der Weiterverwendung wurden die Au-Substrate zur Reinigung für 1,5 h mit einer Ozon-generierenden UV-Lampe bestrahlt (150 W Quecksilberdampf Lampe, TQ150, Heraeus Noblelight GmbH, Hanau, Deutschland) und anschließend 3 min in Ethanol *p.a.* im Ultraschallbad behandelt. Nach Abspülen mit Ethanol *p.a.* und Trocknen mit N₂ wurden alle Au-Substrate

ellipsometrisch vermessen. Für die anschließende Präparation wurden je nach SAM verschiedene Konzentrationen des Thiols und Einlegezeiten gewählt (Tabelle 5). Zur Herstellung der Lösungen für gemischte SAMs wurden zunächst die reinen Komponenten in der jeweiligen Konzentration gelöst und diese Lösungen anschließend in den entsprechenden Verhältnissen gemischt.

Tabelle 5. Präparationsbedingungen für die Selbst-Assemblierung der verschiedenen Thiole.

| Thiol | Abkürzung | Konzentration c [mM] | Einlegezeit t [h] |
|--|-----------------|-----------------------------------|----------------------|
| 1-Dodecanthiol | DDT | 1 | 24 |
| 11-Hydroxy-1-undecanthiol | HUDT | 1 | 24 |
| Hydroxy-PEG2000-thiol | PEG | 0,5 | 48 |
| 11-(Mercaptoundecyl)- <i>N,N,N</i> - trimethylammoniumchlorid | TMAT | 1 / 0,2 | 24 / 48 |
| Natrium-11-1(Mercaptoundecyl)-sulfonat | SAT | 1 / 0,2 | 24 / 48 |
| 11-(Mercaptoundecyl)-carbonsäure | MUDA | 1 / 0,2 (+0,37% NH ₃) | 24 / 48 |
| 11-(Mercaproundecyl)l-phosphonsäure | MUPA | 1 / 0,2 | 24 / 48 |
| 11-(Mercaproundecyl)-carboxybetain | CB | 1 | 24 |
| 11-(Mercaproundecyl)-sulfobetain | SB | 1 | 24 |
| Hydroxy-x-ethylene-glykol-1-undecanthiol | EG _x | 1 | 24 |

Nach der Einlegezeit wurden die Substrate mit Ethanol *p.a.* abgespült, 3 min in Ethanol *p.a.* im Ultraschallbad behandelt, erneut mit Ethanol *p.a.* abgespült und abschließend mit N₂ getrocknet. Direkt nach der Präparation wurden für alle Proben Kontaktwinkel und Schichtdicke (mittels Ellipsometrie) bestimmt und bis zur weiteren Verwendung in einer Ar-Atmosphäre aufbewahrt.

Die verwendeten ethylenglykol-terminierten Thiole sind literaturbekannt.^{21-22,57} Auf ihre Charakterisierung durch Ellipsometrie und Messung des statischen Wasserkontaktwinkels wird daher später nicht mehr eingegangen, die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6. Durch spektrale Ellipsometrie bestimmte Schichtdicken d und statische Wasserkontaktwinkel θ der ethylenglykolterminierten SAMs.

| | d [Å] | θ [°] |
|------------------|---------|--------------|
| | ± 2 | ± 2 |
| EG ₁ | 14 | 30 |
| EG ₃ | 19 | 32 |
| EG ₆ | 26 | 34 |
| EG ₁₂ | 41 | 32 |
| PEG | 46 | 28 |

3.2.2 Polysaccharide

Die Präparation der Polysaccharid-Oberflächen erfolgte auf Silizium-Wafern oder Glassubstraten (NexterionB®, Schott, Mainz, Deutschland). Die Wafer wurden in die gewünschte Größe gebrochen und durch Ultraschall-Behandlung (Typ TRUSR070, Triton) in Lösungsmitteln steigender Polarität (Toluol < Essigester (EE) < Ethanol *p.a.* < Milli-Q Wasser, jeweils 30 s) gereinigt. Glassubstrate wurden ohne weitere Reinigung direkt verwendet.

Die Substrate wurden zunächst im Sauerstoffplasma aktiviert (O_2 -Druck 0.4 mbar, 3 min, 150 W, Pico, Diener, Ebhausen, Deutschland). Die aktivierten Substrate wurden unter N_2 -Atmosphäre mit einer 5 Vol.-%-Lösung von 3-Aminopropyltrimethoxysilan (APTMS) in Aceton überschichtet, die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur für 30 min im Ultraschallbad. Zur Reinigung wurden sie mit Aceton abgespült und für je 20 s in EE, Ethanol und Milli-Q® Wasser im Ultraschallbad gereinigt. Abschließend wurden sie mit Milli-Q®-Wasser abgespült und im N_2 -Strom getrocknet.

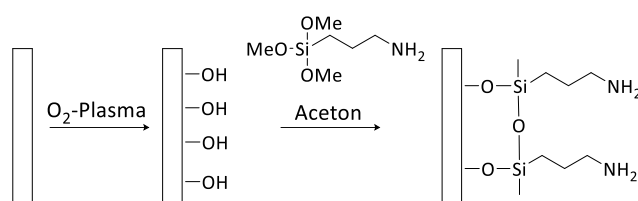


Abbildung 31. Schema der Beschichtung der Substrate mit APTMS.

Die Kopplung der Polysaccharide (PS) erfolgte direkt im Anschluss. Die PS wurden zunächst in HEPES-Puffer gelöst ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), nach 1,5 h wurden zur Aktivierung der Carboxylgruppen *N*-(3-dimethylpropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid (EDC, 0,05 M) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS, 0,01 M) zugegeben. Nach weiteren 15 min wurden die APTMS-beschichteten Substrate mit dieser Lösung überschichtet, die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur auf einem Schütteltisch (65 rpm). Die Kopplung wurde nach 18 h durch Spülen mit der 8-fachen Menge deionisierten Wassers beendet. Zur vollständigen Entfernung physisorbierter Polymere verblieben die Proben für weitere 2 d im Wasser, welches täglich ausgetauscht wurde. Schließlich wurden die Proben mit Milli-Q®-Wasser abgespült

und bis zur weiteren Verwendung unter Milli-Q®-Wasser aufbewahrt oder für die Charakterisierung im N₂-Strom getrocknet.

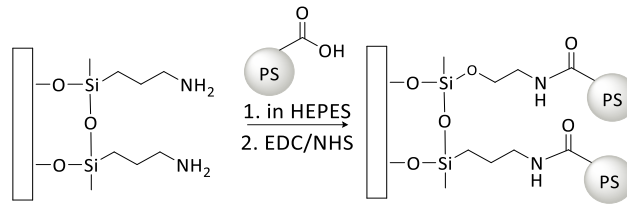


Abbildung 32. Schema der Kopplung der PS an APTMS-beschichtete Substrate.

Zur Modifizierung der immobilisierten Polysaccharide wurden diese zunächst mit einer Lösung aus EDC (25 mM) und NHS (5 mM) in HEPES überschichtet, um freie Carboxylgruppen zu re-aktivieren. Nach 15 min wurde Trifluoethylamin (TFEA) in HEPES (40 mM im Gesamtvolumen) zugegeben. Die Reaktion erfolgte für 18 h bei Raumtemperatur auf einem Schütteltisch (65 rpm) und wurde durch Spülen mit der 8-fachen Menge deionisierten Wassers beendet. Die Proben wurden weitere 4 h im Wasser belassen, abschließend mit Milli-Q® Wasser abgespült und bis zur weiteren Verwendung unter Milli-Q®-Wasser aufbewahrt oder für die Charakterisierung im N₂-Strom getrocknet.

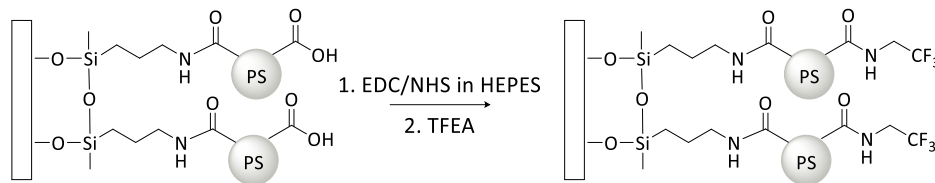


Abbildung 33. Schema der Modifizierung der immobilisierten PS mit TFEA.

3.2.3 pHEMA-Beschichtung durch RAFT-Polymerisation

Die Präparation der Poly(hydroxyethylmethacrylat) Substrate (pHEMA) wurde in der Arbeitsgruppe von PROF. C. BARNER-KOWOLLIK (Institut für technische Chemie und Polymerchemie, KIT, Karlsruhe) von DR. M. ZAMFIR oder DR. N. ZYDZIAK durchgeführt.

Das Kettentransferreagenz zur Immobilisierung (CTA-1) 4-(3-Triethoxysilyl)propylcarbonyl)-2-cyanobutan-2-yl-benzodithioat wurde Literaturangaben folgend aus 4-Cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)pentansäure (CTA-2) und 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) hergestellt.²⁴⁴

Zur Immobilisierung des CTA-1 wurden Si-Wafer zunächst wie für die Polysaccharid-Beschichtung beschrieben gereinigt und im Sauerstoffplasma aktiviert. Die aktivierten Substrate wurden unter N₂-Atmosphäre mit einer 0,02 M Lösung des CTAs in trockenem Toluol überschichtet. Die Reaktion erfolgte zunächst für 2 h bei 50 °C und anschließend über Nacht bei RT. Um physisorbiertes und aggregiertes Silan zu entfernen, wurden die Proben für 5 min in Toluol im Ultraschallbad behandelt, jeweils mit DCM, Ethanol und Aceton abgespült und schließlich im N₂-Strom getrocknet.

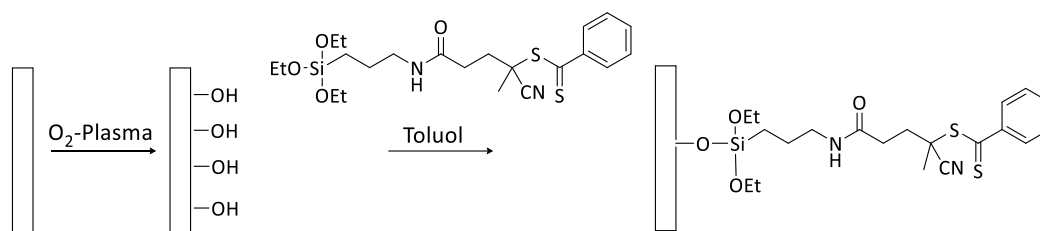


Abbildung 34. Schema der Immobilisierung des CTA-1 auf aktivierten Si-Wafern.

Für die Polymerisation wurden die CTA-1-beschichteten Proben in Glasfläschchen mit luftdichtem Septum platziert und für 1 h mit trockenem N₂ gespült. Während dessen wurde eine Lösung aus HEMA (16,3 mmol, 1735 eq.), 2,2'-Azo-bis-(butyronitril) (AIBN, 9,4 μmol, 1 eq.) und CTA-2 (in variierenden Konzentrationen) in 15 mL Lösungsmittel (Dioxan und H₂O in verschiedenen Mischungsverhältnissen) durch 3 „freeze-pump-thaw“ Zyklen (Einfrieren der Lösung, Evakuierung des Kolbens und anschließendes Auftauen des abgeschlossenen Systems) entgast. 1,5 mL dieser Reaktionsmischung wurden unter Schutzgas in jedes Gläschen transferiert. Die Polymerisation fand bei 80 °C statt. Nach der gewünschten Reaktionszeit wurde die Reaktion durch Quenchen im Eisbad gestoppt, die Substrate wurden mit DMF, Wasser und Aceton abgewaschen und im N₂-Strom getrocknet.

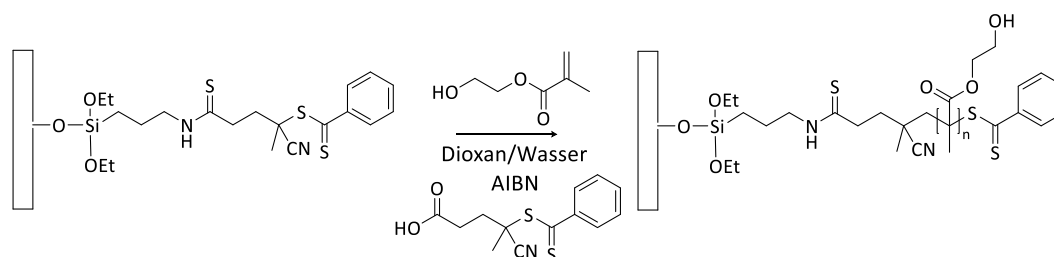


Abbildung 35. Schema der RAFT-Polymerisation auf CTA-beschichteten Si-Wafern.

3.3 Charakterisierung

3.3.1 Kontaktwinkel-Goniometrie

Da die zu charakterisierenden Oberflächen chemisch homogen und glatt waren, wurde der statische Kontaktwinkel gemessen. Alle Messungen fanden unter Normalbedingungen statt. Für die Polysaccharid- und pHEMA-Oberflächen wurde ein in der Arbeitsgruppe angefertigtes Goniometer verwendet. Dazu wurden ~ 20 μL Milli-Q®-Wasser auf die zu untersuchende Oberfläche aufgebracht, der Wassertropfen nach Entfernen der Kapillare per Videodigitalisierung aufgenommen und mit der Young-Gleichung angepasst. Für die SAMs wurde ein DSA100-Goniometer (Krüss, Hamburg, Deutschland) verwendet. Hier wurde nach dem Dosieren von 3 μL Milli-Q®-Wasser mit einer Geschwindigkeit von 10 μL min⁻¹ der Kontaktwinkel mit der Herstellersoftware DSA3 bestimmt.

3.3.2 Spektrale Ellipsometrie

Ellipsometrische Messungen wurden an einem M-44 (J. A. Woollam Co., Lincoln, USA) mit polychromatischer Xe-Bogenlampe durchgeführt. Bei einem konstanten Einfallswinkel von 75 ° wurden im Wellenlängenbereich von (280 - 800) nm die optischen Eigenschaften der Filme bestimmt.

Schichtdicken wurden mit Hilfe der Herstellersoftware *WVase 32* ermittelt. Dafür wurde ein Schichtmodell, bestehend aus Substrat („*void*“) und *Cauchy*-Schicht angenommen. Als Cauchy-Parameter wurden $A = 1,45$, $B = 0,01$ und $C = 0$ verwendet.

3.3.3 Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS)

Röntgen-Photoelektronenspektren wurden an einem MAX200-Spektrometer (Leybold-Heraeus, Köln, Deutschland) mit einer nicht-monochromatisierten Mg-Anode ($K_{\alpha} = 1253,6$ eV, Halbwertsbreite, *engl. full width at half maximum*, FWHM = 0,7 eV) als Quelle aufgenommen. Nach Aufnahme eines Übersichtsspektrums wurden die relevanten Signale identifiziert und in einem schmaleren Energiebereich aufgenommen (Tabelle 7).

Tabelle 7. Geräte-Parameter der XPS-Messungen.

| Spektrum | Energiebereich [eV] | Schrittweite [eV] | Verweildauer [ms] | Passenergie [eV] | Scans |
|-----------|------------------------|----------------------|----------------------|---------------------|-------|
| Übersicht | 1000 - -5 | 0,4 | 10 | 96 | 4 |
| Si 2p | 110 - 90 | 0,2 | 100 | 48 | 8 |
| Au 4f | 100 - 70 | 0,2 | 40 | 48 | 6 |
| C 1s | 300 - 270 | 0,2 | 100 | 48 | 12 |
| N 1s | 410 - 392 | 0,2 | 100 | 48 | 15 |
| O 1s | 540 - 525 | 0,1 | 100 | 48 | 10 |
| F 1s | 695 - 676 | 0,2 | 100 | 48 | 10 |
| S 2p | 175 - 150 | 0,2 | 250 | 48 | 15 |
| P 2p | 140 - 125 | 0,2 | 250 | 48 | 15 |
| Ca 2p | 360 - 340 | 0,2 | 200 | 48 | 20 |

Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm XPS Peak 4.1. Auf Si-Substraten aufgenommene Spektren wurden auf das Si 2p-Signal von SiO_2 bei 103,4 eV normiert, auf Gold aufgenommene Spektren auf das Au 4f-Signal bei 84,0 eV. Es wurde eine Untergrundkorrektur nach Shirley vorgenommen,²⁴⁵ die Signale wurden mit einer symmetrischen Voigt-Funktion mit einem Lorentz-zu-Gauß-Verhältnis von 4 : 1 angepasst. Zur quantitativen Auswertung wurden die in Tabelle 8 aufgelisteten Wirkungsquerschnitte σ , Dublettaufspaltungen und Abschwächlängen λ verwendet.

Tabelle 8. Bei der Auswertung der aufgenommenen XP-Spektren angenommenen Parameter für die Verwendung einer Mg Anode (1253,5 eV). Auf den von C 1s normierte Wirkungsquerschnitte σ ,²⁴⁶ Dublettaufspaltungen,²³⁸ kinetische Energien der Photoelektronen und Abschwächlängen λ in einem dünnen organischen Film.²³⁸⁻²⁴⁰

| | Au 4f | Si 2p | C 1s | N 1s | F 1s | S 2p | P 2p | Ca 2p |
|--|--------|--------|-------|-------|-------|--------|--------|-------|
| σ | 18,98 | 0,86 | 1 | 1,77 | 4,27 | 1,73 | 1,23 | 5,15 |
| Dublettaufspaltung [eV] | 3,65 | - | - | - | - | 1,2 | 0,85 | 3,5 |
| Kinetische Energie [eV] | 1169,5 | 1150,1 | 969,5 | 853,5 | 568,5 | 1091,5 | 1120,3 | 905,0 |
| λ [Å] nach Bain ²⁴⁰ | 26,1 | 25,5 | 21,4 | 18,7 | 12,3 | 24,2 | 24,8 | 19,9 |
| λ [Å] nach Seah ²³⁹ | 37,6 | 37,3 | 34,3 | 32,1 | 26,2 | 36,3 | 36,8 | 33,1 |

Für λ wurden die von N. Meyerbröker nach der von Bain beschriebenen Methode bestimmte Werte verwendet.^{238,240} Dieser Parameter beschreibt hier die charakteristische Abschwächung der Photoelektronen durch einen dünnen organischen Film. Es existieren weitere Methoden, um diese für die quantitative Auswertung zentralen Werte zu bestimmen, vergleichend sind daher außerdem die nach Seah berechneten Werte (Gleichung (13)) aufgeführt. Diese sind im Vergleich systematisch höher. Da die Abschwächung der Elektronen durch die Wechselwirkungen mit dem Material bestimmt wird, durch das sie sich bewegen, deutet diese Erhöhung auf geringere Wechselwirkungen hin. Das zugrundeliegende Modellmaterial hatte dementsprechend eine geringere Dichte. Da in dieser Arbeit hauptsächlich dichtgepackte organische Monolagen untersucht wurden und die zuerst aufgeführten Werte außerdem auf experimentellen Daten des verwendeten Spektrometers beruhen, wurden diese verwendet.

3.3.4 AFM

AFM-Messungen wurden an einem Dimension 3100 mit einem Nanoscope IIIa-Controller (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA) bei Normalbedingungen im Tapping-Modus durchgeführt. Als Cantilever diente eine Si₃N₄-Spitze. Die Auswertung der aufgenommenen Bilder erfolgte mit der Herstellersoftware Nanoscope oder mit der freien Software Gwyddion.

3.4 Biologische Experimente

3.4.1 Stabilitätstests

Testoberflächen wurden in gefiltertem (0,45 μ m-Spritzenfilter) SW (nach Kester,²⁴³ siehe Abschnitt 3.1) über verschiedene Zeiträume bei RT auf einem Schütteltisch inkubiert. Anschließend wurden sie gründlich mit Milli-Q®-Wasser abgespült und im N₂-Strom getrocknet. Die Veränderung

der Schichtdicke wurde durch spektrale Ellipsometrie bestimmt. Jede Probe wurde vor und nach der Inkubation an drei verschiedenen Stellen vermessen.

Die Inkubation der pHEMA-Oberflächen in den Bakterienkulturmedien CASO und M9 erfolgte bei 5 °C, um das Wachstum von Mikroorganismen in den Nährmedien zu reduzieren.

3.4.2 Proteinadsorption

Proteine wurden bei Raumtemperatur in einmal gefiltertem PBS (0,45 µm) gelöst (2 mg·mL⁻¹). Parallel wurden die zu untersuchenden Proben in PBS (1×, 0,45 µm) für 20 min vorinkubiert. Anschließend wurde die klare Proteinlösung zugegeben, die Endkonzentration betrug 1 mg·mL⁻¹. Nach 30 min Inkubation bei RT auf einem Schütteltisch (65 rpm) wurde der Adsorptionsprozess durch Überschwemmen mit der 10-fachen Menge deionisierten Wassers beendet. Beim Entnehmen durch die Wasser-Luft-Grenzfläche wurden die Proben vorsichtig mit Milli-Q®-Wasser abgespült und anschließend im N₂-Strom getrocknet. Die Quantifizierung der adsorbierten Proteinschicht erfolgte mittels spektraler Ellipsometrie als *Cauchy*-Schicht, gefittet auf einer vor der Inkubation als „void“ gemessenen Referenzmessung der betreffenden Probe. In Tabelle 9 sind die Eigenschaften der verwendeten Proteine zusammengefasst.

Tabelle 9. Eigenschaften der verwendeten Proteine.²⁴⁷

| Protein | Molekulargewicht [kDa] | isoelektrischer Punkt | Ladung (pH 7,4) |
|----------------|---------------------------|-----------------------|--------------------|
| Fibrinogen | 340 | α 7,7 | - |
| | | β 8,7 | |
| | | γ 5,5 | |
| Albumin | 66 | 5,6 | - |
| Pepsin | 35 | 1,0 | - |
| Pyruvat Kinase | 237 | 7,6 | + |
| Lysozym | 15 | 9,3 | + |

3.4.3 Mikrofluidische Scherspannungsmessungen

Zur Bestimmung der Adhäsionsstärke verschiedener Mikroorganismen wurde ein von DR. C. CHRISTOPHIS entwickeltes Mikrofluidiksystem verwendet.²⁴⁸ Der Aufbau des gesamten Systems bestehend aus Mikroskop, Mediumreservoir, Spritzenpumpe und Kanalsystem, als auch der Aufbau dieser Kanäle, ist schematisch in Abbildung 36 gezeigt.

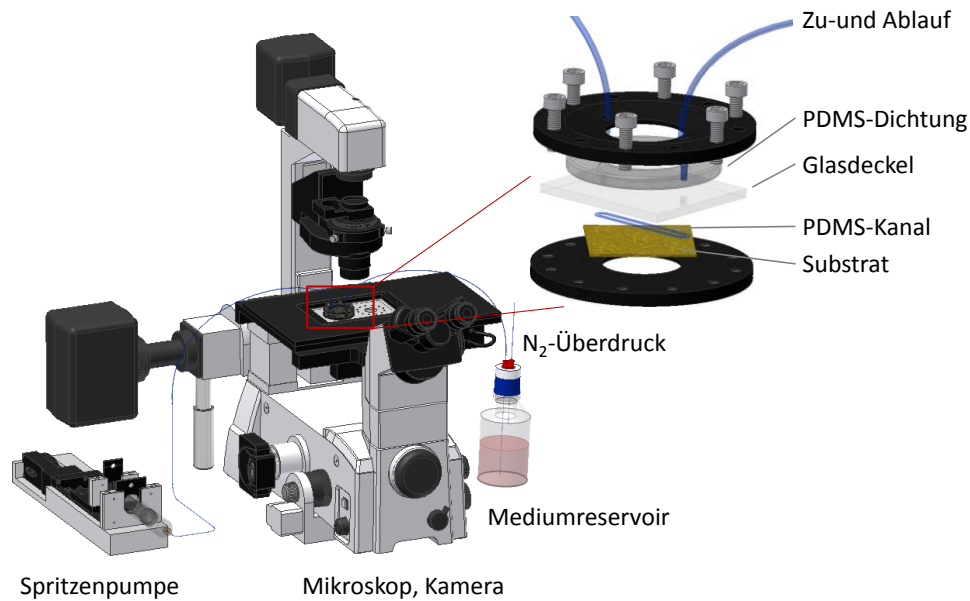


Abbildung 36. Schematischer Aufbau des Mikrofluidik- und Kanalsystems. Zur Übersicht ist nur einer von 4 möglichen Kanälen gezeigt.²⁴⁸

Die vier baugleichen Kanäle bestanden jeweils aus der zu untersuchenden Oberfläche als unterer Teil (25 mm × 25 mm), auf die mittels einer PDMS-Dichtung (Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI, USA) und eines Glasdeckels ein PDMS-Kanal aufgelegt wurde. Die Bohrungen dienten zum Anschluss von Zu- und Ablauf-Schläuchen an den Kanal. Das ganze System wurde mittels Schrauben an eine Objekttscheinsetzplatte fixiert. Der durch dieses Sandwich-System erhaltene Kanal hatte Dimensionen von ~ 13 mm × 0,9 mm × 140 μm (Länge × Breite × Höhe). Die auf der Einsetzplatte montierten Kanalsysteme wurden in einem inversen Mikroskop (TE-2000-U, Nikon, Tokio, Japan) installiert. Der Zulauf-Schlauch wurde mit dem Mediumreservoir (N₂-Überdruck von 0,7 bar), verbunden, der Ablauf-Schlauch mit einer Spritzenpumpe (Physik Instrumente GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Die durch die Herstellersoftware Micromove® gesteuerte Pumpe erzeugte im Anschluss den Fluss im Kanal. Der angelegte Überdruck kompensierte hierbei den Druckabfall bei hohen Strömungen.

Vor jedem Experiment wurde das gesamte Kanalsystem mit sterilem ASW für ~ 5 min präinkubiert. Anschließend wurden die Mikroorganismen (Details im jeweiligen Abschnitt) injiziert und nach der entsprechenden Inkubationszeit auf der zu untersuchenden Oberfläche mit dem Abrissexperiment begonnen. Dafür wurde mit einem Selektor der entsprechende Kanal ausgewählt und die Pumpengeschwindigkeit stufenweise erhöht, Abbildung 37 A zeigt die Zunahme der Scherspannung τ über die gesamte Experimentdauer von 4,5 min. Die Scherspannung

$$\tau_x = \tau_i \cdot F^x \quad (18)$$

steigt mit jeder Stufe X ausgehend von einer initialen Scherspannung τ_i mit einem Wachstumsfaktor F (in allen durchgeführten Experimenten 1,26).

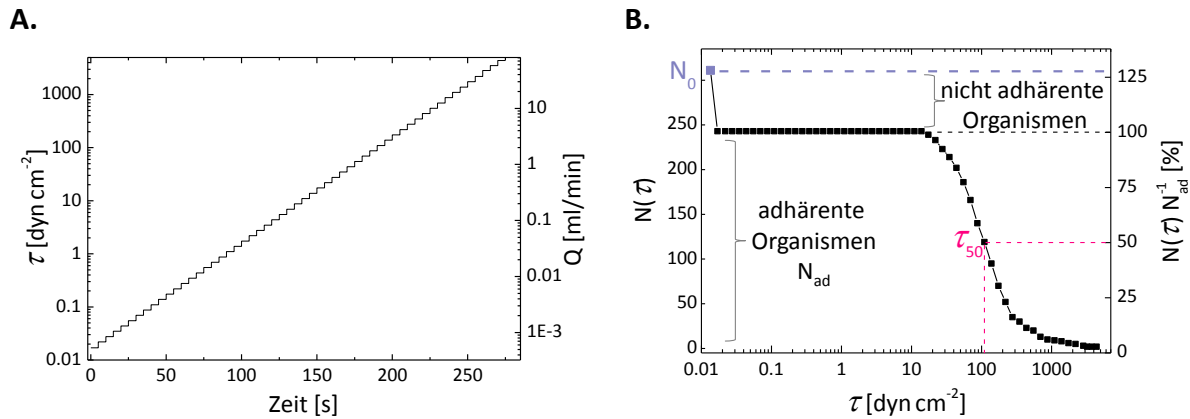


Abbildung 37. A. Zeitlicher Verlauf der Scherspannung bei einem typischen mikrofluidischen Abrissexperiment mit stufenweiser Erhöhung des Volumenflusses Q alle 5 s um 26 %. B. Typischer Verlauf einer Abrisskurve $N(\tau)$ zur Illustration der initial adhärenen Organismen und der kritischen Scherspannung τ_{50} .

Der Abriss der Mikroorganismen im Laufe des Experiments wurde mit Hilfe von Videomikroskopie verfolgt. Der typische Verlauf der Organismenanzahl $N(\tau)$ mit zunehmender Scherspannung ist in Abbildung 37 B gezeigt. Die Abrisskurve zeigt zwei quantifizierbare Kenngrößen des Experiments. Die adhärenente Fraktion N_{ad} ist der im Sichtfeld verbleibende Anteil der Organismen N_0 nach Erreichen einer geringen Scherspannung von $\sim 0,05 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$. Die kritische Scherspannung τ_{50} kennzeichnet die Scherspannung, bei der 50 % dieser adhärenen Organismen N_{ad} von der Oberfläche abgelöst wurden. Dieser Wert ist charakteristisch für die Adhäsionsstärke des jeweiligen Organismus.

Nach jedem Abrissexperiment wurden die Kanaldimensionen h und w (Höhe und Breite) nach Spülen mit Milli-Q®-Wasser und unter N_2 -Überdruck bestimmt. Mit dem Volumenfluss Q und der Viskosität des Mediums μ lässt sich dann nach dem Poiseuille Modell mit

$$\tau = \frac{6Q\mu}{h^2w} \quad (19)$$

die in den Kanälen tatsächlich generierten Scherspannungen kalkulieren. Für μ wurde $10^{-3} \text{ kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ für ASW bei 20°C angenommen.

3.4.3.1 Messung der Adhäsion von *Cobetia marina* auf den synthetisierten Oberflächen

Adhäsionsstärkemessungen des Bakteriums *C. marina* wurden von DR. M. P ARPA SANCET durchgeführt.

BAKTERIENKULTUR

Die verwendeten Bakterien wurden von der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen“ (Braunschweig, Deutschland, DSM 4741) bezogen, in Marine Broth (MB) Nährmedium mit 20 % Glycerol aliquotiert und bis zur Verwendung bei -70°C aufbewahrt. Zur Vorbereitung der Kultur für die folgenden Experimente wurde diese Lösung auf marinen Agar ausgestrichen, die Platten wurden maximal 4 Wochen bei 4°C aufbewahrt. Zur Kultivierung in Lösung wurde eine Einzelkolonie von einer Agarplatte in 20 mL sterilem MB inokuliert, das Wachstum erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Schütteltisch (65 rpm). Die Kultur wurde nach 14 h erneut mit

MB (1 : 100) verdünnt. Die optische Dichte wurde überwacht bis nach ~ 3 h eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,1 erreicht war (DU-70 Photometer, Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland), was die Phase exponentiellen Wachstums (Logphase) der Bakterien kennzeichnete. Zum Austausch des Wachstumsmediums durch ASW (Instant Ocean®) wurde die Bakterienlösung zentrifugiert (10.000 rpm für 2 min, Mikro 22R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) und das Bakterienpellet in sterilem ASW gewaschen und resuspendiert. Vor Injektion in die Kanäle wurde die Lösung abschließend durch einen 5 µm Spritzenfilter gefiltert, um größere Bakterienaggregate abzutrennen. Die verwendete Zellkonzentration betrug $\sim 10^7$ mL⁻¹.

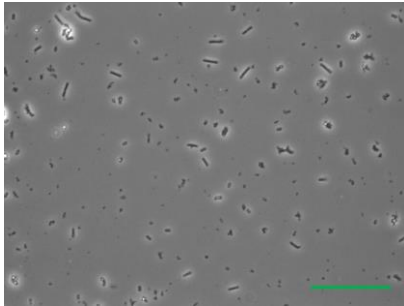


Abbildung 38. Typische Dichte im untersuchten Sichtfeld von *C. marina* auf Glas im mikrofluidischen Kanal nach 2 h Inkubationszeit (40x-Vergrößerung, der Maßstab entspricht 50 µm).

ABRISSEXPERIMENTE

Die Bakterien wurden nach der Injektion in die Kanäle 2 h statisch bei Raumtemperatur inkubiert, das anschließende Abrissexperiment wurde bei 40x-Vergrößerung durch ein Phasenkontrastobjektiv ($NA = 0,6$, Ph2) verfolgt. Das Sichtfeld in der Mitte des Kanals umfasste $255 \mu\text{m} \times 190 \mu\text{m}$, darin befanden sich im Durchschnitt zu Beginn des Experiments ~ 500 Zellen (Abbildung 38).

3.4.3.2 Messung der Adhäsion von *Navicula perminuta* auf den synthetisierten Oberflächen

Adhäsionsstärkemessungen der Kieselalge *N. perminuta* wurden von DR. M. ALLES durchgeführt.

DIATOMEENKULTUR

N. perminuta wurden in 100 mL-Erlenmeyerkolben im F/2 Medium (mit Nährstoffen angereichertem ASW (Instant Ocean®)) in einem Lichttemperaturschrank (Snijders Scientific, Tilburg, Niederlande) bei statischen Bedingungen bei 18 °C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von (16 : 8) h kultiviert. Die Verdünnung der Kultur erfolgte wöchentlich (Kultur zu Medium 1 : 10).

Die sich in der Logphase befindenden Algenzellen wurden vor der Verwendung durch kurze Ultraschallbehandlung vom Boden der Kolben abgelöst. Die optische Dichte der Algensuspension betrug 0,3 - 0,4 (OD_{444} , DU-70 Photometer), was einer Zelldichte von $\sim 10^6$ mL⁻¹ entsprach.

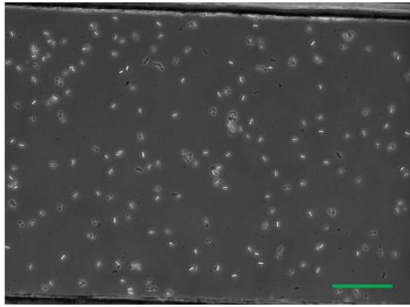


Abbildung 39. Typische Dichte im untersuchten Sichtfeld von *N. perminuta* im mikrofluidischen Kanal nach 4 h Inkubationszeit (10x-Vergrößerung der Maßstab entspricht 200 μm).

ABRISSEXPERIMENTE

Die Diatomeen wurden nach Injektion in die Kanäle 4 h statisch inkubiert, das anschließende Abrissexperiment wurde bei 10x-Vergrößerung durch ein Phasenkontrastobjektiv ($NA = 0,25$, Ph1) verfolgt. Das Sichtfeld in der Mitte des Kanals umfasste $1000 \mu\text{m} \times 750 \mu\text{m}$, darin befanden sich zu Beginn des Experiments im Durchschnitt ~ 200 Zellen (Abbildung 39).

3.4.4 Besiedlung und Haftstärke von *Navicula incerta*

Die Experimente wurden in Kooperation mit der Gruppe von PROF. J. CALLOW und DR. M. CALLOW von DR. J. FINLAY an der Universität Birmingham (Birmingham, UK) durchgeführt, bzw. unter Anleitung von DR. J. FINLAY an der Universität Newcastle (Newcastle, UK).

DIATOMEENKULTUR

N. incerta wurden in 250 mL-Zellkulturflaschen in F/2-Medium bei 18°C in einem 16 h : 8 h Hell-Dunkel-Rhythmus kultiviert. Zellen in der Log-Phase wurden vor der Verwendung dreimal mit frischem Medium gewaschen. Die Konzentration von Chlorophyll *a* wurde auf $\sim 0,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ eingestellt.

BESIEDLUNG

Die Experimente wurden auf beschichteten NexterionB®-Objektträgern durchgeführt, jeweils 3 Replikate einer zu untersuchenden Oberfläche wurden in einer QuadriPERM-Schale gruppiert. Nach Präinkubation der Proben in 10 mL sterilem ASW wurde das Medium durch 10 mL der Algensuspension ersetzt. Nach 2 h Inkubation unter Raumbedingungen wurden die Proben mitsamt der QuadriPERM-Schale in einen Behälter mit sterilem ASW überführt, um einen Durchgang durch die Flüssig-Gas-Grenze zu vermeiden. Dort wurden die Proben vorsichtig einzeln gewaschen um nichtadhärente Zellen zu entfernen. Die Fixierung erfolgte mit 2,5 % Glutaraldehyd in ASW über mindestens 20 min, nach dreimaligem Austausch mit deionisiertem Wasser wurden die Proben luftgetrocknet.

ADHÄSIONSSTÄRKE

Nach dem oben beschriebenen Besiedlungsexperiment wurden drei der untersuchten sechs Replikate nicht fixiert, sondern in einem kalibrierten Flusskanal einer turbulenten Scherspannung von 22 Pa ($220 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$) ausgesetzt. Anschließend erfolgte die Fixierung wie oben beschrieben. Die Zelldichte auf den Replikaten aus dem Flusskanal wurde mit der auf den direkt nach der Besiedlung fixierten Replikaten verglichen.

AUSWERTUNG

Auf jedem Replikant wurden gleichmäßig verteilt 30 Sichtfelder ($440\ \mu\text{m} \times 330\ \mu\text{m}$) ausgewählt. Die Dichte der adhärennten Zellen wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (10×-Vergrößerung, Axioplan, Zeiss, Göttingen, Deutschland) und der Herstellersoftware (Axiovision, Zeiss) quantifiziert. Die Visualisierung der Zellen erfolgte über die Autofluoreszenz von Chlorophyll (Abbildung 40 A).

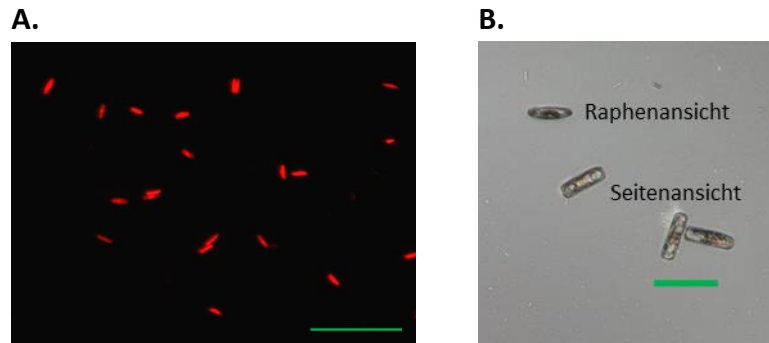


Abbildung 40. Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (10×-Vergrößerung, der Maßstab entspricht $100\ \mu\text{m}$) eines typischen Sichtfeldes bei der Quantifizierung der Besiedlungsdichte von *N. incerta*. B. Lichtmikroskopiebild von adhärennten Diatomeen (40×-Vergrößerung, der Maßstab entspricht $20\ \mu\text{m}$), gezeigt sind Raphenansicht und Seitenansicht.

3.4.5 Besiedlung und Haftstärke von *Ulva linza*

Die Experimente wurden in Kooperation mit der Gruppe von PROF. J. CALLOW und DR. M. CALLOW von DR. J. FINLAY an der Universität Birmingham (Birmingham, UK) durchgeführt, bzw. unter Anleitung von DR. J. FINLAY an der Universität Newcastle (Newcastle, UK).

GEWINNUNG DER ZOOSPOREN

Die adulten Pflanzen wurden direkt vor jedem Experiment geerntet, um aus ihnen die benötigten Zoosporen freizusetzen. Gesammelt wurden die Pflanzen entweder an der Küste von Llantwit Major ($51^{\circ}40'N$, $3^{\circ}48'W$, South Wales, UK; für Experimente in Birmingham) oder an der Ostküste bei Antwick ($51^{\circ}23'N$, $3^{\circ}30'W$, Northumberland, UK; für Experimente in Newcastle). Da der Wachstumszyklus der Grünalge vom Mondzyklus abhängt, findet die natürliche Freisetzung der Sporen vornehmlich bei Voll- oder Neumond statt. Um eine ausreichende Sporenkonzentration zu gewährleisten, wurden die Pflanzen 2-3 Tage zuvor geerntet. Bei der Ernte wurde darauf geachtet, hauptsächlich Pflanzen mit weißen Spitzen zu sammeln (Sporophyten, Abbildung 41 A und B), die bis zur Verwendung leicht getrocknet auf Eis gelagert wurden. Zur Gewinnung der Sporen wurden die hellen Spitzen abgeschnitten (Abbildung 41 B). Sie deuten auf bereits freigesetzte Sporen hin und zeigen somit, dass die Pflanze Sporen produziert hat.

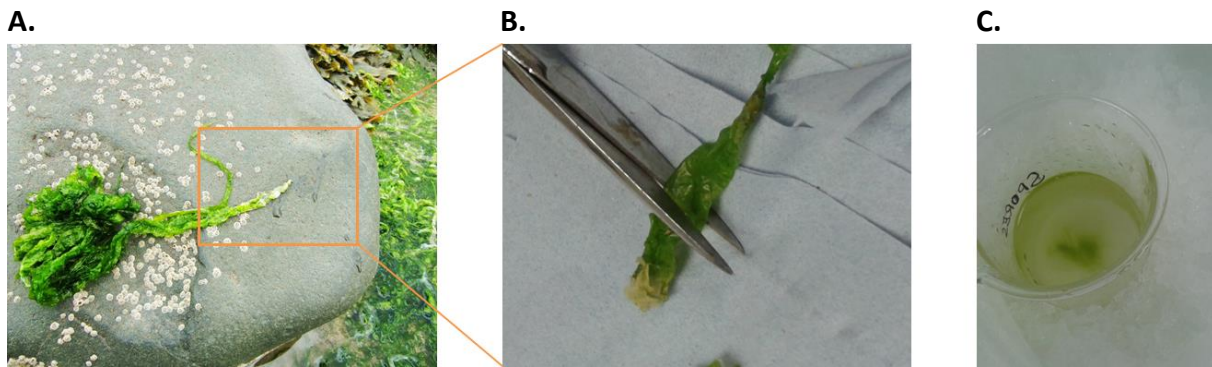


Abbildung 41. Illustration der Gewinnung der *U. linza* Zoosporensuspension. A. Geerntetes Büschel von adulten Grünalgen. B. Schnitt der Sporen-enthaltenden Spitzen. C. Suspension der Sporen auf Eis, die negativ phototaktischen Sporen schwimmen an den Boden des Becherglases.

Zur Freisetzung der Sporen wurden die gewonnenen Spitzen in Meerwasser gegeben (20 µm gefiltertes Tropic Marin® in Birmingham, 20 µm gefiltertes natürliches Seewasser in Newcastle) und an einem hellen Ort platziert. Nach wenigen Minuten wurde die nun grüne Lösung zur ersten Reinigung durch übereinander liegende 100 µm-, 50 µm- und 20 µm-Nylon-Netzfilter filtriert. Eine weitere Reinigung erfolgte durch Platzieren der Sporensuspension auf Eis. Die negativ-phototaktischen Sporen schwimmen an den Boden, können aber aufgrund der Kälte nicht adhären (Abbildung 41 C). Die aufkonzentrierten Sporen wurden mit einer Pipette abgetrennt und erneut in Meerwasser verdünnt. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Die gewonnene Sporensuspension wurde permanent gerührt, um die Adhäsion der Sporen bei Raumtemperatur zu vermeiden. Die optische Dichte wurde auf 0,15 (OD_{660}) eingestellt, was einer Sporenkonzentration von 10^6 mL^{-1} entsprach.

BESIEDLUNG

Die Experimente wurden auf beschichteten NexterionB®-Objektträgern durchgeführt. Dabei wurden jeweils drei Replikate einer zu untersuchenden Oberfläche in einer QuadriPERM-Schale gruppiert. Nach Präinkubation der Proben in 10 mL sterilem ASW wurde das Medium durch 10 mL der Sporensuspension ersetzt. Nach 45 min Inkubation im Dunkeln wurden die Proben vorsichtig in sterilem ASW gewaschen, um nicht adhären und schwimmende Sporen zu entfernen. Die anschließende Fixierung erfolgte mit 2,5 % Glutaraldehyd in ASW über mindestens 20 min, nach dreimaligem Austausch mit deionisiertem Wasser wurden die Proben luftgetrocknet.

ADHÄSIONSSTÄRKE

Nach dem oben beschriebenen Besiedlungsexperiment wurden die Proben nicht fixiert, sondern in einem kalibrierten Wasserkanal einer turbulenten Scherspannung von 52 Pa ($520 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$) ausgesetzt. Anschließend erfolgte die Fixierung und Auswertung wie oben beschrieben mit Hilfe der Autofluoreszenz von Chlorophyll a. Die Zelldichte auf den Replikaten aus dem Flusskanal wurde mit der auf den direkt nach der Besiedlung fixierten Replikaten verglichen.

AUSWERTUNG

Auf jedem Replikate wurden gleichmäßig verteilt 30 Sichtfelder ($440 \mu\text{m} \times 330 \mu\text{m}$) ausgewählt. Die Dichte der adhären Zellen wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (10x-Vergrößerung,

Axioplan, Zeiss, Göttingen, Deutschland) und der Herstellersoftware (Axiovision, Zeiss) quantifiziert. Die Visualisierung der Zellen erfolgte über die Autofluoreszenz von Chlorophyll (Abbildung 42 A).

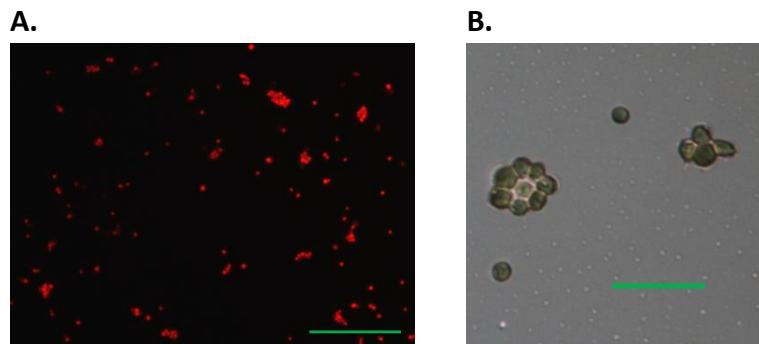


Abbildung 42. A. Fluoreszenzmikroskopieaufnahme (10×-Vergrößerung, der Maßstab entspricht 100 μm) eines typischen Sichtfeldes bei der Quantifizierung der Besiedlungsdichte von *U. linza*. B. Lichtmikroskopiebild adhärenter Sporen (40×-Vergrößerung, der Maßstab entspricht 20 μm).

3.4.6 Besiedlungsverhalten von *Balanus amphitrite*

Die Experimente wurden in Kooperation mit der Gruppe von PROF. A. CLARE an der School of Marine Science and Technology in Newcastle (UK) von DR. N. ALDRED durchgeführt.

SEEPOCKENKULTUR

Ausgewachsene Seepocken von *Balanus amphitrite* wurden bei 23 °C in Meerwasser mit einem Hell-Dunkel-Rhythmus von (16 : 8) h kultiviert. Zur Isolierung der Cyprilarven wurden die erwachsenen Organismen über Nacht an der Luft getrocknet und anschließend in frisches Meerwasser überführt. Die so freigesetzten Nauplii wurden für 4 d bei 28 °C mit einem Hell-Dunkel-Rhythmus von (12 : 12) h in mit Antibiotika versetztem gefiltertem ASW (0,45 μm) bis zum Larvenstadium kultiviert. Anschließend wurden die Cyprilarven abfiltriert und in frisches ASW transferiert, in dem sie bei 6 °C weitere 3 d im Dunkeln aufbewahrt wurden.

BESIEDLUNG

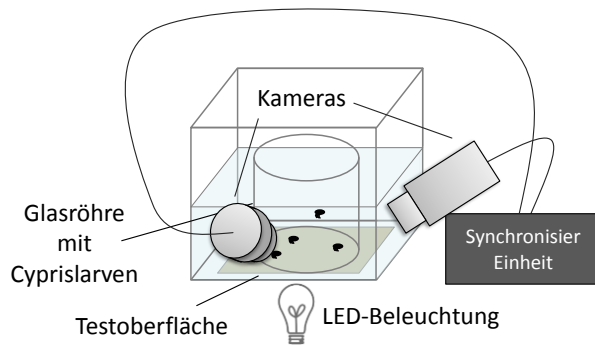
Je nach Experiment wurden beschichtete NexterionB®-Objektträger, in QuadriPERM-Schalen gruppiert, oder Rollrandgläser verwendet. Zu untersuchende Oberflächen wurden 1 h vor dem Experiment in ASW präinkubiert, anschließend wurden ~ 20 Cyprilarven in gefiltertem ASW auf die Oberflächen gebracht. Die Inkubation erfolgte bei 28 °C im Dunkeln, nach verschiedenen Zeiträumen wurde der Anteil von noch schwimmenden und adhärenen Larven mikroskopisch quantifiziert.

STEREOSKOPIE

Der prinzipielle Aufbau des Stereoskopie-Experiments ist in Abbildung 43 A gezeigt.²⁴⁹ Auf der Testoberfläche, die sich am Boden eines mit Meerwasser Behälters gefüllten befand, wurde eine Glasröhre platziert um zu gewährleisten, dass die Larven sich nur im relevanten Bereich bewegen konnten. Darüber befanden sich zwei Kameras, die vertikal zur Oberfläche in einem Winkel von 20° ausgerichtet waren und in der horizontalen Ebene einem Winkel von 90° einschlossen. Sie waren mit einem Gerät zur Synchronisation verbunden. Der Aufbau wurde von unten durch zwei LED-Lichter (Nah-IR) beleuchtet. Zu Beginn des Experiments wurden ~ 30 Cyprilarven in die Glasröhre gegeben,

ihr Verhalten wurde über die nächsten 5 min aufgenommen. Die Auswertung ihrer Bewegungsspuren erfolgte mit der Software SIMI® (Simi Reality Motion Systems GmbH, Unterschleißheim, Deutschland). Abbildung 43 B zeigt beispielhaft eine solche Spur für eine der Kameras, außerdem sind die Glasröhre, die Testoberfläche und die Cyprislarven zu erkennen.

A.



B.

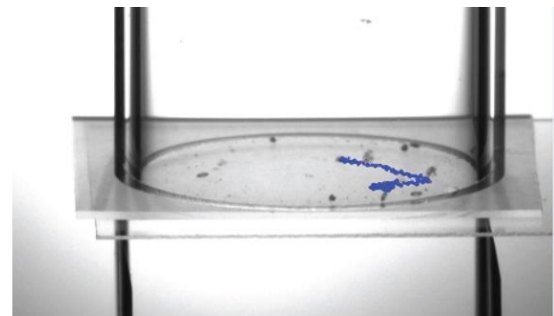


Abbildung 43. A. Illustration des stereoskopischen Aufbaus, bestehend aus zwei Kameras, einem Behälter mit Meerwasser und der Testoberfläche. Angepasst nach Maleschlijski, Dissertation 2014.²⁵⁰ B. Repräsentatives Bild einer Kamera mit der Bewegungsspur einer Cyprislarve.

3.4.7 Feldstudien

3.4.7.1 Florida Institute of Technology (FIT, USA)

Die Experimente wurden in Kooperation mit der Gruppe von PROF. G. SWAIN am Florida Institute of Technology (FIT, Melbourne, FL, USA) durchgeführt. Polysaccharide wurden im Dezember 2010 von DR. M. ALLES, DR. I. THOME, DR. S. VATER und DR. M.P. ARPA SANCET. getestet, zwitterionische gemischte SAMs im Juni 2012.

STATISCHE IMMERSION

Die Experimente wurden auf einem Forschungsgelände des FIT an der Ostküste Floridas an der „Indian River Lagoon“ in der Nähe von Melbourne, FL durchgeführt (27°53'39"N, 80°28'35"W Abbildung 44 A). Es wurden beschichtete Nexterion®-Objektträgern verwendet.

Die Proben wurden in gleichmäßigen Abständen zueinander in Objektträgerhaltern gruppiert (Abbildung 44 C) und ~0,4 m unter der Wasseroberfläche platziert. Nach der jeweiligen Immersionszeit wurden die Probenhalter unter Wasser in Behälter überführt, um die Berührung mit der Wasser-Luft-Grenzfläche zu vermeiden. Anschließend erfolgte die Fixierung der Mikroorganismen.

Im Fall der Polysaccharid-Proben wurde jeweils ein Replikat für 24 h der natürlichen Population im Meerwasser ausgesetzt. Die Fixierung erfolgte über min. 1 h mit Glutaraldehyd, die Endkonzentration betrug 2,5 Vol.-% in Meerwasser. Anschließend wurde die Fixierlösung in mehreren Schritten durch ASW mit abnehmender Salinität (durch Verdünnung mit deionisiertem Wasser) ausgetauscht. Das Wasser wurde danach durch Ethanol-Wasser-Mischungen mit steigendem Ethanol-Gehalt (25 %, 50 %, 75 %, 100 %) ausgetauscht, abschließend wurde das Ethanol gegen HMDS (Hexamethyldisilazan) ausgetauscht und die Proben luftgetrocknet.

Die SAM-Proben wurden in vier Sätzen inkubiert, dreimal für 48 h und einmal für 24 h. Pro Oberflächenchemie und Durchgang wurden je 2 Replikate verwendet. Die Inkubation erfolgte analog wie für die PS-Oberflächen beschrieben. Die Fixierung erfolgte mindestens 1 h lang mit Formaldehyd, die Endkonzentration betrug 5 Vol.-% in Meerwasser. Anschließend wurde die Fixierlösung durch gefiltertes Meerwasser ausgetauscht. Nach mehrfachem Austausch mit destilliertem Wasser wurden die Proben luftgetrocknet.



Abbildung 44. A. Lage des FIT-Testgeländes, B. Steg an dem die Experimente durchgeführt wurden. C. Probenhalter mit Objektträgern.

AUSWERTUNG

Die Visualisierung und Quantifizierung der fixierten adhärenen Mikroorganismen erfolgte durch Lichtmikroskopie (TE-2000-U, Nikon) bei 15×-Vergrößerung (NA = 0,25, Ph1). Auf jedem Replikat wurden gleichmäßig verteilt 40 (PS-Proben) bzw. 60 (SAM-Proben) Sichtfelder aufgenommen (1340 μm \times 1000 μm). Abbildung 45 zeigt die am häufigsten aufgetretenen Organismen. Überwiegend wurden verschiedene Diatomeen-Spezies beobachtet (A-I), außerdem zwei Arten von begeißelten Mikroorganismen (J+K). Die Identifizierung erfolgte nach Zargiel *et al.*⁶⁹

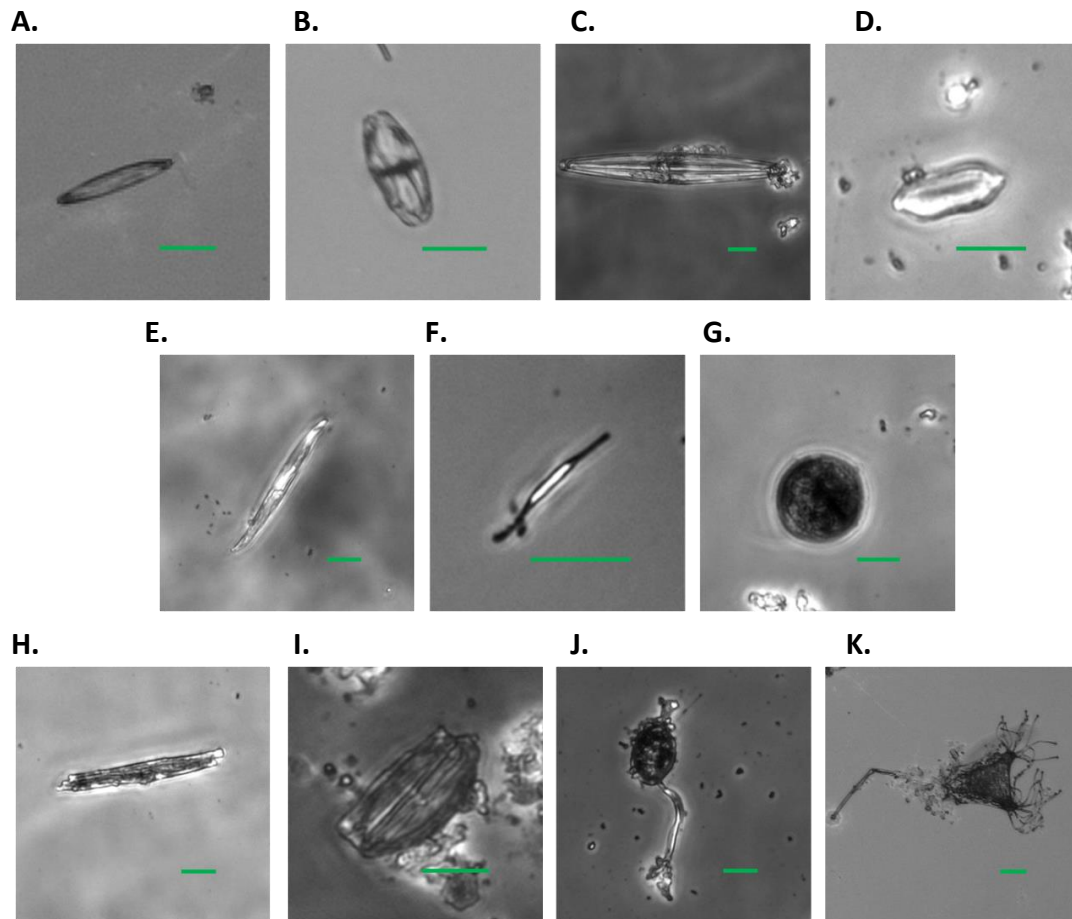


Abbildung 45. Lichtmikroskopiebilder bei 15×-Vergrößerung der am häufigsten auftretenden Organismen, der Maßstab entspricht jeweils 20 µm. A. *Navicula*. B. *Amphora*. C. *Nitzschia*. D. *Progonoi*. E. *Gyrosigma*. F. *Cylindrotheka*. G. *Coscinodiscus*. H. *Bacillaria*. I. *Mastogloia*. J. und K. *Peritrich* (begeißelte Organismen).

3.4.7.2 Universität Singapur (Singapur)

Experimente wurden in Kooperation mit der Gruppe von DR. S. TEO am Tropical Marine Science Institute an der Universität Singapur (Singapur) durchgeführt.

STATISCHE IMMERSION

Die Experimente erfolgten auf einem Forschungsgelände der Universität Singapur (1°17'39"N, 103°45'35"E, Abbildung 46 A). Hierzu wurden beschichtete NexterionB®-Objekträger verwendet.

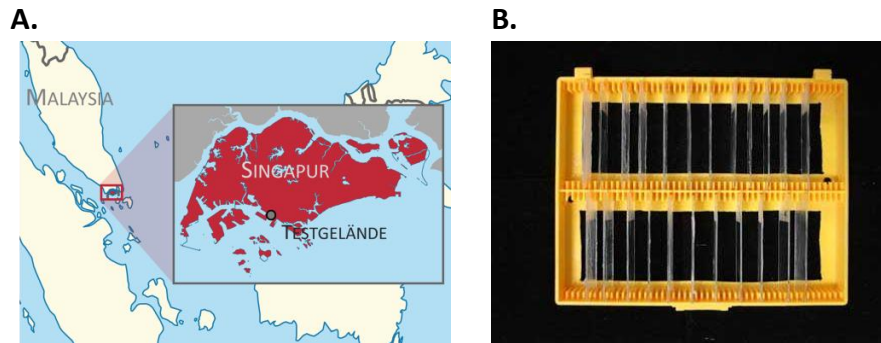


Abbildung 46. A. Lage des Testgeländes der Universität Singapur. B. Anordnung der Objektträger im Probenhalter.

Die Proben wurden in gleichmäßigen Abständen zueinander auf Objektträgerhaltern gruppiert (Abbildung 46 B) und $\sim 0,5$ m unter der Wasseroberfläche platziert. Nach 2 Wochen Inkubation im Meer wurden die einzelnen Objektträger mit einer Canon Powershot G10 (Canon, Tokio, Japan) fotografiert. Zur Bestimmung der Adhäsionsstärke der Organismen wurden die Proben mit einem kalibrierten Wasserstrahl bei 50 psi (~ 345 kPa) und 100 psi (~ 690 kPa) gereinigt und anschließend erneut fotografiert. Es wurden jeweils 10 Replikate untersucht.

AUSWERTUNG



Abbildung 47. Typische Besiedlung einer Oberfläche nach den 2 Wochen Inkubationszeit im Meer. Gezeigt ist ein umgeschichteter Glasobjektträger.

Pro Oberflächenbeschichtung wurde eine Fläche von ~ 140 cm² evaluiert, pro Objektträger wurde ein 2,5 mm breiter Rand von der Analyse ausgeschlossen. Es wurden hauptsächlich „harte“ *Fouling*-Spezies wie Seepocken, Bryozoa oder Mollusken beobachtet. Anhaftende

Organismen wurden identifiziert und quantifiziert, Abbildung 47 zeigt das typische Aussehen eines ganzen Objektträgers nach einer Inkubationszeit von zwei Wochen im Meerwasser.

3.5 Statistische Analyse

Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den verschiedenen Testoberflächen wurde durch einseitige Varianzanalyse (engl. „analysis of variance“, ANOVA) mit paarweisen Tukey-Vergleichstests ermittelt. Bei einem p-Wert unter 0,05 wurde das Datenpaar als statistisch signifikant unterschiedlich betrachtet.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Als inerte Materialien werden solche bezeichnet, die der Wechselwirkung mit ihrer Umgebung widerstehen können. Im speziellen Fall des *Biofouling*s werden damit besonders Oberflächenbeschichtungen beschrieben, die die Anlagerung von organischen Substanzen wie Proteinen und die Anhaftung von Organismen verhindern. Zum Verständnis der komplexen Einflussgrößen, die grundlegend die Dynamik des *Biofouling*-Prozesses bestimmen, hat es sich bewährt, einzelne Parameter mittels Modelloberflächen zu studieren. Abbildung 48 gibt eine Übersicht der in dieser Arbeit verfolgten Ansätze, deren Präparation, Charakterisierung und biologische Evaluierung in den folgenden Abschnitten vorgestellt wird. Als Kerneigenschaft für antiadhäsive Eigenschaften gilt eine ausgeprägte Hydratation, die daher allen Oberflächentypen gemeinsam war.

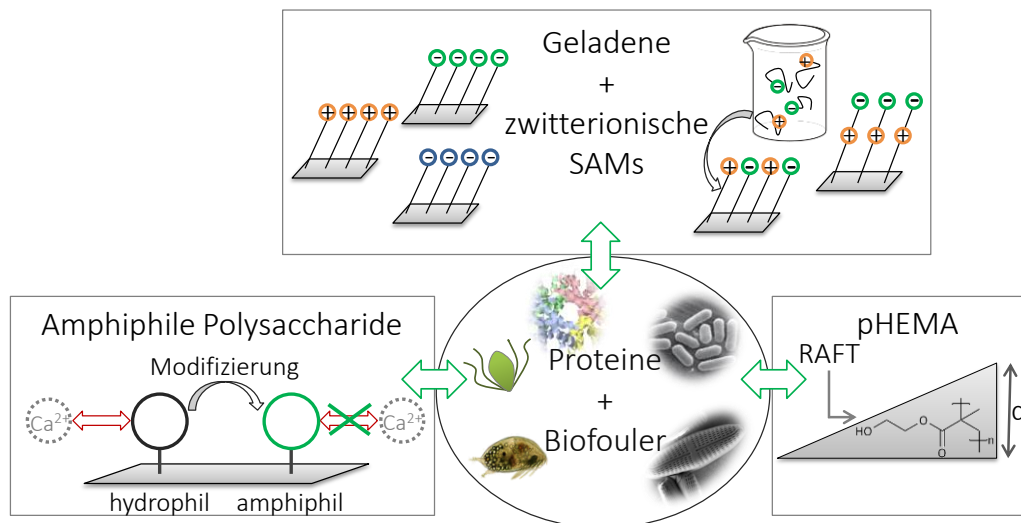


Abbildung 48. Übersicht der Struktur dieser Arbeit: Geladene und zwitterionische SAMs, amphiphile Polysaccharide und pHEMA-Filme wurden präpariert und charakterisiert. Im Anschluss wurden die Auswirkungen dieser Oberflächen mit spezifisch variierenden Eigenschaften auf *Fouling*-Systeme evaluiert.

Eine Klasse von inerten Materialien, die in den letzten Jahren intensiv untersucht wurde, sind zwitterionische Polymere.^{23,164,251} Diese nach außen hin neutralen Moleküle verfügen über eine starke Hydratation, die durch elektrostatische Wechselwirkungen der funktionellen Gruppen zustande kommt.^{179,252} Zu dieser Materialklasse zählen beispielsweise die natürlich vorkommenden Phosphorylcholine, deren Biokompatibilität und Proteinresistenz intensiv untersucht wurde.^{143,176,253} Um den Einfluss unterschiedlicher Ladungsträger und ihrer Kombination auf die biologische Wirkung solcher Beschichtungen zu untersuchen, wurde ein System verschiedener Alkanthiole gewählt, aus denen selbst-assemblierte Monolagen (SAMs) präpariert wurden. Durch die Verwendung von Thiolmolekülen mit variierender Ladungsträgerterminierung, von Mischungen aus ihnen und von zwitterionischen Betain-Thiolen konnten die Auswirkungen von positiver und negativer Ladung, der Natur der Ladungsträger, der verschiedenen zwitterionischen Monolagen und der Bedeutung der Ladungsneutralität analysiert werden.

Auch Polysaccharide sind Materialien, die durch ihr chemisches Grundgerüst von Natur aus hydratisiert sind.²⁴ Ihre prinzipielle Eignung für inerte Beschichtungen wurde schon für eine Reihe von Anwendungen, beispielsweise im medizintechnischen Bereich, demonstriert.²⁰⁸ In mariner

Umgebung allerdings, die im Fokus dieser Arbeit stand, konnten die auf diesen Erfahrungen aufbauenden Erwartungen an die Resistenzeigenschaften verschiedener immobilisierter Kohlenhydrate nicht erfüllt werden.²⁶ Gegenstand dieser Studie war daher die Verbesserung solcher Beschichtungen. Eine Modifizierung mit einem fluorierten Amin erlaubte es, die Auswirkungen amphiphiler Eigenschaften auf die ursprünglich hydrophilen Polysaccharidfilme zu untersuchen. Des Weiteren sollte diese Derivatisierung die Fähigkeit der Carboxylgruppen der Saccharideinheiten, mit Ca(II)-Ionen zu wechselwirken blockieren und damit die antiadhäsiven Eigenschaften der Filme in mariner Umgebung verbessern.

Um Modellsysteme in einen anwendungsbezogeneren Kontext zu bringen, können vielversprechende Bausteine, wie Betain- oder Polysaccharideinheiten, in Polymerfilme eingebaut werden. Ein breit anwendbares Verfahren, das mit vielen Monomeren kompatibel ist, ist die RAFT-Polymerisation. Für mittels dieser Methode polymerisierte Poly(Hydroxyethylmethacrylat)-Filme (pHEMA) wurde beispielhaft der Schichtdickeneinfluss solcher hydratisierten Polymere auf ihre Resistenz analysiert.

4.1 Geladene und zwitterionische SAMs

Zwitterionische Materialien, hauptsächlich polymere Betain-Methacrylate, sind in den letzten Jahren als inerte Oberflächen in den Fokus der Forschung gerückt.^{23,169,175,254-255} Durch ausgeprägte elektrostatische Wechselwirkungen mit Wassermolekülen sind solche Systeme stark hydratisiert, was im Allgemeinen zur Erklärung ihrer hohen Protein-, Zell- und Organismenresistenz herangezogen wird.¹⁷⁹ In diesem Zusammenhang können verschiedene funktionelle Einheiten der zwitterionischen Materialien, wie die eng verwandten Carboxy- oder Sulfobetaine, unterschiedliche Auswirkungen auf das Adhäsionsverhalten von Organismen haben.^{39,256} Wie bei anderen polymeren Systemen auch, werden die Eigenschaften von Beschichtungen mit solchen Makromolekülen von einer Reihe von Faktoren wie Kopplungsdichte und Schichtdicke mitbestimmt. Die Identifizierung und selektive Untersuchung einzelner Parameter wird somit erheblich erschwert. SAMs sind in diesem Kontext ein bewährtes Werkzeug, da sie erlauben, einzelne Faktoren, wie beispielsweise funktionelle Endgruppen, gezielt zu variieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher geladene und gemischte zwitterionische SAMs aus ladungsträgerterminierten Thiolen präpariert, um im Einzelnen den Einfluss dieser Terminierungen untersuchen zu können. Die Auswahl der Gruppen war dabei an natürlich vorkommenden Ladungsträgern angelehnt.^{165,257-258} In vielen biologischen zwitterionischen Systemen ist die positive Ladung an einem alkylierten Stickstoff lokalisiert, weshalb in der vorliegenden Studie ein Trimethylammonium-Thiol als Äquivalent diente. Bei der anionischen Komponente gibt es größere Variationen, wobei häufig Phosphonate (beispielsweise in Phosphorylcholinen), Carboxylate (in Carboxybetainen) und Sulfonate (in Sulfobetainen) die Ladungsträger darstellen; die Thiole wurden dementsprechend gewählt. Die Strukturen und Bezeichnungen der in dieser Studie eingesetzten ladungsträgerterminierten Moleküle zur Präparation zwitterionischer SAMs sind in Abbildung 49 gezeigt.

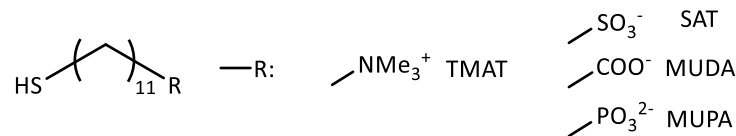


Abbildung 49. Struktur und Abkürzungen der verwendeten Alkanthiole mit Ladungsträgerterminierungen.

Die Herausforderung bei der Herstellung gemischter Monolagen aus Lösungen verschiedener solcher Thiole bestand darin, dass die Assemblierung nicht nur durch die Lösungszusammensetzung bestimmt wird. Im Fall von geladenen Endgruppen spielt ebenso der Ladungsausgleich auf der Oberfläche eine Rolle.^{109,114} Anders als bei solchen ladungsdominierten Systemen verhält es sich bei Mischungen aliphatische Thiole mit Methyl- und Hydroxyterminierung, die zum direkten Vergleich der unterschiedlichen Assemblierungsdynamiken ebenfalls präpariert wurden.

In den folgenden Abschnitten wird daher zunächst die Charakterisierung von SAMs aus Assemblierungslösungen verschiedener Alkanthiolanteile der unterschiedlichen Komponenten gezeigt. Um die Assemblierungsbedingungen zu optimieren, wurde die Präparation für die ladungshaltigen Systeme bei zwei unterschiedlich konzentrierten Lösungen (1 mM und 0,2 mM) untersucht. Dafür wurden zunächst die reinen entgegengesetzt geladenen Komponenten in entsprechenden Konzentrationen in Ethanol gelöst und diese als Stammlösungen zur Herstellung der Assemblierungslösungen gemischt.

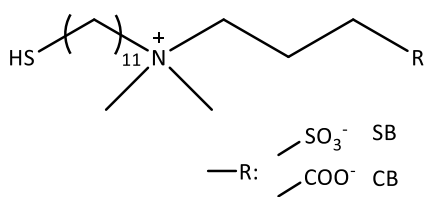


Abbildung 50. Struktur der Alkanthiole mit zwitterionischer Terminierung.

Da neben der Präsenz der Ladungsträger auch ihre genaue Position an der Grenzfläche eine Rolle spielen kann, wurden neben den reinen Komponenten auch Thiole mit zwitterionischen Endgruppen in die Studie miteinbezogen. Im Gegensatz zu den gemischten Monolagen war die gesamte zwitterionische Einheit bei diesen Betain-Thiolen an jeweils einer Alkylkette lokalisiert (Abbildung 50).

Nach der Charakterisierung der verschiedenen Assemblierungsbedingungen wurde der Einfluss der präparierten Modelloberflächen auf die Adsorption von Proteinen und die Adhäsion von marinen Spezies, Sporen der Grünalge *U. linza*, *Navicula*-Kieselalgen und einer realen Population, näher analysiert.

4.1.1 Charakterisierung

Im Folgenden werden die Ergebnisse zur Messung des statischen Wasserkontaktwinkels, der Schichtdickenbestimmung durch Ellipsometrie und XPS-Charakterisierung der gemischten SAMs vorgestellt. Im ersten Abschnitt wird auf die Mischungen der ungeladenen Thiole eingegangen, anschließend werden ihnen die ladungsterminierten gegenübergestellt. Die Ergebnisse für die verschiedenen Konzentrationen werden dabei zunächst getrennt dargestellt und anschließend verglichen.

4.1.1.1 Assemblierung von Mischungen hydrophiler und hydrophober Thiole

Wie schon in Abschnitt 2.2 beschrieben, hängt das Assemblierungsverhalten von gemischten SAMs von einer Reihe von Faktoren wie Lösungsmittel, Konzentration und der Art des verwendeten Thiols ab. Der folgende Abschnitt beschäftigt sich mit binären Mischungen aus dem methylterminierten Dodecanthiol (DDT) und dem hydroxyterminierten Hydroxyundecanthiol (HUDT), die aus 1 mM Lösung präpariert wurden. Da DDT hydrophobe und HUDT hydrophile Eigenschaften aufweist, können Mischungen der beiden Moleküle durch die Anwesenheit beider Elemente als amphiphil angesehen werden.

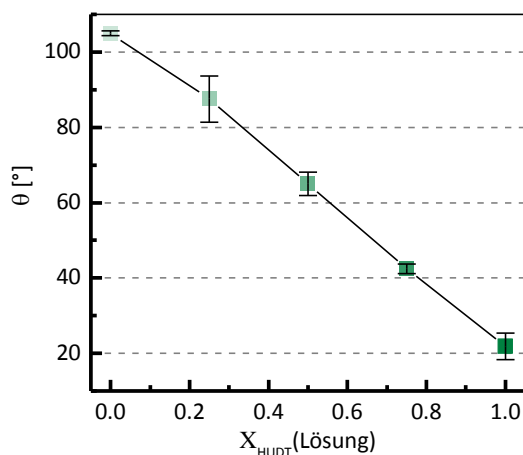


Abbildung 51. Strukturen des hydrophoben DDT und des hydrophilen HUDT, deren Mischungen untersucht wurden.

Diese Art von SAMs ist prinzipiell literaturbekannt.^{104,127} Dennoch ist es an dieser Stelle wichtig, ihr charakteristisches Assemblierungsverhalten zu demonstrieren, um es später mit dem von ladungstragenden Thiolen vergleichen zu können.

Die statischen Kontaktwinkel θ und Schichtdicken d der präparierten SAMs mit zunehmendem Anteil von HUDT in der Assemblierungslösung sind in Abbildung 52 zusammen gefasst.

A.



B.

| | d [Å] |
|---------|---------|
| DDT | 11 ± 1 |
| 75% DDT | 12 ± 1 |
| 50% DDT | 11 ± 1 |
| 25% DDT | 12 ± 1 |
| HUDT | 12 ± 1 |

Abbildung 52. Eigenschaften der gemischten SAMs aus DDT und HUDT. A. Verlauf des statischen Kontaktwinkels θ mit zunehmendem Anteil X von HUDT in der Assemblierungslösung. B. Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken d der präparierten SAMs. Jeder Wert zeigt das Mittel aus drei Messungen auf zwei Proben, Fehlerbalken bzw. Fehler repräsentieren die Standardabweichung.

Der Kontaktwinkel sank mit steigendem Anteil von HUDT in der Assemblierungslösung kontinuierlich vom hydrophoben Bereich ($\theta_{\text{DDT}} = (105 \pm 1)^\circ$) in den hydrophilen ($\theta_{\text{HUDT}} = (22 \pm 4)^\circ$). Die Entwicklung von θ zeigte dabei einen praktisch linearen Zusammenhang (Abbildung 52 A). Die ellipsometrisch bestimmten Schichtdicken d (Abbildung 52 B) lagen alle im Bereich der theoretisch berechneten 12 Å bei Annahme eines Kippwinkels von 30° und den entsprechend dokumentierten Literaturangaben.²⁵⁹

Sie zeigten, dass auch bei den Mischungen hochgeordnete und dichtgepackte Monolagen erhalten wurden.

Zur weiteren Analyse der Oberflächen auf atomarer Ebene wurden sie XP-spektroskopisch charakterisiert. Die Anwesenheit des HUDT-SAMs zeigte ein Signal im O 1s-Bindungsenergiebereich; die Spektren für die verschiedenen Mischungsverhältnisse sind in Abbildung 53 A gegenüber gestellt. Mit abnehmendem Anteil von HUDT in der Assemblierungslösung verschob sich die genaue Position der O 1s-Spezies zu höheren Bindungsenergien, auch die Breite des Signals nahm zu. Diese Beobachtung kann auf die veränderte Umgebung des Sauerstoffs zurück geführt werden und wurde schon in anderen Arbeiten beschrieben.¹⁰⁴ Die Intensität des Signals nahm mit zunehmendem Anteil von DDT ab, sie kann daher zur Quantifizierung des HUDT-Anteils auf der Oberfläche herangezogen werden. Abbildung 53 B zeigt die so bestimmte Oberflächenzusammensetzung abhängig vom HUDT-Lösungsanteil. Auch hier zeigte sich annähernd der lineare Verlauf, der schon bei der Entwicklung der Kontaktwinkel beobachtet wurde. Der Anteil von HUDT auf der Oberfläche $X_{\text{HUDT}}(\text{Oberfläche})$ lag immer leicht unter dem in der Lösung angesetzten, was erneut mit früheren Publikationen übereinstimmte.¹⁰⁴

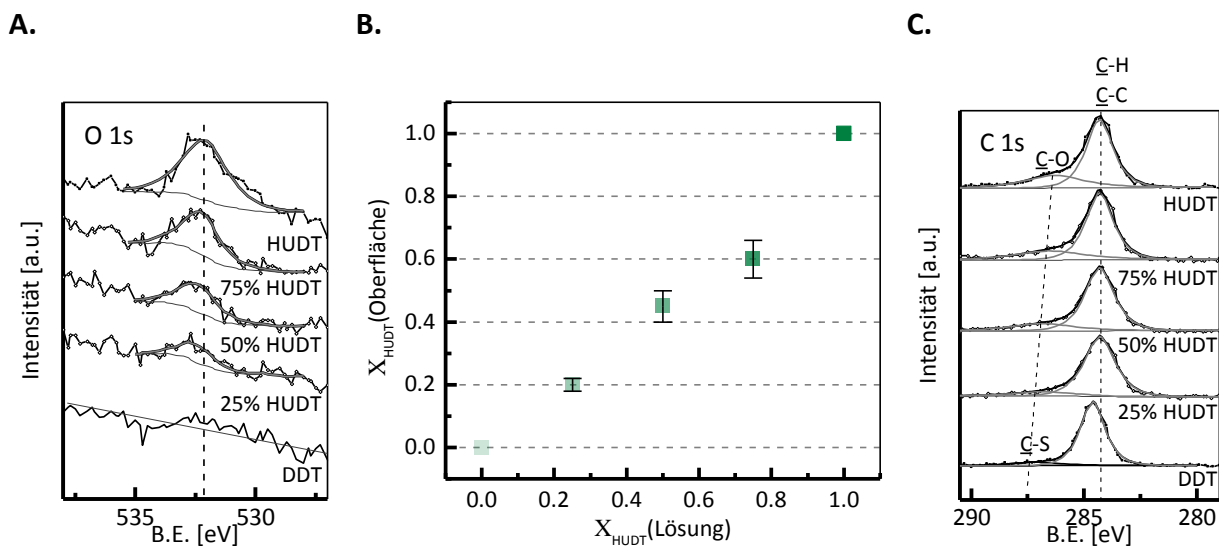


Abbildung 53. Zusammenfassung der XP-spektroskopischen Charakterisierung der gemischten SAMs aus DDT und HUDT. A. O 1s-Bindungsenergiebereich B. Zusammensetzung der gemischten SAMs auf der Oberfläche $X_{\text{HUDT}}(\text{Oberfläche})$ in Abhängigkeit vom HUDT-Anteil in der Lösung $X_{\text{HUDT}}(\text{Lösung})$, bestimmt anhand der Intensitäten des O1s-Signals. Die Fehler zeigen den typischen Fehler von 10 % bei XPS-Messungen C. C 1s-Bindungsenergiebereich (Intensitäten normiert auf die Intensität des aliphatischen Anteils bei BE = 284,7 eV).

Auch die C 1s-Spektren (Abbildung 53 C) veränderten sich systematisch mit variierender Lösungszusammensetzung. Die gezeigten Spektren wurden auf die Intensität des aliphatischen Anteils des Peaks bei 284,6 eV normiert. Das DDT-Signal bestand aus zwei Spezies, der Anteil der aliphatischen Kette war der molekularen Struktur entsprechend höher als der des Thiol-gebundenen Kohlenstoffs (287,1 eV). Auch das HUDT-Signal bestand aus zwei Signalen. Das bei höherer Bindungsenergie war im Vergleich zum DDT intensiver und zu niedrigerer Bindungsenergie verschoben (286,3 eV). Außerdem wies es eine höhere Halbwertsbreite (FWHM) auf, was auf den Beitrag des hydroxylgebundenen Kohlenstoffs zurückzuführen war. Dessen Bindungsenergie war im Vergleich zur Thiolkopfgruppe geringer, die beiden Peaks konnten jedoch beim verwendeten

Spektrometer nicht aufgelöst werden. Während die Position des aliphatischen Signals bei allen SAMs konstant bei 284,6 eV lag, verschob sich das Signal bei höherer Bindungsenergie systematisch mit abnehmendem Anteil von DDT zur niedrigeren Bindungsenergie. Auch die Intensität dieser Spezies stieg mit sinkendem DDT-Anteil.

Zusammenfassend zeigten die unterschiedlichen Charakterisierungsmethoden, dass das Mischungsverhältnis der Lösung für die verwendete Kombination aliphatischer Thiole direkt die Zusammensetzung des resultierenden SAMs auf der Oberfläche bestimmte.

4.1.1.2 Betain-SAMs mit zwitterionischer Endgruppe

Die Präparation der Monolagen mit zwitterionischen Endgruppen erfolgte über 24 h aus 1 mM ethanolischer Lösung. Ethanol zeigte sich im Vergleich zu anderen (Wasser, PBS, Methanol) als am besten geeignetes Lösungsmittel zur Präparation von inerten Sulfobetain-SAMs.²⁶⁰

Die sulfobetainteminierten Monolagen (SB) waren mit einem Wasserkontaktwinkel von $(15 \pm 3)^\circ$ hydrophiler als das homologe Carboxybetain (CB) mit $\theta_{CB} = (41 \pm 3)^\circ$ (Tabelle 10). Die durch spektrale Ellipsometrie bestimmte Schichtdicke von CB entsprach der theoretisch berechneten.* Für SB lag sie um 25 % niedriger.

Tabelle 10. Statische Wasserkontaktwinkel θ und durch spektrale Ellipsometrie bestimmte Schichtdicken d der SAMs mit zwitterionischer Endgruppe. Die angegebenen Werte zeigen den Mittelwert von zwölf Proben mit zugehöriger Standardabweichung. Die berechneten Schichtdicken wurden aus der mit Chem 3D bestimmten Länge des Moleküls bei einem Kippwinkel von 32° abgeschätzt.¹⁴⁷

| | θ [°] | d [Å] | d [Å] berechnet |
|----|--------------|------------|-------------------|
| SB | 15 ± 3 | 14 ± 2 | 19 |
| CB | 41 ± 3 | 18 ± 2 | 18 |

XPS-Untersuchungen der Oberflächen zeigten die Anwesenheit aller, aufgrund der molekularen Zusammensetzung erwarteten, Signale, Abbildung 54 fasst die relevanten Bindungsenergiebereiche zusammen. Für beide Thiole war das charakteristische Signal der Ammoniumgruppen im N 1s-Bindungsenergiebereich detektierbar. Bei SB waren im S 2p-Bereich zwei Signale sichtbar, die dem Au-gebundenen Thiolat und der Sulfonatendgruppe zugeordnet werden konnten. Für CB dagegen war nur erstere Spezies anwesend. Auch die Kohlenstoffspektren spiegelten die unterschiedlichen Endgruppen wider. Das C 1s-Signal des SB wies zwei separierbare Signale auf, die der aliphatischen Kette und den Kohlenstoffatomen mit Schwefel oder Stickstoffbindungspartner zugeordnet werden konnten. Das Signal des CB-SAMs zeigte noch einen zusätzlichen Anteil, der bei der für Carboxylgruppen typischen Bindungsenergie von 289 eV lag.

* ideale Schichtdicke wurde analog dem von Holmlin *et al.*¹⁴⁷ beschriebenen Vorgehen bestimmt: Die Länge des Au-gebundenen all-trans konfigurierten Thiols wurde mit dem Softwarepaket Chem 3D abgeschätzt. Die Schichtdicke ergab sich dann mit dem angenommenen Kippwinkel von 32° .

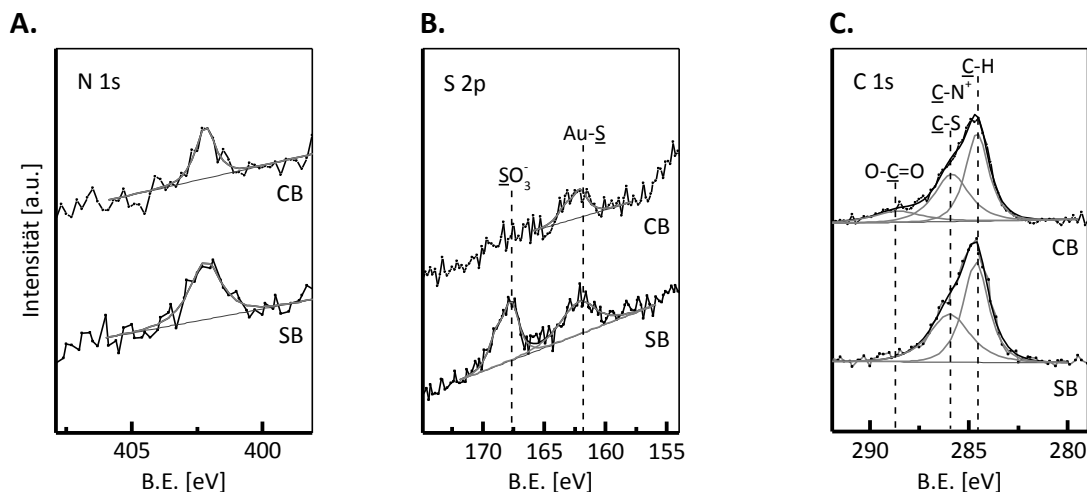


Abbildung 54. Typische XP-Spektren von SB und CB im A. N 1s-Bindungsenergiebereich B. S 2p-Bindungsenergiebereich. C. C 1s-Bindungsenergiebereich.

Das Verhältnis der Sulfonat- bzw. Carboxylgruppe zum Trimethylammonium-Stickstoff liegt stöchiometrisch bei 1 : 1. Bei SB war allerdings mit 1,9 : 1 und bei CB mit 4,8 : 1 die Intensität des Stickstoffsignals zu niedrig. Schon hier deutete sich an, was auch für die einzelladungsträgerterminierten und deren gemischte SAMs beobachtet wurde: die Intensität der geladenen Stickstoffgruppen war verhältnismäßig immer niedriger als stöchiometrisch erwartet. Dieses Phänomen kann auf mehrere Ursachen zurückgeführt werden. Einerseits bietet sich eine höhere Empfindlichkeit der Ammoniumgruppe gegen Strahlenschäden an, beispielsweise verursacht durch einen erhöhten Elektroneneinfang durch die positive Ladung. Ein solcher Zusammenhang würde einen beschleunigten Abbau der Gruppen während der Messung verursachen. Unterschiedlich starke Auswirkungen durch Strahlenschäden sind von SAMs mit variierenden funktionellen Gruppen durchaus bekannt.²⁶¹⁻²⁶² Andererseits könnte, ebenfalls zurückzuführen auf den positiv geladenen Charakter der Gruppe, der Wirkungsquerschnitt für die Erzeugung der Photoelektronen abweichen. Da dieser in die stöchiometrischen Berechnungen miteinflusst, hätte eine solche Abweichung signifikante Auswirkungen auf die resultierenden Ergebnisse. Die exakte Ursache konnte aber anhand der vorliegenden Daten nicht geklärt werden. Für beide Betaine war durch ihre molekulare Struktur eine Stöchiometrie von 1 : 1 der charakteristischen Gruppen sichergestellt. Da diese funktionellen Gruppen denen der ladungsträgerterminierten SAMs entsprachen, wurden die Oberflächensamensetzungen der gemischten SAMs bezogen auf das am Betain gemessene Peakverhältnis berechnet.

Zusammenfassend wiesen die XP-Spektren also charakteristische Signale für die funktionellen Gruppen auf: Im N 1s-Bereich für die Ammoniumkomponente, im S 2p-Bereich bei 168 eV für die Sulfonatterminierung und im C 1s-Bereich bei 289 eV für die Carboxylgruppe. Die durchgeführten Charakterisierungen zeigten daher die erfolgreiche Assemblierung der zwitterionisch terminierten Alkanthiole. Eine höhere Benetzbarkeit und geringere Schichtdicke von SB deuteten darauf hin, dass die molekulare Ordnung innerhalb der Schichten geringer war als bei CB, bzw. der von den Alkylketten eingenommene Kippwinkel unterschiedlich war.

4.1.1.3 Gemischte geladene SAMs aus 1 mM-Assemblierungslösung

Die Assemblierung aus höher konzentrierten Lösungen (1 mM) war problematisch, da sich vor allem das sulfonierte Alkanthiol SAT in dieser Konzentration nicht vollständig löste. Die Lösungen dieser Komponente waren gesättigt und somit niedriger konzentriert als die entsprechende TMAT-Lösung, deren Anteil in den gemischten Lösungen dementsprechend höher war. Insbesondere im Hinblick auf diese Tatsache sind die folgenden Resultate interessant und demonstrieren das individuelle Assemblierungsverhalten der unterschiedlichen Thiole.

Die statischen Wasserkontaktwinkel der reinen SAMs und der Thiolmischungen mit 25 %, 50 % und 75 % anionischer Komponente in der Lösung werden in Abbildung 55 verglichen. Der TMAT-SAM, der für alle Mischungen verwendet wurde, war mit $(36 \pm 5)^\circ$ hydrophiler als die anionischen SAMs. SAT $((49 \pm 4)^\circ)$ und MUDA $((46 \pm 6)^\circ)$ zeigten sich etwas hydrophober, während der Kontaktwinkel von MUPA $((68 \pm 2)^\circ)$ deutlich höher lag.

Die aus den Mischungen aus SAT und MUDA präparierten Oberflächen waren hydrophiler als die reinen Komponenten. Der Abfall des Kontaktwinkels war für die Sulfonat-haltigen Monolagen am stärksten ausgeprägt, was zu einer nahezu vollständigen Benetzung führte. Ein analoger Verlauf konnte für die SAMs aus gemischten Phosphonat-Lösungen dagegen nicht beobachtet werden, nur für Oberflächen mit einem 25 %igem Lösungsanteil von MUPA war der Kontaktwinkel leicht reduziert $((64 \pm 4)^\circ)$.

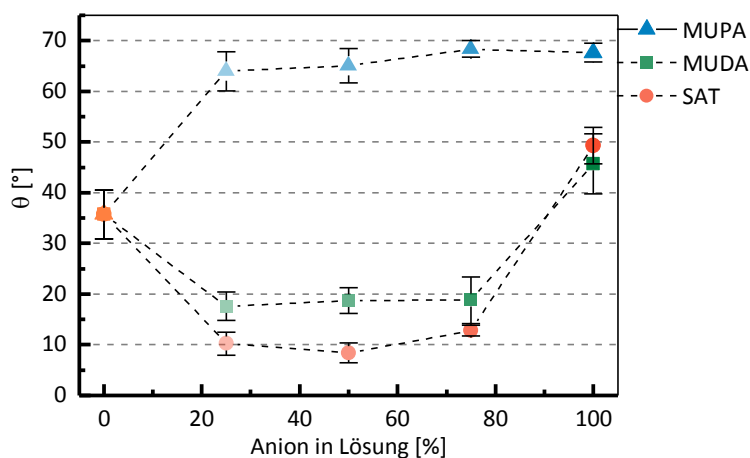


Abbildung 55. Abhängigkeit des Kontaktwinkels θ vom Anteil X des anionischen Alkanthiols in der Assemblierungslösung. Jeder Messpunkt zeigt den Mittelwert von mindestens drei Proben, auf denen je drei Stellen vermessen wurden. Die Fehlerbalken repräsentieren deren Standardabweichung.

Die ellipsometrisch bestimmten Schichtdicken der reinen und gemischten SAMs sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Bei Annahme einer 32°-Verkipfung relativ zur Oberflächennormalen beträgt diese für die verwendeten Thiole idealerweise 16 Å.^{147,†} TMAT entsprach mit (15 ± 2) Å diesem Wert besser als der in der Literatur dokumentierte.¹⁴⁷ Für SAT und MUDA lagen die gemessenen Werte im Bereich dieses theoretisch erwarteten und ebenfalls oberhalb der Literaturangaben.^{147,263} Die Mischungen mit SAT und MUDA führten zu etwas dünneren Schichtdicken. Alle MUPA-Schichten waren dagegen zwar dicker als eine solche ideale Monolage, entsprachen allerdings Literaturwerten für das Phosphonat-Thiol.²⁶⁴

Tabelle 11. Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken d der gemischten SAMs mit zunehmendem Anteil des anionischen Thiols in der Assemblierungslösung. Die angegebenen Werte zeigen den Mittelwert von mindestens drei Proben, auf denen je drei Stellen vermessen wurden. Die zugehörigen Standardabweichungen betragen maximal ± 2 Å.

| | d [Å] | d [Å] | d [Å] |
|------------|---------|---------|---------|
| | SAT | MUDA | MUPA |
| 0 % (TMAT) | 15 | 15 | 15 |
| 25 % | 15 | 14 | 25 |
| 50 % | 14 | 15 | 28 |
| 75 % | 13 | 14 | 26 |
| 100 % | 18 | 16 | 25 |

Um ein genaueres Bild der Oberflächenzusammensetzungen auf atomarer Ebene zu erhalten, wurden auch diese SAMs XP-spektroskopisch charakterisiert.

MISCHUNGEN MIT SAT

In Abbildung 56 sind die relevanten Bindungsenergiebereiche für das SAT-System zusammengefasst. Ein Indikator für die Anwesenheit des TMAT-SAMs war aufgrund der Ammoniumterminierung das N 1s-Signal, in Abbildung 56 A ist dessen Bindungsenergiebereich für die reinen und gemischten Monolagen im Vergleich gezeigt. Für SAT war kein Signal detektierbar, ein deutliches dagegen für TMAT und ein schwächeres für die Mischungen. Das Signal der gemischten Monolagen war jeweils um ~ 0,3 eV verschoben. Analog zu der Interpretation für das O 1s-Signal der HUDT-Mischungen

† Die Berechnung der idealen Schichtdicken der geladenen SAMs erfolgte analog wie in Abschnitt 4.1.1.2 beschrieben. Zum Vergleich mit dokumentierten Werten wurden Holmlin *et al.*, Langmuir **2001** für TMAT und SAT,¹⁴⁷ Mendoza *et al.*, Langmuir **2007** für MUDA²⁶³ und Lee *et al.*, Langmuir **1994**²⁶⁴ für MUPA herangezogen.

| | TMAT | SAT | MUDA | MUPA |
|-------------------------|--------|--------|--------|------|
| Länge des Moleküls [Å] | 18,7 | 18,9 | 18,6 | 19,0 |
| Ideale Schichtdicke [Å] | 15,9 | 16,0 | 15,8 | 16,1 |
| Literaturwerte [Å] | 13 ± 1 | 15 ± 2 | 15 ± 3 | 24 |

zeigte diese Verschiebung eine andere chemische Umgebung der betreffenden Spezies, die ebenfalls als Indikator für die gleichzeitige Anwesenheit beider Ladungsträger auf der Oberfläche gewertet werden konnte. Die zwei unterschiedlichen Schwefelspezies in SAT, das Au-gebundene Thiol und die Sulfonat-Endgruppe, führten im S 2p-Spektrum zu deutlich separierten Signalen. Diese waren typisch für die unterschiedlichen Oxidationszustände der Schwefelatome und analog den schon im SB-Spektrum beobachteten (Abbildung 56 B).²⁶⁵ Im reinen SAM hatten diese ein Intensitätsverhältnis von $\sim 2 : 1$, was vom stöchiometrischen Verhältnis ($1 : 1$) abwich. Aufgrund der Abschwächung des Thiolsignals durch die darüber liegende Alkylkette war dies jedoch zu erwarten und stimmte mit Literaturberichten überein.¹¹⁴ Für die gemischten Monolagen nahm die Intensität der Sulfonat-Spezies ab, das Thiolsignal dagegen blieb konstant. Analog zum N 1s-Signal wurde auch für das höhere S 2p-Bindungsenergiesignal eine Verschiebung beobachtet, allerdings in Richtung niedrigerer Bindungsenergie. Dieses Phänomen wurde bereits in früheren Arbeiten über gemischte SAMs bestehend aus Sulfonat- und kationischem Thiol beobachtet und auf die Bildung von Ionenpaaren zurückgeführt.¹¹³ Auch beim TMAT-SAM wurde neben dem SAM-typischen S 2p-Dublett bei 162 eV ein Signal bei der höheren Bindungsenergie detektiert, das in diesem Fall jedoch auf die Oxidation der Thiolgruppe zurückgeführt werden musste. In Spektren anderer Monolagen wurde dieses Signal nicht beobachtet, was wiederum auf eine besondere Empfindlichkeit dieses SAMs unter den beschriebenen Präparations- und Messbedingungen hindeutete.

Auch die C 1s-Signale zeigten charakteristische Zusammensetzungen (Abbildung 56 C). Für den TMAT-SAM bestand es aus zwei Anteilen. Der Beitrag bei der niedrigeren Bindungsenergie (284,8 eV) war der Alkylkette zuzuordnen, der breitere Peak bei 286,5 eV den direkt an das ladungstragende Stickstoffatom gebundenen Kohlenstoffatomen der Ammoniumterminierung. Zusätzlich trug auch der Thiol-gebundene Kohlenstoff zu diesem Signal bei, was bei der gegebenen Energieauflösung nicht einzeln angepasst werden konnte. Das Verhältnis der Signalanteile betrug $1 : (0,8 \pm 0,1)$, wobei der im Vergleich zum theoretischen Verhältnis von $1 : 1,8$ (bzw. $5 : 9$) deutlich höhere Anteil der höheren Bindungsenergiekomponente durch dessen exponierte Lage in der geordneten Schicht erklärbar war. Auch das entsprechende SAT-Signal ließ sich in zwei Anteile aufteilen: in den Anteil der aliphatischen Kette bei 284,7 eV und den deutlich kleineren der schwefelgebundenen Spezies bei 287,1 eV. Für die gemischten Monolagen lag das Verhältnis dieser beiden Signale zwischen dem der beiden reinen Komponenten.

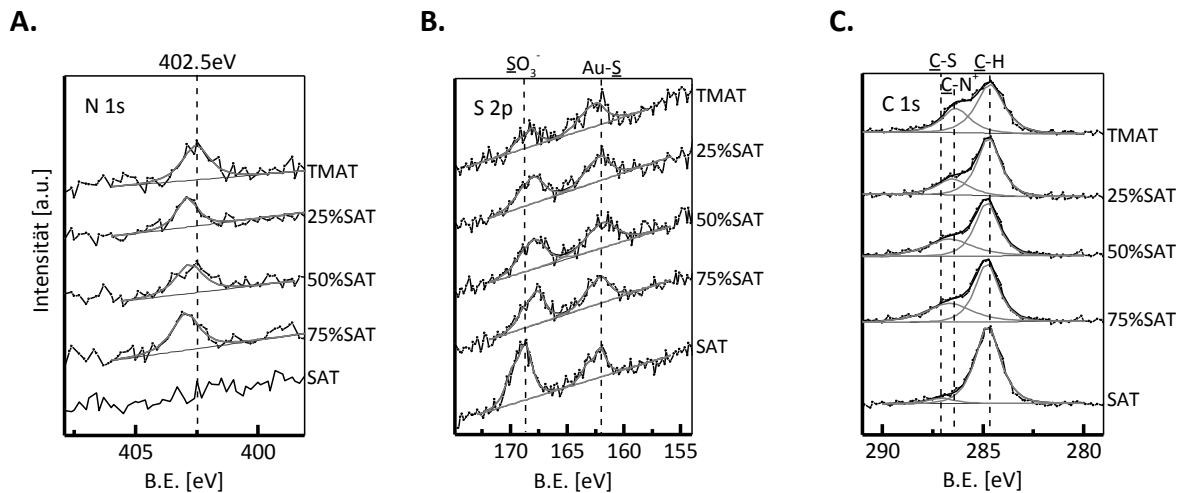


Abbildung 56. Typische XP-Spektren der gemischten SAMs mit TMAT und SAT in verschiedenen Mischungsverhältnissen in der Assemblierungslösung A. N 1s-Bindungsenergiebereich B. S 2p-Bindungsenergiebereich. C. C 1s-Bindungsenergiebereich.

Neben diesen qualitativen Beobachtungen wurde das Verhältnis der Thiole auf der Oberfläche auch quantitativ analysiert. Dazu boten sich die oben beschriebenen charakteristischen Signale der beiden reinen Komponenten an. In Abbildung 57 A ist das Verhältnis der beiden S 2p-Signale in Abhängigkeit der Lösungszusammensetzung gezeigt. Dieses Verhältnis lag für alle Mischungsverhältnisse konstant bei $\sim 1 : 1$. Der Vergleich mit dem reinen SAT zeigte, dass das Sulfonatthiol in den Mischungen zu $\sim 50\%$ vorhanden war.

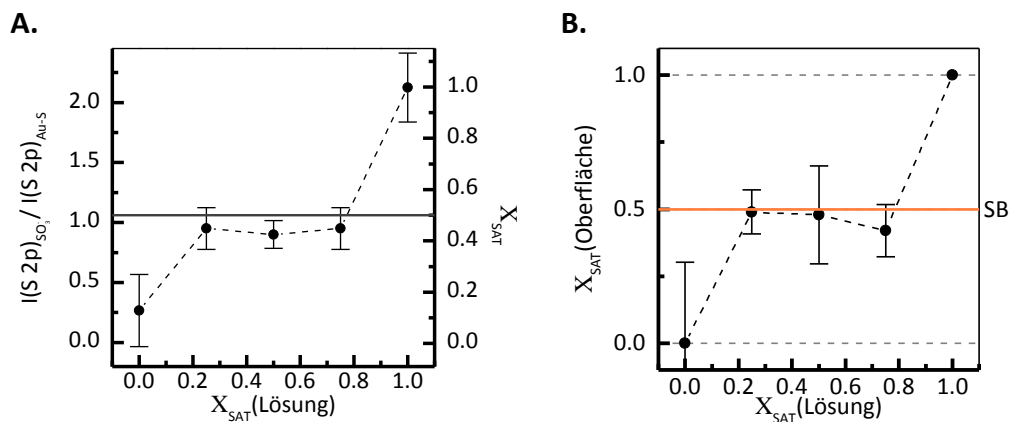


Abbildung 57. Quantitative Auswertung der XP-Signale für gemischte SAMs aus SAT und TMAT in Abhängigkeit der Assemblierungslösungszusammensetzung. A. Intensitätsverhältnisse der beiden S 2p-Signale (linke Achse). Um den SAT-Anteil zu bestimmen, wurden diese Verhältnisse auf den Wert von reinem SAT normiert (rechte Achse). B. Oberflächenanteil \bar{X} von SAT berechnet nach Gleichung (22) durch das Intensitätsverhältnis der N 1s- und S 2p(168 eV)-Signale im Vergleich zum entsprechenden Wert für den Betain-SAM. Die gezeigten Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert aus vier Messungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Da das N 1s-Signal für TMAT und das S 2p von SAT bei 168 eV charakteristisch für das jeweilige assemblierte Thiol war, gibt ihr Verhältnis theoretisch die Zusammensetzung der Gruppen auf der Oberfläche an. Der Anteil von SAT wird dabei durch

$$A_{SO_3^-} = \frac{I_{\sigma}(S\ 2p)_{168eV}}{I_{\sigma}(N\ 1s) + I_{\sigma}(S\ 2p)_{168eV}} \quad (20)$$

beschrieben. Zur Berechnung der relativen Intensitäten I_σ wurden die gemessenen Intensitäten I durch den jeweiligen Wirkungsquerschnitt σ (aufgeführt in Abschnitt 3.3.3) korrigiert ($I_\sigma = \frac{I}{\sigma}$). Aufgrund der schon bei den Betain-SAMs diskutierten niedrigen Intensität des N 1s-Signals wurden diese Messwerte mit einem empirischen Korrekturfaktor K korrigiert. Dieser stammt aus der Analytik des Betain-SAMS SB, bei dem das Nominalverhältnis der Gruppen 1 : 1 beträgt. K stellte dabei das Verhältnis zwischen dem stöchiometrisch gegebenen Anteil der Sulfonatkomponente von 0,5 und dem tatsächlich Beobachteten dar:

$$K = \frac{0,5}{A_{SO_3^-}(SB)} \quad (21)$$

Idealerweise läge er bei 1, durch die bei den Betain-SAMS diskutierten Effekte weicht er aber mit $K = 0,76$ davon ab. Der mit

$$X_{SAT}^{Oberfläche} = A_{SO_3^-}(SAT) \cdot K \quad (22)$$

berechnete Anteil von SAT in den assemblierten Monolagen ist in Abbildung 57 B gegen die Lösungszusammensetzung aufgetragen; er zeigte sich konstant bei $\sim 0,5$.

Dieser Oberflächenanteil stimmt gut mit dem Peakverhältnis der Schwefelsignale Abbildung 57 A überein.

Zusammenfassend ließ die durchgeführte Charakterisierung auf die dichtgepackte Assemblierung von Monolagen aus allen untersuchten Lösungszusammensetzungen schließen. Des Weiteren demonstrierten vor allem die Kontaktwinkelmessungen und XPS-Analytik, dass alle präparierten Monolagen die gleiche Zusammensetzung mit einem Anteil von 1 : 1 beider Thiolspezies aufwiesen.

MISCHUNGEN MIT MUDA

Für das MUDA-System wurden zum SAT analoge XPS-Untersuchungen durchgeführt (Abbildung 58). Im Bereich der N 1s-Bindungsenergie ließ sich erst ab einem relativ niedrigen Anteil von MUDA (10 %) ein Signal detektieren. Bei den im SAT-System verwendeten Mischungsverhältnissen von bis zu 75 % an negativer Komponente war dagegen die Anwesenheit des TMAT nicht nachweisbar. Die Zusammensetzung des C 1s-Signals des reinen MUDA-SAMs spiegelte den Aufbau des Moleküls wieder (Abbildung 58 B). Dieses ließ sich in drei Komponenten zerlegen, die der O=C=O-Endgruppe, der Au-gebundenen-Thiol-Gruppe und der Alkylkette zuzuordnen sind. Charakteristisch für den Carboxyl-SAM war das Signal bei 288,7 eV, das auch für die SAMs mit niedrigem Anteil des Thiols in Lösung (1 %) noch sichtbar war.

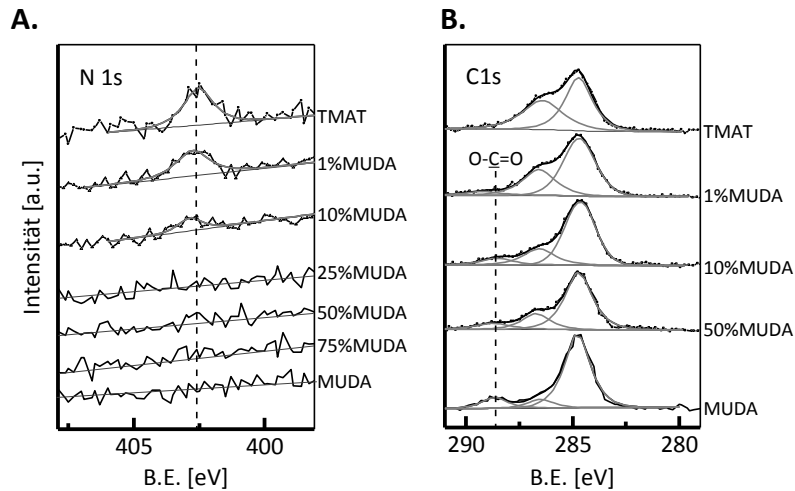


Abbildung 58. Typische XP-Spektren der gemischten SAMs mit TMAT und MUDA in verschiedenen Mischungsverhältnissen in der Assemblierungslösung A. N 1s-Bindungsenergiebereich B. C 1s-Bindungsenergiebereich.

Zur Quantifizierung des MUDA-Anteils in den assemblierten Monolagen bot sich hier die Intensität des charakteristischen Carboxylanteils im C 1s-Signal an. Den auf die Signalintensität des reinen MUDA normierten Verlauf dieser Relation in Abhängigkeit von der Lösungszusammensetzung zeigt Abbildung 59 A. Für einen Anteil von 50 % MUDA in der assemblierten Monolage wäre dieser Parameter bei 0,5 zu erwarten. Für alle untersuchten Mischungen war die Intensität des Carboxyls niedriger als für den reinen MUDA-SAM. Zusammen mit dem sich mit dem MUDA-Anteil verändernden Kontaktwinkel verdeutlichte dies eine von einem 100 % MUDA-SAM abweichende Zusammensetzung. Damit war die Anwesenheit des TMAT indiziert, dessen Anteil jedoch bei Oberflächen mit MUDA-Lösungsanteilen (X_{MUDA}) über $\sim 0,1$ zu gering war, um zu einem detektierbaren N 1s-Signal zu führen.

Eine Quantifizierung der Oberflächenszusammensetzungen analog zu Gleichung (22) eignete sich hier nur bedingt, da für dieses System das notwendige N 1s-Signal nicht für alle untersuchten Oberflächen detektierbar war. Zur Vollständigkeit wurde die Berechnung dennoch durchgeführt. Der Korrekturfaktor $K = 0,36$ wurde in diesem Fall aus den Messungen für den Carboxybetain-SAM CB bestimmt. Der MUDA-Anteil der Oberfläche ließ sich folglich durch

$$X_{MUDA}^{Oberfläche} = K \cdot \frac{I_{\sigma}(C\ 1s)_{O-C=O}}{I_{\sigma}(N\ 1s) + I_{\sigma}(C\ 1s)_{O-C=O}} \quad (23)$$

bestimmen und ist in Abbildung 59 B gezeigt.

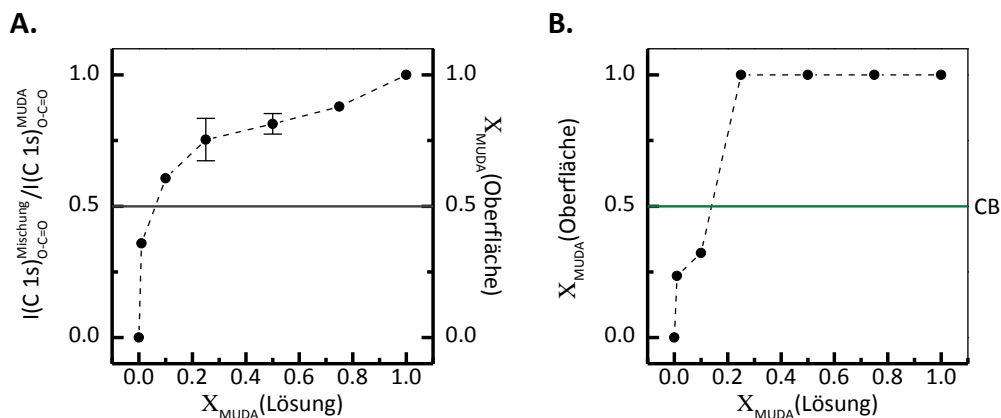


Abbildung 59. Oberflächenanteil X von MUDA in Abhängigkeit der Zusammensetzung der Assemblierungslösung. A. Bestimmt durch die Relation der Carboxylintensitäten bei 288,7 eV zur Signalintensität des reinen MUDA B. Berechnet nach Gleichung (23) durch das Intensitätsverhältnis der N 1s- und Carboxylsignale im Vergleich zum entsprechenden Wert für den Betain-SAM. Die gezeigten Datenpunkte von X_{MUDA} 0,25, 0,5 und 1,0 repräsentieren den Mittelwert aus drei Messungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Auch hier wurde deutlich, dass MUDA in den assemblierten Monolagen immer stark überwog. Die Präparationsbedingungen waren demnach nicht geeignet, um ausgeglichene SAMs aus TMAT und MUDA herzustellen.

MISCHUNGEN MIT MUPA

Für das MUPA-System ergab sich zunächst ein ähnliches Bild wie für das mit MUDA: lediglich bei MUPA-Anteilen unter 10% konnte das TMAT-typische N 1s-Signal detektiert werden (Abbildung 60 A). Durch die Phosphonat-Endgruppe wies dieses Thiol ein charakteristisches Signal im P 2p-Bindungsenergiebereich auf (Abbildung 60 B), welches für alle Mischungen detektierbar war. Die Intensität war deutlich reduziert, bei geringen Anteilen von MUPA war auch dieses Signal zu niedriger Bindungsenergie verschoben. Weiterhin zeigte die Analyse der S 2p-Signale im typischen Bindungsenergiebereich Au-gebundener Thiole ((162 - 163) eV, Abbildung 60 C), dass sie aus zwei sich überlagernden Dubletts gebildet wurde. Der um $\sim 1\text{eV}$ zu höherer Bindungsenergie verschobene Anteil ist ein Indikator für ungebundene Thiole.²⁶⁵ Sowohl beim reinen MUPA-SAM als auch bei Mischungen mit hohem MUPA-Anteil waren somit nicht nur auf dem Au assemblierten Thiole präsent, sondern auch ungebundene Spezies, die auf ungeordnete und teilweise Mehrfachlagen schließen ließen. Erst bei geringen Anteilen der Phosphonat-Komponente zeigte sich nur noch ein S 2p-Dublett. Bei diesem Mischungsverhältnis war auch das N 1s-Signal erstmals detektierbar.

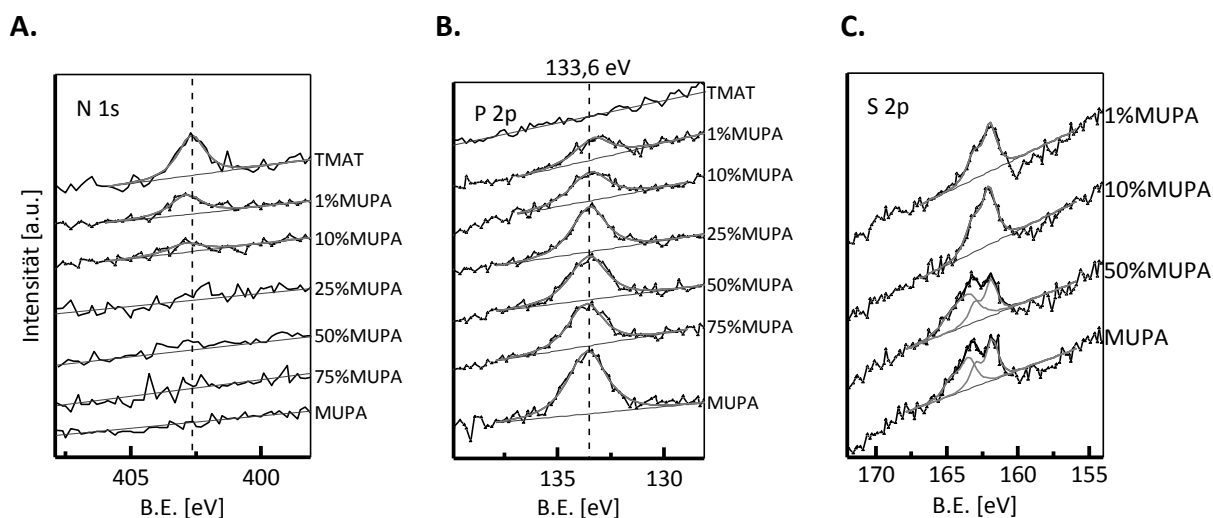


Abbildung 60. Typische XP-Spektren der gemischten SAMs mit TMAT und MUPA in verschiedenen Mischungsverhältnissen in der Assemblierungslösung A. N 1s-Bindungsenergiebereich B. P 2p-Bindungsenergiebereich C. S 2p-Bindungsenergiebereich.

Schon die hohe Schichtdicke von $(25 \pm 2) \text{ \AA}$, die ellipsometrisch für MUPA bestimmt wurde, war erheblich höher als der theoretische Wert einer Monolage von 16 \AA . Zusammen mit den XP-Spektren legten diese Ergebnisse die Bildung von ungeordneten Mehrfachlagen nahe. Die verwendeten Präparationsbedingungen waren folglich für den Phosphonat-SAM und dessen Mischungen nicht geeignet. Anzumerken ist an dieser Stelle, dass die diskutierten Ergebnisse mit Literaturberichten übereinstimmen, die jedoch nicht den Schluss einer ungeeigneten Präparation zogen.^{116,264}

4.1.1.4 Gemischte geladene SAMs aus 0,2 mM-Assemblierungslösung

Die Präparation der gemischten SAMs aus 1 mM-Assemblierungslösung zeigte sich für alle untersuchten Thiolkombinationen als problematisch: SAT wurde nicht vollständig gelöst, für TMAT wurde die Oxidation beobachtet und im Fall des carboxyl- und phosphonatterminierten Thiols führte sie nicht zu geordneten Monolagen mit variierender Zusammensetzung. Literaturberichten folgend wurde daher nur noch ein Fünftel der ursprünglichen Konzentration verwendet.¹¹⁴ Die Konzentration der Assemblierungslösung und eine geeignete Präparationsdauer zeigten sich als invers proportional,¹⁴ die Immersionszeit wurde daher parallel von einem auf zwei Tage verlängert. Vor allem bei den carboxylterminierten Thiolen wurden dieser Anpassung noch weitere Überlegungen zugrunde gelegt:

Die Herstellung qualitativ hochwertiger säureterminierter Monolagen ist seit Jahren Gegenstand kontroverser Diskussionen.^{263,266-267} Arnold *et al.* demonstrierten beispielsweise in einer systematischen Arbeit zur Kristallinität solcher SAMs, dass die Zugabe geringer Mengen einer organischen Säure zu einer niedrig konzentrierten Assemblierungslösung die zuverlässigsten Resultate lieferte.²⁶⁷ Zu ähnlichen Schlussfolgerungen gelangten auch Wang *et al.*, die die sauer präparierten Monolagen abschließend noch mit einer basischen Lösung abspülten.²⁶⁸ Allerdings existieren auch entgegengesetzte Berichte,^{130,266} die außerdem explizit die Verbesserung der SAM-Qualität durch saure Assemblierung verneinen.²⁶³ Auch die Assemblierung aus basischer Lösung ist dokumentiert.²⁶⁹ Da im Rahmen dieser Arbeit vor allem die Rolle der Carboxylgruppe als Ladungsträger im Fokus stand, wurde ähnlichen Arbeiten von Chen *et al.*¹¹⁴ folgend der

Assemblierungslösung der MUDA-Komponente NH_3 zugesetzt, um die vollständige Deprotonierung der Endgruppen unter den basischen Präparationsbedingungen zu gewährleisten. Im Großteil der genannten Publikationen wird Ethanol als geeignetes Lösungsmittel genannt, weshalb es auch im Folgenden beibehalten wurde.

Die Charakterisierung des 1 mM SAT-Systems demonstrierte die ladungsgesteuerte Assemblierung und folglich den konstanten Anteil beider Komponenten in der resultierenden Monolage. In den folgenden Untersuchungen wurden daher neben den mittleren Mischungsverhältnissen von (25 - 75) % auch die Bereiche geringen Anteils einer Komponente ((1 - 10) %) mit einbezogen.

Die statischen Wasserkontaktwinkel θ dieser gemischten SAMs sind in Abbildung 61 zusammengefasst. Der generelle Verlauf war ähnlich wie schon in Abschnitt 4.1.1.3 diskutiert. TMAT ($\theta = (35 \pm 4)^\circ$) und SAT ($\theta = (25 \pm 1)^\circ$) zeigten die stärkste Benetzung durch Wasser, für MUDA war der Kontaktwinkel erhöht ($\theta = (49 \pm 1)^\circ$) und MUPA wies den höchsten Kontaktwinkel mit $\theta_{MUPA} = (70 \pm 3)^\circ$ auf.

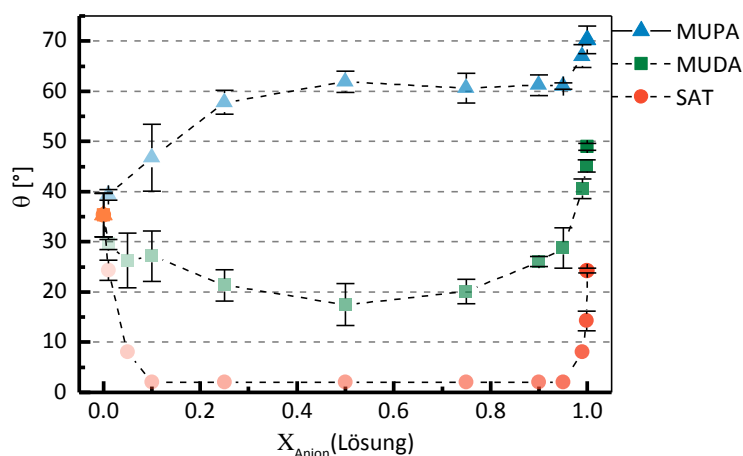


Abbildung 61. Abhängigkeit des Kontaktwinkels θ vom Anteil X des anionischen Thiols in der Assemblierungslösung. Jeder Messpunkt zeigt den Mittelwert von mindestens zwei Proben, auf denen je drei Stellen vermessen wurden, die gezeigten Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Bei allen Mischungen war die Benetzbarkeit im Vergleich zur reinen anionischen Komponente erhöht. Am stärksten war diese Tendenz erneut für die SAT-Oberflächen ausgeprägt, die für Lösungszusammensetzungen von (10 - 90) % einen Kontaktwinkel unter 5° aufwiesen. Oberflächen mit MUDA-Anteilen zeigten ein schmaleres Plateau niedrigster θ als die entsprechenden SATs. Auch für die MUPA-haltigen gemischten Lösungen waren die resultierenden Oberflächen hydrophiler als das reine Phosphonatthiol, jedoch lag θ immer oberhalb des Wertes für reines TMAT. Auch diese Mischungen bildeten ein Plateau bei $\theta \sim 60^\circ$ für (25 - 95) %.

Die Schichtdicken wurden durch spektrale Ellipsometrie bestimmt (Tabelle 12). Die reinen Komponenten lagen wiederum im Bereich der theoretisch idealen 16 \AA (siehe vorangegangener Abschnitt), SAT war erneut leicht erhöht. Die Ausnahme bildete auch für diese Präparationsbedingungen MUPA, das mit $(27 \pm 2) \text{ \AA}$ eine deutlich höhere Schichtdicke aufwies. SAMs mit SAT-Anteil waren dünner als die reinen Homologen. Auch in diesem Vergleich waren die Schichtdicken der MUPA-haltigen Oberflächen erhöht, allerdings lagen sie im vorliegenden Fall deutlich unter dem Wert der reinen Komponente.

Analog zum dem in Abschnitt 4.1.1.3 beschriebenen Vorgehen wurden auch die aus niedriger Konzentration präparierten Oberflächen durch XPS charakterisiert.

Tabelle 12. Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken d der gemischten SAMs mit zunehmendem Anteil des anionischen Thiols in der Assemblierungslösung. Die angegebenen Werte zeigen den Mittelwert von mindestens drei Proben, auf denen je drei Stellen vermessen wurden, die zugehörigen Standardabweichungen waren $\pm 2 \text{ \AA}$.

| | $d \text{ [\AA]}$ | $d \text{ [\AA]}$ | $d \text{ [\AA]}$ |
|------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | SAT | MUDA | MUPA |
| 0 % (TMAT) | 15 | 15 | 15 |
| 1 % | 13 | 13 | 19 |
| 5 % | 13 | 13 | 19 |
| 10 % | 13 | 13 | 20 |
| 25 % | 14 | 16 | 19 |
| 50 % | 14 | 13 | 21 |
| 75 % | 14 | 17 | 17 |
| 90 % | 12 | 15 | 19 |
| 95 % | 14 | 15 | 19 |
| 99 % | 15 | 13 | 22 |
| 100 % | 18 | 15 | 27 |

MISCHUNGEN MIT SAT

Für die SAT-haltigen Monolagen sind die relevanten Spektren in Abbildung 62 zusammengefasst. Im N 1s-Bindungsenergiebereich konnte für alle untersuchten Mischungsverhältnisse ein Signal nachgewiesen werden (Abbildung 62 A). Auch für diese wurde eine Verschiebung um $\sim 0,2 \text{ eV}$ gegenüber dem reinen TMAT beobachtet, allerdings erst ab Lösungsanteilen der anionischen Komponente $> 1 \%$. Die S 2p-Spektren wiesen die schon im vorangegangenen Abschnitt diskutierten Charakteristika auf. Analog zum Auftreten des N 1s-Signals wurde auch die Sulfonatspezies bei $168,0 \text{ eV}$ für alle Lösungszusammensetzungen detektiert. Das zweite Schwefelsignal, das teilweise für TMAT aus 1 mM -Lösung auftrat und auf dessen Oxidation hinwies, konnte nicht mehr beobachtet werden.

Auch die Interpretation der C 1s-Signalförmchen zeigte sich identisch zu der schon beschriebenen. Alle Signale waren aus zwei Anteilen zusammengesetzt, die dem aliphatischen Rückgrat bei niedrigerer Bindungsenergie von $284,7 \text{ eV}$ und den schwefelgebundenen bzw. stickstoffnahen Kohlenstoffen zugeordnet werden konnten.

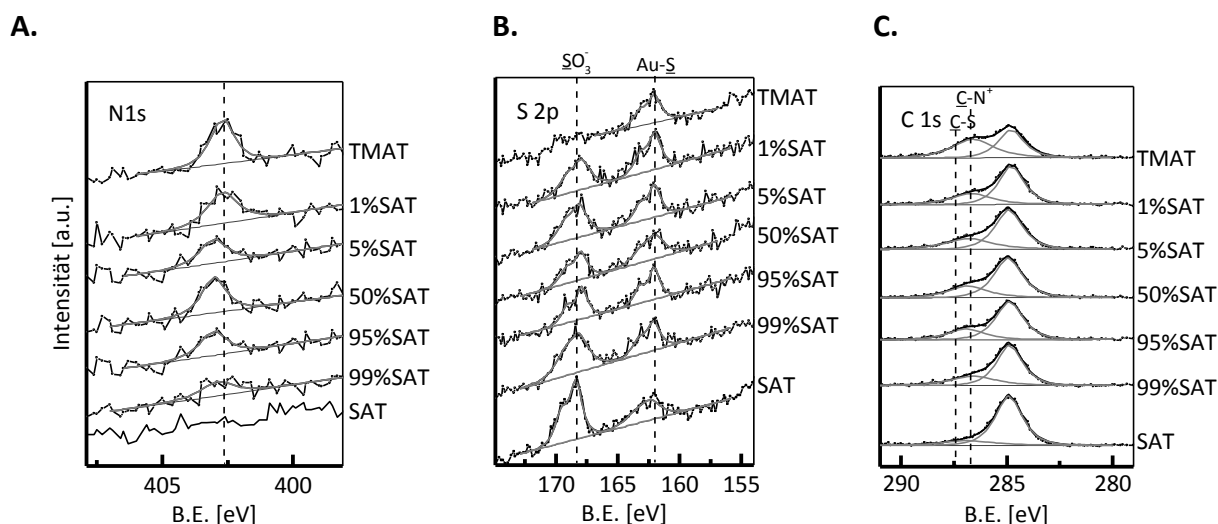


Abbildung 62. Typische XP-Spektren der gemischten SAMs mit TMAT und SAT in verschiedenen Mischungsverhältnissen in der Assemblierungslösung A. N 1s-Bindungsenergiebereich B. S 2p-Bindungsenergiebereich. C. C 1s-Bindungsenergiebereich.

Auch hier charakterisierte das Verhältnis der beiden Schwefel-Spezies die Zusammensetzung der Oberfläche, Abbildung 63 B zeigt es in Abhängigkeit des SAT in der Lösung. Dieser Parameter war für Anteile von (5 - 95) % innerhalb der Messfehler und Schwankungen konstant. Der Vergleich mit dem reinen SAT-SAM ließ darauf schließen, dass der SAT-Anteil der Mischung innerhalb der Fehlergrenzen $\sim 0,5$ betrug. Zur Quantifizierung des Komponentenverhältnisses auf der Oberfläche bot sich außerdem der Vergleich der beiden charakteristischen Gruppensignale, für SAT das Sulfonat-S 2p- und für TMAT das N 1s-, an (Abbildung 63 A, berechnet nach Gleichung (22)). Der Anteil des anionischen Thiols lag über weite Bereiche konstant bei $\sim 0,5 - 0,6$, und bestätigte damit die oben diskutierten Annahme.

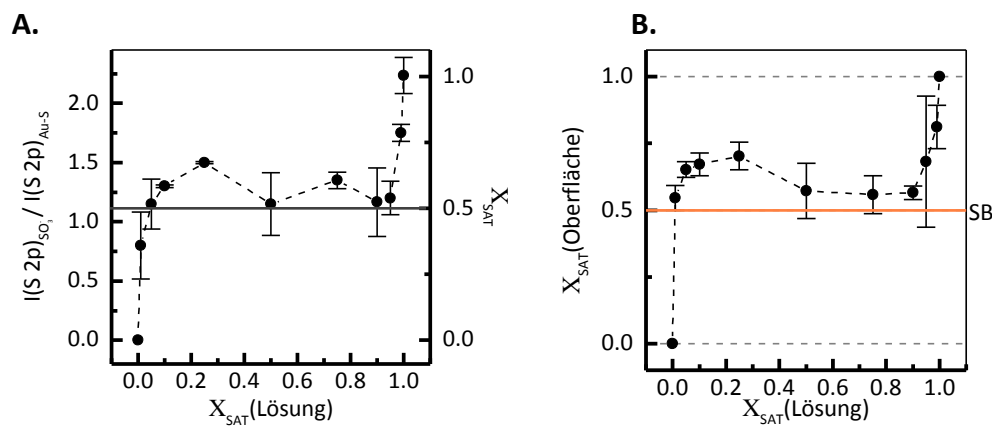


Abbildung 63. Anteil X von SAT in der assemblierten Monolage in Abhängigkeit der Lösungszusammensetzung. A. Intensitätsverhältnisse der beiden S 2p-Signale (linke Achse). Um den SAT-Anteil zu bestimmen, wurden diese Verhältnisse auf den Wert von reinem SAT normiert (rechte Achse). B. Berechnet nach Gleichung (22) durch das Intensitätsverhältnis der N 1s- und S 2p(168 eV)-Signale im Vergleich zum entsprechenden Wert für den Betain-SAM. Die gezeigten Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert aus mindestens zwei Messungen, die Fehlerbalken deren Standardabweichungen.

Insgesamt zeigten die XPS-Messungen, dass die Assemblierung zu ladungsausgeglichenen Monolagen tendierte. Oberflächen mit einem Ladungsüberschuss wurden nur für Anteile von 1 % oder 99 % SAT gebildet.

MISCHUNGEN MIT MUDA

Die charakteristischen N 1s- und C 1s- Bindungsenergiebereiche für die gemischten Monolagen mit MUDA-Anteil sind in Abbildung 64 gezeigt. Das TMAT-typische Signal bei 402,6 eV war ab Mischungsanteilen von MUDA $\leq 95\%$ detektierbar, das charakteristische MUDA-Carboxylsignal bei 288,7 eV bis zu Anteilen von 1 %.

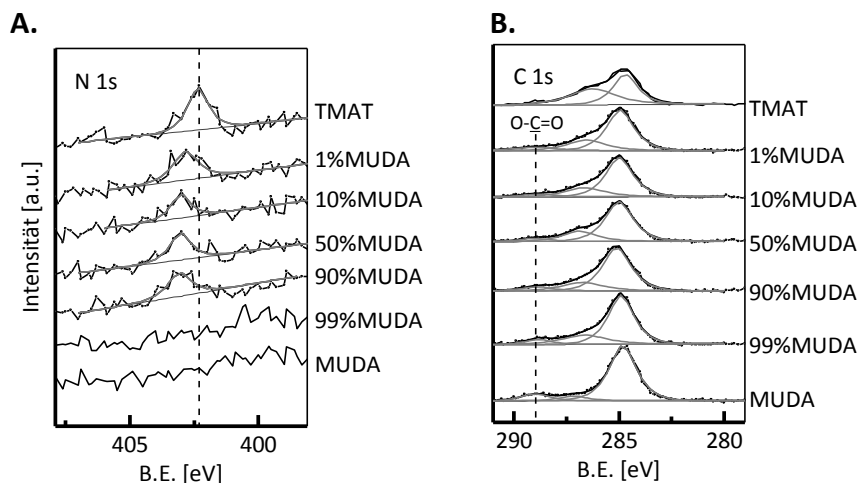


Abbildung 64. Typische XP-Spektren der gemischten SAMs mit TMAT und MUDA in verschiedenen Mischungsverhältnissen in der Assemblierungslösung A. N 1s-Bindungsenergiebereich B. C 1s-Bindungsenergiebereich.

Zur quantitativen Analyse der gemischten Oberflächen wurde zunächst die Signalintensität des Carboxylsignals bei 288,7 eV des MUDA-SAMs mit dem der gemischten Monolagen verglichen. Aus der relativen Intensität lässt sich auf den Anteil des Carboxylthiols in der assemblierten gemischten Monolage schließen (Abbildung 65 A). Für Lösungsanteile von (10 - 90) % MUDA war die SAM-Zusammensetzung konstant bei $\sim 1 - 1$ der beiden Komponenten. Auch für dieses System wurde neben der Quantifizierung über ein charakteristisches Signal der Vergleich zwischen den beiden typischen Gruppensignalen nach Gleichung (23) durchgeführt (Abbildung 65 B). Der Vergleich der unterschiedlichen Berechnungen der Oberflächenanteile zeigte wie schon beim SAT-System, dass beide Quantifizierungsansätze zu vergleichbaren Ergebnissen führten. Für den überwiegenden Teil der untersuchten Lösungszusammensetzungen lag er zwischen 0,4 und 0,6. Die gezeigten Daten sprechen, trotz der verhältnismäßig großen Fehler, für eine ausgeglichene Zusammensetzung der Oberflächen aus den beiden Thiolen TMAT und MUDA.

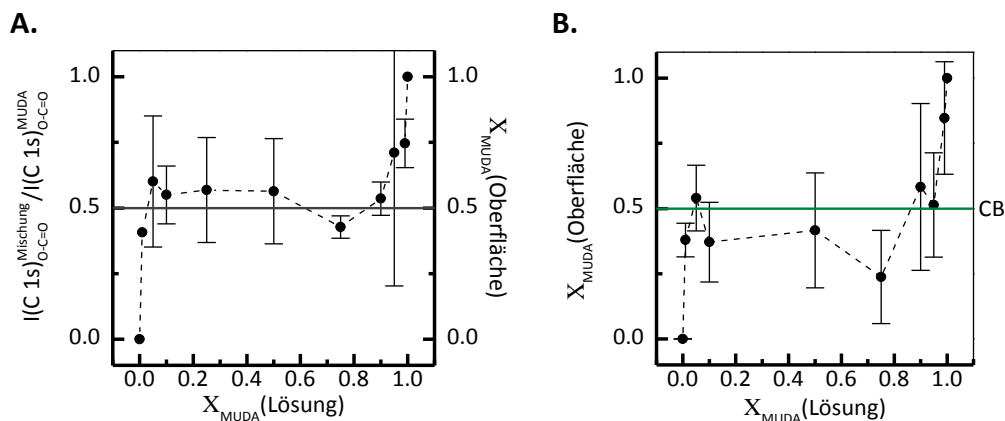


Abbildung 65. Anteil X von MUDA in den assemblierten Monolagen in Abhängigkeit der Lösungszusammensetzung. A. Bestimmt aus der Relation der Carboxylsignalintensitäten bei 288,7 eV zur Signalintensität des reinen MUDA. B. Berechnet durch das Intensitätsverhältnis der N 1s- und C 1s (289 eV)-Signale im Vergleich mit dem entsprechenden Wert für den Betain-SAM CB. Die gezeigten Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert aus mindestens zwei Messungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. (Ausnahme: 99%MUDA wurde nur einmal gemessen, der gezeigte Fehler beträgt 10 %).

Durch die XPS-Charakterisierung konnte für die MUDA-enhaltenden gemischten Monolagen somit die ausgeglichene Anwesenheit beider geladener Thiole für Anteile von (10 - 90) % der Carboxylkomponente in der Assemblierungslösung demonstriert werden. Der Überschuss einer der beiden Komponenten zeigte sich nur bei Mischungen außerhalb dieses Bereichs.

MISCHUNGEN MIT MUPA

Für die Endgruppen der gemischten SAMs aus TMAT und MUPA waren die Bindungsenergiebereiche der N 1s- und P 2p-Atomorbitale charakteristisch, die entsprechenden Spektren für verschiedene Mischungsverhältnisse sind in Abbildung 66 A und B gezeigt. Die Präsenz des Trimethylammoniumthiols konnte für MUPA-Anteile bis 95 % nachgewiesen werden; das phosphonattypische Signal im P 2p-Bereich war für alle Mischungsverhältnisse detektierbar.

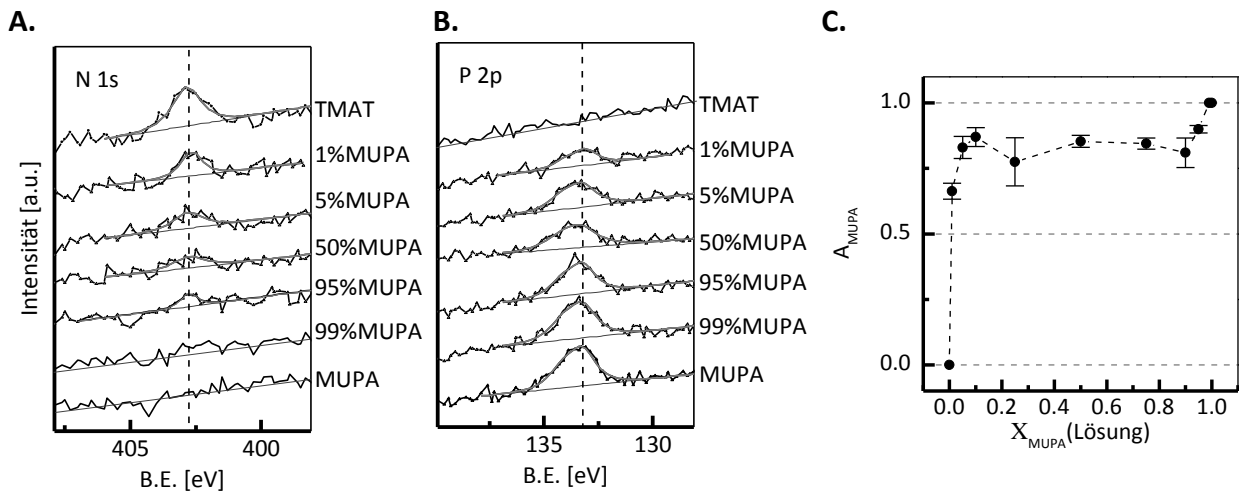


Abbildung 66. Typische XP-Spektren der gemischten SAMs mit TMAT und MUPA in verschiedenen Mischungsverhältnissen in der Assemblierungslösung A. N 1s-Bindungsenergiebereich B. P 2p-Bindungsenergiebereich C. Anteil von MUPA auf der Oberfläche in Abhängigkeit der Lösungszusammensetzung, berechnet durch das Intensitätsverhältnis der N 1s- und P 2p-Signale. Die gezeigten Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert aus mindestens zwei Messungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Da kein dem SB und CB analoges Betainmolekül verfügbar war, konnte der Vergleich der Signalintensitäten nach Gleichung (20) nicht korrigiert werden, um das schwache N 1s-Signal zu berücksichtigen. Der Intensitätsvergleich der charakteristischen Signale nach

$$A_{MUPA} = \frac{I_{\sigma}(P\ 2p)}{I_{\sigma}(N\ 1s) + I_{\sigma}(P\ 2p)} \quad (24)$$

gibt dennoch Aufschluss über die Verhältnisse in der assemblierten Thiolschicht (Abbildung 66 C). Bis zu Anteilen von 5 %-MUPA-Lösungsanteil überwog deutlich die Phosphonatkomponente.

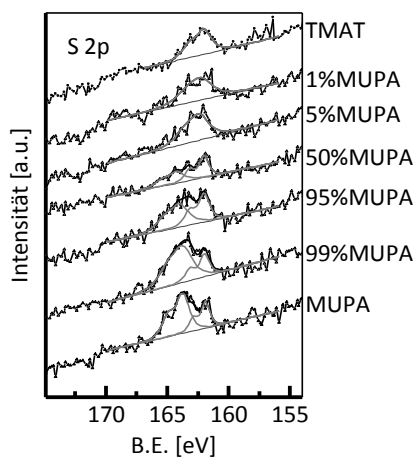


Abbildung 67. Typische XP-Spektren des S 2p-Bindungsenergiebereichs der gemischten SAMs mit TMAT und MUPA in verschiedenen Mischungsverhältnissen in der Assemblierungslösung.

Auch für diese Präparation waren die jeweiligen S 2p-Signale bei allen MUPA-Anteilen > 5 % aus zwei Spezies bei 162 eV und 163 eV zusammengesetzt (Abbildung 67).

Für den Großteil der charakterisierten Mischungsverhältnisse konnte somit die Anwesenheit beider Thiole nach Assemblierung auf der Oberfläche gezeigt werden. Jedoch indizieren die beiden Signale im S 2p-Bindungsenergiebereich und die hohen Schichtdicken auch für die hier untersuchten Präparationsbedingungen, dass die Assemblierung nicht in hochgeordneten Monolagen resultierte.

Der Assemblierungsmechanismus unterschied sich somit grundlegend von dem der Mischungen von TMAT mit den anderen beiden anionisch-terminierten Thiolen (siehe folgender Abschnitt).

4.1.2 Vergleich der Assemblierungsmechanismen und -konzentrationen

Die Ergebnisse der vorangegangenen Abschnitte legten nahe, dass der untersuchte Parameter der Lösungskonzentration und des Basenzusatzes im Fall von MUDA, einen direkten Einfluss auf die Assemblierung der ladungsträgerterminierten gemischten Monolagen hatte.

Für alle untersuchten Mischungen aus Trimethylammonium- und Sulfonatthiol konnte XP-spektroskopisch für beide Konzentrationen die Präsenz beider Spezies auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Die Analyse der S 2p-Signalverhältnisse (Abbildung 68 A) zeigte, dass die resultierende Oberflächenzusammensetzung weder von der Gesamthiolkonzentration, noch von der Zusammensetzung der Präparationslösung (Verhältnis der Thiolkomponenten zueinander), abhängig war. Innerhalb der Fehlergrenzen war das Verhältnis der geladenen Gruppen in den assemblierten Monolagen nicht signifikant unterschiedlich bei einem Verhältnis von $\sim 1 : 1$. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass es vor allem die geladenen Endgruppen waren, die die Assemblierung bestimmten.

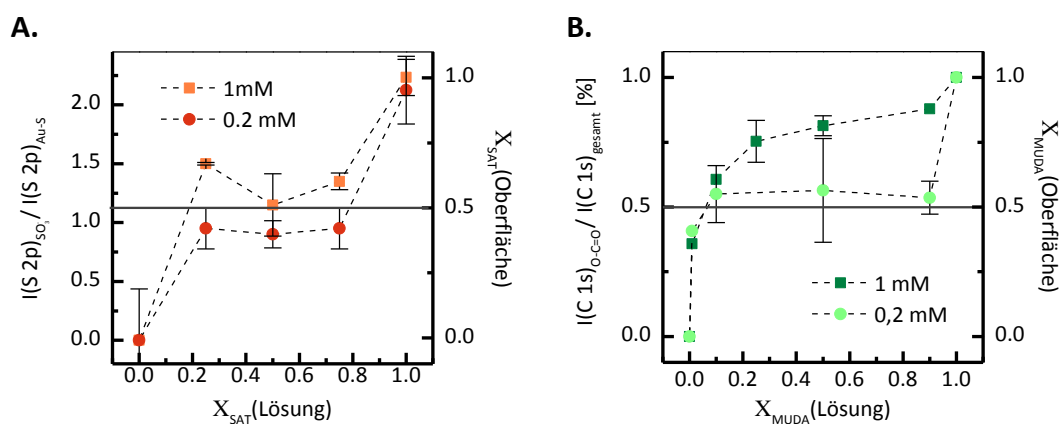


Abbildung 68. Vergleich der gemischten SAMs aus TMAT und einer anionischen Thiolkomponente, präpariert bei verschiedenen Lösungskonzentrationen A. Anteil \bar{X} von SAT in Abhängigkeit der Assemblierungslösungszusammensetzung, bestimmt durch das Intensitätsverhältnis der Schwefelsignale. B. Anteil \bar{X} von MUDA in Abhängigkeit der Lösungszusammensetzung, bestimmt durch die relativen Carboxylsignalintensitäten bei 288,7 eV.

Für die Bildung gemischter SAMs aus MUDA und TMAT zeigte sich nur die niedrigere Konzentration (0,2 mM) mit Basenzusatz als geeignet. Nur bei diesen Präparationsbedingungen konnte das charakteristische N 1s-Signal über weite Bereiche detektiert werden. Außerdem bewies der Intensitätenvergleich der Carboxylsignale der gemischten SAMs mit dem des reinen MUDA die Abnahme des MUDA-Anteils in der assemblierten Monolage auf 0,5 (Abbildung 68 B). Der Vergleich der beiden Präparationsbedingungen zeigt anschaulich, das unterschiedliche Assemblierungsverhalten der Thiolkombination von TMAT und MUDA bei den beiden gewählten Bedingungen.

SAT und MUDA in Kombination mit TMAT zeigten bei niedriger Konzentration ein Verhalten, das als „ideale Nichtidealität“ (engl. *ideal nonideality*) bezeichnet wird.¹¹³ Über weite Bereiche von Lösungszusammensetzungen war die resultierende Oberflächenzusammensetzung konstant (Abbildung 69).

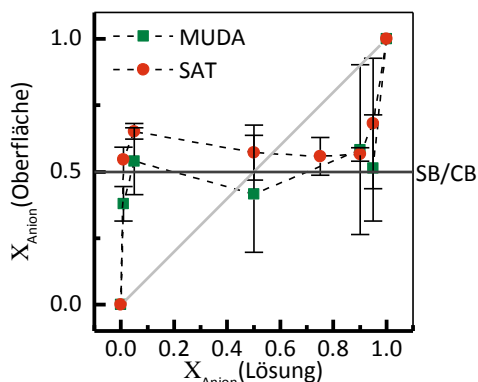


Abbildung 69. Vergleich der Oberflächenszusammensetzungen der gemischten SAMs aus TMAT und einer anionischen Komponente (SAT oder MUDA) mit variierender Lösungszusammensetzung (Gesamthiolkonzentration 0,2 mM). Die Berechnungen erfolgten nach Gleichung (20) für SAT und Gleichung (23) für MUDA. Außerdem gekennzeichnet ist die 1:1-Zusammensetzung der Betain-SAMs SB und CB und ein linearer Zusammenhang, wie er für die Mischung von HUDT und DDT beobachtet wurde.

sowohl die Verwendung von Wasser, wässrigen Puffersystemen als auch Ethanol zur Lösung von ladungsterminierten Thiolen diskutiert.^{112,114-115,147} Die Ergebnisse dieser Studie demonstrierten, dass die hier untersuchte einheitliche Herstellung aus niedrig konzentrierter ethanolischer Lösung geeignet war. Der Anteil der anionischen Komponente lag für SAT-haltige Oberflächen etwas über $\sim 50\%$, wie aus dem Vergleich mit dem zwitterionischen Betain-SAM SB geschlussfolgert werden konnte. Für MUDA-haltige SAMs entsprach die Zusammensetzung der des entsprechenden Betains CB und zeigte somit eine Zusammensetzung von 1:1 von TMAT und MUDA in den resultierenden Monolagen. Ein erhöhter Anteil einer Komponente und damit ein Ladungsüberschuss konnte für beide Thiolkombinationen nur für die äußerem Mischungsverhältnisse gezeigt werden.

Beide getesteten Bedingungen erwiesen sich als nicht geeignet für die Präparation von reinen MUPA-Monolagen und dessen Mischungen mit TMAT. Schon beim reinen MUPA bewiesen der hohe Kontaktwinkel und die S 2p-Spektren die Bildung von Multilagen. Zwar konnte nach Verdünnung der Konzentration um 80 % die Anwesenheit beider Thiole auf den Oberflächen nachgewiesen werden, jedoch handelte es sich bei diesen Filmen nicht um geordnete Monolagen, wie die Präsenz von zwei Schwefelspezies im XP-Spektrum zeigte. Des Weiteren dominierte in allen Fällen die Phosphonatkomponente, was schon in früheren Studien beobachtet wurde.¹¹⁶ Da diese funktionelle Gruppe im Gegensatz zu den anderen beiden Anionen eine zweiprotonige Säure ist, wäre bei einem vom Ladungsausgleich bestimmten Assemblierungsmechanismus ein Überschuss der positiven Komponente zu erwarten gewesen.

Die beiden anderen anionischen Komponenten waren schon in der ethanolischen Assemblierungslösung deprotoniert und somit geladen: SAT wurde als basisches Natriumsalz verwendet, MUDA-Lösungen wurde eine Base zugesetzt. Diese Ladungspräsenz war, wie bereits erläutert, offensichtlich die Voraussetzung einer ladungsgesteuerten Assemblierung. Die Lösungen des Phosphonat-Thiols

Im Kontrast dazu steht ein Assemblierungsverhalten, wie es für Mischungen aus DDT und HUDT bekannt ist und in Abschnitt 4.1.1.1 demonstriert wurde (in Abbildung 69 angedeutet durch die graue Linie). Lösungs- und Oberflächenszusammensetzung korrelierten dabei linear. Als Ursache für das nichtideale Verhalten werden die elektrostatischen Wechselwirkungen der Endgruppen als dominierender Faktor während des Adsorptionsprozesses angenommen.¹⁰⁹ Bei ungeladenen Thiolen dagegen haben Van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Alkylketten den Haupteinfluss. In der Literatur gibt es eine Reihe von Präparationsbedingungen, die für die Herstellung von SAMs mit Ladungsträgerterminierung genutzt wurden. Es werden

waren dagegen nicht durch Basenzusatz modifiziert, das Molekül war dementsprechend nicht deprotoniert und ungeladen. Den Assemblierungsprozess bestimmten somit nicht die elektrostatischen Wechselwirkungen der Endgruppen, sondern andere Faktoren, die zu einem Überschuss des MUPA auf der Oberfläche führten (Abbildung 69). Dieser Befund steht in Einklang mit Modelrechnungen zu solchen Systemen aus einer neutralen und einer geladenen Spezies.¹⁰⁹ Um auch mit dem Phosphonatthiol eine ladungsausgleichende Assemblierung zu erreichen, müsste dementsprechend die Präparation unter basischen Bedingungen erfolgen.

4.1.3 Stabilität unter marinen Bedingungen

Die Stabilität der ladungsträgerterminierten SAMs in Medien hoher Salinität wurde über einen Zeitraum von zehn Tagen überprüft. Dafür wurden die reinen Komponenten und deren 50 %-Mischungen (präpariert aus 0,2 mM-Assemblierungslösung) in künstlichem Meerwasser (SW) inkubiert. Als Vergleich mit einer anderen oft verwendeten Klasse von SAMs wurden Thiole mit unterschiedlich langer EG-Terminierung (1-, 3-, 6- und 12 EG-Einheiten an der C₁₁-Kette, Oligoethylenglykol-(OEG)-SAMs) und ein PEG-Thiol (ohne Alkylkettenabstandshalter) mit einbezogen. Bei allen Thiolen (außer PEG) bildete eine Mercaptoundecyl-Einheit das Grundgerüst, der entsprechende alkylterminierte SAM (DDT) stand repräsentativ für diesen Baustein.

Abbildung 70 fasst den Verlauf der per Ellipsometrie bestimmten Schichtdicken, normiert auf den jeweiligen Anfangswert, zusammen. Für die ladungsträgerterminierten Oberflächen zeigten sich innerhalb des Beobachtungszeitraums keine wesentlichen Abnahmen. Eine Ausnahme bildete die 50 %-MUDA-Oberfläche, bei der nach zehn Tagen Inkubation die Schichtdicke um ~ 25 % abnahm. Für die restlichen SAMs wurde eher der gegenteilige Effekt einer Zunahme beobachtet, am deutlichsten beim ungeladenen DDT.

Die beobachteten Zunahmen der Filmdicke wies zunächst auf ein ungenügendes Abspülen der zurückbleibenden Salze nach dem Inkubationszeitraum hin. Jedoch waren die dokumentierten Zunahmen auch nach erneuter Reinigung der Oberflächen noch vorhanden und deuteten somit auf andere Ursachen hin. Ein möglicher Erklärungsansatz ist die Komplexierung von Ionen aus dem Inkubationsmedium.

Für den kürzesten OEG-SAM wurde ebenfalls eine Zunahme der Schichtdicke mit zunehmender Inkubationszeit beobachtet. Die beiden mittleren (EG₃ und EG₆) waren nach zehn Tagen minimal dünner. Für EG₆ wurde deshalb zusätzlich eine Langzeitstudie über 6 Wochen durchgeführt, bei der keine weitere Abnahme über die hier gezeigten 10 % hinaus beobachtet werden konnte. Ein Abbau der Schichtdicke war sowohl für EG₁₂ als auch für PEG offensichtlicher und für das polymere Thiol am deutlichsten ausgeprägt.

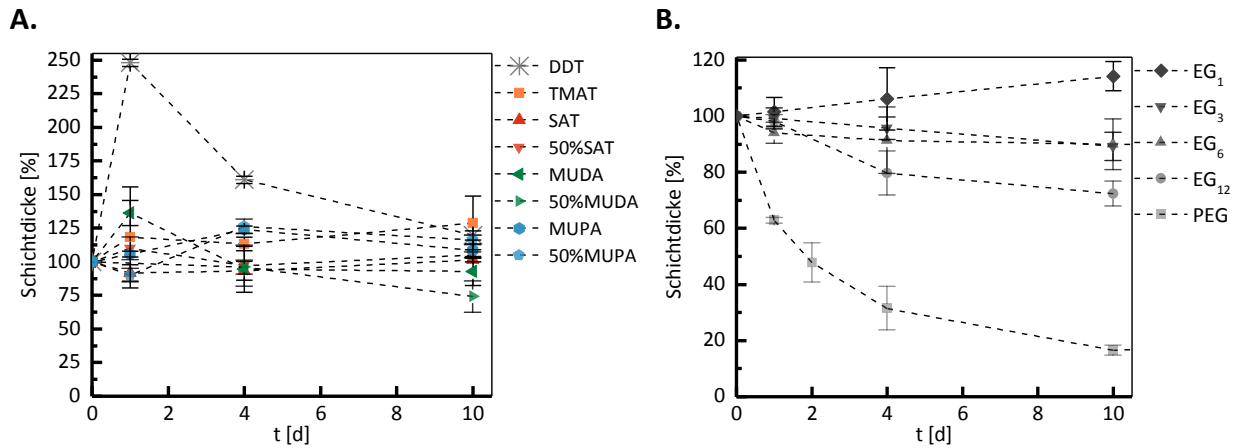


Abbildung 70. Entwicklung der relativen Schichtdicken nach Inkubation in SW über zehn Tage A. Von ladungsträgerterminierten SAMs und DDT. B. Von EG-terminierten SAMs.

In den folgenden biologischen Untersuchungen wurden die Testoberflächen maximal zwei Tage marinen Bedingungen ausgesetzt, daher war dafür der hier untersuchte Anfangszeitraum relevant. Nach den ersten vier Tagen (Abbildung 71) waren für TMAT und die beiden MUPA-Oberflächen Zunahmen der Schichtdicken um bis zu 20 % zu beobachten, die anderen zeigten innerhalb der Fehler keine Veränderungen. Eine signifikante Abnahme, bewirkt durch das verwendete Medium konnte also in den biologischen Experimenten ausgeschlossen werden.

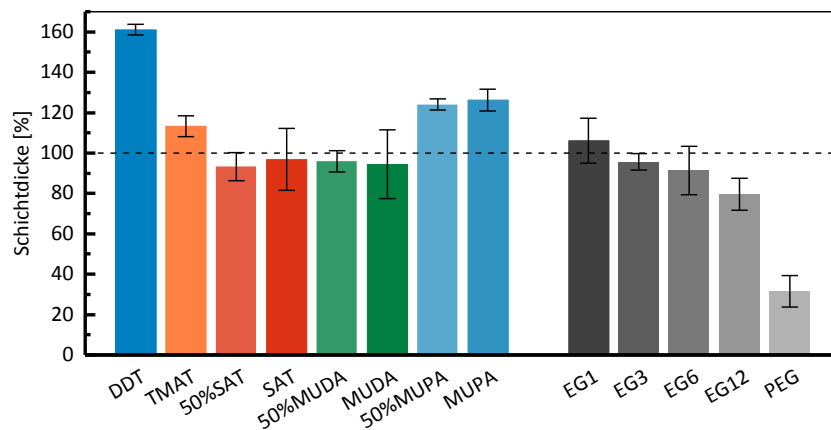


Abbildung 71. Relative zurückbleibende Schichtdicke von DDT und SAMs mit geladener Endgruppe oder EG-Terminierung nach vier Tagen Inkubation in SW.

Die Stabilität der OEG-SAMs war abhängig von der Endgruppenlänge, je länger diese war desto deutlicher war die Schichtdickenabnahme.

Aus den gezeigten Daten lassen sich zwei Schlussfolgerungen ziehen: Das Grundgerüst der Thiole, die Mercaptoundecylkette, ist ein geeigneter und stabiler Baustein für SAMs mit relativ kleinen Endgruppen unter den untersuchten Bedingungen. Diese Beobachtung wurde schon für eine eingeschränkte Auswahl ähnlicher SAMs dokumentiert.¹³⁰ Des Weiteren demonstrierte der Vergleich mit PEG, welches keine Alkylkette zwischen Thiolgruppe und EG-Einheiten enthielt und deutlich schneller dünner wurde, die Bedeutung einer solchen Gruppe für die Stabilität gegen eine vermutliche Desorption der kompletten Thiolmoleküle. Die abnehmende Stabilität der EG-SAMs mit zunehmender Anzahl von EG-Einheiten kann ebenfalls als Desorption der gesamten Moleküle gedeutet werden. Durch die länger werdenden EG-Terminierungen wird die Unordnung der

Endgruppen größer, was auch die dichte Packung der Alkylankerketten stört.²⁰ Deutlich wird dieser Zusammenhang durch die nicht-kontinuierliche Zunahme der Schichtdicken. Da somit die stabilisierenden Wechselwirkungen dieser entscheidenden Bausteine vermindert werden, ist auch die Desorption der Moleküle eher möglich.

4.1.4 Wechselwirkung der zwitterionischen SAMs mit biologischen Systemen

Ziel des vorliegenden Teils dieser Arbeit war es, den Einfluss der verschiedenen Ladungsträger und ihrer gleichzeitigen Präsenz an der Grenzfläche eines SAMs auf die Resistenz gegenüber biologischen Systemen zu analysieren. Im ersten Schritt wurde daher das Adsorptionsverhalten zweier Testproteine und anschließend das Adhäsionsverhalten von zwei marinen Algen untersucht. Schließlich wurden die Testoberflächen in einem Feldexperiment einer realen marinen Population ausgesetzt.

4.1.4.1 Proteinadsorption

VERGLEICH DER PRÄPARATIONSBEDINGUNGEN

Die Adsorption zweier gegensätzlich geladener Testproteine, Fibrinogen und Lysozym, wurde auf den unterschiedlich präparierten gemischten SAMs analysiert. Nach der Inkubation des jeweiligen Substrates in der Proteinlösung wurde die adsorbierte Proteinschichtdicke durch spektrale Ellipsometrie bestimmt.

Fibrinogen, das unter den experimentellen Bedingungen im PBS-Puffer mit pH 7,4 über eine negative Nettoladung verfügte, bildete auf dem positiv geladenen TMAT die größte Adsorptionsschicht im Bereich von 60 Å (Abbildung 72). Auf den negativen Komponenten war die Adsorption deutlich reduziert, lag jedoch weiterhin im Bereich des ungeladenen DDTs, das als bekannte nicht-proteinresistente Referenz diente. Bei SAT zeigte sich ein deutlicher Einfluss der Präparationsbedingungen: Auf der Oberfläche aus 0,2 mM-Lösung war die Fibrinogenschicht um 40 % im Vergleich zur Oberfläche aus höher konzentrierter Lösung reduziert. Auch für die gemischten SAT-SAMs zeigte sich die Tendenz, dass die Proteinadhäsion auf diesen Substraten abnahm (um mindestens 80 %). Für reines MUDA und MUPA konnte kein Unterschied zwischen den unterschiedlich präparierten Substraten beobachtet werden. Auf den MUDA-Mischungen nahm die Schichtdicke auf den SAMs aus den niedriger-konzentrierten Präparationslösungen ab, wogegen für die gemischten MUPA-Oberflächen ein solch einheitlicher Abfall nicht beobachtet wurde. Für MUDA-Mischungen war die Adsorption im Vergleich zur reinen Komponente bei den 0,2 mM Testoberflächen reduziert. Auf allen MUPA-enthaltenden Oberflächen lagen die bestimmten Schichtdicken im gleichen Bereich von ~ 40 Å. Im Vergleich aller untersuchten Mischungen zeigten SAT-enthaltende Substrate die höchste Resistenz gegenüber Fibrinogen.

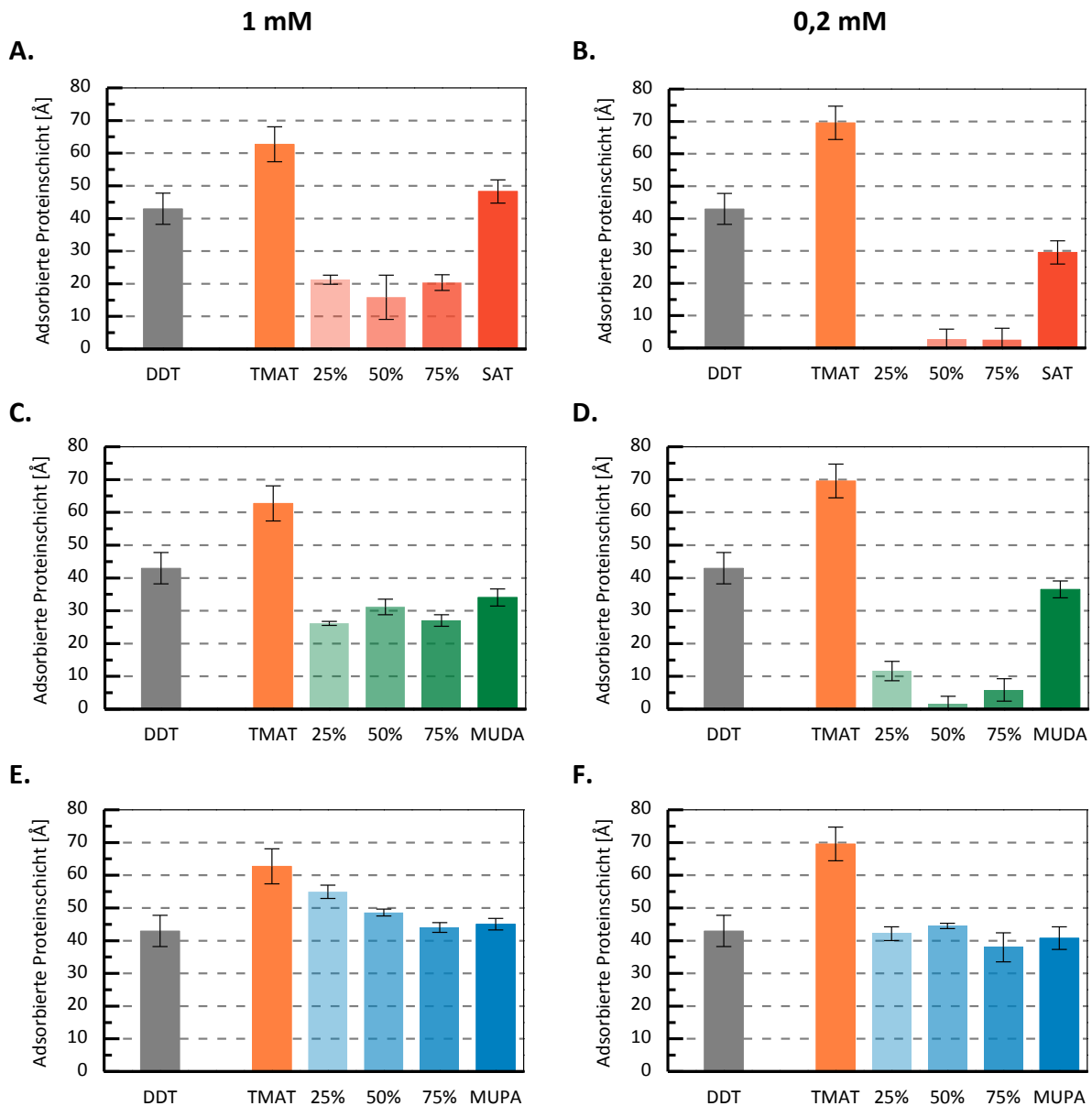


Abbildung 72. Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken von adsorbiertem Fibrinogen auf gemischten geladenen SAMs präpariert aus Lösungen verschiedener Konzentration und verschiedener Zusammensetzung. Diagramme in der linken Spalte zeigen die Proteinschicht für die Präparation aus 1 mM-, die rechten aus 0,2 mM-Assemblierungslösungen. A. und B. zeigen SAT-haltige, C. und D. MUDA-haltige und E. und F. MUPA-haltige Monolagen; die Prozentangaben an der Abszisse geben den Anteil der anionischen Komponente in der jeweiligen Assemblierungslösung an.

Das Adsorptionsverhalten des positiv geladenen Testprotein Lysozym war auf den reinen SAMs mit negativen Ladungsträgern mit dem auf DDT vergleichbar (min. 20 Å, Abbildung 73). Auf dem gleichnamig geladenen TMAT dagegen war höchstens eine Schicht von 0,5 Å nachweisbar. Wie schon beim Fibrinogen beobachtet hatten die Präparationsbedingungen für reines TMAT, MUDA und MUPA keinen wesentlichen Einfluss. Auf SAT dagegen nahm die Adsorption für die geringere Konzentration um 35 % ab. Gemischte SAMs mit SAT zeigten die höchste Resistenz gegen die Lysozymadsorption. Auch für MUDA-Mischungen wurde diese für die niedrige Präparationskonzentration beobachtet. Im Gegensatz zu diesen beiden Systemen konnte für die MUPA-Mischungen kein Resistenzbereich beobachtet werden.

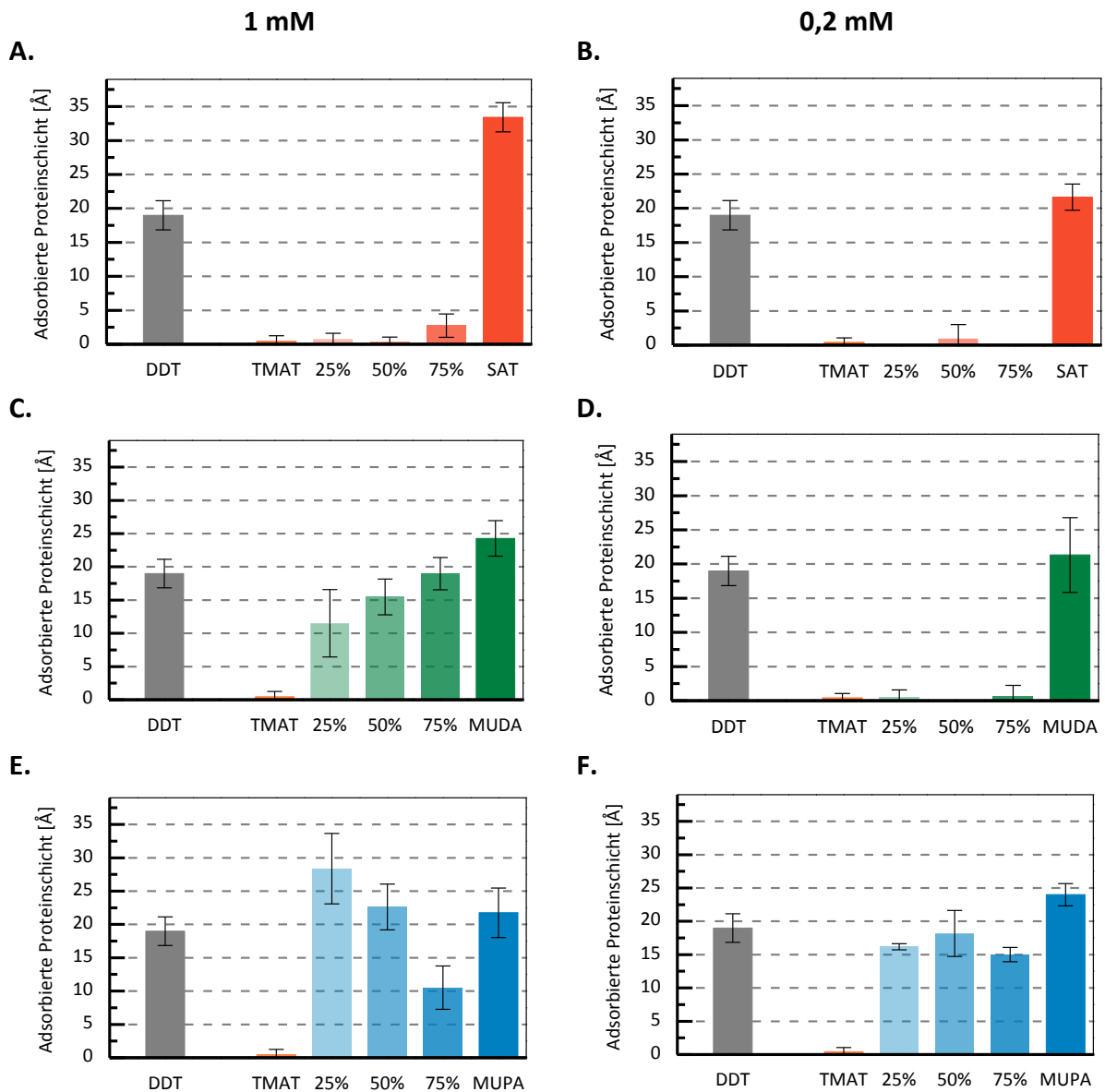


Abbildung 73. Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken von adsorbiertem Lysozym auf gemischten geladenen SAMs präpariert aus Lösungen verschiedener Konzentration und verschiedener Zusammensetzung. Diagramme in der linken Spalte zeigen die Proteinschicht für die Präparation aus 1 mM-, die rechten aus 0,2 mM-Assemblierungslösungen. A. und B. zeigen SAT-haltige, C. und D. MUDA-haltige und E. und F. MUPA-haltige Monolagen; die Prozentangaben an der Abszisse geben den Anteil der anionischen Komponente in der jeweiligen Assemblierungslösung an.

Die Proteinadsorption auf den reinen SAMs war von den Nettoladungen der Proteine und Testoberflächen bestimmt. Negativ geladenes Fibrinogen adsorbierte am stärksten auf positiv geladenem TMAT, positiv geladenes Lysozym auf den negativ geladenen Komponenten. Die höchste Resistenz gegen beide Testproteine zeigten gemischte SAMs mit SAT-Anteil. Sowohl für dieses als auch für das MUDA-enhaltende System waren die Resistenzeigenschaften bei der Präparation aus den niedriger konzentrierten Lösungen erhöht.

Dagegen ließ sich für keine der MUPA-Oberflächen eine Proteinresistenz beobachten. Schon die Charakterisierung zeigte, dass unter den untersuchten Präparationsbedingungen keine wohldefinierten Monolagen assemblierten, weshalb in den folgenden Proteinadsorptionsexperimenten und den biologischen Evaluierungen dieses System nicht mehr mit einbezogen wurde.

ADSORPTION AUF MISCHUNGEN MIT ÜBERSCHUSS EINER KOMPONENTE

Die Analytik der gemischten SAT- und MUDA-SAMs zeigte für die Präparation aus 0,2 mM-Lösung eine konstante Zusammensetzung der Monolagen auch außerhalb der vorangegangenen analysierten Anteile zwischen 25 % und 75 %. Daher wurden auch die äußeren Mischungsbereiche bis zu 1 % einer der Komponenten in der Lösung auf ihre Proteinresistenz untersucht, um die Auswirkungen vom Überschuss einer der ladungstragenden Komponenten zu evaluieren.

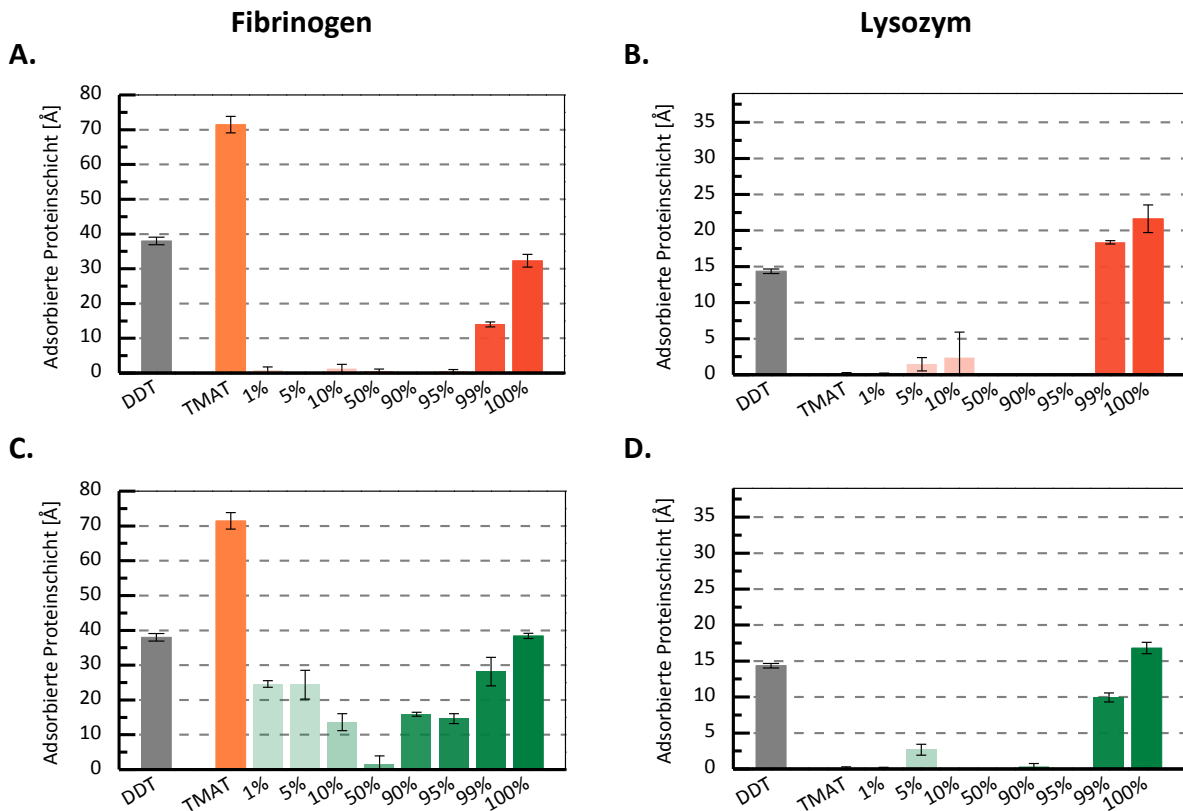


Abbildung 74. Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken adsorbierter Proteine auf gemischten geladenen SAMs präpariert aus 0,2 mM-Lösungen verschiedener Zusammensetzung: Fibrinogen auf SAT-haltigen (A.) und MUDA-haltigen (C.) und adsorbiertem Lysozym auf SAT-haltigen (B.) und MUDA-haltigen (D.) Die Prozentangaben an der Abszisse geben den Anteil der anionischen Komponente in der jeweiligen Assemblierungslösung an.

Auf sulfonathaltigen Monolagen zeigte sich lediglich beim höchsten Anteil von 99 % SAT mit der erhöhten Adsorption von Fibrinogen und Lysozym eine beobachtbare Auswirkung zur sonst vollständigen Unterdrückung der Proteinadsorption. Diese Ergebnisse ließen sich mit den spektroskopischen Daten in Einklang bringen, in denen die Zusammensetzung der SAT-haltigen SAMs auch nur für diesen Lösungsanteil signifikant abwich. Im Fall der MUDA-haltigen Mischungen war, vor allem bei der Fibrinogenadsorption, eine höhere Abhängigkeit der adsorbierten Proteinschicht von der Lösungszusammensetzung zu beobachten. Die höchste Resistenz zeigte die 50 %-Mischung, während auf den anderen Testoberflächen die adsorbierte Proteinschichtdicke in Richtung beider reiner Komponenten kontinuierlich zunahm. Ein direkter Bezug zu den spektroskopischen Daten wie für SAT ließ sich in diesem Fall nicht herstellen, allerdings korrelierte diese Tendenz mit den statischen Kontaktwinkeln der SAMs.

Aus dem Vergleich der Fibrinogenadsorptionen auf den Mischungen mit variierender anionischer Komponente ließen sich zwei Schlussfolgerungen ziehen: Die Eigenschaften der MUDA-haltigen SAMs variierten stärker mit der Lösungszusammensetzung, wogegen die SAT-enthaltenden Monolagen über weitere Bereiche einheitliche Eigenschaften demonstrierten. Außerdem war die hohe Proteinresistenz der Oberflächen, wie schon von Holmlin *et al.*¹⁴⁷ festgehalten, nur bei ausgeglichener Anwesenheit beider Ladungskomponenten gegeben.

MISCHUNGEN HYDROPHILER UND HYDROPHOBER THIOLE

Auch die gemischten amphiphilen SAMs wurden auf ihr Resistenzverhalten gegenüber verschiedenen Proteinen getestet. Abbildung 75 fasst die Ergebnisse von Adsorptionsexperimenten mit Fibrinogen, BSA und Lysozym zusammen. Die höchste Proteinschicht auf DDT wurde von Fibrinogen gebildet ($d = (32,8 \pm 0,9) \text{ \AA}$), die kleineren Proteine BSA ($d = (19,4 \pm 0,8) \text{ \AA}$) und Lysozym ($d = (19,5 \pm 0,5) \text{ \AA}$) bildeten dünnere Schichten, was auf die kleinere Masse dieser Proteine zurückzuführen war.

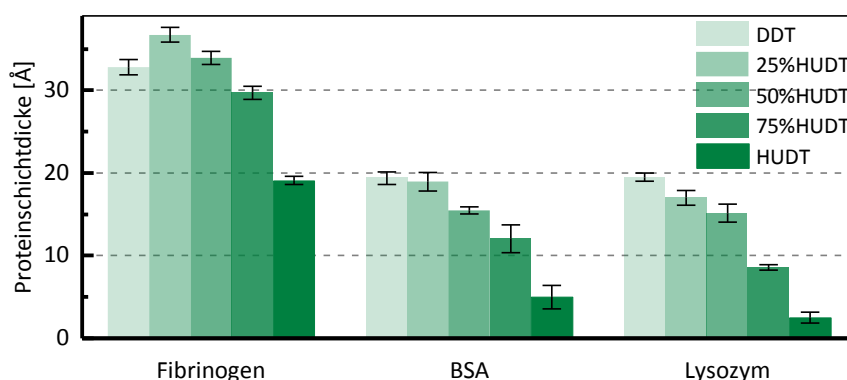


Abbildung 75. Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken von adsorbierten Proteinen auf gemischten amphiphilen SAMs.

Die Menge der adhären Proteine nahm mit steigendem Anteil von HUDT in der Assemblierungslösung, also steigender Hydrophilie, kontinuierlich ab. Für BSA und Lysozym war diese Tendenz eindeutig. Die beobachteten Ergebnisse stimmen mit Tendenzen aus früheren Arbeiten überein, Proteine adhären bevorzugt auf hydrophobe Substrate.^{19,270} Die exakten Werte der adhären Proteinschichtdicke variierten, beispielsweise wurde in der genannten Arbeit in einem analogen Experiment auf DDT eine Fibrinogenschicht von $\sim 60 \text{ \AA}$ beobachtet, während sie im vorliegenden Fall bei nur 33 \AA lag. Diese Abweichungen demonstrieren die hohe Sensitivität des durchgeführten Experimentes von der exakten Ausführung, bei der vor allem das Abspülen der Testoberflächen nach der Inkubation in den Proteinlösungen von zentraler Bedeutung ist.

Auch hier zeigte sich erneut der grundlegende Unterschied zu den Mischungen aus geladenen Komponenten. Diese wiesen einen breiten Bereich mit resistenten Eigenschaften auf, während sich für die amphiphilen SAMs ein linearer Zusammenhang zwischen Zusammensetzung, Benetzbarkeit und Proteinadsorption zeigte.

4.1.4.2 Adhäsionsverhalten von Diatomeen

Diatomeen der Gattung *Navicula* sind schiffchenförmige Mikroalgen, die in ihrer planktonischen Form nicht motil sind. Nach dem passiven Erreichen eines Substrats sondern sie extrapolymer

Substanzen (EPS) aus, die ihnen zunächst optional ein gleitendes Fortbewegen und anschließend die permanente Adhäsion ermöglichen. In den beiden folgenden Abschnitten werden Ergebnisse aus Experimenten mit zwei eng verwandten Spezies, *N. perminuta* und *N. incerta*, vorgestellt.

ADHÄSIONSVERHALTEN VON *NAVICULA PERMINUTA*

Die Stärke der Adhäsion von *N. perminuta* wurde in einem mikrofluidischen Scherkräftexperiment (experimentelle Details in Abschnitt 3.4.3.2) von DR. M. ALLES auf aus 1 mM Lösung präparierten SAMs aus positiven TMAT- und negativen SAT-Alkanthiolen quantifiziert.

Nach der vorangegangenen statischen Inkubation zeigte die Besiedlungsdichte der Algenzellen beim Erreichen einer schwachen Scherspannung von $\sim 0,01 \text{ dyn cm}^{-2}$ keine signifikanten Unterschiede bei den Mischungsverhältnissen von 25 % und 50 %. Eine Ausnahme bildete die Oberfläche mit 75 % SAT-Lösungsanteil, auf der der Anteil dieser permanent adhärenen Zellen signifikant niedriger war (Abbildung 76 A).

Ein differenzierteres Bild bot der Vergleich der kritischen Scherspannungen τ_{50} , welche sich als Maß für die Adhäsionsstärke heranziehen lassen (Abbildung 76 B). Diese waren für die gegensätzlich geladenen Homologen in allen Fällen höher als auf den gemischten zwitterionischen Oberflächen. Am stärksten hafteten die Diatomeen auf dem positiven TMAT-SAM. τ_{50} war hier mit $(865 \pm 172) \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$ mehr als doppelt so hoch als auf dem negativ geladenen SAT $((429 \pm 93) \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2})$. Bezogen auf den für TMAT erhaltenen Mittelwert nahm τ_{50} auf Oberflächen mit beiden Ladungsträgern um mindestens 95 % ab. Diesbezüglich wurde die signifikant schwächste Adhäsion auf dem 75 %-SAT-SAM gemessen (ANOVA, $p < 0,05$).

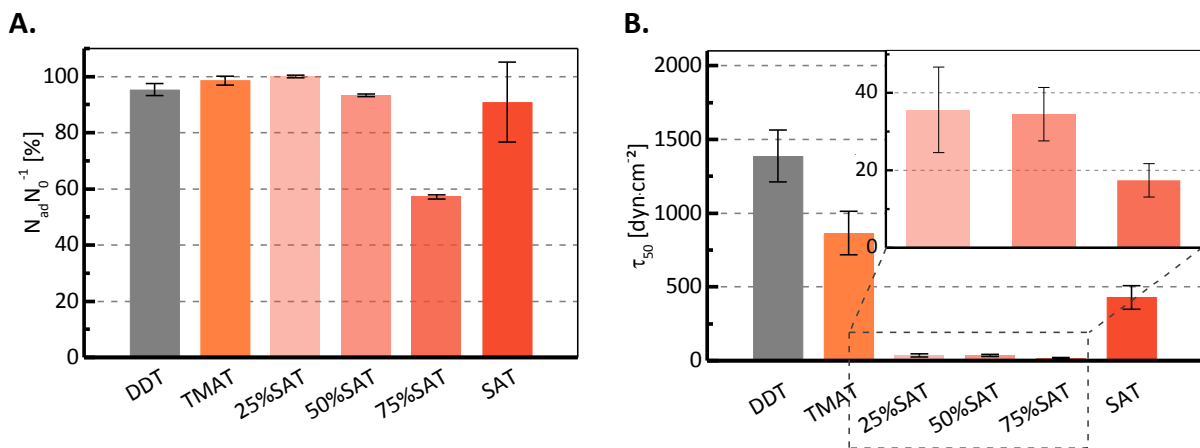


Abbildung 76. Mikrofluidische Abrissexperimente mit *N. perminuta* auf gemischten zwitterionischen SAMs aus TMAT und SAT in verschiedener Zusammensetzung. A. Anteil der initial sichtbaren Zellen $N_{ad}N_0^{-1}$, die nach dem Erreichen einer schwachen Scherspannung von $\sim 0,01 \text{ dyn cm}^{-2}$ adhären blieben. B. Kritische Scherspannung τ_{50} , nach der die Hälfte der initial adhärenen Zellen von der Oberfläche abgerissen waren.

Die für die vorliegende gemischt-geladene SAM-Serie ermittelten kritischen Scherspannungen lagen somit im vergleichbaren Wertebereich, der für Ethylenglykol-terminierte SAMs in analogen Experimenten erhalten wurde.⁷⁶

ADHÄSIONSVERHALTEN VON *NAVICULA INCERTA*

Experimente zu Besiedlungsverhalten und Haftstärke der Diatomeenspezies *N. incerta* wurden unter Anleitung von DR. J. FINLAY an der Universität Newcastle (UK) durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten auf Oberflächen, die aus 0,2 mM Lösungen präpariert wurden und umfassten Lösungszusammensetzungen von 0 %, 5 %, 10 %, 50 %, 90 %, 95 % und 100 % bezogen auf SAT oder MUDA. Als Referenzoberfläche diente das hydrophobe, ungeladene DDT. Außerdem wurden die beiden mit zwitterionischen Endgruppen terminierten Thiole (SB und CB) einbezogen, um die Empfindlichkeit der Zellen auf die exakte Struktur der Oberflächenterminierung zu evaluieren. Diese SAMs dienten schon in der spektroskopischen Charakterisierung der gemischten SAMs als Referenzsystem, das beide geladenen funktionellen Gruppen an einem Molekül und damit ideale zwitterionische Eigenschaften aufwies (1 : 1-Verhältnis der funktionellen Gruppen).

Nach Inkubation in der Diatomeensuspension wurden die Substrate zunächst vorsichtig gewaschen, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen. Die Zelldichte wurde im Anschluss an einen Fixierungsschritt über die Autofluoreszenz des in den Chloroplasten enthaltenen Chlorophylls bestimmt. Ein Teil der zuvor inkubierten Oberflächen wurde nicht direkt fixiert, sondern in einem turbulenten Wasserflusskanal einer Scherspannung von $\sim 30 \text{ Pa}$ ($300 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$) ausgesetzt. In Abbildung 77 sind die Zelldichten vor und nach der Behandlung im Flusskanal vergleichend gegenüber gestellt.

Die höchste Besiedlungsdichte wurde auf dem positiven TMAT beobachtet, welche im Vergleich zur ungeladenen DDT-Referenz um 63 % erhöht war. Auf den negativen SAT- und MUDA-SAMs hingegen wurde eine niedrigere Mikroorganismendichte als auf TMAT (- 26 % auf SAT und - 14 % auf MUDA) quantifiziert, bezogen auf DDT war diese jedoch weiterhin erhöht.

Die Anzahl adhärenenter Diatomeen war mit 60 - 90 Zellen $\cdot\text{mm}^{-2}$ auf den zwitterionisch gemischten SAMs mit SAT für alle Mischungsverhältnisse gegenüber den beiden reinen Komponenten signifikant reduziert (ANOVA, $p < 0,01$, Abbildung 77 A). Bereits für den niedrigsten SAT-Anteil (5 %) betrug die Abnahme 68 % relativ zu dem positiven TMAT-SAM. Die Diatomeendichte lag auch auf den anderen Mischungen im gleichen Bereich und nahm erst bei 95 % der anionischen Komponente wieder zu. Der sulfonathaltige Betain-SAM (SB) zeigte eine mit den Mischungen vergleichbare Zellanzahl.

Auf MUDA-enthaltenden Mischungen war keine so deutliche Reduktion der adhärenenten Zellanzahl im Vergleich zu den reinen SAMs feststellbar. Auf allen Mischungsverhältnissen konnten zwischen (159 - 170) Zellen $\cdot\text{mm}^{-2}$ beobachtet werden, was weniger als auf TMAT ((186 ± 9) Zellen $\cdot\text{mm}^{-2}$) im Bereich des reinen MUDAs ((161 ± 9) Zellen $\cdot\text{mm}^{-2}$, Abbildung 77 B) lag. Auf dem entsprechenden Carboxybetain (CB) war die adhärenente Zelldichte mit (181 ± 10) Zellen $\cdot\text{mm}^{-2}$ am besten mit der auf TMAT zu vergleichen.

Nach der Behandlung im Flusskanal nahm die Zelldichte auf allen untersuchten Oberflächen außer DDT ab, auf dem keine Entfernung der Zellen festgestellt werden konnte. Auf den SAT-Mischungen war die Diatomeen-Ablösung am stärksten ausgeprägt, es blieben höchstens ~ 25 Zellen $\cdot\text{mm}^{-2}$ zurück (auf 95 % SAT). Die Zelldichten auf den Betain-SAMs SB und CB nach dem Flusskanal waren, wie die vor dem Flusskanal auch, im gleichen Bereich wie auf den entsprechenden gemischten SAMs.

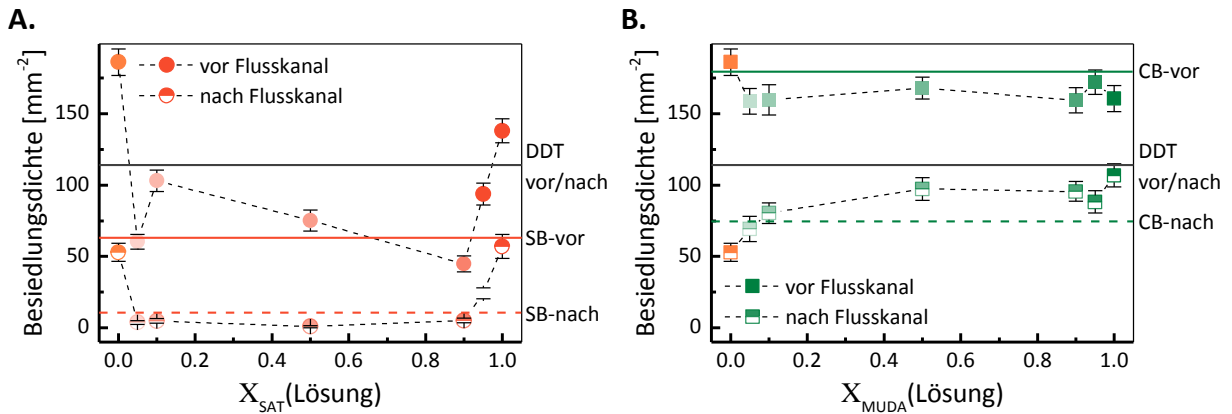


Abbildung 77. Besiedlungsexperimente mit *N. incerta* auf gemischten geladenen SAMs aus TMAT und A. SAT und B. MUDA. Besiedlungsdichte der Algenzellen nach 2 h vor und nach Behandlung in einem kalibrierten Flusskanal mit 30 Pa. Die angegebenen Werte zeigen den Mittelwert der Evaluierung von jeweils 30 FOVs auf drei Replikaten, die Fehlerbalken das 95 %-Konfidenzintervall.

Das Verhältnis zwischen permanent adhärennten und nach dem Flusskanal noch vorhandenen Zellen gibt Aufschluss darüber, wie gut die Kieselalgen sich von einer Oberfläche entfernen lassen (Abbildung 78). Wie auch aus der Literatur bekannt,⁷⁶ hafteten die Zellen am stärksten auf dem hydrophoben DDT und wurden dementsprechend durch den Flusskanal nicht entfernt (100 % zurückbleibende Diatomeen). Dieser Anteil war auf allen anderen untersuchten Oberflächen deutlich kleiner. Unter diesen blieben auf dem negativen MUDA-SAM am meisten zurück, auch im Vergleich zu dem ebenfalls negativen SAT und dem positiven TMAT-SAM. Auf den gemischten SAT-Oberflächen zeigte sich mit zunehmendem Anteil der negativen Komponente ein höherer Anteil abgelöster Mikroorganismen, der bei 50 % SAT maximal war und mit weiterer SAT-Zunahme wieder abnahm. Auch hier unterschied sich der Verlauf für SAT- und MUDA-Mischungen: Ohne Ausnahme war der zurückbleibende Algenanteil auf Oberflächen mit Carboxylkomponenten höher (mindestens 40 %) als auf TMAT (28 %). Auch auf den betainterminierten SAMs waren die Adhäsionsvermögen unterschiedlich, für CB lag sie mit 41 % im Bereich der MUDA-Mischungen. Auf SB blieben 17 % der *Navicula* zurück, sie hafteten somit schwächer als auf TMAT aber stärker als auf den SAT-Mischungen mit (5 - 90) % SAT-Lösungsanteil.

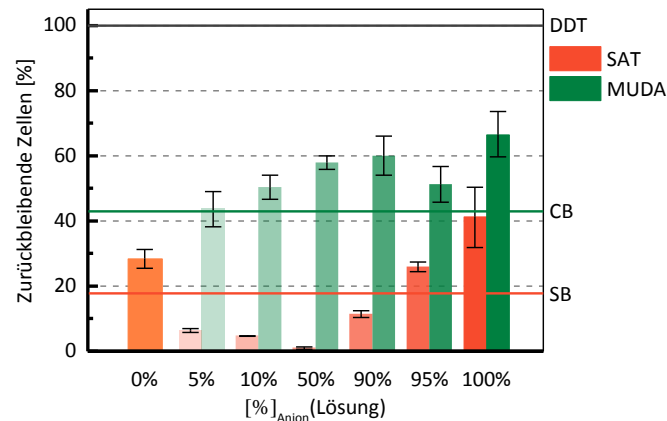


Abbildung 78. Prozentualer Anteil von zurückbleibenden Algenzellen auf gemischten SAMs aus TMAT und SAT oder MUDA nach dem Aussetzen in einem turbulenten Fluss von 30 Pa. Die angegebenen Werte zeigen den Mittelwert der Evaluierung von jeweils 30 FOVs auf drei Replikaten, die Fehlerbalken das 95 %-Konfidenzintervall.

Gemeinsam war allen Testoberflächen, dass ihre höhere Benetzbarkeit im Vergleich zu DDT. Die einheitliche Abnahme der prozentualen Ablösbarkeit der Diatomeen trotz der unterschiedlichen Ladungsarten deutete darauf hin, dass es vor allem diese Oberflächeneigenschaft war, die die Stärke der Adhäsion beeinflusste. Die Korrelation der zurückbleibenden Zellanteile mit den statischen Kontaktwinkeln der SAMs (Abbildung 79 A) bestätigt diese Hypothese.

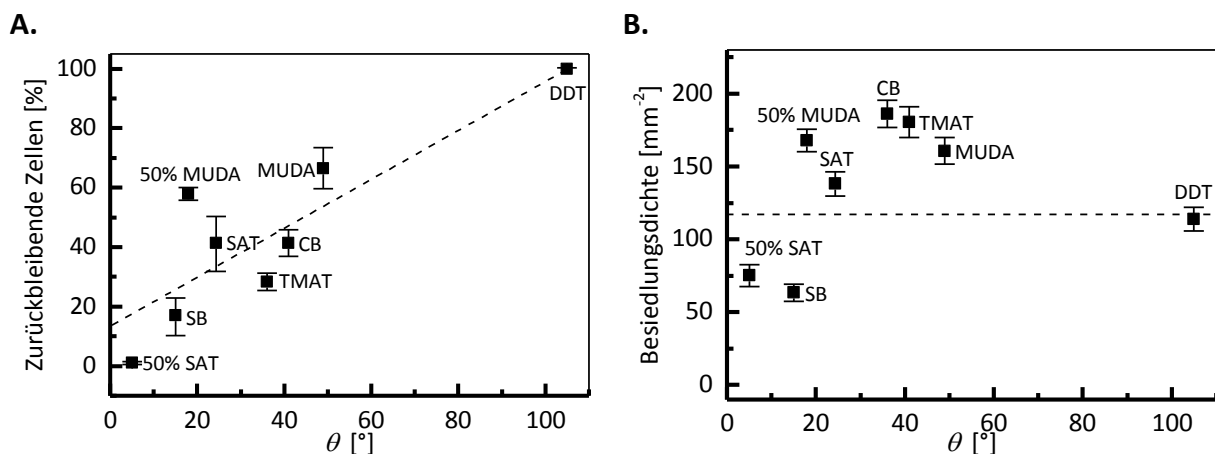


Abbildung 79. Korrelation des statischen Wasserkontaktwinkels θ der Testoberflächen mit A. dem zurückbleibenden Zellanteil nach der Behandlung im turbulenten Flusskanal und B. der Besiedlungsdichte von *N. incerta* vor dem Flusskanal. Die gestrichelte Linie in A. deutet einen linearen Zusammenhang zwischen dem Kontaktwinkel und den zurückbleibenden Zellen an, die in B zeigt zur besseren Einordnung der Resultate die Besiedlungsdichte auf DDT.

Da die Diatomeen vor dem Erreichen eines Substrates nicht motil sind und bei den durchgeführten Experimenten stets eine konstante Konzentration von Zellen auf alle Oberflächen gegeben wurde, war ihre Anzahl nach der statischen Inkubation zunächst auf allen Testsubstraten identisch. Die ersten Unterschiede in den Zelldichten spiegelten daher schwach haftende Zellen wieder, die direkt entfernt wurden. Diese initialen Besiedlungsdichten (Abbildung 79 B) konnten nicht direkt mit den Benetzungseigenschaften in Verbindung gebracht werden, wie es für die zurückbleibenden Zellen möglich war. Die Abbildung macht jedoch deutlich, dass die Haftung auf den sulfonat-haltigen Oberflächen (gemischte SATs und SB) im Vergleich zu den entsprechenden Carboxylderivaten

(gemischte MUDAs und CB) abgeschwächt war. Die Anzahl der adhärenen Mikroorganismen war um die Hälfte reduziert.

Auf den sulfonathaltigen zwitterionischen SAMs hafteten die *Navicula* schwächer als auf allen anderen untersuchten Oberflächen, was sich einerseits durch eine initial deutlich reduzierte Zelldichte und eine nahezu vollständige Entfernung der Kieselalgen nach dem Flusskanal zeigte. Eine ähnliche Reduktion der anhaftenden Zellen wurde schon in einer Studie auf einem polymeren zwitterionischen Material beobachtet, bei denen die initiale Phase der Besiedlung daraufhin näher untersucht wurde.¹⁷⁵ Häufig müssen sich die Diatomeen nach dem Erreichen einer Oberfläche erst drehen, um mit einer Raphe in Richtung des Substrates zu liegen. Erst dann kann durch die Aussonderung von EPS die Adhäsion zustande kommen. Auf den in der entsprechenden Studie untersuchten Poly(sulfobetainmethacrylat)-Oberflächen konnte eine solche Anpassung der Zellposition nicht beobachtet werden, womit die verminderte Kontaktherstellung zur Oberfläche erklärt wurde. Die leichte Ablösung der Diatomeen wurde darauf zurückgeführt, dass sie die primäre Adhäsion nicht mehr auf eine effektive Weise bewerkstelligen konnten.¹⁷⁵ Auf den carboxylhaltigen zwitterionischen Oberflächen konnte eine dieser Beobachtung entsprechende, initial reduzierte Adhäsion nicht festgestellt werden.

Zusammenfassend ließ sich folgendes über das Besiedlungsverhalten der Diatomee *N. incerta* festhalten: Ihre primäre Adhäsion wurde nur durch die sulfonathaltigen Oberflächen signifikant beeinflusst. Die Stärke der permanenten Adhäsion, repräsentiert durch den prozentual ablösbaren Anteil von Zellen, ließ sich dagegen am besten mit der Oberflächenbenetzbarkeit und nicht der Natur der vorhandenen Ladungsträger korrelieren.

4.1.4.3 Adhäsionsverhalten von *Ulva linza*-Zoosporen

Das Adhäsionsverhalten von *U. linza*-Zoosporen wurde ebenfalls an der Universität Newcastle unter Anleitung von DR. J. FINLAY auf den unterschiedlichen geladenen und zwitterionischen SAMs analysiert. Die Präparation der gemischten SAMs erfolgte aus 0,2 mM ethanolischen Assemblierungslösungen. Analog zum Vorgehen beim statischen *Navicula*-Besiedlungsexperiment wurden die Testoberflächen in einer Suspension der motilen Zoosporen inkubiert und die Anzahl adhärenter Zellen quantifiziert. Ein Teil der Oberflächen wurde einer turbulenten Scherströmung ausgesetzt, um die Ablösbarkeit der Sporen zu vergleichen. Anders als *Navicula*, die bis zum Erreichen eines potentiellen Adhäsionsortes nicht motil sind, verfügen *Ulva* Sporen über vier Flagellen, die ihnen ein freies Schwimmen und damit die aktive Auswahl eines Siedlungsplatzes ermöglichen.^{40,271}

Die Dichte adhärenter Zellen war auf dem positiv geladenen TMAT am höchsten, im Vergleich zum für die Sporen attraktiven hydrophoben DDT war sie verdoppelt (Abbildung 80 A und B). Sowohl auf den reinen negativ geladenen als auch auf den beiden Betain-SAMs (SB und CB) dagegen adhärten nur wenige Sporen, im Vergleich zum positiven TMAT höchstens 15 %. Auf den Mischungen zeigten sich systematische Unterschiede: Auf SAT-haltigen Oberflächen war die Besiedlungsdichte höher als auf DDT und nur leicht vermindert im Vergleich zum TMAT (Abbildung 80 A). Auf allen MUDA-Mischungen war eine signifikante Reduktion in Bezug auf TMAT und ab Anteilen > 5 % auch

gegenüber DDT zu beobachten (ANOVA, $p < 0,05$, Abbildung 80 B). Ab diesem Mischungsanteil lag die Zelldichte im Bereich des reinen MUDA, die quantifizierbare Dichte von ~ 100 Sporen·mm⁻² war minimal.

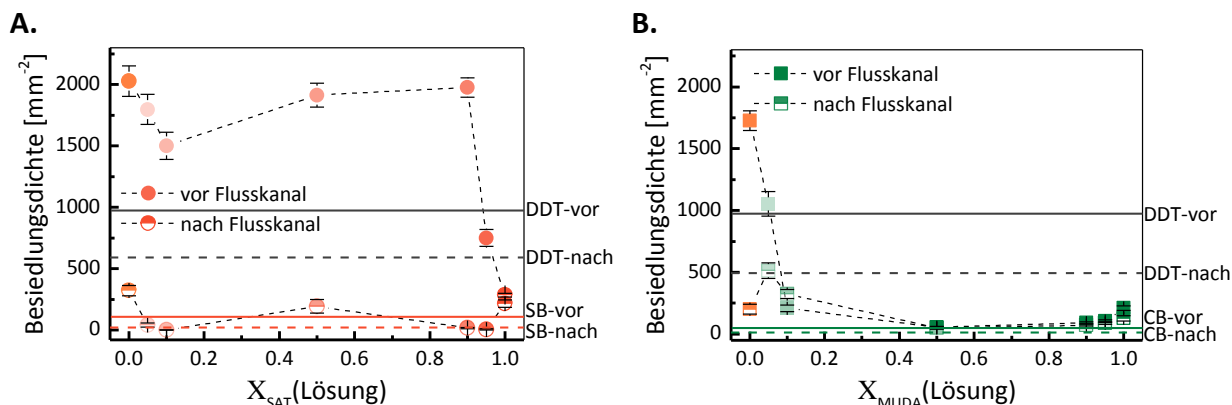


Abbildung 80. Besiedlungsexperimente mit *U. linza* auf gemischten geladenen SAMs aus TMAT und A. SAT oder B. MUDA. Besiedlungsdichte der Algenzellen nach 45 min vor und nach Behandlung in einem kalibrierten Flusskanal mit 52 Pa. Die angegebenen Werte zeigen den Mittelwert der Evaluierung von jeweils 30 FOVs auf drei Replikaten, die Fehlerbalken das 95 %-Konfidenzintervall.

Eine weitere Beobachtung, die neben der reinen Quantifizierung der adhärennten Sporen gemacht wurde, war ein großer Anteil sog. „Pseudobesiedlung“ (engl. *pseudo settlement*) auf den CB-Oberflächen. Sporen die den vollständigen Adhäsionsprozess durchlaufen zeichnen sich durch ihre runde Form und das Verschwinden der Flagellen aus. Pseudogesiedelte dagegen weisen noch die Birnenform der schwimmenden Sporen und (zumindest einen Teil der) Flagellen auf. Diese Form der Besiedlung wurde bisher hauptsächlich auf kationischen Peptid-SAMs beschrieben.¹⁴⁹ Ihr Auftreten auf den ladungsausgeglichenen Carboxybetainen, aber auf keinem der anderen Testsubstrate, ist ein Phänomen, das momentan noch nicht verstanden ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte auf diese Beobachtung allerdings nicht weiter eingegangen werden.

Beim Vergleich der Sporendichten vor und nach der Behandlung im Wasserkanal fiel vor allem das nahezu vollständige Entfernen der adhärennten Zellen von den SAT-enthaltenen Mischoberflächen auf, der prozentuale Anteil zurückbleibender Sporen für dieses System ist in Abbildung 81 gezeigt. Auf den MUDA-haltigen SAMs waren schon die initialen Zelldichten so niedrig, dass sich keine statistisch relevanten Aussagen über die die Ablösbarkeit treffen ließen. Auf die graphische Darstellung der prozentual zurückbleibenden Organismen wird daher an dieser Stelle entsprechend der in der Literatur üblichen Vorgehensweise verzichtet.²² Auf den sulfonathaltigen Substraten war die Adhäsion so schwach, dass nach dem Flusskanal praktisch keine Sporen mehr vorhanden waren. Auf reinem TMAT war die Haftung gegenüber DDT abgeschwächt, ebenso auf dem Betain-SAM. Im Vergleich blieben prozentual mehr Sporen auf dem reinen SAT-SAM zurück, allerdings war auch bei diesem die initiale Zelldichte derart gering, dass eine statistische Signifikanz dieser Aussage nicht gewährleistet ist. Insgesamt waren alle Testoberflächen bis auf TMAT in der Lage, die starke permanente Adhäsion der Sporen zu verhindern.

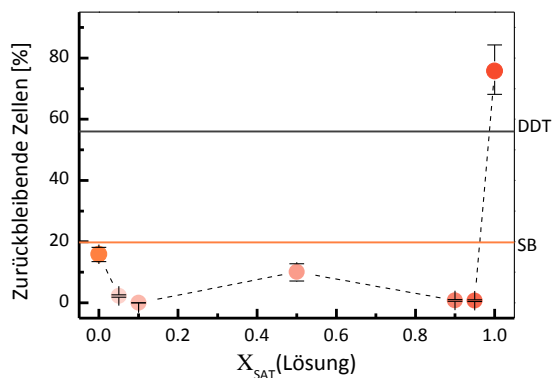


Abbildung 81. Prozentualer Anteil von zurückbleibenden Algenzellen nach dem Aussetzen eines turbulenten Flusses von 52 Pa auf gemischten SAMs aus TMAT und SAT. Die angegebenen Werte zeigen den Mittelwert der Evaluierung von jeweils 30 FOVs auf drei Replikaten, die Fehlerbalken das 95 %-Konfidenzintervall.

Von *Ulva*-Sporen ist eine Besiedlungspräferenz für hydrophobe Substrate bekannt,¹⁶ die Anzahl der adhärennten Sporen wurde daher mit dem statischen Wasserkontaktwinkel der Testsubstrate korreliert (Abbildung 82 A). Vor allem die hohe Besiedlungsdichte auf den gemischten Sulfonat-Oberflächen und dem positiven TMAT wich deutlich von einem einfachen Zusammenhang der Oberflächenbenetzbarkeit und der *Ulva*-Besiedlung ab. Die anschließende Entfernung der adhärennten Sporen im Flusskanal zeigte außerdem, dass die Algen auf den extrem hydrophilen gemischten SAT-SAMs im Gegensatz zum reinen TMAT schwächer hafteten, was durch ihre praktisch vollständige Entfernung durch den Flusskanal deutlich wurde (Abbildung 82 B). Auch dieser Zusammenhang steht im Kontrast zu literaturdokumentierten Tendenzen zu einer stärkeren Adhäsion auf hydrophilen Substraten.¹⁶ Die vorhandenen Ladungsträger veränderten also die Adhäsion der Zellen im Vergleich zu ungeladenen Substraten. Die Fähigkeit der Sporen zur sensiblen Diskriminierung von exakten Oberflächenterminierungen wird noch einmal im Vergleich der gemischten mit den Betain-SAMs deutlich. Vorhandene Carboxyleinheiten, wie in allen MUDA-Oberflächen und CB, verhinderten die Ansiedlung der Sporen, während die Trimethylammoniumgruppe diese förderte. Der Einfluss der Carboxyle überwog dabei, da die Sporen auf den MUDA-Mischungen nicht siedelten, auf den SAT-haltigen jedoch ein dem TMAT analoges Verhalten zeigten. Festgehalten werden kann daher an dieser Stelle, dass die *Ulva*-Sporen eine ausgeprägte Tendenz zur Besiedlung von Substraten mit Ammoniumterminierung aufwiesen, auf deren Mischungen sie jedoch extrem schwach adhärten und daher im Experiment vollständig entfernt werden konnten.

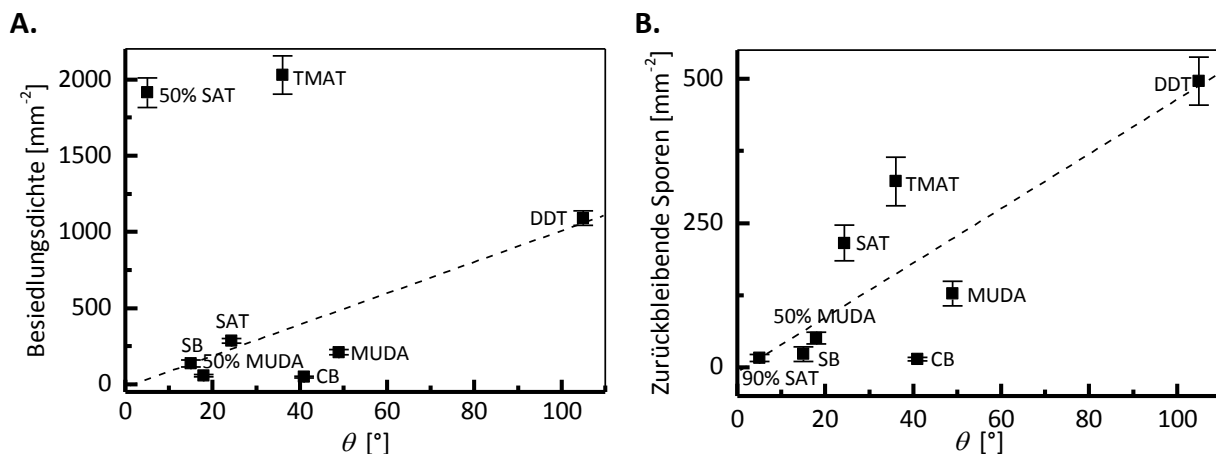


Abbildung 82. Korrelation der statischen Wasserkontaktwinkel θ der SAMs mit geladenen Endgruppen und DDT mit der Besiedlungsdichte von *U. linza* A. vor und B. nach dem Flusskanal. Die gestrichelte Linie deutet einen linearen Zusammenhang zwischen dem Kontaktwinkel der Oberflächen und der Sporendichte an.

Verursacht durch die sie umhüllende Schicht aus negativ geladenen EPS verfügen die Sporen nach außen hin über ein negatives Zeta-Potential.¹⁴⁸ In früheren Studien wurde dementsprechend eine auf elektrostatische Wechselwirkungen zurückgeführte verringerte Besiedlungstendenz auf gleichartig geladenen Oberflächen beobachtet. Auch die Adhäsionsstärke der gesiedelten Sporen war reduziert.¹⁴⁸ Die gezeigten Ergebnisse entsprechen der verminderten Besiedlung auf negativ geladenen Oberflächen, legen aber einen komplexeren, als den auf reinen elektrostatischen Faktoren beruhenden, Zusammenhang nahe. Die Sporen zeigten ein hohes Maß an Diskriminierungsfähigkeit zwischen den funktionellen Einheiten.

4.1.4.4 Feldstudie am Florida Institute of Technology (Melbourne, USA)

Um das Besiedlungsverhalten einer realen marinen Population auf den geladen und zwitterionischen SAMs zu testen, wurden sie im Juni 2012, in Kooperation mit dem *Florida Institute of Technology* (FIT, USA), einem Feldexperiment unterzogen. Die aus 1 mM Lösung präparierten Oberflächen aus verschiedenen Mischungsverhältnissen von TMAT und SAT wurden dafür für 24 h oder 48 h im Meer inkubiert. Die Quantifizierung der adhärenen Mikroorganismen erfolgte durch lichtmikroskopische Evaluierung, wobei die Gattungen der Organismen in Übereinstimmung mit Zargiel *et al.* identifiziert wurden.⁶⁹ Ihre Übersicht ist in Abschnitt 3.4.7.1 zu finden.

Aus Laborexperimenten mit Einzelspezies ist bekannt, dass unterschiedliche Mikroorganismen verschiedene Präferenzen für spezifische Oberflächenchemien aufweisen.^{16,131} Daher war neben der reinen Quantifizierung der adhärenen Mikroorganismen auch die Verteilung ihres Auftretens auf den unterschiedlichen Oberflächenterminierungen von Interesse (Abbildung 83). Den Hauptanteil mit $\sim 60\%$ bildeten nach beiden Untersuchungszeiträumen und in allen Fällen schiffchenförmige Spezies, zu denen *Navicula*, *Nitzschia*, *Gyrosigma* und *Progonoi* gezählt wurden. Neben ihnen traten als eindeutig identifizierbare Spezies hauptsächlich *Amphora*, *Cylindrotheka* und begeißelte Organismen auf. Der überwiegende Teil der beobachteten Spezies waren Diatomeen, was basierend auf Literaturberichten den Erwartungen entsprach.²⁷²⁻²⁷³ Die Verteilung der Organismen variierte zwischen den Oberflächen nicht maßgeblich. Dieser Befund steht im Einklang mit Untersuchungen auf SAMs mit variierender Benetzbarkeit, die parallel durchgeführt wurden.²⁷⁴

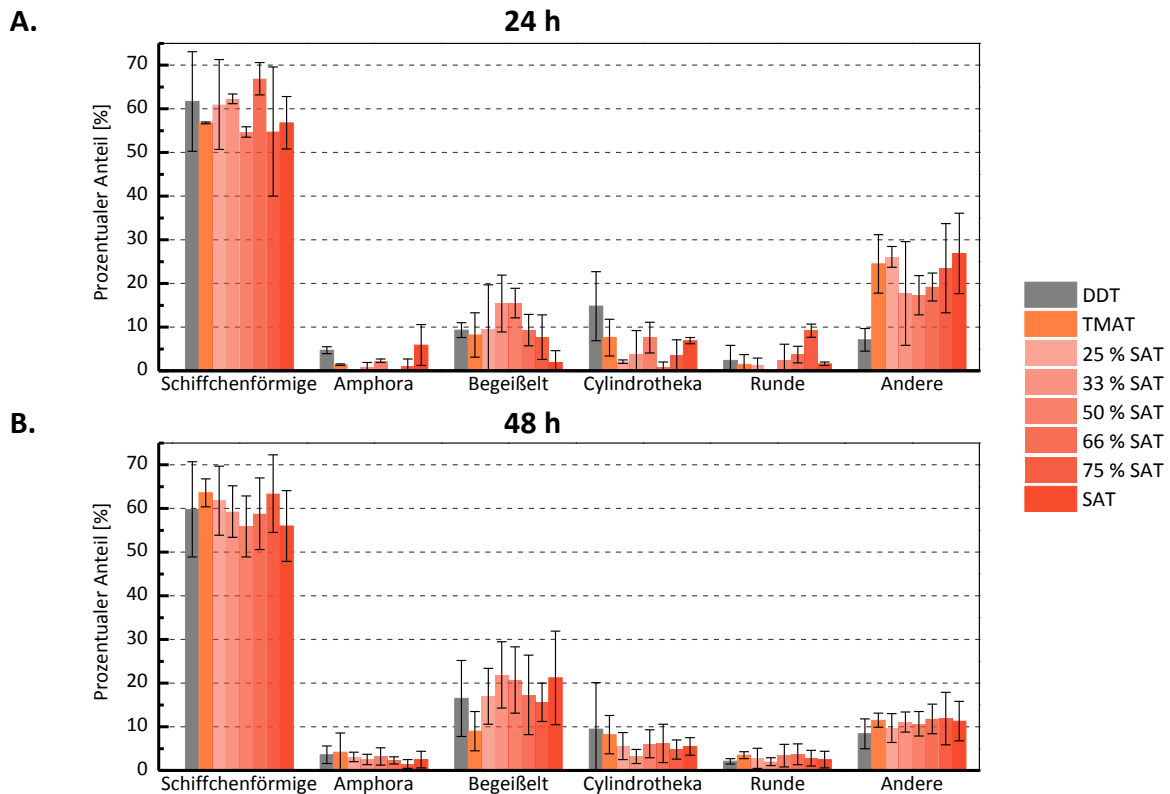


Abbildung 83. Prozentuale Verteilung der Organismen auf den gemischten SAMs aus TMAT und SAT nach A. 24 h und B. 48 h. In der Gruppe der Schiffchenförmigen wurden *Navicula*, *Nitzschia*, *Gyrosigma* und *Progonoi* zusammengefasst; in der der runden Organismen *Coscinodiscus*, *Cocconeis* und *Triceratium*. Die gezeigten Daten repräsentieren die Mittelwerte der Evaluierung von zwei Replikaten für 24 h und von sechs Replikaten für 48 h; die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Nach 24-stündiger Inkubation zeigte die Organismenanzahl auf allen Testoberflächen keine signifikanten Unterschiede, war jedoch im Vergleich zur DDT-Referenz um mindestens 65 % reduziert (Abbildung 84, linke Balken). Dieses Experiment wurde daher nicht wiederholt, die Daten repräsentieren einen Durchlauf bei dem jeweils zwei Replikate untersucht wurden. Nach 48 h dagegen waren auch zwischen den ladungsträgerterminierten Oberflächen differenzierbare Tendenzen zu erkennen, diese Bedingungen wurden zweimal reproduziert (Abbildung 84, rechte Balken). Die höchste Besiedlungsdichte zeigte sich nach wie vor auf DDT. Auf dem positiven TMAT adhärten mehr Mikroorganismen als auf dem negativen SAT (+ 11 %), dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant (ANOVA, $p > 0.05$). Alle untersuchten gemischten SAMs reduzierten die Besiedlungsdichte signifikant im Vergleich zu den reinen Homologen, was mit den vorangegangenen Ergebnissen einer erhöhten Resistenz der zwitterionischen Oberflächen übereinstimmte.

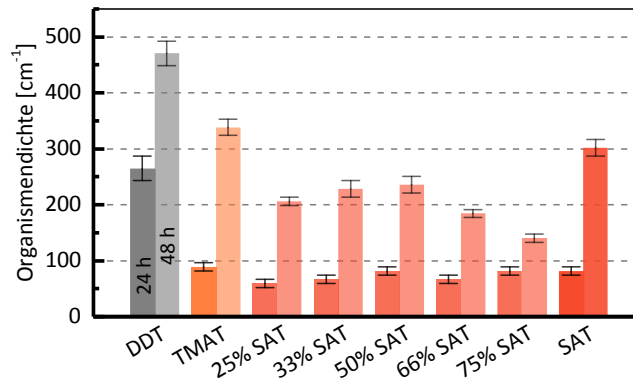


Abbildung 84. Organismendichte auf gemischten SAMs aus TMAT und SAT nach 24 h (linke Balken) und 48 h (rechte Balken) Inkubation im Meer an der „Indian River Lagoon“ auf dem Testgelände des FIT, Florida. Die gezeigten Daten repräsentieren die Evaluierung von 60 Sichtfeldern je Oberflächenbeschichtung, für 24 h auf zwei, für 48 h auf sechs Replikaten. Die Fehlerbalken zeigen den SEM ($n_{24\text{ h}} = 120$, $n_{48\text{ h}} = 360$).

Für die hier durchgeführten Untersuchungen zur anfänglichen Besiedlung von Oberflächen durch marine Populationen erwies sich der längere Untersuchungszeitraum als besser geeignet. Da die Organismenzahl im Vergleich deutlich zunahm, stellte sich zunächst die Frage nach einem möglichen Abbau der funktionellen Schicht. Dieser Einfluss konnte aber aufbauend auf den in Abschnitt 4.1.3 gewonnenen Ergebnissen zur Stabilität solcher Oberflächen ausgeschlossen werden. Ausgehend vom Vergleich der Organismenzusammensetzung kam auch eine später einsetzende Besiedlung durch eine nach 48 h dominante Spezies nicht in Frage.

Eine Reihe von Faktoren, die sich mit der Zeit aufbauen, können siedelnde Mikroorganismen in ihrem Adhäsionsverhalten beeinflussen. Beispielhaft seien hier Konditionierungsfilme, Biofilme und physiologische Reaktionen genannt. Konditionierungsfilme werden durch im Medium vorhandenes Material gebildet.⁵⁴ Für sie konnte gezeigt werden, dass ihr durch Proteine bestimmter Aufbau abhängig von der gegebenen Oberflächenchemie ist.⁵⁷ Anhand der in Abschnitt 4.1.4.1 oberflächenabhängigen Adsorptionspräferenz der verschiedenen Testproteine lag eine abweichende Zusammensetzung auf den unterschiedlichen Substraten nahe. Allerdings konnte in den vorangegangenen Studien nur ein begrenzter Effekt der Konditionierung auf eine anschließende Besiedlung festgehalten werden.²⁷⁵ Auch die Biofilm-Bildung durch marine Bakterien ist oberflächenabhängig;²⁷⁶⁻²⁷⁷ ENREF_273 solche Mikroorganismengemeinschaften können weiterer *Fouling*-Organismen beeinflussen.^{273,278} Ein weiterer zeitabhängiger Einfluss ist die physiologische Antwort von siedelnden Organismen auf ihren Siedlungsplatz. Diatomeen beispielsweise senden substratabhängig Botenstoffe (z.B. NO) aus, die wirksam auf nachfolgende Spezies sein können.²⁷⁹ Eine genaue Differenzierung zwischen den genannten Einflussgrößen war anhand des durchgeführten Experimentes noch nicht möglich und erfordert Folgeuntersuchungen.

4.1.5 Vergleich und Diskussion der biologischen Experimente

In den vorangegangenen Abschnitten wurden die Ergebnisse von einzelnen Untersuchungen mit biologischen Systemen auf den ladungsterminierten Modelloberflächen vorgestellt. Im Folgenden sollen diese verglichen werden, um generell aufgetretene Tendenzen zu identifizieren.

Auf den Einkomponenten-SAMs war die Adsorption der Proteine von deren Ladung bestimmt. Für die Untersuchungen mit Organismen konnten dagegen keine trivialen einheitlichen Tendenzen

beobachtet werden. In den Einzelspeziesexperimenten zeigten alle Algenzellen die höchste Präferenz für das positive trimethylammonium-terminierte TMAT. Beide negativen SAMs bewirkten auf die Besiedlungsdichten von *N. incerta* und *U. linza* den gleichen Einfluss, der für die Spezies jedoch gegensätzlich war: Im Vergleich zum hydrophoben ungeladenen DDT siedelten die Diatomeen vermehrt auf ihnen; die Anzahl der adhärierenden *Ulva*-Sporen nahm ab. Beim Feldexperiment nahm die Organismenanzahl auf beiden gegensätzlich geladenen Oberflächen im Vergleich zur ungeladenen Referenz ab.

Alle gemischten SAMs zeigten eine ausgeprägte Resistenz gegen die Adsorption von beiden entgegengesetzt geladenen Testproteinen. Die Besiedlungsdichten der Algen waren differenzierter: Die SAT-haltigen Oberflächen reduzierten signifikant die Anzahl adhärenter *Navicula*, während die MUDA-Oberflächen die der *U. linza* Sporen verminderte. Im Feldexperiment zeigte sich auf der gemischten SAT-Oberfläche eine signifikante Verminderung gegenüber sowohl DDT als auch den reinen geladenen SAMs.

In Bezug auf die Benetzbarkeit einer Oberfläche weisen die beiden Algenspezies im Allgemeinen ein gegensätzliche Adhäsionsverhalten auf: *Ulva* siedeln bevorzugt auf hydrophoben Substraten, auf denen die Haftstärke dann schwächer als auf hydrophilen Vergleichsoberflächen ist,¹⁶ während *Navicula* fest auf solchen Oberflächen adhäreren.³⁸ Auf dem positiven TMAT, auf dem beide eine höhere Besiedlungsdichte zeigten, war auch die Stärke der jeweiligen Adhäsion vermindert. Dieses analoge Verhalten zeigte die Relevanz der positiven Ladung für den Adhäsionsprozess beider Spezies. Für die *Ulva* Sporen widersprach das insgesamt beobachtete Verhalten der bekannten Präferenz für hydrophobe Substrate, die höchste Besiedlung wurde auf den hydrophilsten gemischten SAT-SAMs verzeichnet, auf denen aber keine feste permanente Adhäsion hergestellt werden konnte. Gemeinsam ist einer Vielzahl mariner Organismen ihre negative Nettoladung, die durch ausgesonderte EPS zustande kommt.^{148,280-281} Die naheliegende Abstoßung bei Annäherung an eine ebenfalls negativ geladene Oberfläche konnte für die *Ulva*-Sporen auch beobachtet werden, die auf beiden negativen SAMs wenig und nur schwach adhärten. Eine solche „elektrostatische Abstoßung“ der EPS durch vorhandene Oberflächenladungen scheint zunächst plausibel. Bei Betrachtung der typischen Debye-Länge für Meerwasser von nur 4 Å zeigt sich aber,¹⁴⁸ dass diese Wechselwirkungen nur bei direktem Kontakt mit dem Substrat wirksam sein können und länger reichende Kräfte wie van der Waals- oder vor allem Wasserstoffbrücken dominieren müssen. Die Zoosporen wurden dennoch nicht exklusiv von der Benetzbarkeit, sondern offensichtlich auch von Ladungszustand und Hydratation beeinflusst. Die genauere Analyse der Diatomeen-Experimente mit *N. incerta* ließ dagegen den Schluss zu, dass der Ladungszustand der Oberflächen eine untergeordnete Rolle spielte und die Benetzbarkeit und vor allem die Hydratation der zwitterionischen Oberflächen die Stärke ihrer Adhäsion bestimmten. Für die eng verwandte Spezies *N. perminuta* dagegen wurde ein Einfluss der Ladung gefunden, jedoch wurde auch sie am stärksten von den zwitterionischen Oberflächen, den Testsubstraten mit ausgeprägter Hydratation, beeinflusst. Insgesamt zeigte sich für alle durchgeführten Experimente, dass es vor allem diese Oberflächencharakteristik war, die die Adhäsion sowohl der Proteine als auch der Algenzellen verminderte und die Adhäsion der untersuchten Organismen einheitlich abschwächte. Da die

Haftmittel der untersuchten Spezies zu großen Teilen aus Proteinen bestehen,³³⁻³⁴ ist diese verminderte Haftung auf die behinderte Adhäsionsvermittlung durch diese Substanzen zurückzuführen.

Die offensichtlich unterschiedlichen Auswirkungen der verschiedenen Oberflächeneigenschaften Benetzbarkeit, Ladung und Hydratation auf die beiden Algen-Modellorganismen, wirft die Frage nach den biologischen Unterschieden der siedelnden Zellen auf. *Navicula* sind von einer komplexen Hülle aus Silikat umgeben, in Wechselwirkung mit dem Substrat treten somit dieses anorganische Material und die schon erwähnten Haftstoffe.³⁸ Die motilen *Ulva* Sporen dagegen verfügen noch nicht über eine Zellwand, ihre äußere Hülle besteht aus einer Lipoprotein-Membran.¹⁵⁰ Schon in vergleichenden Untersuchungen auf kationischen Oligopeptid-Oberflächen wurde ein ähnlicher prinzipieller Unterschied wie oben diskutiert beobachtet.¹⁵⁰ Eine Wechselwirkung der umhüllenden Zellmembran der Sporen mit den geladenen Endgruppen wurde dabei als naheliegende Ursache benannt. Da auch in dieser Studie ladungsträgerterminierte Oberflächen verwendet wurden, scheint diese Argumentation auch im vorliegenden Fall schlüssig und erklärt die hohe Spezifität die die Sporen bei der Besiedlung an den Tag legten.

Auf den reinen anionischen SAMs wurden keine signifikanten Unterschiede in den biologischen Evaluierungen beobachtet. Ihre Mischungen mit TMAT dagegen hatten unterscheidbare Resultate, sowohl für die Proteinadhäsion als auch für die Algenbesiedlung, zur Folge. Vor allem die initialen Besiedlungsdichten der *Ulva*-Sporen unterschieden sich. An dieser Stelle ist es daher angebracht, die Unterschiede dieser anionischen Ladungsträger näher zu diskutieren. Beide sind monovalente Säuren, durch ihre unterschiedlichen Größen weist allerdings die Sulfonatgruppe eine niedrigere Ladungsdichte auf. Ein weiterer Unterschied zeigt sich in ihrer Wechselwirkung mit Wassermolekülen: Sulfonate lassen sich als chaotrope, also Wasserstruktur-brechende, Ionen einordnen, während Carboxylaten kosmotrope Eigenschaften zugeordnet werden.¹⁸⁷ Auch eine theoretische Analyse von Polysulfo- und Polycarboxybetainen zeigte schon, dass die beiden Betaine die sie umgebende „Wasserstruktur“ unterschiedlich beeinflussen.^{145,282} Die Auswirkungen dieser Faktoren wurde anhand des Explorationsverhaltens von Seepockenlarven demonstriert, die auf den beiden zwitterionischen Polymeren signifikant unterschiedliche Bewegungsmuster zeigten. Allerdings konnte dieses veränderte Verhalten nicht direkt mit den physiko-chemischen Unterschieden der Testsubstrate korreliert werden. Eine solche direkte Begründung fällt daher auch im vorliegenden Fall schwer. Festhalten lässt sich allerdings, dass auch die aufgezeigten Zusammenhänge wiederholt die dominante Rolle der Wasserbindung für die Wechselwirkung einer Oberfläche mit potentiell adhärierenden Systemen demonstrieren.

EINFLUSS DER LÖSUNGSZUSAMMENSETZUNG

Neben den Auswirkungen der reinen Ladungsträger und deren gleichzeitiger Präsenz wurde auch der Einfluss der Mischungsverhältnisse und dem Überschuss einer der Komponenten näher analysiert. Bei der Adsorption der Proteine war vor allem für die MUDA-Mischungen eine Abhängigkeit von der Lösungszusammensetzung beobachtbar, die bei Fibrinogen stärker ausgeprägt war. Für die äußeren Mischungsverhältnisse, bei denen eine der Komponenten nur zu 1 - 5 % Anteil in der Lösung hatte,

war die Schichtdicke des Proteins im Vergleich mit den anderen Mischungen erhöht. Im Fall der Präparation aus höher konzentrierter Lösung wurde für die 75 %-SAT-Mischung für *N. perminuta* eine signifikant verminderte Haftstärke und im Feldexperiment eine geringere Organismenanzahl im Vergleich zu den anderen Mischungsverhältnissen gefunden. Solche Abweichungen lassen sich mit Beobachtungen von Chen *et al.* erklären, die IR-spektroskopisch einen Einfluss der Lösungskomposition auf die Struktur der resultierenden Monolagen feststellten.¹¹⁴

In den Besiedlungsexperimenten mit den beiden Algenspezies konnten nur auf den Oberflächen mit niedrigstem Lösungsanteil einer der beiden Thiole Abweichungen für ihr jeweiliges Adhäsionsverhalten festgestellt werden. Schon die spektroskopische Analyse der Substrate zeigte Änderungen des Oberflächenaufbaus nur für diese äußeren Mischungsverhältnisse, bei denen einer der Ladungsträger im Überschuss vorhanden war. Somit war der zwitterionische Charakter mit ausgeglichenen Ladungsanteilen nicht mehr gegeben, was sich offensichtlich direkt auf die biologischen Systeme auswirkte. Die Ladungsausgeglichenheit auf den Oberflächen war somit nicht nur für die Proteinresistenz, sondern auch für die verminderte Besiedlung und Abschwächung der Adhäsion der untersuchten Organismen von zentraler Bedeutung.

VERGLEICH DER GEMISCHTEN MIT DEN BETAIN-SAMs

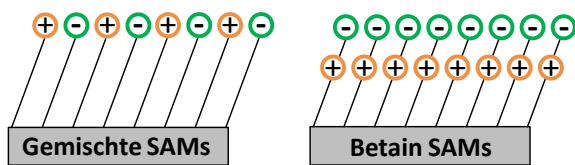


Abbildung 85. Illustration der strukturellen Unterschiede der Ladungsträgerlage in den gemischten zwitterionischen und den Betain-SAMs.

In den Besiedlungsexperimenten mit *N. incerta* und *U. linza* wurden nicht nur die Mischungen aus positivem Thiol und einer anionischen Komponente, sondern auch die entsprechenden Betain-SAMs untersucht. Sie unterschieden sich durch die Verteilung der Ladungsträgerlagen in der Oberfläche, wie in

Abbildung 85 für eine angenommene ideale Packung illustriert. Bei den gemischten SAMs waren die funktionellen Einheiten nebeneinander auf der Oberfläche vorhanden. Für die Betain-SAMs bildete dagegen die anionische Komponente die äußerste Lage, während der positive Ammonium-Teil weiter unten positioniert war. Für die Untersuchungen mit Diatomeen waren keine Unterschiede zwischen diesen beiden Formen der zwitterionischen SAMs beobachtbar. Dieses Resultat bestätigt die von Holmlin *et al.* festgehaltene Beobachtung, dass nicht die Form, sondern lediglich das gleichzeitige Vorhandensein der gegensätzlichen Ladungen relevant für die resultierenden Eigenschaften der SAMs ist.¹⁴⁷ Dagegen entsprach die Besiedlung der *Ulva*-Sporen auf Sulfonat-haltigen SAMs nicht dieser Regel. Da diese Abweichung die Einzige war, konnte nicht von einer mangelnden Qualität oder Unterschieden der verwendeten Oberflächen ausgegangen werden. Die Sporen zeigten auf dem SB-SAM eine dem reinen Sulfonat-SAM ähnliche Adhäsionsdichte, während die Zelldichte auf den Mischungen im Bereich des positiven TMAT-SAMs lag. Bei erneuter Betrachtung von Abbildung 85 legen diese Zusammenhänge die Vermutung nahe, dass die Sporen höchst selektiv auf die äußerste Oberflächenlage reagierten, die im Fall des SB-SAMs von den Sulfonat-Einheiten gebildet wurde.

4.1.6 Zusammenfassung

Die Ladung und der Hydratationszustand einer Oberflächenbeschichtung sind zentrale Eigenschaften, die ihre Wechselwirkungen mit organischem Material bestimmen. Zwitterionische Systeme sind solche, deren starke Hydratation auf der gleichzeitigen Präsenz entgegengesetzter Ladungsträger und deren elektrostatischer Wechselwirkungen mit Wasser beruht. Diese Materialien wurden schon in verschiedenen Zusammenhängen als vielversprechend für *Antifouling*- und *Foulingrelease*-Anwendungen demonstriert.²³ Dieser Teil der Arbeit beschäftigte sich daher mit der Präparation, Charakterisierung und biologischen Evaluierung von SAMs mit Ladungsträgerterminierung und ihren Mischungen zu zwitterionischen Monolagen. Als positives Thiol diente TMAT, das eine Trimethylammoniumgruppe aufwies. Die anionischen Gegenstücke waren sulfonat- (SAT), carboxyl- (MUDA) oder phosphonat-terminiert (MUPA).

Die Assemblierung der reinen Thiole und ihrer Mischungen wurde für zwei Konzentrationen ethanolischer Lösungen untersucht. Die höhere Konzentration (1 mM) zeigte sich als nicht geeignet für gemischte SAMs aus TMAT und der Carboxyl- oder Phosphonat-Komponente, da die resultierenden Oberflächen nicht beide Thiolkomponenten aufwiesen. Für die niedrigere Konzentration von 0,2 mM dagegen wurden sowohl für Mischungen des Sulfonatthiols (SAT) als auch des Carboxylatthiols (MUDA) mit ammoniumterminierten TMAT durch XP-Spektroskopie beide Molekülspezies auf der Oberfläche detektiert. Die Analyse der Assemblierungsverhalten zeigte, dass nicht die Lösungszusammensetzung den Aufbau der resultierende Oberfläche bestimmte, sondern dieser nahezu unabhängig von den verwendeten Mischungsverhältnissen war und zu einem SAM mit 1 : 1-Verhältnis der beiden Komponenten führte. Dieses Assemblierungsverhalten entsprach den Erwartungen für die verwendeten entgegengesetzt geladenen Komponenten.^{109,113-114} Für alle untersuchten Oberflächen mit dem phosphonatterminierten Thiol (MUPA) wurden keine dichtgepackten geordneten SAMs erhalten. Des Weiteren zeigte sich das Molekül bei der gleichzeitigen Assemblierung als dominant im Vergleich mit dem positiven Thiol, sein Anteil in den resultierenden Multilagen war immer erhöht. Die untersuchten Präparationsbedingungen waren daher nicht geeignet für diese Komponente und ihre Mischungen mit TMAT.

Bei der Inkubation in SW zeigten sich die SAMs als stabil, nach einem Beobachtungszeitraum von zehn Tagen konnte kein Abbau der Monolagen festgestellt werden. In den folgenden biologischen Evaluierungen konnte daher davon ausgegangen werden, dass beobachtbare Effekte auf die Endgruppenchemie zurückzuführen waren.

Die Adsorption der beiden Testproteine Fibrinogen und Lysozym, die unter den experimentellen Bedingungen entgegengesetzt geladen waren, wurde auf den reinen SAMs von deren Nettoladung bestimmt. Die Mischungen reduzierte die adsorbierte Schichtdicke in allen Fällen, was für die aus niedrigerer Konzentration präparierten Oberflächen stärker ausgeprägt war. Aufbauend auf dieser vielversprechenden Proteinresistenz wurde das Adhäsionsverhalten von marinen Modellorganismen näher untersucht. Die Adhäsionsstärke der Kieselalge *N. perminuta* konnte durch ein mikrofluidisches Scherkräftexperiment qualitativ verglichen werden. Auf den gemischten Sulfonat-SAMs lag die charakteristische kritische Scherspannung τ_{50} in einem Bereich, der schon für hydratisierte Ethylenglykol-SAMs gemessen wurde.⁷⁶ Für den reinen geladenen SAMs war sie signifikant höher, am

höchsten auf dem positiven TMAT, was als starke Haftung der Einzeller gedeutet werden konnte. Ein analoger Einfluss der Ladungsträger wurde mit der nahverwandten Spezies *N. incerta* nicht in diesem Ausmaß festgestellt. Für sie wurden Benetzbarkeit und Hydratation als bestimmende Faktoren für ihre initiale und permanente Adhäsion identifiziert. Zoosporen der Grünalge *Ulva linza* zeigten sich empfindlicher auf die exakte Terminierung der Oberfläche, was auf die direkte Wechselwirkung der sie umgebenden Zellmembran mit den geladenen Oberflächenendgruppen zurückgeführt werden konnte. Ihre Besiedlung wurde auf beiden rein-negativ terminierten SAMs gleichermaßen signifikant reduziert. Die Mischungen der Anionen (Sulfonat und Carboxylat) mit TMAT dagegen hatten entgegengesetzte Effekte auf die Anzahl der Sporen, die permanent auf ihnen adhärten. Der detaillierte Vergleich der gemischten SAMs mit ihren analogen Betainen offenbarte eine Präferenz für die Trimethylammoniumgruppe und eine ausgeprägte Unattraktivität der Carboxylate.

Unter realen Bedingungen wurde abschließend die Besiedlungsdynamik einer marinen Population in einem Feldexperiment an der Atlantikküste Floridas evaluiert. Nach 48 h konnten deutliche Unterschiede zwischen reinen und gemischten SAMs aus TMAT und SAT quantifiziert werden: Die Anzahl adhärenter Organismen war auf den Mischungen, den Oberflächen mit höherem Hydratationsgrad, am niedrigsten. Auf den entgegengesetzt geladenen reinen SAMs dagegen war keine Differenzierung wie für die Einzelspeziesexperimente feststellbar.

Zusammenfassend konnte eine unterschiedlich stark ausgeprägte Diskriminierung aller untersuchten Organismen auf die einzelnen Ladungsträger festgehalten werden: Die positive Ammoniumgruppe hatte immer eine besiedlungsfördernde Wirkung; die negativen Gruppen hatten einen analogen, aber für die beiden Einzelspezies entgegengesetzten Einfluss. Die zwitterionischen Eigenschaften der gemischten Komponenten reduzierten alle für die Stärke der Adhäsion repräsentativen Parameter.

Für Anschlussstudien bieten sich einige Ansatzpunkte: Zunächst müssten die Präparationsbedingungen für die Phosphonatkomponente optimiert werden, um die zur Verfügung stehende Probenmatrix zu erweitern. Des Weiteren wären auch weitere positive Ladungsträger wünschenswert, um zu evaluieren, inwiefern die diskutierten Beobachtungen auf die positive Ladung, oder die chemische Natur der Trimethylammoniumgruppe zurückzuführen sind. Abschließend wäre die detailliertere Untersuchung der Auswirkungen der gleichzeitigen, aber nicht ausgeglichenen Präsenz zweier Ladungsträger von Interesse. Dafür müsste jedoch die Präparation der gemischten SAMs angepasst werden, beispielsweise durch den schrittweisen Austausch von Teilen von zunächst vollständig assemblierten Monolagen.

4.2 Hydrophile und amphiphile Polysaccharide

Hydrophile Oberflächen haben im Vergleich zu Materialien mit niedrigerer Benetzbarkeit höheres Potential, resistent gegenüber der Anlagerung von Biomaterial zu sein.¹²² Polysaccharide (PS) bilden eine Klasse von Biopolymeren, die daher vielversprechende Kandidaten für die Beschichtung inerter Oberflächen sind. Ihre Hydratisierung beruht nicht wie bei zwitterionischen Systemen auf elektrostatischen Wechselwirkungen, sondern auf Wasserstoffbrückenbindungen der Hydroxylgruppen. Ihr Potential wurde schon im Kontext der Protein-, Zell- und Bakterienresistenz demonstriert.²⁸³⁻²⁸⁴

Ausgehend von solchen Studien wurde in früheren Arbeiten in unserer Gruppe auch die Anwendung immobilisierter Saccharid-Polymere im marinen Bereich untersucht.²⁸⁵ In diesen ersten Arbeiten zeigten die präparierten Oberflächen nicht die aufgrund der hohen Protein- und Zellresistenz erwarteten Eigenschaften zur Verhinderung der Adhäsion von marinen Organismen. Als Ursache wurde die Wechselwirkung von freien Carboxylgruppen mit im marinen Medium vorhandenen zweiwertigen Kationen identifiziert. Die Blockierung dieser funktionellen Einheiten sollte dementsprechend die Resistenz dieser Substanzklasse auch in Medien mit hoher Salinität gewährleisten. Im Rahmen dieser Dissertation wurden daher die freien Carboxylgruppen von immobilisierten Zuckermolekülen gezielt modifiziert.

Als natürliche Polysaccharide wurden Alginsäure (AA), Hyaluronsäure (HA) und Chondroitinsulfat (CS) verwendet, die sich geringfügig in ihrem Disaccharidgrundbausteins unterscheiden (Abbildung 86). AA ist ein in Meeresalgen vorkommendes Blockpolymer mit variierenden Mengen an α -L-Guluronsäure (G-Einheit) und β -D-Mannuronsäure (M-Einheit), die [1 \rightarrow 4]-glykosidisch verknüpft sind. Es verfügt über eine zusätzliche Säuregruppe im Grundbaustein, die Anzahl der verfügbaren Komplexbildner und Modifikationsstellen ist damit doppelt so hoch wie bei den anderen Sacchariden und die Auswirkung einer Modifikation somit potentiell höher. HA ist aus β -D-Glucuronsäure-[1 \rightarrow 3]- β -N-Acetyl-D-Glucosamineinheiten aufgebaut. Das Glykosaminoglykan (GAG) kommt beispielsweise als Hauptbestandteil des Bindegewebes, als Gelenkschmiermittel oder im Glaskörper des Auges vor. CS ist das häufigste GAG, es verfügt über die gleiche Disaccharideinheit wie HA, die zusätzlich eine Sulfateinheit trägt. Diese kann in 4- oder 6-Position der N-Acetyl-Galactosamin-Einheit angebunden sein. Neben dem Vorkommen in der Glykocalyx von Zellen, im Bindegewebe und Knorpeln wurde es außerdem in Fischschleim nachgewiesen, wo es für antiadhäsive Eigenschaften mitverantwortlich gemacht wird.^{196,215,286-287} Auch wurde in diesem Zusammenhang die Rolle als Botenstoff identifiziert, der das Verhalten anderer mariner Organismen aktiv beeinflussen kann.²⁸⁸ Es wurden polydisperse Materialien aus natürlichen Quellen verwendet, um günstige Materialien für eine eventuelle zukünftige Anwendung zu nutzen: AA stammte aus Braunalgen ($M \sim (8 - 12) \cdot 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), HA von *Streptococcus equi* ($M \sim (1,5 - 1,8) \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) und CS aus Haiknorpel ($M \sim (3,1 - 3,7) \cdot 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$).

Die Auswahl dieser drei Biopolymere erlaubt es, die Auswirkungen der leichten strukturellen Veränderungen im Grundgerüst der Bausteine auf ihre antiadhäsiven Eigenschaften zu untersuchen.

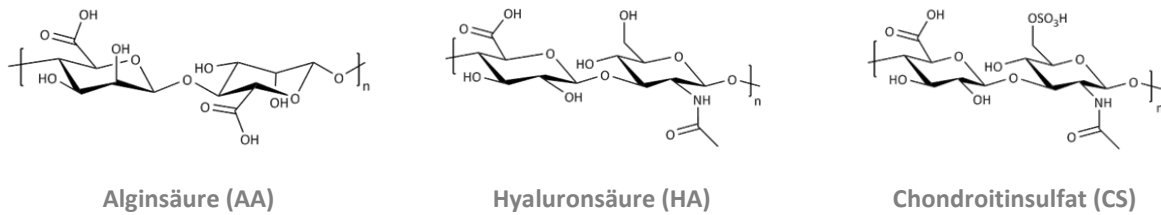


Abbildung 86. Disaccharidbausteine der verwendeten Polysaccharide. Für AA sind zwei [1→4]-verknüpfte M-Einheiten gezeigt, für CS die Modifizierung in 6-Position.

Zur Modifizierung der auf den Oberflächen immobilisierten Polysaccharide wurde das hydrophobe Trifluoethylamin (TFEA) verwendet. Zusätzlich zur Blockierung der koordinierenden Fähigkeiten der Carboxylgruppen für zweiwertige Kationen konnten so amphiphile Eigenschaften im natürlicherweise hydrophilen Polymernetzwerk etabliert werden.

Abbildung 87 zeigt schematisch die etablierte Kopplungsstrategie, die in dieser Arbeit angewendet wurde.^{26,289-290} Zur Aktivierung der siliziumbasierten Substrate (Wafer oder Glas) wurden diese im ersten Schritt im Sauerstoffplasma behandelt. Die generierten Hydroxygruppen erlaubten im Anschluss die Anbindung von Aminopropyltrimethoxysilan (APTMS), einem Silan-Linker mit Aminoterminierung. Zur Immobilisierung der PS wurden deren Carboxylgruppen mittels EDC und NHS aktiviert. Die gebildeten NHS-Ester konnten selektiv mit den auf der Oberfläche angebondenen Aminogruppen reagieren.

Da in diesem Schritt nicht alle Säuregruppen als Amide an die Oberfläche angebonden wurden, konnten diese freien Einheiten in einem nächsten Schritt erneut durch EDC/NHS aktiviert und zur gezielten Modifizierung der oberflächengebundenen PS verwendet werden. Zur Einführung hydrophober Bausteine in die hydrophilen Polysaccharid-Netzwerke wurde Trifluoethylamin (TFEA) verwendet.

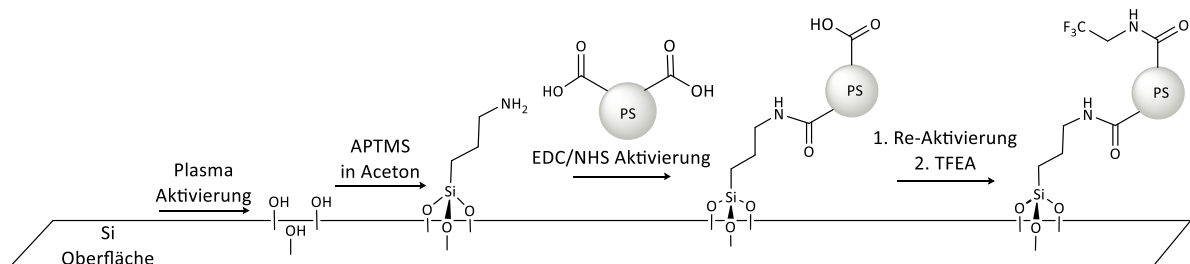


Abbildung 87. Schematische Übersicht der angewandten Strategie zur Kopplung der Polysaccharide. Die gereinigten Si-Oberflächen wurden zunächst im Sauerstoffplasma aktiviert, anschließend wurde ein aminoterminierter Silan-Linker an die reaktiven Hydroxylgruppen gekoppelt. Die Polysaccharide wurden über ihre Carboxylgruppen an diese Aminogruppen angebonden. Freie Säuregruppen konnten anschließend re-aktiviert werden, um ein fluoriertes Amin anzubinden.

In den folgenden Abschnitten wird zunächst auf die Charakterisierung der so präparierten Oberflächen eingegangen. Anschließend werden die Ergebnisse biologischer Evaluierungen mit diversen *Biofouling*-Spezies präsentiert.

4.2.1 Charakterisierung von Polysaccharidoberflächen

Alle Präparationsschritte wurden durch Kontaktwinkel- und Ellipsometriemessungen verifiziert. Zur detaillierten Analyse der Beschichtungszusammensetzungen wurden XPS-Messungen durchgeführt.

4.2.1.1 Kontaktwinkel und Ellipsometrie

Die Benetzbarkeit aller präparierten Proben wurde durch Messung des statischen Wasserkontaktwinkels θ untersucht. In Tabelle 13 sind die Ergebnisse dieser Messungen zusammengefasst. Ein erster Indikator für die erfolgreiche Durchführung der einzelnen Kopplungsschritte war die Entwicklung der Benetzbarkeit. Durch die Plasmabehandlung waren die Proben zunächst extrem hydrophil ($\theta < 5^\circ$). Nach der Beschichtung mit dem Aminosilan APTMS nahm der Kontaktwinkel erwartungsgemäß zu ($\theta_{\text{APTMS}} = (40 \pm 3)^\circ$). Die Anbindung der verschiedenen Polysaccharide wiederum zeigte sich in der erneuten Zunahme der Hydrophilie ($\theta < 10^\circ$). Der anschließende Kopplungsschritt erhöhte θ erneut um $\approx 10^\circ$, je nach PS auf (20 - 30)°.

Tabelle 13. Statische Wasserkontaktwinkel θ und ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken d eines repräsentativen Satzes von beschichteten Si-Wafern. Die Werte entsprechen dem Mittel aus Messungen an drei verschiedenen Stellen je Probe, die angegebenen Fehler den Standardabweichungen.

| | θ [°] | d [Å] |
|------------------|--------------|----------------|
| Plasma gereinigt | < 5 | 0 |
| APTMS | 40 ± 3 | $7,8 \pm 2,8$ |
| AA | 13 ± 3 | $26,2 \pm 7,8$ |
| AA+TFEA | 26 ± 3 | $26,6 \pm 3,2$ |
| HA | < 10 | $20,7 \pm 2,8$ |
| HA+TFEA | 22 ± 5 | $23,5 \pm 2,6$ |
| CS | 13 ± 4 | $32,4 \pm 0,8$ |
| CS+TFEA | 24 ± 2 | $34,7 \pm 0,9$ |

Die Schichtdicken d wurden durch spektrale Ellipsometrie bestimmt. Hierbei wurde ein Zwei-Schichten-Modell zugrunde gelegt, bei dem ein gereinigter Si-Wafer als reflektierender Untergrund diente. Der organische Film wurde als Cauchy-Schicht mit den Parametern $A = 1,45$, $B = 0,01$ und $C = 0$ modelliert. Definitionsgemäß ist die Schichtdicke der Referenzprobe demnach 0 Å. Die Ergebnisse von $(7,8 \pm 2,8)$ Å stimmen mit der theoretischen Länge eines APTMS-Moleküls von 8,5 Å überein und sprechen für die Bildung einer Monolage.²⁹¹

Nach der Polysaccharidkopplung nahm die Schichtdicke weiter um durchschnittlich ~ 20 Å zu, wobei die Ergebnisse relativ stark für unabhängige Durchführungen schwankten (AA (26 - 50) Å, HA (20 - 45) Å, CS (22 - 35) Å). Die Länge einer Monosaccharideinheit lässt sich für alle verwendeten Zucker auf ~ 5 Å abschätzen.[‡] Für die verwendeten natürlichen Polymerketten ergibt sich damit, bei Annahme einer gestreckten Konformation aller Einheiten, eine Kettenlängen im μm -Bereich für AA

[‡] Eine Glucuronsäure-Einheit wurde in Chem 3D modelliert und der Abstand zwischen dem verbrückenden Sauerstoff und dem Kohlenstoff in 4-Position des Sechsrings gemessen.

und HA bzw. im Bereich mehrerer Nanometer für CS. Die erhaltenen Filmdicken zeigten somit, dass keine hochgeordneten Schichten aufgerichteter Ketten wie beispielsweise bei SAMs gebildet wurden. Auch die vollständig flache Anbindung der Polymerstränge ließ sich auch ausschließen, da die Filme dafür nicht größer als die abgeschätzten 5 Å werden könnten.²⁹² Die Ketten bildeten dementsprechend ungeordnete Strukturen, bei denen Teile der aktivierten Carboxylgruppen an die Aminogruppen der APTMS-Moleküle angebunden wurden. Eine solche ungeordnete, mehrfache Anbindung die zu sog. „coil“-Strukturen (Schlaufenstrukturen) der angebundenen Makromoleküle führt, ist beispielsweise von HA bekannt.²⁸⁹ Auch andere Polymere mit multiplen Ankergruppen bilden solche Oberflächenfilme.²⁹³ Somit ließen die Schichtdickenmessungen, deren Tendenzen mit früheren Arbeiten übereinstimmten, auf die Immobilisierung der PS zu einem ungeordneten Netzwerk schließen.²⁸⁵

Die Derivatisierung durch das fluorierte Amin zeigte sich durch eine leichte Zunahme der Schichtdicken. Aufgrund der vergleichsweise großen Schwankung waren diese Änderungen zwar nicht signifikant, jedoch in Kombination mit der Zunahme der Kontaktwinkel ein erster Indikator für eine erfolgreiche Kopplung des Amins an die Carboxylgruppen.

4.2.1.2 XPS

Zur Bestimmung der chemischen Zusammensetzung der Filme wurden sie XP-spektroskopisch charakterisiert.

Im Übersichtsspektrum (Abbildung 88 A) nach der Beschichtung eines Si-Wafers mit APTMS (Abbildung 88 B) zeigten sich entsprechend der Molekülstruktur die Anwesenheit von Silizium, Sauerstoff, Kohlenstoff und Stickstoff. Im Vergleich zur plasmabehandelten Referenz waren die Intensitäten der Si-Signale verringert, die der Kohlenstoff- und Stickstoffsignale waren erhöht.

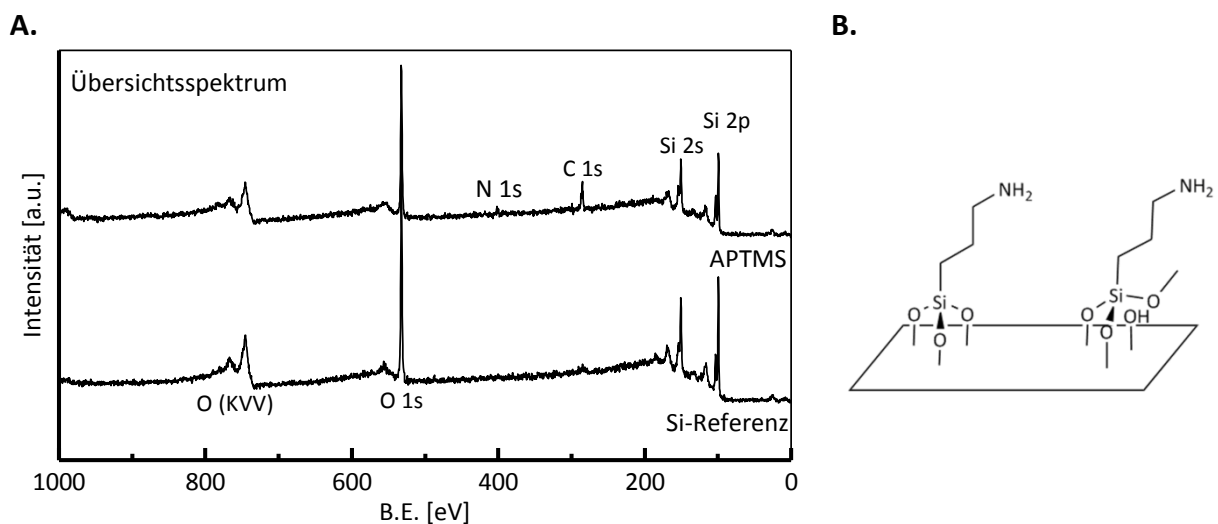


Abbildung 88. A. Übersichtsspektrum von APTMS im Vergleich zu einem plasmabehandelten Si-Wafer. B. Mögliche Bindungsmodi von APTMS an die Si-Oberfläche. Links kondensieren alle Methoxygruppen mit den Hydroxylgruppen der Oberfläche, rechts bleibt die Kondensationsreaktion unvollständig. Die erhöhte Anzahl von Kohlenstoffatomen erhöht den Anteil des C 1s-Peaks bei 286,4 eV und das Verhältnis von Kohlenstoff und Stickstoff.

Abbildung 89 A und B zeigen die Detailspektren der N 1s- und C 1s-Bindungsenergiebereiche. Das N 1s-Signal setzte sich aus zwei Spezies zusammen, die auf unprotoniertes (399,3 eV) und

protoniertes (401,1 eV) aliphatisches Amin zurückzuführen waren.^{290,294} Das C 1s-Signal bestand hauptsächlich aus zwei Spezies bei 286,4 eV und 285,0 eV, die dem APTMS-Molekül zugeordnet werden konnten (siehe auch Tabelle 14). Die Spektren zeigten ein stöchiometrisches Verhältnis dieser Spezies von $\approx 1 : 1$, was vom theoretischen (1 : 2) bei Abspaltung aller Methoxygruppen abweicht. Die teilweise Abspaltung dieser Gruppen durch eine unvollständige Kondensationsreaktion des Silans an die Oberfläche, gezeigt rechts in Abbildung 88 B, erklärt diese Diskrepanz. Auch ein erhöhtes C : N-Verhältnis von $\approx 5 : 1$ (bei einem theoretischen Verhältnis von 3 : 1 bei vollständiger Kondensation) weist auf einen höheren Anteil von Kohlenstoff und damit den angenommenen Anbindungsmechanismus hin. Diese Abweichung vom idealen stöchiometrischen Verhältnis der beiden quantifizierbaren Parameter lässt sich als durchschnittliche Ausbildung von ≈ 2 Silanbrücken pro APTMS-Molekül zur Oberfläche interpretieren.

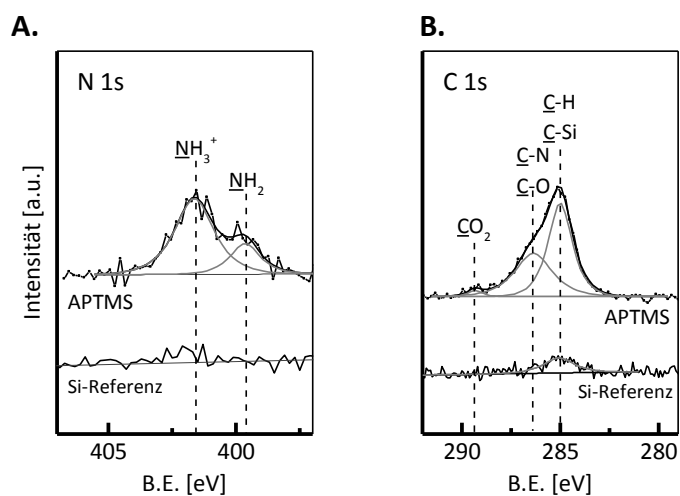


Abbildung 89. A. N 1s-Bindungsenergiebereich und B. C 1s-Bindungsenergiebereich typischer XP Spektren eines mit APTMS-beschichteten im Vergleich zum plasmabehandelten Si-Wafer.

Das schwache Signal bei 289,4 eV im C 1s-Spektrum ist auf adsorbiertes CO_2 aus der Luft zurückzuführen. In Summe zeigten die XP-Spektren die Kopplung des Amino-Linkers (APTMS) an die Oberflächen.

Nach der Anbindung der Polysaccharide wies das Übersichtsspektrum im Fall von AA und HA keine weiteren Elemente im Vergleich zur APTMS-Schicht auf (Abbildung 90 A). Für das sulfatierte CS war ein Signal im S 2s-Bindungsenergiebereich identifizierbar (Abbildung 90 B), was die Anbindung des Polysaccharids indizierte.

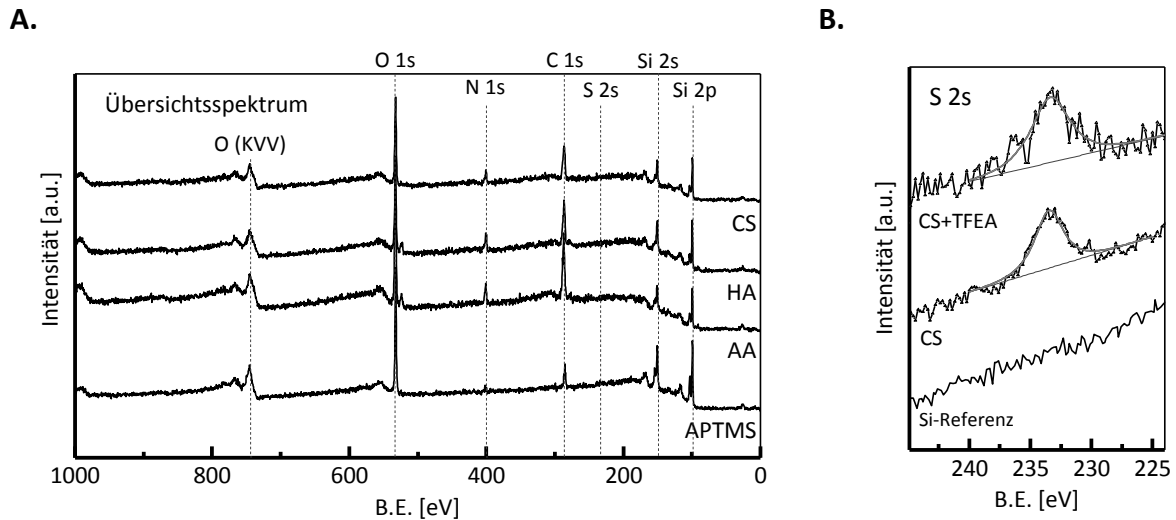


Abbildung 90. A. Vergleich der Übersichtsspektren von APTMS mit denen der PS. B. Vergleich der XP-Spektren vom S 2s-Bindungsenergiebereich eines plasmagereinigten Wafers mit einer Probe nach Ankopplung des sulfatierten CS (vor und nach Modifizierung mit TFEA).

Bei allen drei Polysacchariden war ein N 1s-Signal detektierbar, das wiederum aus zwei Spezies bestand (Abbildung 91 A - C). Im Vergleich zum APTMS-N 1s-Signal waren die Intensitätsverhältnisse umgekehrt. Es dominierte der Anteil bei geringerer Bindungsenergie, die auf amidgebundene Stickstoffe hindeutet. Das Vorhandensein der Spezies bei höherer Bindungsenergie zeigte, dass nicht alle Aminogruppen der APTMS-Schicht mit den Polysacchariden verknüpft waren.

Die C 1s-Detailspektren der PS-Oberflächen wurde aus drei Kohlenstoffspezies gebildet, eine Zuordnung der einzelnen Signale zeigt Tabelle 14. Die Signale bei höchster Bindungsenergie stammten von Carboxyl-, Amid- und Sulfat gebundenen C-Atomen, bei 286,4 eV sind typischerweise an ein elektronegatives Element gebundene Spezies zu erwarten, rein aliphatische Bausteine führten zu Signalen bei 285,0 eV.

Tabelle 14. Zuordnung der XPS-Signale im C 1s-Spektrum.²⁹⁵

| Peakposition [eV] | 288,2 | 286,4 | 285,0 |
|---------------------|-------------------------------|----------|----------------|
| Kohlenstoff-Spezies | O-C=O, N-C=O, O-C-O, O-C-S | C-O, C-N | C-C, C-H, C-Si |

Für HA und CS weist in einer Disaccharideinheit, bestehend aus 14 Kohlenstoffatomen, jeweils nur eines über aliphatisch Charakter auf und ist damit der niedrigsten Bindungsenergie von 285,0 eV zuzuordnen. AA verfügt über keine Kohlenstoffatome mit nur anderen Kohlenstoffbindungspartnern. Die aliphatischen Anteile in den Spektren stammten daher hauptsächlich von der unterliegenden APTMS-Schicht, da die PS aufgrund der erläuterten chemischen Struktur nicht oder nur in sehr geringem Maß zu diesem Signal beitragen.

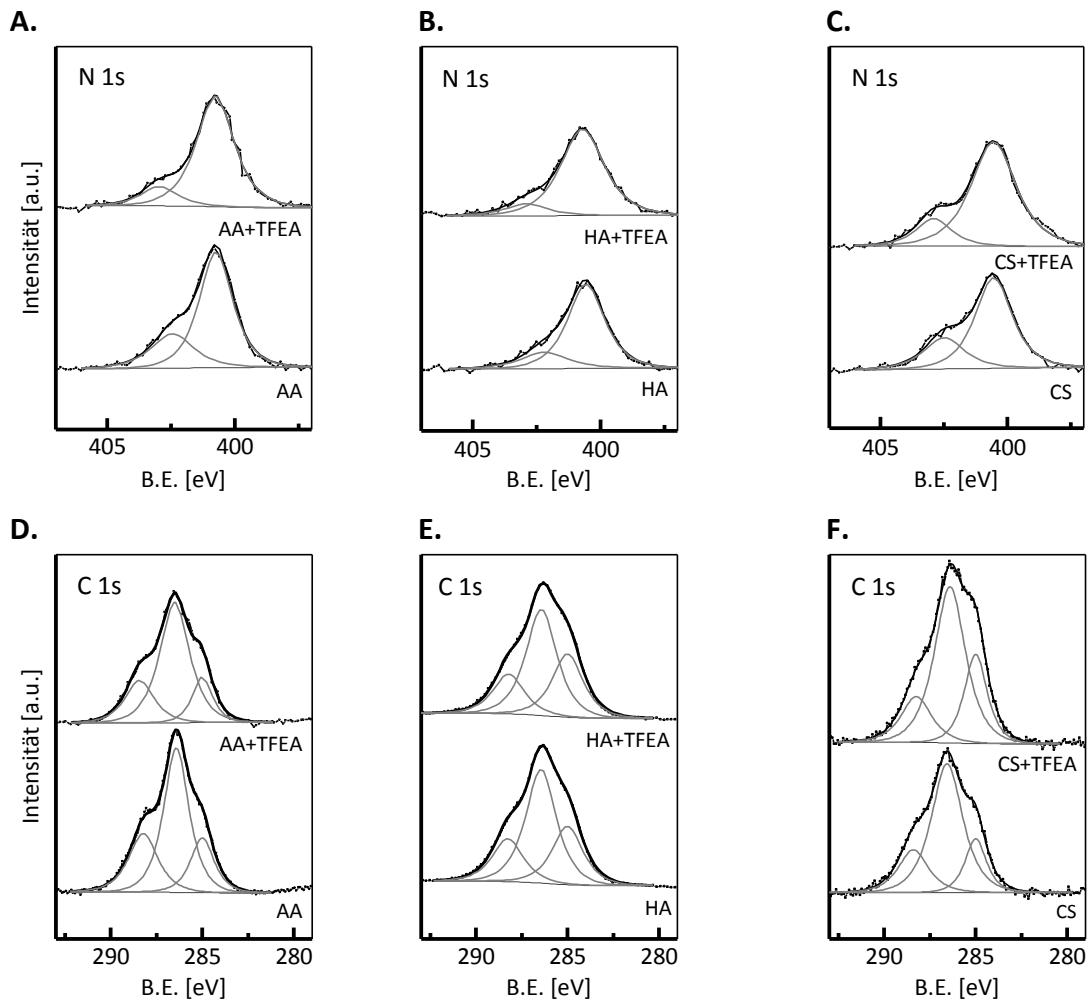


Abbildung 91. Typische XP-Spektren vom N 1s- (A - C) und C 1s-Bindungsenergiebereich (D - F) der einzelnen Polysaccharide vor und nach Modifizierung mit TFEA.

Auch für das Signal bei 286,4 eV muss der Anteil des APTMS beachtet werden. Ein exakt die PS-Zusammensetzung widerspiegelndes Verhältnis der beiden Signale bei höherer Bindungsenergie (286,4 eV und 288,2 eV) war daher nicht zu erwarten. Trotz alledem entsprachen die Intensitätsverhältnisse und ihre Unterschiede den Zusammensetzungen der Kohlenhydrat-Grundbausteine (Tabelle 15). Der Anteil der Signale von Kohlenstoffatomen, welche in unmittelbarer Nähe elektronegativer Atome lokalisiert sind (Hydroxygruppen tragend und an der glykosidischen Bindung beteiligt, bei 286,4 eV), war bei HA und CS im Vergleich zu AA erhöht, wie von der theoretischen Zusammensetzung zu erwarten.

Tabelle 15. Verhältnis der Signalintensitäten bei 286,4 eV (C-O) und 288,2 eV (O-C=O, N-C=O) im C1s-Spektrum im Vergleich mit der stöchiometrischen Zusammensetzung der Disaccharideinheiten. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte aus 4 Messungen, die angegebenen Fehler ihre Standardabweichung.

| | Stöchiometrisch | I(286,4eV) : I(288,2eV) |
|---------|-----------------|-------------------------|
| AA | 2,0 | 2,24 ± 0,22 |
| AA+TFEA | | 2,61 ± 0,31 |
| HA | 2,25 | 2,43 ± 0,17 |
| HA+TFEA | | 2,73 ± 0,19 |
| CS | 2,25 | 2,49 ± 0,23 |
| CS+TFEA | | 3,02 ± 0,43 |

Die oben diskutierten Spektren zeigten nach der Modifizierungsreaktion mit TFEA keine signifikanten Änderungen, was zunächst als Indiz für die Stabilität der Polysaccharidschichten während der Reaktion zu werten war. Im Fall von CS war diese Tatsache vor allem im S 2s-Spektrum zu erkennen (Abbildung 90), das unverändert blieb. Auch die N 1s-Detailspektren (Abbildung 91 A-C) unterschieden sich nicht deutlich in Intensität und Zusammensetzung. In den C1s-Spektren war ein leichter Anstieg des Anteils der Spezies bei 286,4 eV beobachtbar (Abbildung 91 D-F), der den Aminogruppen-gebundenen Kohlenstoffen im TFEA zuzuordnen war. Das Signal der CF₃-Endgruppe des Modifizierungsreagenz ist typischerweise bei 293 eV zu finden.²⁹⁵ Dieses Signal war jedoch in den Spektren nicht erkennbar.

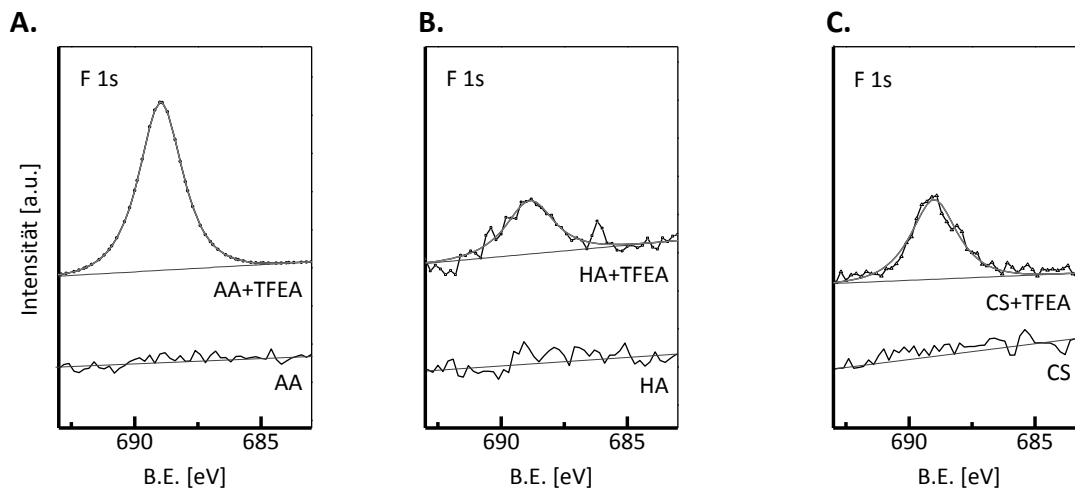


Abbildung 92. Vergleich der XP-Spektren des F1s-Bindungsenergiebereichs der Polysaccharide vor und nach Modifizierung mit TFEA. Alle Spektren wurden auf die zugehörige Intensität der O-C=O-Spezies im C1s Signal normiert. A. Unmodifiziertes und modifiziertes AA. B. Unmodifiziertes und modifiziertes HA. C. Unmodifiziertes und modifiziertes CS.

Eindeutiger war die Analyse der F 1s-Detailspektren (Abbildung 92), die die Anwesenheit von Fluoratomen nach der Kopplungsreaktion für alle drei Polysaccharide zeigte. Da der Wirkungsquerschnitt des Fluors größer ist als der des Kohlenstoffs ($\sigma_{F1s} = 4,27$, $\sigma_{C1s} = 1,0$)²⁴⁶, war ihr geringer Anteil noch nachweisbar, wohingegen die korrespondierende C-Spezies im Spektrum nicht

mehr detektiert werden konnte. Diese beiden Faktoren deuteten auf eine geringe Kopplungseffizienz der Reaktion hin.

Eine Quantifizierung der Ausbeute war durch einen Vergleich der Intensitäten der zur Reaktion fähigen Carboxylgruppen im C1s-Spektrum mit der Intensität des F1s-Signals möglich. Im Fall der Carboxylquantifizierung musste beachtet werden, dass zum korrespondierenden Peak nicht nur die carboxyl-, sondern auch die amidgebundenen und glykosidisch-verbrückenden C-Atome beitragen. Der entsprechende Faktor N musste daher bei der Berechnung der Ausbeute berücksichtigt werden. Die entsprechenden Spezies sind in Abbildung 93 in den Strukturen der PS markiert. Bei AA sind die Hälfte der signalbeitragenden Spezies potentiell reaktiv (grün), bei HA und CS jeweils nur ein Viertel.

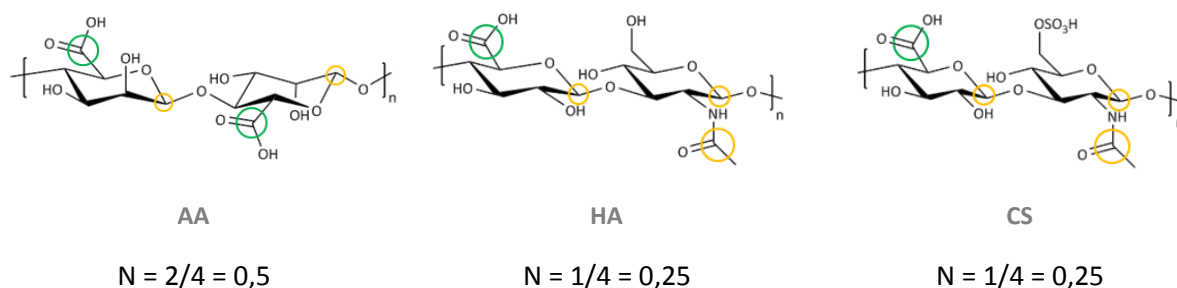


Abbildung 93. Disaccharidstrukturen der verwendeten Polysaccharide mit Kennzeichnung der zur Ausbeuteberechnung beitragenden Kohlenstoffspezies. Grün gekennzeichnet sind Kohlenstoffatome, die bei der Kopplung aktiv sein können, orange solche, die zwar zum Signal beitragen aber keine Kopplungsreaktion eingehen können. Der Faktor N beschreibt den Anteil der peakbeitragenden Spezies, die die Kopplungsreaktion eingehen können.

Das F1s-Signal musste um den Faktor drei korrigiert werden, da jedes Aminmolekül drei F-Atome trägt. Des Weiteren sind die Wirkungsquerschnitte ($\sigma_{F1s} = 4,27$, $\sigma_{C1s} = 1,0$) zu berücksichtigen. Damit ergibt sich für den Anteil der modifizierten Carboxylgruppen:

$$[\%] = \frac{\sigma_{C1s} \cdot I(F1s)}{\sigma_{F1s} \cdot I(C1s_{289eV}) \cdot 3N} \cdot 100. \quad (25)$$

Bei dieser Herangehensweise konnte nicht zwischen an die Oberfläche gebundenen, freien und modifizierten Carboxylen unterschieden werden, sie ermöglichte aber dennoch eine Übersicht über den Anteil des hydrophobenamins im Polysaccharidnetzwerk. Tabelle 16 fasst die Ergebnisse dieser Berechnungen zusammen.

Tabelle 16. Zusammenfassung der mit XP-Spektroskopie nach Gleichung (25) bestimmten Ausbeuten der Kopplungsreaktion für die verschiedenen Polysaccharide. Die gezeigten Werte sind die Mittel aus vier Messungen für AA und HA und drei Messungen für CS, die angegebenen Fehler die Standardabweichungen.

| Polysaccharid | Ausbeute [%] |
|---------------|---------------|
| AA | $7,8 \pm 1,6$ |
| HA | $5,6 \pm 0,5$ |
| CS | $8,9 \pm 1,6$ |

Diese Quantifizierung bestätigte die Vermutung einer geringen Effizienz der Kopplungsreaktion. Am höchsten war sie für CS mit $(8,9 \pm 1,6) \%$, bei AA mit $(7,8 \pm 1,6) \%$ etwas niedriger. Die geringste

Dichte von fluorierten Gruppen zeigte sich bei HA mit $(5,6 \pm 0,5)$ %. Bemerkenswert war an dieser Stelle, dass dennoch in allen Fällen eine deutliche Erhöhung des Kontaktwinkels (siehe Abschnitt 4.2.1.1) zu beobachten war.

Um zu untersuchen, ob die Modifizierung in der gesamten PS-Schicht homogen war, bzw. ob unter den wässrigen Präparationsbedingungen eine eventuelle Umorientierung der hydrophoben Ketten in das Innere des Film stattfand, wurden Messungen bei verschiedenen Kippwinkeln der Proben durchgeführt. In der Standard-Konfiguration der XP-Messungen betrug der Winkel zwischen Probennormalen und Detektor 0° . Da sich bei Verkippung der Probe die Oberflächenempfindlichkeit erhöht, wurden Messungen mit 30° bzw. 45° Kippwinkel durchgeführt. Abbildung 94 verdeutlicht die Messgeometrien.

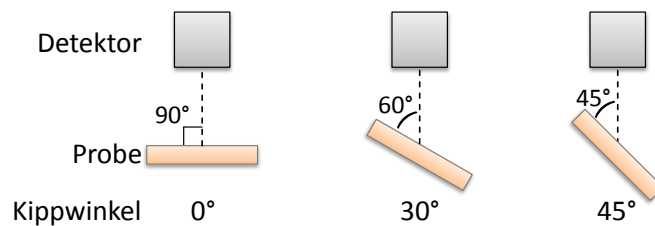


Abbildung 94. Schematische Darstellung der verschiedenen Messgeometrien zur Verdeutlichung der winkelabhängigen XPS-Messungen.

Da, wie erläutert, das Intensitätsverhältnis von Carboxylanteil im C 1s-Signal und F s-Signal ein Maß für die Kopplungsausbeute ist, wurde es auch für diese Untersuchungen herangezogen (Abbildung 95).

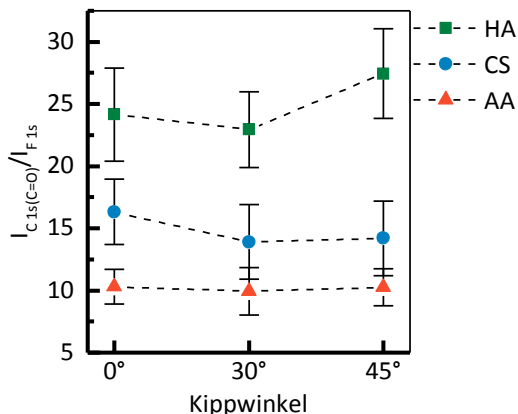


Abbildung 95. Verhältnis der C 1s(C=O)- zu den F 1s-Intensitäten in Abhängigkeit von der Messgeometrie. Für AA- und HA-Derivate repräsentieren die Werte den Mittelwert aus zwei Messungen und deren Standardabweichung, ebenso für CS+TFEA bei 0° -Verkippung. Für CS+TFEA unter 30° - und 45° -Verkippung wurde der Fehler einer Messung abgeschätzt.

Die unterschiedlichen Bereiche, in denen die erhaltenen Werte lagen, waren auf die erhöhte Anzahl vom beitragenden Gruppen (bei AA) und auf die höhere Effizienz der Derivatisierungsreaktion (für CS) zurückzuführen. Die relative Intensität der Signale änderte sich für keines der untersuchten PS signifikant. Nur für HA war für die 45° -Messgeometrie, die die höchste Oberflächenempfindlichkeit bot, eine Erhöhung sichtbar, was eine Anreicherung der Fluorgruppen im oberen Bereich des Films andeutete. Allerdings lag diese im Rahmen der Messfehler.

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse die gleichmäßige Verteilung der modifizierten Carboxylgruppen und somit die homogene Derivatisierung im gesamten Film.

4.2.2 Ca²⁺-Komplexierung aus marinem Medium

Die zugrundeliegende Hypothese zur Modifizierung der freien Carboxylgruppen der immobilisierten Polysaccharide in dieser Arbeit war, dass auf diese Weise die Komplexbildung zweiwertiger Kationen aus marinem Medium verhindert oder reduziert werden kann. Um zu überprüfen, wie erfolgreich dieser Ansatz war, wurden mit Polysacchariden beschichtete Oberflächen in unmodifizierter und mit TFEA-modifizierter Form für 24 h in künstlichem Meerwasser (SW) inkubiert und anschließend XP-spektroskopisch untersucht. Von den im Medium vorhandenen Ionen (Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺) eignete sich das Ca 2p-Orbital aufgrund eines genügend großen Wirkungsquerschnitts ($\sigma_{\text{Ca } 2p} = 5,66$) und einer geeigneten Bindungsenergie (356 eV) am besten, um in diesem Zusammenhang untersucht zu werden. Abbildung 96 zeigt die Ca 2p-Detailspektren der Beschichtungen sowohl vor als auch nach der Inkubation. Die Signale wurden auf die Intensität des korrespondierenden C 1s_{289eV}-Signals normiert, um bei Schwankungen der Schichtdicken die Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Sowohl bei den unmodifizierten PS (Abbildung 96) als auch bei den modifizierten Derivaten (zur besseren Übersichtlichkeit nicht gezeigt) war vor der Behandlung mit SW kein Ca 2p-Signal nachweisbar. Die Signale, die nach der Inkubation im AA und HA-Spektrum sichtbar waren, konnten somit eindeutig auf komplexierte Ionen aus dem Medium zurückgeführt werden. Für AA und HA ließ sich ein Ca 2p-Dublett mit einem Peakabstand von 3,5 eV anpassen, dessen Intensität bei AA höher war. Im CS-Spektrum dagegen war ein solches Signal nicht mehr erkennbar. Die unterschiedlichen Intensitäten zeigten ein variierendes Komplexbildungsvermögen der verschiedenen Polysaccharidstrukturen, wobei dieses bei AA am stärksten ausgeprägt war. Dieser Befund steht im Einklang mit dem sog. „egg-box“-Modell (engl. Eierkarton), nach dem die AA-Disaccharideinheiten die ideale Geometrie haben, um Ca²⁺-Ionen zu komplexieren.²⁰²

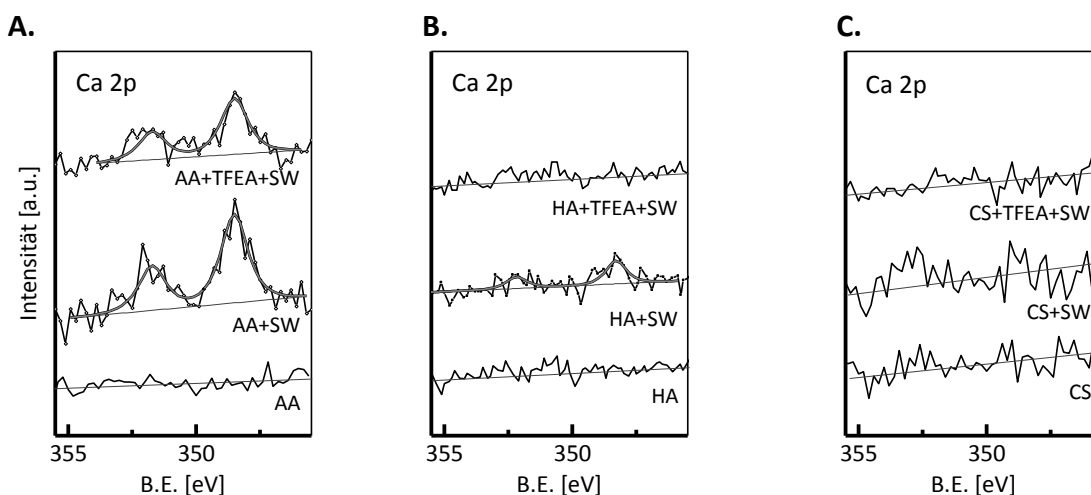


Abbildung 96. Vergleich der XP-Detailspektren des Ca 2p-Bindungsenergiebereichs vor und nach 24-stündiger Inkubation in SW. Alle Spektren wurden auf die Intensität des korrespondierenden C 1s_{289eV}-Signals normiert. A. AA vor und nach (+SW) Inkubation, AA+TFEA nach (+SW) Inkubation, B. HA vor und nach (+SW) Inkubation, HA+TFEA nach (+SW) Inkubation C. CS vor und nach (+SW) Inkubation, CS+TFEA nach (+SW) Inkubation.

Nach der Modifizierung war die Intensität der Ca 2p-Signale für AA als auch HA reduziert. Im Fall von HA ließ sich kein Signal mehr nachweisen, was einer nahezu 100-prozentigen Unterdrückung der Komplexbildungsfähigkeit entspricht. Für AA ergab sich beim Vergleich der Intensitäten vor und nach

Inkubation in SW eine Reduzierung der Ca^{2+} -Konzentration im Film um $(38 \pm 4) \%$. Eine vollständige Verhinderung der Interaktion der Carboxylgruppen mit den Ionen im Medium war nicht zu erwarten, da die Analyse der Kopplungseffizienz schon zeigte, dass noch freie Komplexbildner vorhanden waren. Dennoch bewirkte die durch die Derivatisierung erreichte veränderte Geometrie der Disaccharideinheiten sowohl für AA als auch bei HA offensichtlich eine Behinderung der idealen Komplexierungskonfiguration.

4.2.3 Stabilität der Polysaccharidfilme unter marinen Bedingungen

Zur Stabilitätsprüfung der Polysaccharid-Filme wurden Langzeitstudien in Salzwasser (SW) durchgeführt, dessen Zusammensetzung der ionischen Komponenten der von Meerwasser entsprach.²⁴³ Dies war besonders in Hinblick auf die bis zu zwei Wochen andauernden biologischen Evaluierungen wichtig, um die Qualität der Proben über einen längeren Zeitraum sicher gewährleisten zu können. Hierfür wurden die Oberflächen bis zu zwölf Tage in SW inkubiert und die Schichtdicke vor- und nach der Inkubation mittels spektraler Ellipsometrie bestimmt. Es wurde SW ohne den Zusatz von organischem Material verwendet, um selektiv den Effekt der Salinität zu untersuchen. In kommerziell erhältlichem künstlichem Meerwasser (ASW) sind zusätzlich zu den mineralischen auch organische Komponenten wie Proteine enthalten, die sich auf den Oberflächen abscheiden können und somit die zu beobachteten Effekte verfälschen würden.⁵⁷ Zur besseren Vergleichbarkeit wurde jeweils auf den Anfangswert der Schichtdicken bei $t=0$ normiert. Abbildung 97 A fasst den Verlauf der relativen Schichtdicken der einzelnen Beschichtungen über die untersuchte Zeitspanne zusammen. Über den gesamten Beobachtungszeitraum war der Verlauf der Schichtdicken für alle untersuchten Oberflächen gleichmäßig, wobei ein Abfall um maximal 20 % auftrat. Eine Ausnahme bildete CS+TFEA, das zu diesem Zeitpunkt nur noch eine Filmdicke von 60 % aufwies.

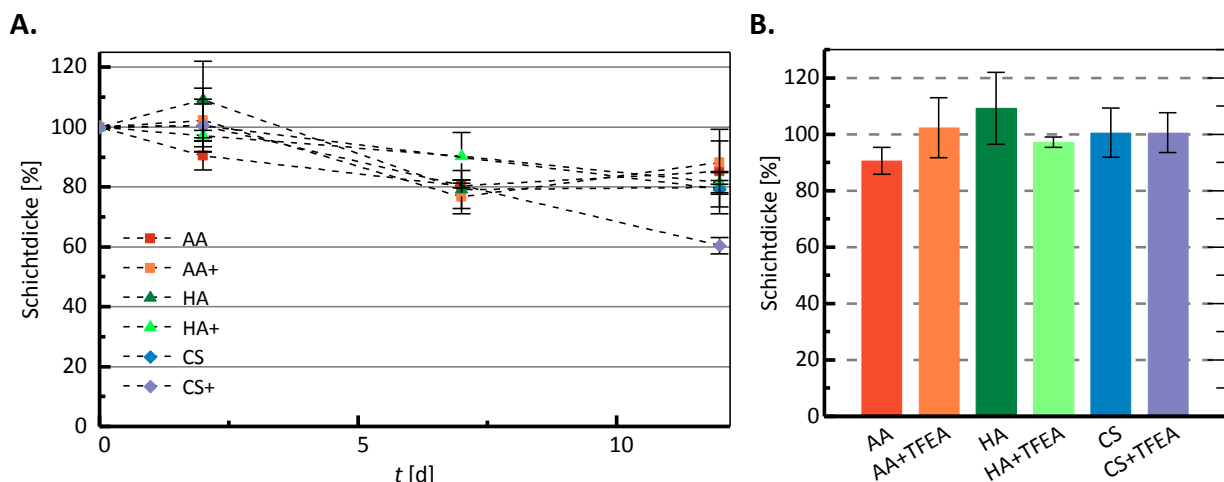


Abbildung 97. A. Entwicklung der relativen Schichtdicken der Polysaccharid-Beschichtungen nach Inkubation in SW über 12 Tage. B. Zurückbleibende Schichtdicken der PS-Filme nach zwei Tagen Inkubation in SW. Alle Werte wurden auf die jeweilige Anfangsschichtdicke bei $t = 0$ normiert.

Die meisten der biologischen Experimente waren aber im „stabilen“ Anfangszeitraum angesiedelt: Die Evaluierung der einzelnen Spezies in Laboruntersuchungen dauerte maximal vier Stunden, der Feldtest in Florida 24 h. Lediglich die Felduntersuchungen in Singapur überschritten mit einer Dauer

von zwei Wochen den demonstrierten Stabilitätsbereich. In Abbildung 97 B sind daher die Ergebnisse nach zwei Tagen nochmals heraus gestellt. Die Graphik verdeutlicht, dass der Schichtdickenabbau für diesen Beobachtungspunkt maximal 10 % betrug.

4.2.4 Wechselwirkung der Polysaccharid-Oberflächen mit biologischen Systemen

Um die *Biofouling*-Resistenz der Matrix von sechs PS-Oberflächen (AA, HA, CS, jeweils unmodifiziert und modifiziert) zu bestimmen, wurden Proteinadsorptionsexperimente und Untersuchungen zum Resistenz- und Adhäsionsverhalten gegenüber repräsentativen marinen Spezies durchgeführt. Abschließend wurden die Oberflächen in Feldversuchen unter realen marinen Bedingungen getestet.

4.2.4.1 Proteinadsorption

Die Adsorption von Proteinen auf einer Oberfläche lässt erste Rückschlüsse über ihre Resistenzeigenschaften zu. Die Makromoleküle sind im realen Umfeld, beispielsweise beim Kontakt mit Meerwasser, unter den ersten Substanzen, die sich auf einer Oberfläche anlagern und zum Konditionierungsfilm beitragen.⁵⁷ Auch die Haftmittel vieler relevanter Spezies, wie *Ulva* Sporen, Diatomeen und Seepockenlarven, enthalten Proteine.^{33-35,38} Eine verhinderte oder verminderte Adsorptionsfähigkeit dieser Klebstoffe kann dementsprechend auch Auswirkungen auf die Adhäsion der betroffenen Organismen haben. Die Resistenz der unmodifizierten PS wurde schon in vorangegangenen Arbeiten demonstriert.^{26,296} Es stellte sich daher an dieser Stelle die Frage, ob diese Inertheit auch nach der Derivatisierung mit TFEA noch vorhanden war. Die auf Si-Wafern präparierten PS-Oberflächen wurden aus diesem Grund auf ihre Resistenz gegenüber einer Reihe von Proteinen mit unterschiedlicher Größe und Ladung getestet. Als Referenz diente jeweils ein hydrophober Dodecanthiol-SAM (DDT), der über keine Proteinresistenz verfügt. Die Oberflächen wurden in einer Lösung des Proteins in PBS bei einem pH-Wert von 7,4 inkubiert. Im Anschluss wurde die Veränderung der Schichtdicke ellipsometrisch bestimmt. Abbildung 98 fasst diese zusammen, außerdem sind sowohl die Ladung der Makromoleküle unter den experimentellen Bedingungen als auch ihr Molekulargewicht angegeben. Die Größe der Proteine spiegelte sich in den Dicken der Schicht wider, die auf der SAM-Referenz adhärierte. Die beiden „großen“ Proteine Fibrinogen und Pyruvatkinase (PK) bildeten dickere Schichten als die „kleinen“ Proteine Albumin (BSA, bovines Serum-Albumin), Pepsin und Lysozym.

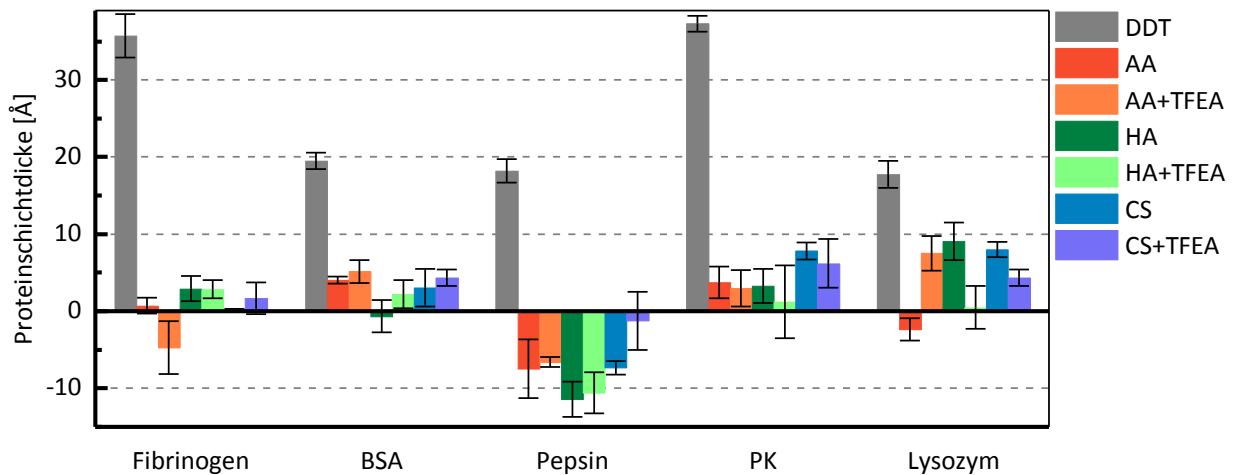


Abbildung 98. Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken von adsorbierten Proteinen auf PS-Oberflächen. Gezeigt sind die Mittelwerte jeweils eines repräsentativen Experiments, bei dem je drei Stellen pro Probe evaluiert wurden. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Als Referenz diente immer ein nicht-resistenter DDT-SAM, außerdem ist die Ladung der Proteine in PBS bei pH 7,4 und ihr Molekulargewicht angegeben.

Die Adsorption des als „klebrig“ betrachteten negativ geladenen Fibrinogens¹²⁰ war auf allen PS-Oberflächen im Vergleich zur nicht-resistenten Referenz um mindestens 92 % reduziert. Im Vergleich zu den unmodifizierten Derivaten war sie auf den modifizierten Oberflächen nicht signifikant verändert. Ein ähnliches Bild ergab sich für das Adsorptionsverhalten von BSA, das wie Fibrinogen negativ geladen war. Die Adsorption war reduziert und auch hier waren die Unterschiede sowohl zwischen den einzelnen PS als auch zwischen modifizierter und unmodifizierter Form nicht ausgeprägt. Die einzige Ausnahme bildete HA, dessen Schichtdicke nach Inkubation in der BSA-Lösung leicht abnahm. Pepsin, das dritte negativ geladene Protein, zeigte ein offensichtlich anderes Adsorptionsmuster. Alle PS-Schichten nahmen nach Inkubation in der Lösung des Verdauungsenzyms ab.²⁹⁷ Die naheliegende Vermutung, dass dieses Protein die Zuckerschichten aktiv abbauen könnte, steht allerdings im Widerspruch zur Deaktivierung der Proteinaktivität im neutralen pH-Bereich des verwendeten Puffersystems.²⁹⁸

Auch im Fall der beiden positiv geladenen Testproteine wurde die Proteinadsorption im Vergleich zur Referenz reduziert. Bei der großen Pyruvatkinase war diese Tendenz deutlicher (um mindestens 79 % und bis zu 97 % im Vergleich zu DDT). Die adhärierte Schichtdicke war hier auf CS ausgeprägter als bei den beiden anderen PS. Im Vergleich zu den anderen Proteinen war die Lysozymadsorption mit (49 - 97) % am wenigsten reduziert. Allerdings war sowohl bei den HA- als auch bei den CS-Derivaten eine Abnahme der Proteinschichtdicke nach der Modifizierung zu erkennen. Die erhöhte Adsorption von Lysozym wurde schon früher beobachtet und auf einen veränderten Adsorptionsmechanismus zurückgeführt, der durch die entgegengesetzten Ladungen und eine optimale Größe des Proteins für eventuelle Bindungstaschen bewirkt wird.²⁶

Ein anderes Adsorptionsmuster wurde von Fyrner *et al.* auf monosaccharid-modifizierten SAMs beobachtet:¹⁰³ Fibrinogen adhärierte von allen getesteten Proteinen am stärksten, während keine Adsorption von BSA, Pepsin und Lysozym beobachtet wurde. Allerdings wurden Saccharide ohne Carboxylgruppen, also ohne Ladungsträger verwendet, was die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse auf elektrostatische Faktoren zurückführen lässt.

Zusammenfassend lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass die präparierten Oberflächen eine hohe Resistenz gegenüber Proteinen mit einer Reihe verschiedener Größen und Ladungen zeigten. Die Modifizierungsreaktion verminderte diese vielversprechende Eigenschaft nicht.

4.2.4.2 Adhäsionsverhalten von *Cobetia marina*

Cobetia marina dient häufig als Modellorganismus für das Adhäsionsverhalten mariner Bakterien. Sie gehören zu den im *Biofouling*-Prozess schnell siedelnden, biofilmbildenden Spezies. Um das Adhäsionsverhalten des Bakteriums zu untersuchen, wurden von DR. M.P. ARPA SANCET mikrofluidische Scherkräftexperimente durchgeführt. Die Bakterien wurden dafür für zwei Stunden statisch in den mikrofluidischen Kanälen inkubiert. Eine gleichmäßig ansteigende Scherströmung löste anschließend die Bakterien von der Oberfläche, was videomikroskopisch verfolgt wurde (siehe auch Abschnitt 3.4.3).

EINFLUSS DES HYDRATATIONSZUSTANDES DER OBERFLÄCHEN

Da die untersuchten Oberflächen durch die Natur der verwendeten Polymere Hydrogel-Eigenschaften hatten, lag die Vermutung nahe, dass der Hydratationsgrad einen Einfluss auf die potentielle Speziesantwort hatte. Wie in Abschnitt 2.3.2 gezeigt, spielt die Hydratation einer Oberfläche eine wichtige Rolle für ihre Resistenzeigenschaften, daher bedeutet ein höherer Hydratisierungsgrad auch häufig eine erhöhte Resistenz.²² Die Lagerungsbedingungen könnten daher einen Einfluss auf die Eigenschaften der präparierten Filme haben. Die Haftstärken von *C. marina* wurden daher auf getrocknete Filme (unter Ar aufbewahrt) mit auf in Wasser gelagerten verglichen. Abbildung 99 zeigt im Vergleich die τ_{50} -Werte von HA und modifiziertem HA für die verschiedenen Filmzustände. Für beide war die Stärke der Bakterienadhäsion, repräsentiert durch die kritische Scherspannung τ_{50} , nach der Modifikation reduziert.

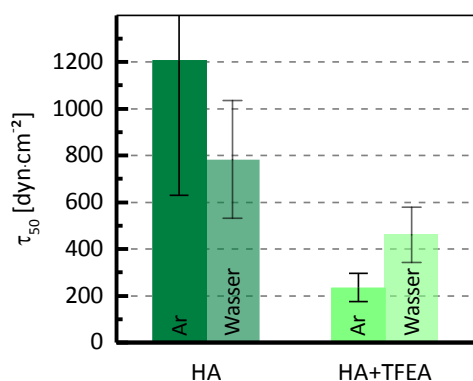


Abbildung 99. Vergleich der Auswirkung verschiedener Lagerungsbedingungen auf die kritische Scherspannung τ_{50} von HA und HA+TFEA. Die beschichteten Oberflächen wurden unter Ar oder MilliQ®-Wasser aufbewahrt. Jeder Wert zeigt den Mittelwert aus 4 Messungen, Fehlerbalken zeigen den SEM (n = 4).

Die Mittelwerte aus den vier durchgeführten Messungen nahmen für das unmodifizierte HA bei Wasserlagerung und somit stärkerer Hydratisierung ab. Für die modifizierte HA-Form ließ sich jedoch die umgekehrte Tendenz beobachten. An dieser Stelle muss auf die hohe Streuung der Messwerte hingewiesen werden. Dieses der Arbeit mit lebendigen Systemen inhärente Problem wurde schon von Dr. Arpa Sancet in ihrer Dissertation dargelegt.²⁹⁹ Die für die beiden HA-Oberflächen erhaltenen Mittelwerte waren daher nicht signifikant unterschiedlich, auch die Streuung der für HA+TFEA ermittelten

kritischen Scherspannungen war sehr groß (Wasser-gelagert: (190 - 1910) dyn·cm⁻², Ar gelagert: (170 - 580) dyn·cm⁻²). Abschließend ließ sich damit keine klare Aussage treffen, wie stark der Einfluss der untersuchten Lagerungsbedingungen auf das Adhäsionsverhalten der Bakterien war. Im

Folgenden wurden die Polysaccharide daher in zwei getrennten Gruppen untersucht, in Wasser- und Ar- gelagert. Ein direkter Vergleich der Messwerte war so zwar erschwert, aber wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt blieben die Tendenzen zwischen den Oberflächen unverändert.

EINFLUSS VON POLYSACCHARID UND MODIFIZIERUNG

Abbildung 100 A (in Wasser gelagert) und C (unter Ar gelagert) zeigen den Anteil der initial adhärenen Bakterien $N_{ad}N_0^{-1}$ auf den Polysaccharid-Oberflächen im Vergleich zu einer Glasreferenz. Nach einer schwachen Scherspannung von $\sim 0,01 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$ blieben $\sim 80\%$ der Organismen haften, alle sichtbaren Schwankungen waren im Bereich des Fehlers und statistisch nicht signifikant (ANOVA, $p > 0,05$). Bei der initialen Adhäsion zeigten die Bakterien keine Diskriminierung zwischen den verschiedenen Beschichtungen, was mit früheren Beobachtungen übereinstimmt.³⁰⁰

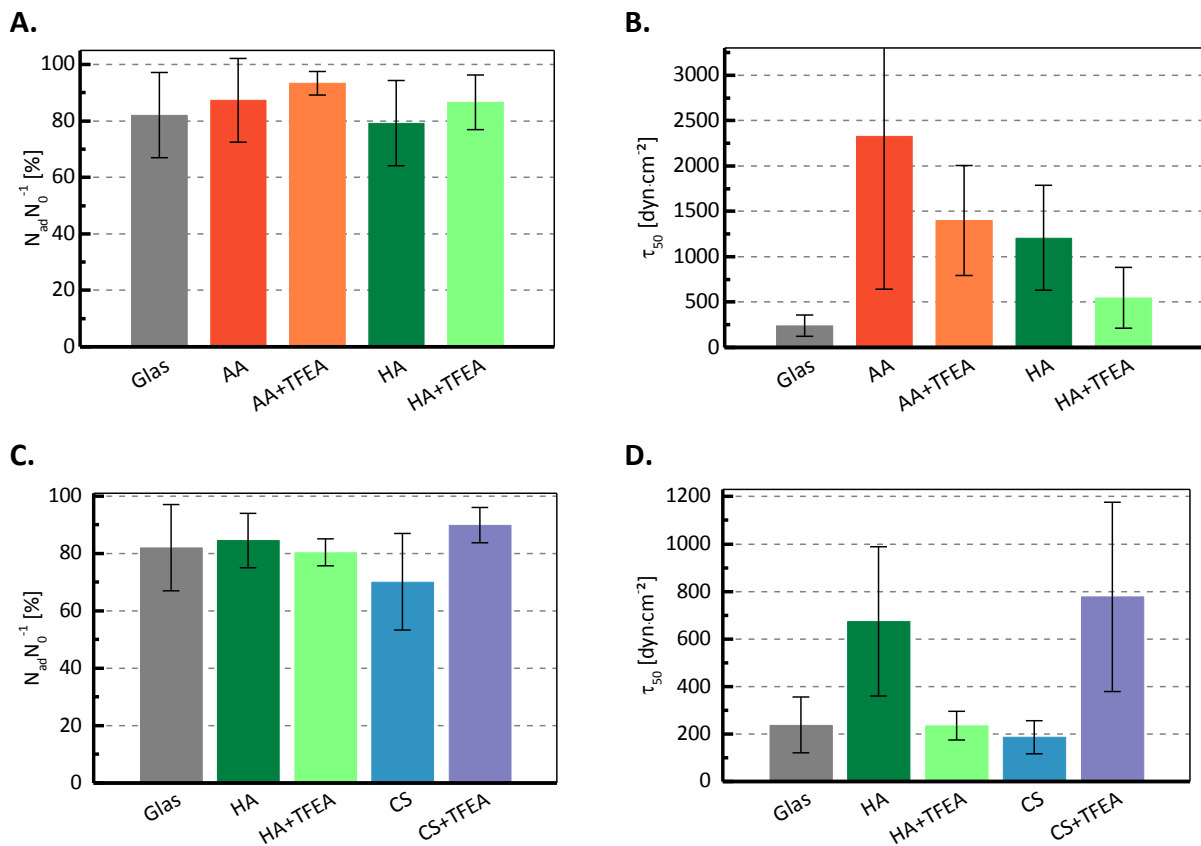


Abbildung 100. Mikrofluidische Abrissexperimente mit *C. marina* auf polysaccharidbeschichteten Oberflächen. A. und C. Anteil der initial sichtbaren Bakterien $N_{ad}N_0^{-1}$, die nach dem Erreichen einer schwachen Scherspannung von $\sim 0,01 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$ adhären blieben. B. und D. Kritische Scherspannung τ_{50} , nach der die Hälfte der initial adhärenen Zellen von der Oberfläche abgerissen wurden. Jeder Wert zeigt den Mittelwert aus vier Messungen. Die Fehlerbalken zeigen den SEM ($n = 4$). Für A. und B. wurden die Oberflächen in Wasser gelagert, für C. und D. unter Ar.

Beim Vergleich der kritischen Scherspannungen auf den verschiedenen unmodifizierten Polysacchariden waren dagegen Unterschiede erkennbar. Im Mittel war sie auf AA am größten und auf CS am kleinsten (Abbildung 101 B und D). Die Modifizierung verringerte die Haftstärke für AA und HA, während für CS der gegenteilige Effekt beobachtet wurde. Aufgrund der im vorangegangenen Abschnitt schon diskutierten großen Schwankungen stellten sich allerdings alle Unterschiede als statistisch nicht signifikant heraus (ANOVA, $p > 0,05$).

In früheren statischen Untersuchungen zeigten die Bakterien generell eine Präferenz für hydrophobe Oberflächen,¹⁷ was sich auch bei den kritischen Scherspannungen in analogen mikrofluidischen Experimenten auf SAMs zeigte.³⁰⁰ Auf dem hydrophoben DDT, was schon im vorangegangenen Proteinadsorptionsexperiment als nicht-proteinresistente Referenz herangezogen wurde, lagen beispielsweise die τ_{50} -Werte im Bereich von (2900 - 5400) dyn·cm⁻². Die für die PS-Oberflächen ermittelten Werte waren deutlich niedriger, was mit ihrer hohen Hydrophilie im Einklang steht. Auch die Hydratation einer Beschichtung wurde als Einflussparameter bei der Adhäsion der Bakterien demonstriert.³⁰¹⁻³⁰² Mit steigendem Hydratationsgrad nahm die Tendenz zur Biofilmbildung und das Haftvermögen ab. Auf hydratisierten PEG-SAMs adhärten die Bakterien dementsprechend sehr schwach (τ_{50} (45 - 200) dyn·cm⁻²).³⁰⁰ Für modifiziertes HA und CS war die Adhäsion vergleichbar schwach.

4.2.4.3 Adhäsionsverhalten von *Navicula perminuta*

Auch die Kieselalge *Navicula perminuta* ist ein Modellorganismus der *Biofouling*-Forschung. Sie repräsentiert *Mikrofouler*, die passiv zu ihrem Adhäsionsort gelangen. Messungen der kritischen Scherspannungen mit diesem Einzeller wurden analog zu denen mit *C. marina* von DR. M. ALLES auf den AA- und HA-Derivaten durchgeführt. Abbildung 101 fasst die Ergebnisse aus vier Messreihen pro Oberfläche zusammen.

Die adhärenen Zellanteile $N_{ad}N_0^{-1}$ zeigten keine signifikanten Unterschiede (ANOVA, $p > 0,5$), was aufgrund des passiven Erreichens der Oberfläche typisch für den untersuchten Organismus ist.⁷⁶ Der Vergleich der kritischen Scherspannungen τ_{50} zeigt eine verminderte Haftstärke der Diatomeen auf AA im Vergleich zu HA, allerdings ist auch dieser Unterschied statistisch nicht signifikant (ANOVA, $p > 0,5$). Eine schwächere Haftung auf AA wurde auch schon in früheren Studien beobachtet.²⁸⁵ Die Modifizierung der beiden PS zeigte keinen beobachtbaren Einfluss auf die hier untersuchten Adhäsionsparameter.

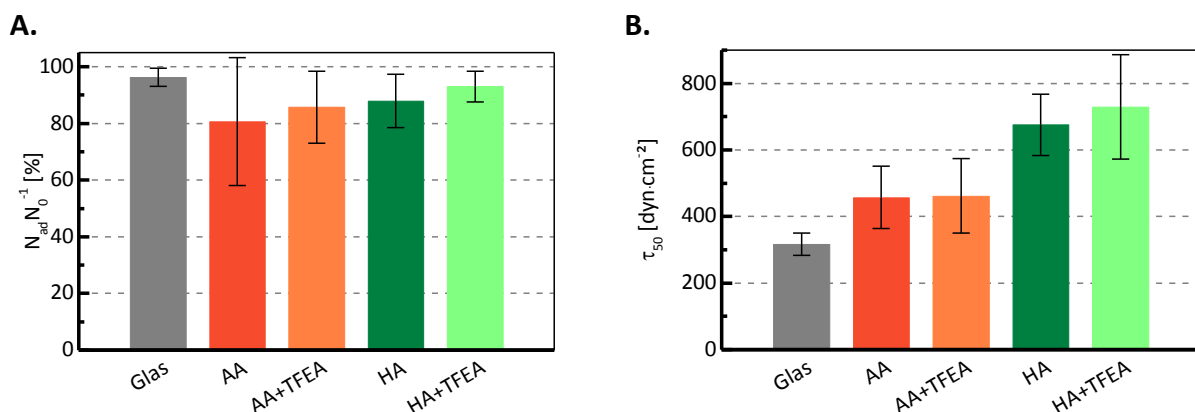


Abbildung 101. Mikrofluidische Abrissexperimente mit *N. perminuta* auf polysaccharidbeschichteten Oberflächen. A. Anteil der initial sichtbaren Zellen $N_{ad}N_0^{-1}$, die nach dem Erreichen einer schwachen Scherspannung von $\sim 0,01$ dyn·cm⁻² adhärent blieben. B. Kritische Scherspannung τ_{50} , nach der die Hälfte der initial adhärenen Zellen von der Oberfläche abgerissen wurden. Jeder Wert zeigt den Mittelwert aus vier Messungen. Die Fehlerbalken zeigen den SEM (n = 4).

In vorangegangenen Scherspannungsmessungen auf SAMs mit variierender Benetzbarkeit zeigten die Kieselalgen eine zunehmend stärkere Adhäsion mit Zunahme des Kontaktwinkels. Für hydrophobes

DDT wurden τ_{50} -Werte von (1150 - 1690) dyn·cm⁻², für das hydrophile HUDT Werte von (200 - 340) dyn·cm⁻² gemessen.⁷⁶ Die Adhäsion der Kieselalgen auf den PS-Oberflächen lag zwischen diesen beiden Extremen, obwohl die Benetzbarkeit aller Testoberflächen höher war als bei HUDT. Im Vergleich zu hydratisierten SAMs (PEG: τ_{50} (4 - 8) dyn·cm⁻²), auf dem die Algen praktisch nicht hafteten, war die Adhäsion erheblich stärker.

4.2.4.4 Adhäsionsverhalten von *Ulva linza*-Zoosporen

Die Grünalge *Ulva linza* ist ein kosmopolitischer Organismus, der als Modell- und Referenzsystem für die Resistenz von Oberflächenbeschichtungen dient. Das im Kontext des Besiedlungsverhaltens relevante Stadium im Lebenszyklus der Alge ist das der Zoospore. Diese Zellen verfügen über vier Flagellen, was sie zu aktiven Schwimmern macht. Bei der Wahl eines permanenten Adhäsionsortes zur Weiterentwicklung in die erwachsene Pflanze zeigen sie dadurch ein ausgeprägtes Diskriminierungsverhalten.

Experimente mit Zoosporen wurden in Birmingham an der *School of Biosciences* von DR. J. A. FINLAY durchgeführt. Die beschichteten Oberflächen wurden dafür zunächst für 45 min in der Sporensuspension inkubiert. Nach vorsichtigem Abspülen der nicht adhärenen Sporen wurde die Dichte der Organismen auf den Oberflächen quantifiziert. Die Ergebnisse dieser Zählungen sind in den linken Balken in Abbildung 102 A gezeigt.

Die initiale Besiedlungsdichte war auf HA-Oberflächen im Vergleich der drei PS am niedrigsten, gegenüber AA und CS war sie um ~ 85 % reduziert. Die Anzahl von adhärenen Sporen auf AA lag im Bereich der Glasreferenz, die auf CS darunter. Nach der Modifizierung war die Sporendichte auf AA um ~ 25 % reduziert, während sie auf HA im gleichen Bereich lag und auf CS um ~ 7 % zunahm.

Ein Teil der Oberflächen wurde nach dem ersten Abspülen einem turbulenten Fluss von 52 Pa ausgesetzt. Die Dichte der zurückbleibenden Sporen ist ebenfalls in Abbildung 102 A in den rechten Balken dargestellt. Der prozentuale Anteil an Zellen, die nach dem Flusskanal noch adhären waren, gibt Aufschluss über das Adhäsionsvermögen der Organismen (Abbildung 102 B). Je größer dieser Parameter, desto stärker war auch ihre Haftung. Der prozentuale Anteil an noch-adhärenen Sporen nach dem turbulenten Flusskanal war auf HA mit (31 ± 5) % am niedrigsten. Auf AA und CS nahm die Sporendichte nur wenig ab. Die Modifizierung zeigte einen positiven, also adhäsionsschwächenden, Effekt auf AA, der Anteil der verbleibenden Zellen sank um 11 %. Auf dem CS-Derivat wurde keine Veränderung beobachtet und auf HA nahm der Anteil um 36 % zu.

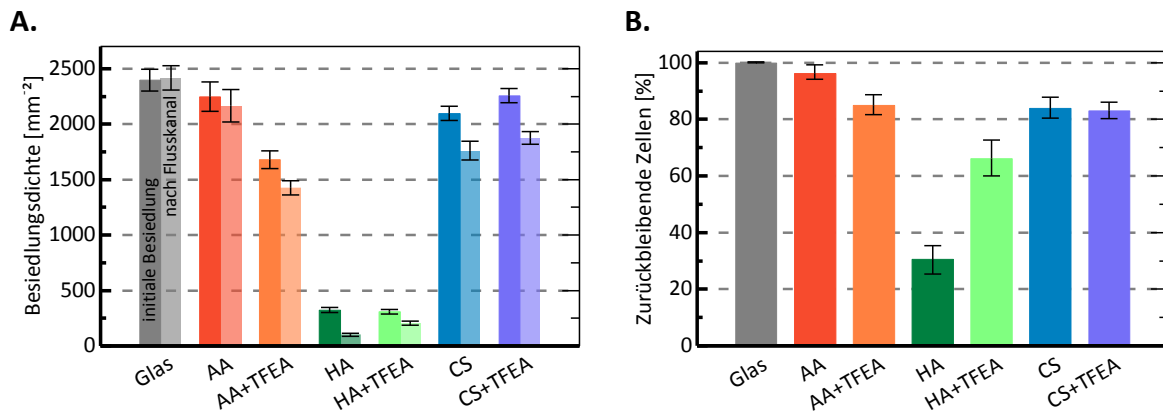


Abbildung 102. Zusammengefasste Ergebnisse der Besiedlungs- und Abrissexperimente mit *U. linza* auf polysaccharidbeschichteten Oberflächen. A. Besiedlungsdichte der Algenzellen nach 45 min vor und nach der Anwendung eines turbulenten Flusses von 52 Pa. B. Prozentualer Anteil von verbleibenden Algenzellen nach der Anwendung eines turbulenten Flusses von 52 Pa. Die gezeigten Werte sind das Ergebnis der Evaluierung von jeweils 30 FOVs auf drei Replikaten. Die Fehlerbalken zeigen das 95 %-Konfidenzintervall.

Die gleichzeitige niedrige Besiedlungsdichte gemeinsam mit der verminderten Stärke der Adhäsion auf HA ist für *U. linza* ungewöhnlich, häufig ist bei einer geringen Tendenz zur Besiedlung die Adhäsion stärker ausgeprägt.¹⁶

An dieser Stelle ist es wichtig anzumerken, dass die Aussagen zum Abreißen der Sporen bei einer geringen Besiedlungsdichte nicht so aussagekräftig sind, wie bei attraktiven Oberflächen.

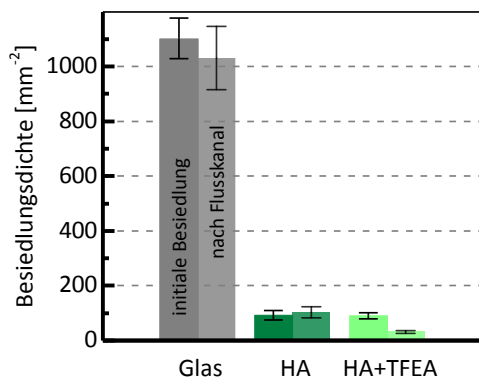


Abbildung 103. Ergebnisse eines weiteren Besiedlungs- und Abrissexperimentes mit *U. linza*.

Deutlich wird dieses Problem beim Vergleich der in Abbildung 102 gezeigten Daten mit einem weiteren Experiment (Abbildung 103). Das Verhältnis der Besiedlungsdichten der beiden HA-Derivate untereinander und im Vergleich zur Glas-Kontrolle ist bei beiden identisch. Das der verbleibenden Zellen jedoch ist umgekehrt. Auf HA wurden durch den Fluss nahezu keine Sporen entfernt, während die Abnahme bei HA+TFEA deutlich ist. Die Ergebnisse der beiden Experimente widersprechen sich, so dass zu diesem Parameter kein abschließender Schluss gezogen werden kann.

Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass die Sporen empfindlich auf die genaue PS-Struktur reagierten. Ein solches Verhalten wurde bereits auf PS-SAM basierenden Studien gezeigt, bei denen schon Unterschiede in der genauen Konfiguration einer einzigen Saccharid-Einheit signifikante Unterschiede hervor riefen.¹⁰³

4.2.4.5 Besiedlungs- und Explorationsverhalten von *Balanus amphitrite*

Auch die Seepockenspezies *Balanus amphitrite* wird als Modellorganismus in der *Biofouling*-Forschung eingesetzt, sie ist repräsentativ für die Gruppe der „harten“ *Fouler*. Ähnlich wie die Grünalge *U. linza* verfügen die Seepocken über ein frühes Stadium im Lebenszyklus, das durch seine Motilität und die Fähigkeit zur aktiven Exploration von potentiellen Siedlungsplätzen den Vergleich

von Oberflächeneigenschaften erlaubt. Diese sog. Cyprislarven verfügen über komplexe Schwimm- und Sensororgane, was ihnen in der Nähe einer Oberfläche ein aktives Erkundungsverhalten ermöglicht.⁶⁴⁻⁶⁵ Neben der reinen Quantifizierung der Besiedlung kann dieses Rückschlüsse auf die inerten Eigenschaften einer Testoberfläche zulassen. Neben dem Standard- Besiedlungsexperiment, das den prozentualen Anteil von gesiedelten Larven quantifiziert, wurden mit dieser Spezies zusätzlich Untersuchungen zu ihrem Bewegungsverhalten auf den PS-Oberflächen durchgeführt. Die Experimente wurden in Kooperation mit der *School of Marine Science and Technology* (Universität Newcastle, UK) von DR. N. ALDRED durchgeführt. Die stereoskopisch aufgenommenen Daten wurden von S. MALESCHLIJSKI ausgewertet.

4.2.4.5.1 Besiedlungs-Experimente

Bei der Standard-Ausführung des Experiments zum Besiedlungsverhalten der Cyprislarven werden Glasobjektträger verwendet. Dafür werden Wassertropfen, die eine bestimmte Anzahl der Organismen enthalten, auf die Oberfläche gebracht. Durch die hohe Hydrophilie der untersuchten Beschichtungen wurde aber die Durchführung dieses Experiments schwierig und fehleranfällig. Die Tropfen waren auf den hydrophilen Testsubstraten extrem flach, was ein freies Schwimm- und Explorationsverhalten verhinderte. Außerdem bestand dadurch eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, dass die Larven in der Grenzfläche zwischen Tropfen und Umgebungsluft gefangen wurden und somit nicht mehr in die Statistik mit einfließen konnten. Daher wurden für die Untersuchung des Besiedlungsverhaltens Glas-Zylinder beschichtet, die ein Befüllen mit größeren Flüssigkeitsvolumina erlaubten und damit die beschriebene Problematik umgingen. Von jeder Beschichtung wurden jeweils sechs Replikate getestet, die jeweils ~ 20 Cyprislarven enthielten. Nach 24 h und 48 h wurde der Anteil der adhärenenten und der noch frei schwimmenden Organismen bestimmt (Abbildung 104). Als Standard wurden unbeschichtete Glasproben verwendet, die für die Larven ein unattraktives Substrat darstellten.

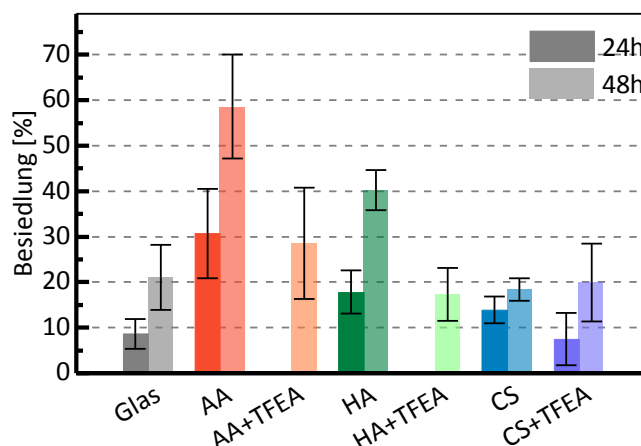


Abbildung 104. Besiedlung der PS-Oberflächen durch *B. amphitrite*-Cyprislarven nach 24 h (Balken links) und 48 h (Balken rechts). Die gezeigten Daten sind das Ergebnis von Evaluierungen auf sechs Replikaten je Oberflächenbeschichtung. Die Fehlerbalken zeigen den SEM ($n = 6$).

Generell stimmten die Trends nach 24 h und 48 h überein. Nach 24 h konnten auf den modifizierten Derivaten von HA und AA keine adhärenenten Larven beobachtet werden. Die höchste Tendenz zur Besiedlung wurde jeweils auf AA festgestellt, auf HA und CS war der Anteil an gesiedelter

Organismen niedriger. Die Modifizierung hatte wiederum auf HA und AA den Effekt einer verminderten Besiedlung, auf CS dagegen war kein Unterschied feststellbar.

Die dokumentierten Oberflächenpräferenzen von Cyprislarven variieren je nach Art der Experimentausführung in der Literatur. In einer systematischen Studie auf SAMs konnte jedoch gezeigt werden, dass sie tendenziell wenig von der Oberflächenenergie und stark von vorhandenen Ladungsträgern beeinflusst werden. Negative Ladungen stimulierten dabei die Besiedlung am stärksten.¹³⁰ Die Modifizierung reduziert die Ladungsträgerdichte der PS-Filme, da derivatisierte Carboxylgruppen nicht mehr deprotoniert werden können. Die beobachtete Tendenz der verminderten Besiedlung auf den modifizierten Oberflächen könnte somit auf die Veränderung dieses Parameters zurückzuführen sein.

4.2.4.5.2 Stereoskopische Quantifizierung der Exploration

Zur Quantifizierung des Explorationsverhaltens der Cyprislarven auf den PS-Oberflächen wurden stereoskopische Untersuchungen durchgeführt.

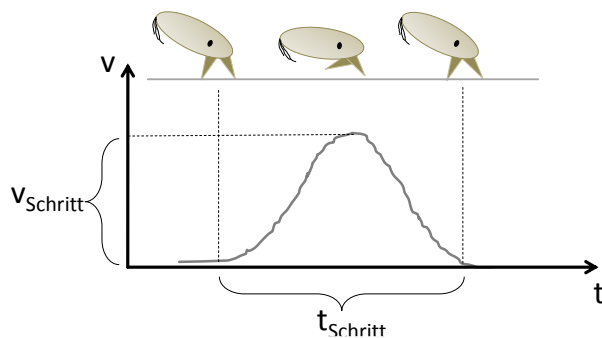


Abbildung 105. Schematische Darstellung eines Cyprislarven-Schrittes zur Verdeutlichung der Schrittlänge t und der maximalen Schrittgeschwindigkeit v .²⁵⁰

Die Bewegungen der Organismen wurden dafür von zwei Kameras aufgenommen, durch die algorithmengestützte Zusammenführung der einzelnen Videos konnten so 3-dimensionale Bewegungsprofile erhalten werden. Im vorliegenden Fall war das Verhalten der Organismen bei Kontakt mit der Oberfläche von Interesse. Cyprislarven können sich bei Kontakt mit einer Oberfläche auf dieser wie zweifüßig laufend fortbewegen (Abbildung 105).³⁰³ Die „Schritte“, die sie dabei

machen, sind durch die Dauer t und die maximale Geschwindigkeit v , mit der sich die Larve in dieser Zeit in der xy -Ebene bewegt (wobei die z -Richtung der Oberflächennormalen entspricht), charakterisiert. Abbildung 106 zeigt diese charakteristischen Verhaltensgrößen für die AA- und HA-Oberflächen im Vergleich zu deren modifizierten Derivaten. Die Schrittdauer war auf HA-beschichteten Proben am kürzesten, auf AA benötigten die Larven für jeden Einzelschritt deutlich länger. Die Modifizierungsreaktion hatte einen analogen Einfluss bei beiden Polysacchariden. Der Effekt war auf HA ausgeprägter: die Länge eines Schrittes nahm um 44 % zu, bei AA um 9 %. Auch bei den Schrittgeschwindigkeiten zeigt die Modifizierungsreaktion die gleichen Auswirkungen auf AA und HA, im Vergleich zu den unveränderten Oberflächen war sie verringert.

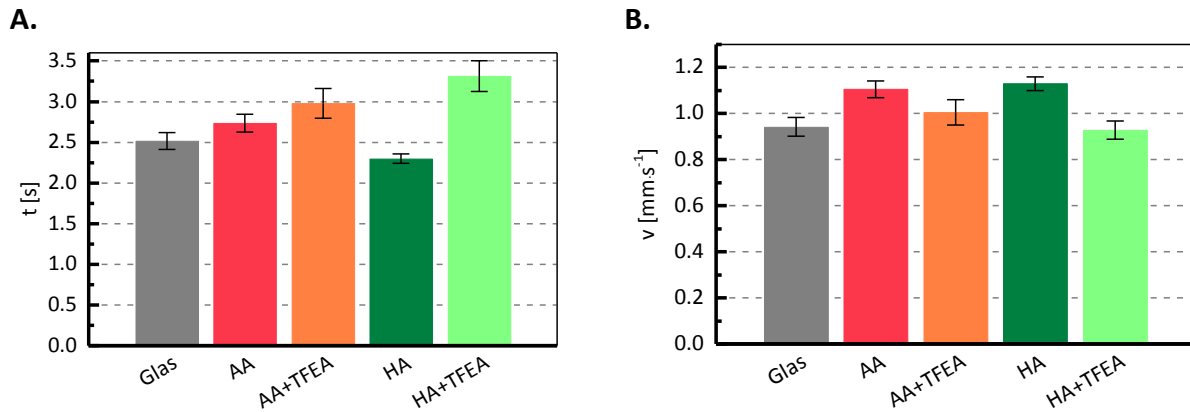


Abbildung 106. Ergebnisse der stereoskopischen Untersuchungen des Explorationsverhaltens von Cyprislarven auf PS-beschichteten Oberflächen. A. Mittlere Schrittdauer t . B. Mittlere Maximalgeschwindigkeit v . Je Oberfläche wurden 7-8 Trajektorien aufgezeichnet, die jeweils ~ 20 Schritte enthielten. Die gezeigten Werte sind die Mittelwerte dieser Datenpunkte. Die Fehlerbalken zeigen den SEM ($n_{\text{Larven}} = 8$, $n_{\text{Schritte}} = 20$).

Auf HA+TFEA, der im Besiedlungsexperiment am wenigsten attraktiven Oberfläche für die Cyprislarven, war demnach die Verweilzeit am längsten und die Bewegungsgeschwindigkeit am geringsten. Dieser Zusammenhang deutete darauf hin, dass die Zeit, die die Larven mit der Untersuchung eines potentiellen Besiedlungssubstrates verbringen, negativ mit der Eignung zur permanenten Adhäsion korreliert.

4.2.4.6 Feldversuche

Experimente mit einzelnen Spezies sind relativ simple und standardisierte Werkzeuge, mit denen das Potential einer neuen Oberflächenbeschichtung evaluiert werden kann. Allerdings spielen im realen Anwendungsumfeld eine große Bandbreite von Faktoren, wie Wetterbedingungen und die Wechselwirkung zwischen Spezies, eine Rolle, die sich gegenseitig verstärken oder abschwächen können. Feldversuche, bei denen eine Testoberfläche einer Reihe von Einflüssen gleichzeitig ausgesetzt wird, sind daher der nächste Schritt bei der Entwicklung von inerten Beschichtungen. Die PS-Oberflächen wurden daher in Feldexperimenten in Florida und Singapur statisch inkubiert, um ihre Resistenzeigenschaften unter realen marinen Bedingungen zu testen.

4.2.4.6.1 Florida Institute of Technology (Melbourne, Florida)

Die beschichteten Glasobjektträger wurden für 24 h in der ‚Indian River Lagoon‘ inkubiert. Nach der Fixierung wurden adhärenente Organismen größer als $10 \mu\text{m}$ lichtmikroskopisch identifiziert und quantifiziert, die Ergebnisse sind in Abbildung 107 dargestellt.

Die Besiedlungsdichten auf den unmodifizierten PS (AA, HA und CS) zeigten keine signifikanten Unterschiede (ANOVA, $p < 0,05$), alle lagen innerhalb der Fehlergrenzen im gleichen Bereich. Auf den modifizierten AA- und HA-Oberflächen war diese Dichte im Vergleich zu den reinen Polymeren um $\sim 50\%$ reduziert. Bei CS dagegen wurde der gegenteilige Effekt beobachtet, die Organismenzahl nahm um 50% zu.

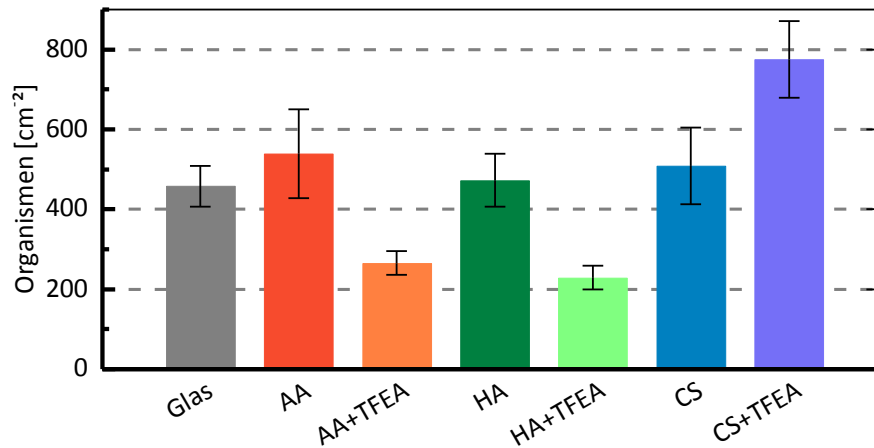


Abbildung 107. Organismendichte auf den PS-Oberflächen nach 24 h Inkubation im Meer an der „Indian River Lagoon“ auf dem Testgelände des FIT, Florida. Die gezeigten Daten repräsentieren die Evaluierung von 40 Sichtfeldern je Oberflächenbeschichtung, die Fehlerbalken zeigen den SEM (n = 40).

Festhalten lässt sich, dass die beobachteten Tendenzen mit denen aus den zuvor vorgestellten Einzelspezies-Experimenten übereinstimmten. Da die gezeigten Experimente Teil eines Pilotprojektes zur initialen Besiedlung auf Oberflächen in Feldtests waren, ist es nicht möglich die Ergebnisse im Kontext mit anderen zu vergleichen.

4.2.4.6.2 Universität Singapur (Singapur)

In Kooperation mit der Gruppe von DR. S. TEO an der Universität Singapur wurden ebenfalls Feldversuche durchgeführt. Die Oberflächen wurden hier für 14 Tage im Meer inkubiert, um auch die Langzeitwirkung der Oberflächen zu evaluieren. Zur Auswertung wurde die Anzahl gesiedelter Organismen auf Fotografien ganzer Objektträger quantifiziert. Durch die Reinigung der Substrate mit einem Wasserstrahl von zunächst 345 kPa und anschließend 690 kPa wurde zusätzlich die Haftstärke der adhärenen Organismen erfasst. Die zurückbleibenden wurden wie zuvor auf ganzen Objektträgern ausgezählt.

Abbildung 108 fasst die so erhaltenen Organismenzahlen zusammen. Auf HA adhärenen signifikant weniger Organismen als auf den beiden anderen PS, wobei die höchste Anzahl auf CS gefunden wurde. Die Modifizierung hatte auf die verschiedenen Testpolymere unterschiedliche Auswirkungen: bei HA nahm die Anzahl von Organismen im Vergleich zum unmodifizierten Derivat zu, während bei AA und CS kein Unterschied beobachtbar war.

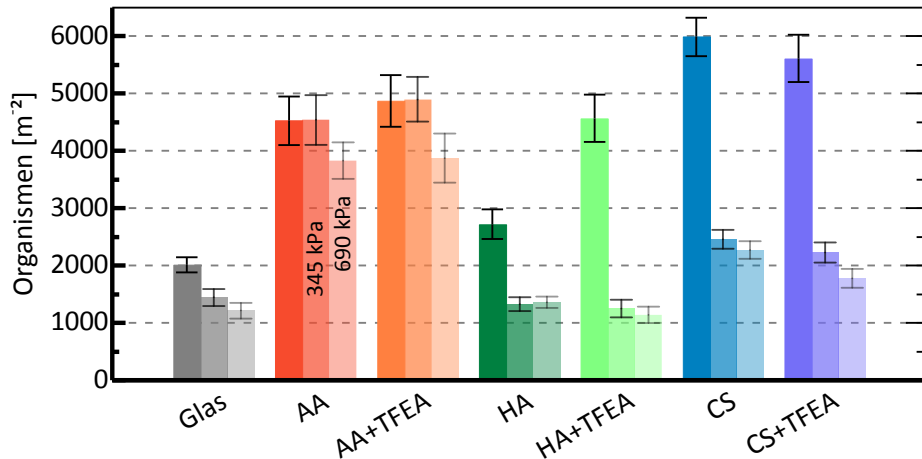


Abbildung 108. Organismendichte auf den PS-Oberflächen nach zweiwöchiger Inkubation im Meer (linke Balken) vor und nach anschließender Reinigung mit einem Wasserstrahl von 345 kPa (mittlere Balken) und 690 kPa (rechte Balken). Die Balken repräsentieren den Mittelwert der Evaluierung von zehn Replikaten je Oberflächenbeschichtung. Die Fehlerbalken zeigen den SEM (n = 10).

Diese Tendenzen zeigten sich auch bei den prozentualen Anteilen der auf der Oberfläche verbleibender Organismen nach der Reinigung (Abbildung 109). Auf beiden AA-Derivaten hafteten die Organismen so stark, dass sich erst bei der Verwendung des stärkeren Wasserstrahls einer Verminderung ihrer Anzahl zeigte. Bei HA und CS wurde schon beim schwächeren Reinigungsschritt ~ (40 - 50) % des adhärenen Biomaterials abgelöst. Die Modifizierung verringerte auf HA die Stärke der Organismenhaftung noch weiter, wogegen auf CS dieser Effekt nicht beobachtet werden konnte. Der zweite Reinigungsschritt (gezeigt in den rechten Balken) löste im Vergleich zum Ersten bei allen vier HA und CS-Beschichtungen nicht signifikant mehr Organismen ab.

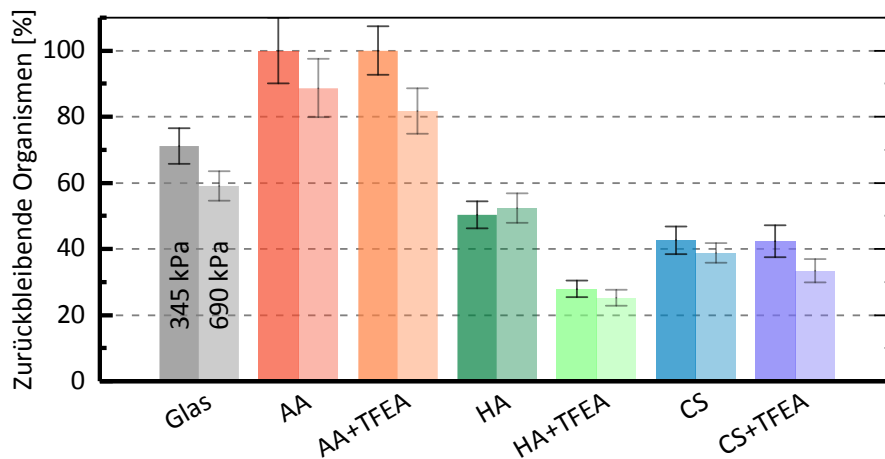


Abbildung 109. Prozentualer Anteil von zurückbleibenden Organismen nach dem Aussetzen eines Wasserstrahls mit 345 kPa (linke Balken) und 690 kPa (rechte Balken).

Trotz der in Abschnitt 4.2.3 gezeigten Abnahme der PS-Schichten über den Experimentzeitraum waren Unterschiede für die verschiedenen Beschichtungen feststellbar.

4.2.5 Vergleich und Diskussion der biologischen Experimente

In den vorangegangenen Abschnitten wurden die Ergebnisse von Besiedlungs- und Ablösbarkeitsexperimenten und mikrofluidischen Untersuchungen zur kritischen Scherspannung einer Reihe repräsentativer *Foulingorganismen*, sowie Feldversuche auf den PS-Modelloberflächen

vorgestellt. Da ein einzelnes Experiment aber nicht als Kriterium für die Resistenzleistung einer Oberfläche herangezogen werden kann, muss die Gesamtheit dieser Ergebnisse betrachtet werden. Zunächst sollen hier daher die einzelnen Polysaccharide miteinander verglichen werden. Tabelle 17 gibt zu diesem Zweck eine vergleichende qualitative Übersicht. Der Vergleich für ein Besiedlungs- und Ablösbarkeitsexperiment mit *N. incerta* stammt aus einer früheren Arbeit und wird hier der Vollständigkeit halber mit aufgeführt, die Durchführung erfolgte analog zu den in Abschnitt 3.4.4 beschriebenen Methoden.²⁹⁶

Tabelle 17. Qualitativer Vergleich der Einzelspezies- und Feld-Experimente auf den unmodifizierten PS (AA, HA und CS). ✓ bedeutet eine niedrigere Besiedlung, einen niedrigeren τ_{50} -Wert oder eine höhere prozentuale Ablösung der Organismen und damit eine bessere Leistung im Sinne einer inerten Oberfläche, ○ bedeutet, dass kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte. n.v. zeigt an, dass das entsprechende Experiment nicht durchgeführt wurde oder zu keinem Ergebnis führte.

| | | AA | HA | AA | CS | HA | CS |
|-------------------------------------|--------------|------|----|------|----|------|----|
| <i>C. marina</i> (τ_{50}) | | | ✓ | | ✓ | | ✓ |
| <i>N. perminuta</i> (τ_{50}) | | ✓ | | n.v. | | n.v. | |
| <i>N. incerta</i> | Besiedlung | n.v. | | n.v. | | ○ | |
| | Ablösbarkeit | n.v. | | n.v. | | ✓ | |
| <i>U. linza</i> | Besiedlung | | ✓ | ○ | | ✓ | |
| | Ablösbarkeit | | ✓ | | ✓ | ✓ | |
| <i>B. amphitrite</i> (Besiedlung) | | | ✓ | | ✓ | | ○ |
| Feldversuch Florida (Besiedlung) | | ○ | | ○ | | ○ | |
| Feldversuch Singapur | Besiedlung | | ✓ | ✓ | | ✓ | |
| | Ablösbarkeit | | ✓ | | ✓ | | ○ |

Als interne Standards wurden in allen gezeigten biologischen Experimenten ultraglatte Objektträger mit einbezogen, auf denen die meisten Organismen wenig siedeln und nur schwach haften. Sie dienen daher nicht als nichtresistenter Standard, sondern als Kontrolle des Organismenzustandes und der Experimentdurchführung. In Abbildung 110 A sind die auf diesen Standard normierten Ergebnisse zur Besiedlungsdichte der einzelnen PS quantitativ-vergleichend zusammengestellt. Des Weiteren wurden die Ergebnisse zur kritischen Scherspannung von *C. marina* und *N. perminuta* sowie der prozentualen Ablösung der Organismen im Experiment mit *U. linza* und einem Feldexperiment verglichen.

Zunächst fällt auf, dass keines der PS den gleichen Einfluss auf alle Spezies bzw. Experimente hatte. Auf HA, das bei fast allen Experimenten „besser“ abschnitt als AA (Reduzierung von Besiedlung und schwächere Adhäsion), hafteten die Diatomeen stärker. Auch im Vergleich von AA mit CS siedelten tendenziell mehr Organismen oder hafteten stärker. Auch hier gab es Ausnahme mit der Besiedlungsdichte der Organismen im Singapur-Feldtest. Insgesamt demonstriert der Vergleich, dass die HA-Oberflächen die besten Resistenzeigenschaften bei der Besiedlung und Ablösbarkeit mariner Organismen aufwiesen, was mit Tendenzen in früheren Arbeiten übereinstimmt.^{26,285}

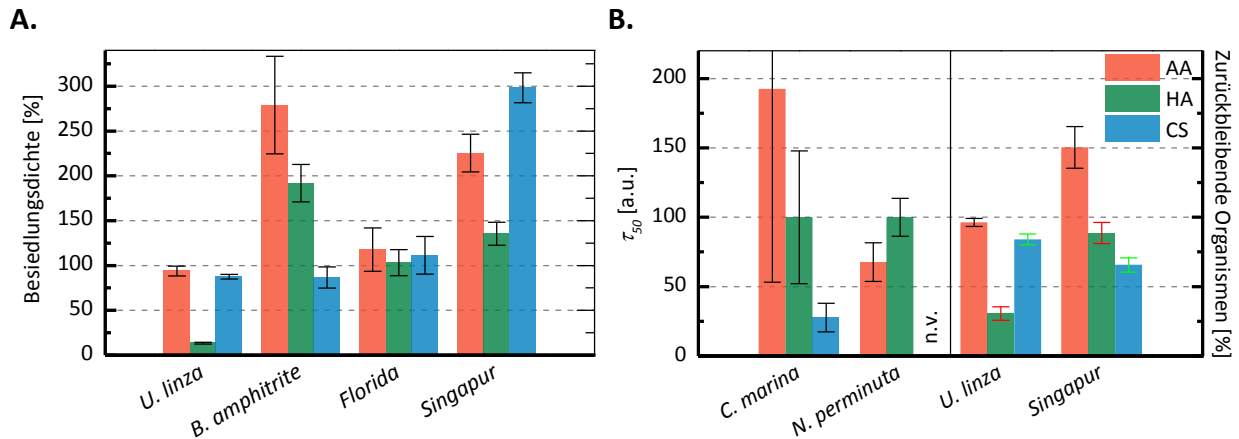


Abbildung 110. Vergleich des Organismenverhaltens auf den unmodifizierten PS (AA, HA und CS). A. Besiedlungsdichten, normiert auf den Glasstandard im jeweiligen Experiment. B. Vergleich der relativen kritischen Scherspannungen τ_{50} für *C. marina* und *N. perminuta* (linke Achse) und der zurückbleibenden Organismen für *U. linza* und das Singapur-Feldexperiment (rechte Achse).

Die Disaccharideinheiten der drei PS unterschieden sich vor allem in der Anzahl der Säuregruppen. Die gezeigten Unterschiede in den Speziesantworten könnten demnach auf diese Bausteine zurückzuführen sein. Einen ersten Erklärungsansatz bieten die variierenden Ladungsdichten, die durch die Deprotonierung der Säuregruppen im verwendeten Medium gegeben sind. HA verfügt über eine, AA über zwei Carboxylgruppen, die negative Ladungsdichte im AA-Netzwerk ist also potentiell doppelt so hoch wie bei HA. Ladungsneutralität ist einer der Kernpunkte der von der Whitesides-Gruppe für potentiell inerte Oberflächen gefundenen Eigenschaften.¹²¹ Dieser Regel widersprechen die hier untersuchten PS zwar an und für sich, sie bietet aber dennoch einen Deutungsansatz für die stärkere Resistenz von HA, welches eine geringere Ladung als AA aufweist. CS trägt neben einer Carbon- noch eine Sulfonsäuregruppe, deren Säurestärke deutlich höher ist als die der Carboxylgruppen, was durch den Vergleich der pK_S -Werte von analogen kurzkettigen Säuren deutlich wird. Essigsäure hat einen pK_S -Wert von 4,8 während Methylsulfonsäure mit $pK_S = -2,6$ saurer ist.³⁰⁴ Die Ladung der CS-Schichten sollte dementsprechend auch unter den leicht basischen Bedingungen der Experimente (Proteinadsorption in PBS bei $pH = 7,4$, marine Untersuchungen bei $pH \sim 8,4$) im Vergleich der drei PS am höchsten sein. Die Tatsache, dass CS bessere Resistenzeigenschaften als AA zeigt, steht erneut im Widerspruch mit der bereits erwähnten Grundregel. Für das Resistenzverhalten der PS mussten demnach andere Faktoren als die reine Ladung entscheidend sein.

Ein weiterer Parameter, der Besiedlungs- und Adhäsionsverhalten beeinflusst, ist die Benetzbarkeit einer Oberfläche. Für die reinen PS unterschied sie sich jedoch nicht signifikant und bietet daher keine Interpretationsmöglichkeit für die beobachteten Unterschiede.

Auf Monosaccharid-funktionalisierten SAMs wurde gezeigt, dass schon die exakte Konfiguration der Hydroxylgruppen dieser Grundbausteine Einfluss auf die Proteinresistenz und das Organismenverhalten haben kann, da sie die Hydratisierung der Systeme mitbestimmen.¹⁰³ Die bei den verwendeten PS vorliegende unterschiedliche Substitution sollte daher einen noch größeren Einfluss haben, was die Ergebnisse auch nahelegen. Im Vergleich zu beispielsweise PEGs scheint die Hydratisierung der präparierten Filme aber schwächer zu sein, was die quantitativ vergleichbaren Ergebnisse der mikrofluidischen Experimente mit *C. marina* und *N. perminuta* nahelegten. Für diese

Organismen wurde der Hydratationsgrad als bestimmender Faktor für die Adhäsionsstärke gezeigt. Die ermittelten Haftstärken auf den PS-Oberflächen lagen im Vergleich mit einem stark hydratisierten System höher. Auch für *U. linza* unterschied sich das Verhalten auf den PS von dem auf hydratisierten Oberflächen. Auf entsprechenden EG-SAMs wurde eine extrem schwache Adhäsion beobachtet,²² deutlich niedriger als die auf den PS zu beobachteten.

Einen weiteren Ansatzpunkt zur Deutung der Unterschiede zwischen den PS liefert die variierende Fähigkeit zur Ca^{2+} -Komplexierung, die bei AA am stärksten ausgeprägt und bei CS nicht nachweisbar war. Die biologische Relevanz von Ca(II) -Ionen für den Adhäsionsprozess bei diversen Spezies ist bekannt.³⁰⁵ Einerseits können nicht-spezifische Wechselwirkungen wie die Neutralisation der elektrischen Doppelschicht eine Rolle spielen. Andererseits kann das zweiwertige Ion negativgeladene funktionelle Gruppen verbrücken und damit spezifisch mit Polysacchariden und Proteinen der extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) interagieren.³⁰⁶ Eine verminderte Präsenz schwächt dementsprechend diese Wechselwirkungen und damit den Adhäsionsprozess. Die Bevorzugung der AA-Oberflächen durch die meisten Spezies in Kombination mit der ausgeprägtesten Fähigkeit zur Ca-Bindung verifiziert diese Zusammenhänge. Die genaue Zusammensetzung der EPS variiert zwischen verschiedenen Spezies,^{276,307-308} was auch eine variierende Relevanz der Ca(II) für den Adhäsionsprozess nahelegt.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass es bei dieser Beschichtungsklasse eine Vielzahl von Faktoren gibt, deren genaues Zusammenspiel die jeweiligen Speziesantworten bestimmt.

Neben dem Einfluss des chemischen Rückgrats der Disaccharideinheiten wurden auch die Auswirkungen der Modifizierungsreaktion auf die PS verglichen. Durch die Blockierung der komplexbildenden Säuregruppen sollte die Fähigkeit zur Interaktion mit Ca(II) -Ionen reduziert werden. In Tabelle 18 sind die Ergebnisse der biologischen Experimente qualitativ gegenübergestellt.

Tabelle 18. Qualitativer Vergleich der Einzelspezies- und Feld-Experimente der unmodifizierten und mit TFEA-modifizierten PS. ✓ bedeutet eine niedrigere Besiedlung, einen niedrigeren τ_{50} -Wert oder eine höhere prozentuale Ablösung der Organismen und damit eine bessere Leistung im Sinne einer inerten Oberfläche, ○ bedeutet, dass kein Unterschied festgestellt werden konnte. n.v. zeigt an, dass die entsprechenden Experimente nicht durchgeführt wurden oder zu keinem Ergebnis führten.

| | | AA | AA+TFEA | HA | HA+TFEA | CS | CS+TFEA |
|-------------------------------------|--------------|----|---------|----|---------|----|---------|
| <i>C. marina</i> (τ_{50}) | | | ✓ | | ✓ | ✓ | |
| <i>N. perminuta</i> (τ_{50}) | | | ○ | | ○ | | n.v. |
| <i>N. incerta</i> | Besiedlung | | n.v. | | ✓ | | ○ |
| | Haftstärke | | n.v. | | ✓ | | ○ |
| <i>U. linza</i> | Besiedlung | | ✓ | | ○ | ✓ | |
| | Ablösbarkeit | | ✓ | | ○ | | ○ |
| <i>B. Amphitrite</i> (Besiedlung) | | | ✓ | | ✓ | | ○ |
| Feldversuch Florida (Besiedlung) | | | ✓ | | ✓ | ✓ | |
| Feldversuch | Besiedlung | | ○ | ✓ | | | ○ |
| Singapur | Ablösbarkeit | | ○ | | ✓ | | ○ |

Der quantitativ interessante Aspekt in diesem Zusammenhang war der Vergleich der einzelnen PS mit ihren modifizierten Derivaten. In Abbildung 111 sind die auf die Werte der unmodifizierten PS normierten Ergebnisse für die TFEA-derivatisierten Oberflächen gezeigt. Diese Normierung erlaubt es, den jeweiligen Einfluss der Kopplungsreaktion zu evaluieren.

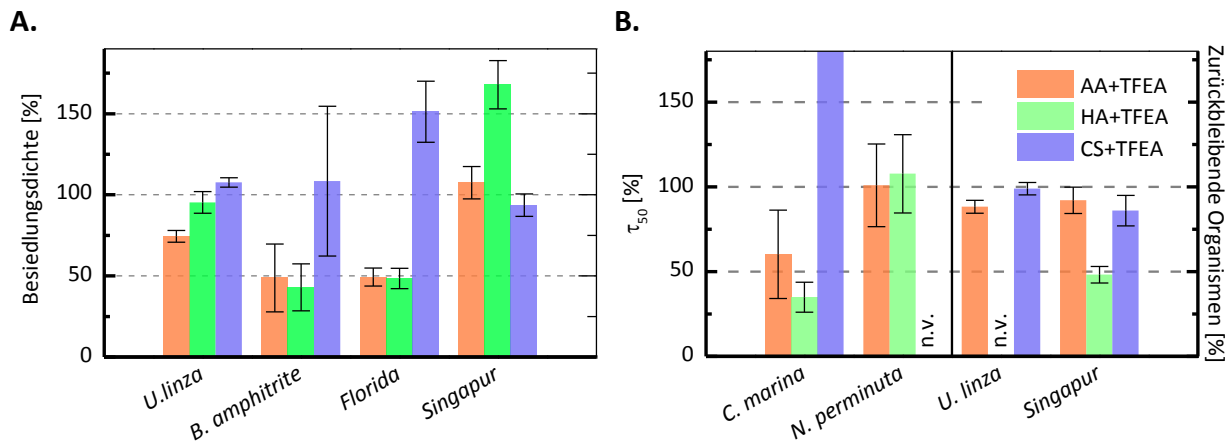


Abbildung 111. Vergleich des Einflusses der Modifikation der PS auf das Organismenverhalten. A. Vergleich der Besiedlungsdichten. B. Vergleich der kritischen Scherspannungen τ_{50} für *C. marina* und *N. perminuta* (linke Achse) und der zurückbleibenden Organismen für *U. linza* und das Singapur-Feldexperiment (rechte Achse). Die gezeigten Werte zeigen das Verhältnis der Werte von modifizierten (M) zu unmodifizierten (U) PS in % (M/U·100).

Die Gesamtübersicht der Ergebnisse zeigt, dass es für AA und HA im Vergleich zu CS unterschiedliche Tendenzen gab. Bei einer beobachtbaren Veränderung hatte die Modifizierung für die Alginatate einen „positiven“ Einfluss. Die Organismendichte war für *U. linza*, *B. amphitrite* und im Florida-Feldversuch reduziert und die kritische Scherspannung τ_{50} von *C. marina* nahm ab. Bei HA ergab sich ein

ähnliches, jedoch weniger einheitliches Bild. In den Besiedlungsexperimenten, mit Ausnahme des Feldexperiments in Singapur, nahm die Anzahl der Organismen auf dem modifizierten Derivat ab. Auch die Ablösbarkeit, wiederum mit Ausnahmen bei *N. perminuta* und *Ulva* Sporen, wurde erhöht. Bei der mit *N. perminuta* eng verwandten Diatomeenspezies *N. incerta* dagegen wurde sowohl Besiedlungsdichte als auch Stärke der Adhäsion durch die Derivatisierung reduziert. Im Fall von CS zeigte die Modifikation in den meisten Fällen keinen signifikanten Einfluss oder verschlechterte die Resistenzeigenschaften. *U. linza* siedelte bevorzugt auf dem modifizierten Derivat und auch im Florida-Feldversuch nahm die Besiedlungsdichte zu. Die kritische Scherspannung τ_{50} für *C. marina* stieg um mehr als das Vierfache.

Die durchgeführte Modifikation der immobilisierten PS beeinflusste die oben diskutierten Parameter der Ladungsdichte, Benetzbarkeit und Ca(II)-Komplexierungsfähigkeit. Durch die Amidierung der Carboxyle wurde deren saurer Charakter unterbunden, was die Ladungsdichte im betreffenden Film herabsetzen sollte. Die beschriebenen verbesserten Eigenschaften von AA und HA stehen im Einklang mit den Whitesides-Regeln,¹²² die eine maximale Resistenz bei Ladungsneutralität vorhersagen. Auch die Erhöhung des Kontaktwinkels und damit die Annäherung an das Berg-Limit von $\Theta = 65^\circ$ der Baier-Kurve versprechen eine reduzierte Adhäsion von Biomasse.¹²⁴⁻¹²⁵ Wiederum entsprachen AA und HA diesen Erwartungen, während für CS das gegenteilige Verhalten beobachtet wurde.

Die deutlichsten Auswirkungen, die bei AA beobachtet wurden, bestätigten zudem die eingangs formulierte Hypothese, dass die zahlreicheren Carboxylgruppen und deren Ca(II)-Komplexierungsvermögen relevant für das Resistenzverhalten sind. Die höhere Anzahl, verbunden mit der höheren Ausbeute der Modifizierungsreaktion, maximierte den Unterschied zwischen den beiden untersuchten Derivaten. Auch die analogen aber schwächeren Effekten für HA, das einerseits weniger Ca(II) komplexieren konnte und zum anderen schwächer modifiziert wurde, sprechen für diese Interpretation.

Der durchweg negative Einfluss der Carboxylfunktionalisierung bei CS deutet wiederum daraufhin, dass das empfindliche Zusammenspiel der oben diskutierten verschiedenen Faktoren für dieses PS in die falsche Richtung verändert wurde. Natives CS zeigt hohe biologische Aktivität und beeinflusst beispielsweise das Verhalten von Fischen und Larven.^{288,309} Auch wird dem GAG eine Rolle in der natürlichen *Fouling*-Resistenz verschiedener Spezies zugeordnet.^{286,310} Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Konfiguration für diese Funktionen optimiert ist und eine Modifizierung deren Aktivität vermindert.

4.2.6 Zusammenfassung

Die drei natürlichen Polysaccharide AA, HA und CS konnten über die gewählte Kopplungsstrategie an amino-funktionalisierte Oberflächen immobilisiert und anschließend mit TFEA modifiziert werden. Die Filme waren (2 - 3) nm dick und hydrophil, nach der Modifizierung war der Wasserkontaktwinkel in allen Fällen um $\sim 10^\circ$ erhöht. Die Ausbeute der Kopplungsreaktion wurde über XPS-Messungen auf (6 - 9) % bestimmt. In einem Stabilitätstest unter marinen Bedingungen zeigten die präparierten Filme über einen Zeitraum von zwölf Tagen einen messbaren Abbau, der jedoch im Schnitt nicht höher als 20 % war.

Alle untersuchten Oberflächen waren proteinresistent, wobei keine signifikanten systematischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Beschichtungen festgestellt werden konnten. Die untersuchten Spezies dagegen zeigten sowohl in ihrem Besiedlungsverhalten als auch bei der Adhäsionsstärke ein deutlich diskriminierendes Verhalten. Das marine Bakterium *C. marina* haftete auf CS am schwächsten. Die Modifizierung schwächte die Adhäsion für HA und AA, während sie auf CS zunahm. Dagegen konnte für die Diatomee *N. perminuta* kein Einfluss durch die Modifizierung der PS festgestellt werden. Als weiterer *Mikrofouler* wurden Zoosporen von *U. linza* untersucht, die deutlich zwischen den drei PS unterschieden. Am wenigsten Sporen siedelten auf HA, auch ihre Ablösbarkeit war hier am höchsten. Der Einfluss der Modifizierung war allerdings nicht eindeutig. Der *Makrofouler* *B. amphitrite* siedelte bevorzugt auf AA. Die Modifizierung reduzierte für AA und HA die Tendenz zur Besiedlung, während sie für CS zunahm. Erste stereoskopische Untersuchungen zum Bewegungsverhalten der Cyprislarven beim Kontakt mit den Oberflächen deuteten darauf hin, dass sie sich auf unattraktive Oberflächen tendenziell schneller bewegten.

Abschließende Feldversuche mit realen Speziespopulationen wurden mit Kooperationspartnern in Florida und Singapur durchgeführt. Die kurzen Experimente (24 h) in Florida bestätigten die Mehrzahl der Tendenzen aus den Untersuchungen mit einzelnen Spezies, vor allem im Hinblick auf die Auswirkung der Kopplungsreaktion. Auf AA und HA wurde die Besiedlungsdichte reduziert, während sie für CS anstieg. Das zweiwöchige Experiment in Singapur, das im Vergleich mit den anderen durchgeführten Untersuchungen schon als Langzeitstudie bezeichnet werden kann, zeigte etwas andere Tendenzen. Es wurden Unterschiede zwischen den PS beobachtet, wobei HA am resistertesten war.

Eine Zurückführung der beobachteten Phänomene auf einzelne Parameterunterschiede zwischen den PS und ihren modifizierten Derivaten gestaltete sich schwierig. Insgesamt ließ sich dennoch festhalten, dass von den drei untersuchten Polysaccharide HA das höchste Potential im Bereich von *Antifouling*- und *Fouling*-Release-Oberflächen hat. AA eignet sich eher als Modellsystem. Der Einfluss der durchgeführten Modifizierung war hier am stärksten ausgeprägt und bestätigte damit die anfangs formulierte Hypothese, dass die Resistenzeigenschaften durch Verminderung der Ca(II)-Komplexierung verbessert werden könnten. CS zeigte sich in seiner natürlichen Form als am effizientesten.

Insgesamt waren die präparierten Filme geeignet, um phänomenologisch die Speziesantwort von marinen *Biofoulern* auf unterschiedliche Saccharidbausteine und ihrer modifizierten Derivate zu untersuchen. Modelloberflächen auf Basis von SAMs, die hochgeordnet nur durch die einzelnen PS-Bausteine mit der Umgebung wechselwirken, könnten ein detaillierteres Verständnis zu den genauen Wirkmechanismus der einzelnen Kohlenhydrate ermöglichen. Weiterführende Untersuchungen an diesem System könnten des Weiteren auf die Erhöhung der Kopplungseffizienz der Modifizierungsreaktion abzielen. Dies könnte beispielsweise durch die Modifizierung der freien PS vor der Immobilisierung geschehen. Damit würde die sterische Zugänglichkeit der zu modifizierenden Säuregruppen erhöht werden, die im vorliegenden Fall durch die Immobilisierung und der damit verbundenen Einschränkung der Kettenbeweglichkeit vermindert ist. Außerdem sind länger-kettige

Amine mit mehr Fluorgruppen ein vorstellbarer Weg, die zum einen den amphiphilen Charakter verstärken und zum anderen weitere sterische Freiheitsgrade ins System einbringen würden.

Die Relevanz von effektiven amphiphilen Systemen wird noch einmal deutlich, wenn man die neusten Entwicklung von kommerziellen Beschichtungen betrachtet: auch sie basieren auf einem hydrophoben Baustein, der von einer hydrophilen Hydrogelschicht modifiziert wird, ein Beispiel ist eine sog. Beschichtung der dritten *Foulingrelease*-Generation, Hemptasil X3.³¹¹

4.3 pHEMA-Oberflächen durch RAFT-Polymerisation

Dünne Filme, wie die in den vorangegangenen Abschnitten vorgestellten SAMs und Polysaccharid-Beschichtungen, eignen sich um systematisch als Modelloberflächen zu dienen. Im größeren Kontext der Anwendbarkeit sind aber meist Filme mit höheren Schichtdicken notwendig, die beispielsweise durch Polymerisationsreaktionen hergestellt werden können. Durch solche Verfahren können Modellsysteme, die sich als vielversprechend herausgestellt haben, in eine mehr anwendungsbezogene Form gebracht werden. Auch bei prinzipieller Eignung eines Materials zur Präparation inerter Beschichtungen, muss eine resultierende Oberfläche nicht zwangsweise die angestrebten Resistenzeigenschaften aufweisen. Vor allem bei Polymeren kommen weitere Faktoren, wie die sterische Konfiguration der oberflächengebundenen Ketten hinzu. In diesem Zusammenhang hat beispielsweise die Schichtdicke der Polymerfilme einen entscheidenden Einfluss auf die resultierenden inerten Eigenschaften. Dieser Parameter wurde daher für das häufig als Biomaterial verwendete pHEMA (Poly(Hydroxyethylmethacrylat)) anhand von Proteinadsorptionsexperimenten analysiert. Die angewendete Methode der RAFT-Polymerisation könnte prinzipiell auch geeignet sein, um polymere Filme aus Beateinen oder Polysacchariden herzustellen.

Zur Beschichtung von Oberflächen mit Makromolekülen gibt es prinzipiell zwei Ansätze: Das gewünschte Polymer kann durch komplementäre Ankergruppen an eine vorfunktionalisierte Oberfläche angebunden werden, ein Beispiel dieser „*grafting to*“-Strategie ist die im vorangegangenen Abschnitt angewendete Immobilisierung von Polysacchariden. Beim sog. „*grafting from*“ wächst das Polymer ausgehend von einer Startergruppe direkt auf der Oberfläche. Dieser Ansatz wurde für die Beschichtung mit pHEMA durch RAFT-Polymerisation (*engl. reversible addition-fragmentation chain transfer*, reversibeler Additions-Fragmentierungs-Kettentransfer) gewählt. Der präparative Teil dieser Studie fand in der Arbeitsgruppe von PROF. BARNER-KOWOLLIK statt. Dabei sollte die Wachstumskinetik der oberflächeninitiierten radikalischen Polymerisation von HEMA sowie der Einfluss des verwendeten Lösungsmittels ausgehend von einer auf der Oberfläche immobilisierten Kettentransferreagenz (CTA) untersucht werden.

In Abbildung 112 sind die verschiedenen Beschichtungsschritte schematisch dargestellt. Nach der Aktivierung der Oberflächen im Sauerstoff-Plasma wurde das CTA, ein Silan wie das in Teil 0 verwendete APTMS, angebunden. Dieses zur Radikalbildung fähige Molekül war bei der folgenden Polymerisation entscheidend für das kontrollierte und gleichmäßige Kettenwachstum. Neben der Wahl des Monomers und der Polymerisations-Technik beeinflussen auch die Anwesenheit von zusätzlichem („*sacrificial*“) CTA und die Polarität des Lösungsmittels die Eigenschaften der präparierten immobilisierten Polymere. Durch den „lebenden“ Charakter der Reaktion, bei dem jedes neue Monomer in die bestehende Kette insertiert und die CTA-Funktion immer die Endgruppe bildet, kann die Polymerisation auch neu gestartet und fortgesetzt werden. Der gewählte Ansatz erlaubt die Präparation von wohldefinierten Polymersträngen mit definierter Länge ohne die Verwendung von toxischen Katalysatoren. Durch eine nicht vollständige Entfernung nach der Präparation haben beispielsweise kupferbasierte Reaktionsbeschleuniger, wie sie bei ATRP-Polymerisationen zum Einsatz kommen, den Nachteil, dass die biozide Wirkung des zentralen Metallions auch in den hergestellten Filmen noch vorhanden ist. Diese Rückstände können sich negativ auf das

Anwendungspotential von Biomaterialien auswirken, die nur selektiv über die maßgeschneiderten Eigenschaften mit der Umgebung wechselwirken sollen.

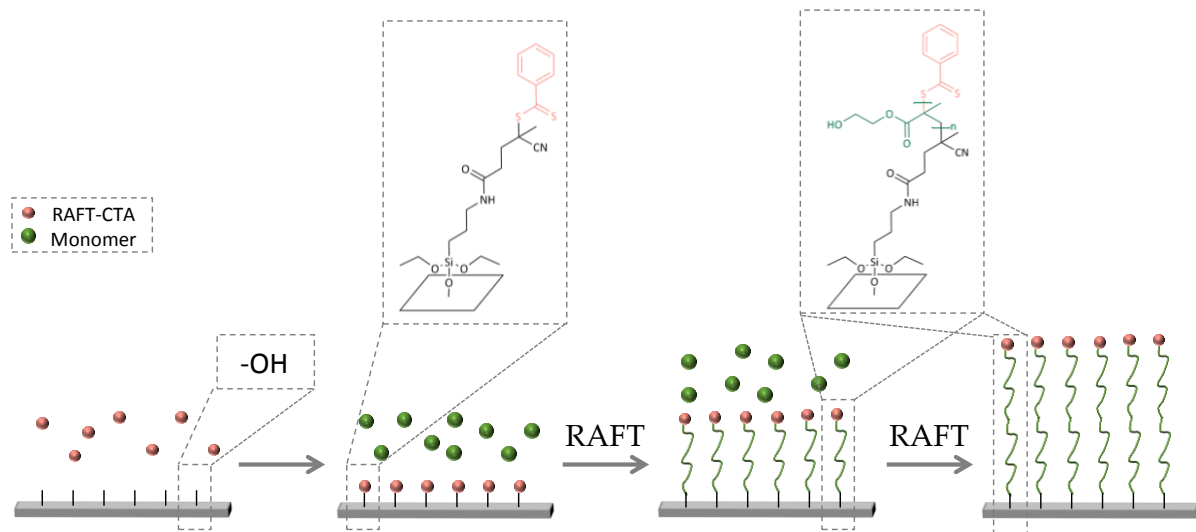


Abbildung 112. Schematische Darstellung der RAFT-Polymerisation zur Beschichtung von Si-Oberflächen mit pHEMA. Nach der Aktivierung im Sauerstoffplasma wurde ein CTA-terminierter Silan-Linker an die reaktiven Hydroxylgruppen gekoppelt. Die RAFT-Polymerisation des HEMA ging von diesen funktionellen Einheiten aus. Durch den lebendigen Charakter der Polymerisation und die Erhaltung der reaktiven Endgruppen konnte die Reaktion wiederholt durchgeführt werden.

Die präparierten Oberflächen wurden bezüglich ihrer Schichtdicke, Benetzbarkeit, Morphologie und chemischen Zusammensetzung charakterisiert. Außerdem wurde die Stabilität verschieden dicker Polymerfilme über sieben Tage in verschiedenen Medien getestet. Einerseits ist die generelle Proteinresistenz von pHEMA basierten Beschichtungen bekannt, andererseits haben aber Schichtdicken, Kopplungsdichten und Konformation der Polymerstränge erheblichen Einfluss auf diese Eigenschaft.^{32,312} Abschließend wurde daher untersucht, ob auch die mit dem beschriebenen Ansatz präparierten Polymerfilme resistent gegen die Adhäsion der beiden Plasmaproteine Albumin und Fibrinogen waren.

4.3.1 Charakterisierung der pHEMA-Oberflächen

Die Benetzbarkeit der präparierten Proben wurde durch Messung des statischen Wasserkontaktwinkels θ , die Schichtdicke durch spektrale Ellipsometrie und die Rauigkeit durch AFM-Messungen charakterisiert (Tabelle 19). Die für die pHEMA-Filme angegebenen Werte spiegeln die Bandbreite der durch den Ansatz herstellbaren Polymerfilme dar, in den folgenden Abschnitten wird noch näher auf ihre Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen und der Polymerisationsdauer eingegangen.

Die erfolgreiche Anbindung des CTAs zeigte sich durch die Abnahme der Benetzbarkeit und die Zunahme der Schichtdicke. Gemeinsam mit der niedrigen mittleren Rauigkeit von < 1 nm lässt sich auf die Bildung von gleichmäßigen Monolagen schließen, die notwendig für die anschließende Stabilität der wachsenden Polymerketten sind.

Tabelle 19. Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken d , statische Wasser-Kontaktwinkel θ und mittlere Rauigkeiten R_q von Si-Wafern nach den einzelnen Beschichtungsschritten.

| | θ [°] | d [nm] | R_q [nm] |
|------------------|--------------|---------------|---------------|
| Plasma gereinigt | < 5 | 0 | n.v. |
| CTA | 72 ± 2 | $2,0 \pm 0,5$ | $0,5 \pm 0,1$ |
| pHEMA | 55 ± 5 | 3 - 70 | 0,5 - 1,2 |

Nach der Polymerisation nahm der Kontaktwinkel deutlich ab. Unabhängig von der Schichtdicke, die (3 – 70) nm betrug, lag dieser bei $\theta_{\text{pHEMA}} = 55^\circ$ und zeigte die Anwesenheit der hydrophilen HEMA-Einheiten. Er stimmt mit Berichten über die Benetzbarkeit dieses Polymers aus ATRP-Polymerisationen überein.²¹⁹

Zur Untersuchung der OF-Topographie wurden AFM-Messungen durchgeführt und die Rauigkeiten der verschiedenen Beschichtungsschritte bestimmt. Für die Polymerschichten nahmen die Rauigkeiten im Vergleich zur CTA-Schicht leicht zu oder blieb gleich. Alle untersuchten Filme waren homogen und auf Nanometer-Ebene glatt.

XP-SPEKTROSKOPIE

Die chemische Zusammensetzung der Filme wurde XP-spektroskopisch untersucht. In Abbildung 113 sind die relevanten Detailspektren für die verschiedenen Beschichtungsschritte gezeigt. Neben diesen war erwartungsgemäß auch im Si 2p-Bereich für gereinigte und CTA-beschichtete Substrate ein Signal detektierbar.

Die Anbindung des Dithio-CTAs (Struktur in Abbildung 112) zeigte sich durch Signale im N 1s- und S 2s-Bereich, die auf der Plasma-gereinigten Referenz nicht vorhanden waren. Sie waren auf den Alkylamid bzw. Cyanid-Stickstoff und die Dithioester-Schwefelatome zurück zu führen.

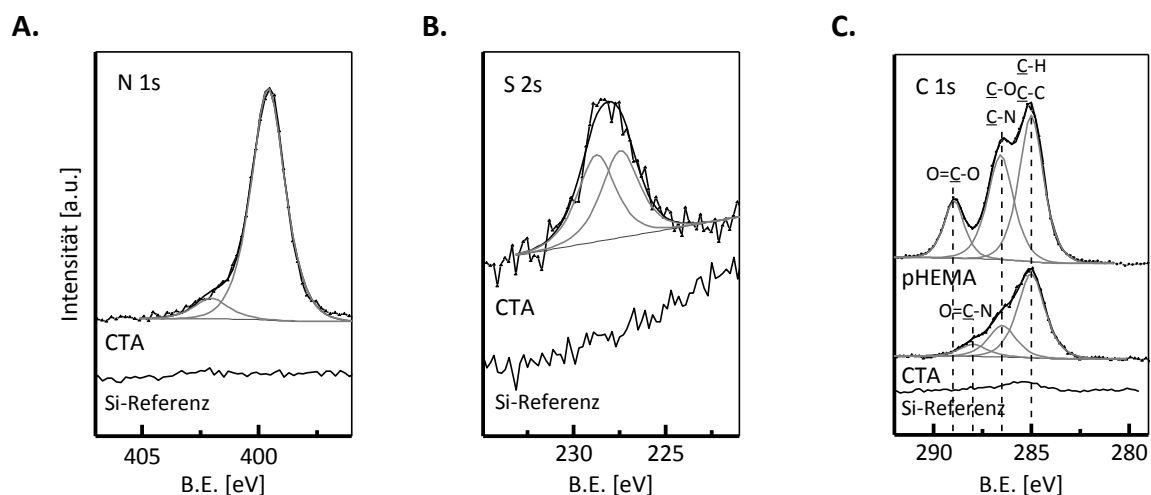


Abbildung 113. Typische XP-Spektren vom A. N 1s- B. S 2s- und C. C 1s-Bindungsenergiebereich der einzelnen Beschichtungsschritte auf Si-Wafern (pHEMA-Spektren stammen von einer 54 nm dicken Polymerprobe).

Die Zusammensetzung des C 1s-Signals entsprach der theoretischen des Moleküls (Tabelle 20), ebenso das Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff von 9 : 1. Bei beiden Analysen wurde eine nicht-

vollständige Kondensation, sondern das Zurückbleiben einer der Ethoxygruppen am Silizium angenommen (siehe dazu Abschnitt 4.2.1.2).

Nach der Polymerisation waren weder im N 1s- noch im S 2s-Bereich Signale detektierbar, die Spektren entsprachen denen der plasmagereinigten Referenz und sind zur besseren Übersichtlichkeit nicht mehr gezeigt. Bei Polymerfilmen dicker als 10 nm (bestimmt durch Ellipsometrie) verschwand auch das Si 2p-Signal, die Abschwächung des Substratsignals indiziert homogene und lochfreie Filme. Die Intensität des C 1s-Signals allerdings nahm zu, auch die Intensitätsverhältnisse der verschiedenen Kohlenstoffspezies veränderte sich (Abbildung 113 C, Tabelle 20). Die Zusammensetzung war unabhängig von der Schichtdicke der untersuchten Polymerprobe und entsprach der chemischen Struktur des HEMA-Monomers.

Tabelle 20. Theoretische und stöchiometrische Zusammensetzung des C 1s-Signals für CTA und pHEMA-beschichtete Si-Wafer, die angegebene Reihenfolge entspricht der abnehmender Bindungsenergie mit den Zuordnungen [O=C-N, S=C-S] bzw. [O=C-O] : [C-O, C-N, C-S] : [C-C, C-H].

| | theoretisch | stöchiometrisch |
|------|-------------|-----------------|
| CTA | 2 : 3 : 13 | 2 : 5 : 14 |
| HEMA | 1 : 2 : 3 | 1 : 2 : 2,8 |

Die Abwesenheit der N 1s- und S 2s-Signale widersprach auf den ersten Blick dem beschriebenen Mechanismus der RAFT-Polymerisation, bei dem die Endgruppe immer durch die funktionellen Gruppen des CTAs gebildet werden sollte. Da aber die Polymerblöcke deutlich hydrophiler als diese Endgruppen waren, war eine Umorientierung der hydrophoberen Einheiten in das Innere des Polymerfilms bei den wässrigen Präparationsbedingungen wahrscheinlich. Die Analyse der XP-Spektren zeigte somit durch das Auftreten der erwarteten Signale und deren eindeutige Zuordnung die erfolgreiche Präparation der pHEMA-Filme durch die RAFT-Polymerisation.

ABHÄNGIGKEIT DER SCHICHTDICKE VON CTA-ZUSATZ UND LÖSUNGSMITTEL

Die oben gezeigte Analytik der pHEMA-Oberflächen beschränkte sich zunächst auf ihre allgemeine Morphologie und chemische Beschaffenheit. Ein wichtiger Faktor bei der angewendeten Polymerisationsmethode ist aber immer auch die Kontrolle über die Reaktion, die sich im gleichmäßigen Wachstum der Polymerstränge und damit der Schichtdicke der präparierten Filme zeigt. Für die genaue Kinetik der Reaktion sind auch die Anwesenheit eines zusätzlichen CTAs in der Lösung und die Natur des verwendeten Lösungsmittels von Bedeutung.

Im ersten Schritt wurde daher das Verhältnis von zusätzlichem CTA (4-Cyano-4-(phenyl-carbonothioylthio)pentansäure) zum Kettenstarter (AIBN) variiert und der Verlauf der Schichtdicke mit der Polymerisationszeit untersucht (Abbildung 114 A). Zunächst fallen die extrem kleinen Fehlerbalken für alle gezeigten Werte auf, die, wie schon die vorangegangenen Analysen, die Homogenität der Oberflächen und damit das gleichmäßige Wachstum der Polymerketten zeigten. Für alle Verhältnisse zeigte sich anfangs ein linearer Anstieg, der bis zum Erreichen eines Plateaus abnahm. Die Reduzierung der Kettenwachstumsgeschwindigkeit konnte auf Terminierungs-

reaktionen und die abnehmende Monomerkonzentration zurückgeführt werden. Dennoch zeigt das anfängliche gleichmäßige Wachstum die kontrollierte Natur des Mechanismus, bei einer freien radikalischen Polymerisation wäre ein rapider Anstieg zu beobachten gewesen. Mit zunehmendem Anteil von CTA in der Reaktionslösung nahm die Konzentration an Kettenträgern zu und dementsprechend die mittlere Masse M der Polymerstränge ab. Auch die maximal erreichte Schichtdicke nahm dementsprechend von ~ 50 nm auf ~ 18 nm ab.

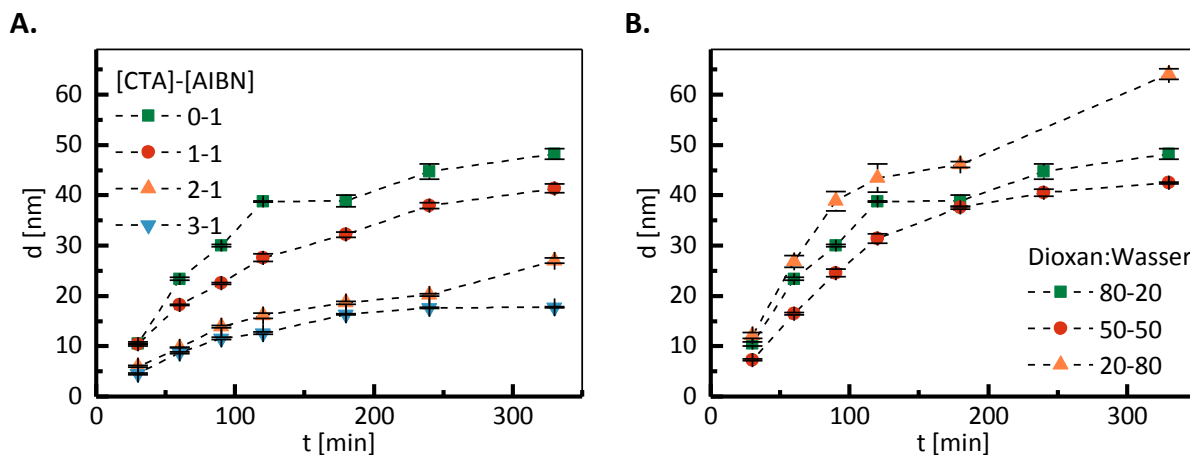


Abbildung 114. Schichtdickenentwicklung mit steigender Polymerisationsdauer für die RAFT-Polymerisation von HEMA. A. Abhängigkeit des Verhältnis von CTA zu AIBN. B. Abhängigkeit von der Polarität des Lösungsmittels. Die Werte wurden durch spektrale Ellipsometrie bestimmt. Jeder zeigt das Mittel aus drei Messungen pro Probe, Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Eine genauere Analyse dieser Ergebnisse zeigte, dass der kontrollierte Charakter der Polymerisation bei einem CTA:AIBN-Verhältnis von 1:1 am stärksten ausgeprägt war. Die folgenden Untersuchungen zum Einfluss der Lösungsmittelpolarität erfolgte daher bei diesen Bedingungen. Dafür wurde das Verhältnis von Dioxan:Wasser systematisch erhöht. Abbildung 114 B gibt eine Übersicht über die Schichtdicken mit zunehmender Polymerisationsdauer. Wieder zeigte sich ein zunächst linearer Anstieg, der nach einer Abflachung in einem Plateau endete. Im Lösungsmittelgemisch höchster Polarität (Dioxan:Wasser 20:80) war dieser Anstieg am steilsten, das Kettenwachstum also am schnellsten und auch die erreichten Schichtdicken waren mit ~ 64 nm am höchsten.

DEMONSTRATION DES LEBENDIGEN CHARAKTERS DER POLYMERISATION

Der beschriebene Mechanismus der oberflächeninitiierten RAFT-Polymerisation mit dem verwendeten CTA-Molekül legt nahe, dass die Reaktion durch wiederholte Zugabe der Reaktionspartner neu gestartet werden kann. Um diesen „lebenden“ Charakter zu demonstrieren, wurden Polymerfilme erneut der Polymerisationslösung ausgesetzt. In Abbildung 115 werden die Schichtdicken des ersten Polymerisationsschrittes, die Gesamtdicke nach dem zweiten Schritt und der Zuwachs durch diesen zweiten Schritt verglichen. Es zeigte sich, dass das Polymerwachstum auch im zweiten Schritt stattfand. Erstaunlicherweise waren die Kinetiken der beiden Schritte sogar nahezu identisch.

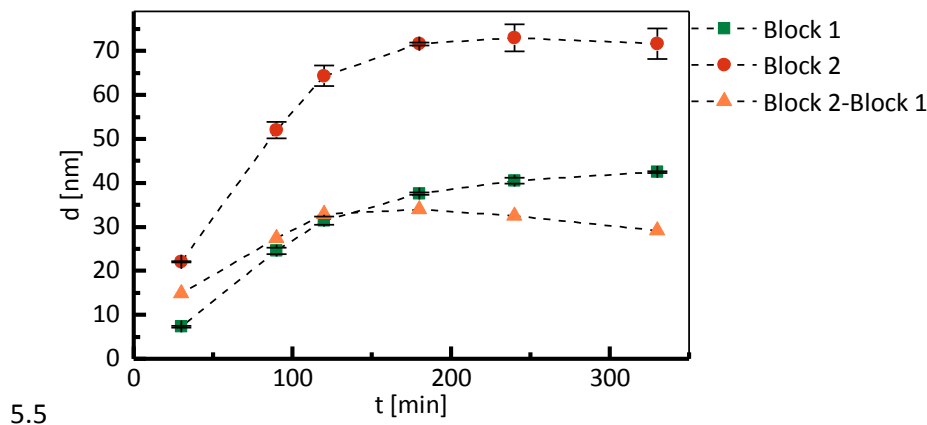


Abbildung 115. Schichtdickenentwicklung mit steigender Polymerisationsdauer für die RAFT-Polymerisation von HEMA zum Beweis des lebendigen Charakters. Block 1 zeigt die Schichtdicken einer ersten Polymerisation, Block 2 zeigt die Gesamtschichtdicke nach erneuter Polymerisation auf den gleichen Oberflächen, Block 1-Block 2 zeigt durch die Differenz der beiden Blöcke die Zunahme bei der zweiten Polymerisation. Die Werte wurden durch spektrale Ellipsometrie bestimmt. Jeder zeigt das Mittel aus drei Messungen pro probe, Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Diese Beobachtung zeigte einerseits, dass die Aktivität des CTAs nicht von der Kettenlänge abhängig war und andererseits, dass der Kettenabbruch durch Rekombinationen im ersten Schritt minimal war.

4.3.2 Stabilität der pHEMA-Filme

Die Stabilität der präparierten pHEMA-Filme wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen in verschiedenen, für biologische Experimente relevanten Medien, getestet. MilliQ®-Wasser enthält keinerlei weitere Zusätze und zeigt daher die Stabilität im wässrigen Milieu. Künstliches Meerwasser (SW) wurde verwendet, um die marine Umgebung zu simulieren, ohne Störfaktoren wie die Bildung eines Konditionierungsfilms berücksichtigen zu müssen. CASO und M9 sind Medien zur Bakterienkultivierung, die beispielsweise für *Pseudomonas aeruginosa* verwendet werden. Sie enthalten neben Salzen vor allem Proteine und Zucker. Es wurden drei verschieden dicke Filme getestet, um eine eventuelle Abhängigkeit von diesem Faktor mit einbeziehen zu können. Die Schichtdicken wurden vor und nach Inkubation durch spektrale Ellipsometrie bestimmt und zur besseren Vergleichbarkeit auf den Anfangswert normiert (Abbildung 116).

Das keine weiteren Ionen enthaltende MilliQ®-Wasser zeigte keine Auswirkungen auf die Filme. Nach der Inkubation wich keiner der gemessenen Werte maßgeblich vom Anfangswert ab. SW zeigte keinen Effekt bei den mittleren getesteten Schichtdicken. Die beiden anderen allerdings wurden deutlich, wenn auch schwach, abgebaut. Am stärksten war dies beim 52 nm-Film sichtbar, der nach sieben Tagen um 15 % dünner wurde.

Nach der Inkubation in den Bakterienmedien konnte keine signifikante Veränderung der Schichtdicken festgestellt werden, alle gemessenen Werte lagen um die 100 % der zu Anfang bestimmten. Auch eine denkbare Zunahme durch die Anlagerung organischer Substanzen konnte dementsprechend nicht nachgewiesen werden.

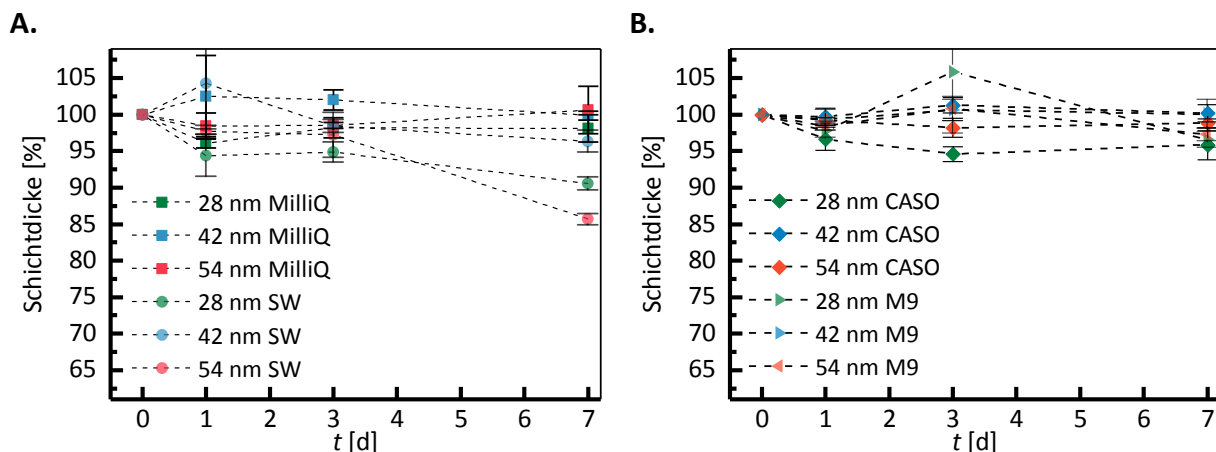


Abbildung 116. Entwicklung der relativen Schichtdicken von pHEMA-Filmen mit drei verschiedenen Schichtdicken bei Inkubation in A. MilliQ®-Wasser und SW. B. CASO und M9 über sieben Tage.

4.3.3 Proteinadsorption auf pHEMA-Oberflächen

Die Proteinresistenz der präparierten pHEMA-Filme wurde mit den beiden Hauptproteinen des Blutplasmas getestet. Fibrinogen stammte dabei aus bovinem Serum, das Albumin aus humanem Material (HSA- humanes Serumalbumin). Es wurden verschieden dicke Filme verwendet, um einen eventuellen Schichtdickeneinfluss auf das Resistenzverhalten zu identifizieren. Die Ergebnisse der ellipsometrisch bestimmten adhärennten Proteinschicht nach Inkubation in der jeweiligen Proteinlösung sind in Abbildung 117 zusammengefasst. Im Vergleich zur hydrophoben, nicht-proteinresistenten SAM-Referenz DDT reduzierten alle untersuchten pHEMA-Filme die Adhäsion der beiden Testproteine.

Dennoch waren die dünneren Filme nicht vollständig resistent und erlaubten noch die Adhäsion geringer Mengen der Makromoleküle. Auf Filmen ab 20 nm Schichtdicke war keine Adhäsion der Proteine mehr nachweisbar.

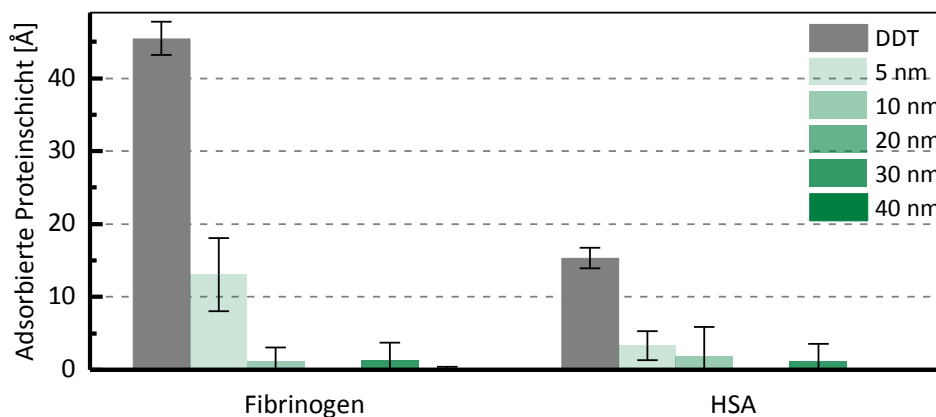


Abbildung 117. Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken von adsorbierten Proteinen auf pHEMA-Filmen verschiedener Schichtdicken.

Dieses Resultat stimmt mit kürzlich veröffentlichten Daten zur Fibrinogenadsorption von Poly(HEMA-PEG)-Blockpolymeren überein, die ebenfalls eine schichtdickenabhängige Proteinresistenz aufwiesen.³² Yandi *et al.* führten ihre Ergebnisse auf die zunehmende Hydratation der Polymerfilme mit wachsender Schichtdicke zurück.

4.3.4 Zusammenfassung

Für die anwendungsbezogenere Beschichtung von Oberflächen werden meist dickere Filme als die in den ersten beiden Teilen der Arbeit vorgestellten Modellsysteme untersucht. Zur Präparation solcher Schichten eignet sich beispielsweise die RAFT-Polymerisation. Da diese mit einer weiten Bandbreite von Monomeren kompatibel ist, stellt sie ein mögliches Verfahren für die Herstellung von zwitterionischen Betainen oder auch Polysaccharidbaustein-enthaltenden Filmen dar.

In Kooperation mit der Gruppe von PROF. BARNER-KOWOLLIK wurde die RAFT-Polymerisation von HEMA, einem hydrophilen Modellmonomer, auf funktionalisierten Si-Oberflächen untersucht. Die Charakterisierung durch Kontaktwinkelmessungen, Ellipsometrie, AFM und XPS zeigte die erfolgreiche und homogene Präparation der gewünschten Oberflächen, deren Benetzbarkeit und Homogenität nicht schichtdickenabhängig waren. Untersuchungen zur Kinetik der Reaktion unter verschiedenen Reaktionsbedingungen demonstrierten die kontrollierte Natur des ablaufenden Mechanismus. Das Verhältnis von zusätzlichem CTA zum Initiator in der Reaktionslösung bestimmte die maximal erreichbare Kettenlänge und die damit verbundene Filmdicke. Die Polymerisierung lief in Lösungsmittelgemischen mit zunehmender Polarität schneller ab, auch hier war die Länge des Polymers und damit die Schichtdicke der Filme unterschiedlich. Der lebende Charakter des Mechanismus und die Eignung der Polymerstränge zur erneuten Initialisierung von Polymerisationen konnte anhand einer zweistufigen Polymerisation demonstriert werden. Die präparierten Oberflächen zeigten sich stabil in reinem Wasser und in zwei Bakterienkulturmedien. In einem Medium mit hoher Salinität (SW) dagegen wurde nach sieben Tagen ein deutlicher Abbau der Schichten beobachtet. Wie für pHEMA-Oberflächen charakteristisch, zeigte sich in einem Inkubationsexperiment eine deutliche Abnahme der adhärenierten Proteinschicht. Eine vollständige Resistenz wurde erst bei Schichtdicken ab ~ 20 nm beobachtet. Diese Abhängigkeit der Proteinadsorption von der Schichtdicke war durch die Abhängigkeit der Hydratation von diesem Faktor erklärbar.

5 VERGLEICHE, ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Marines *Biofouling* beeinflusst die Funktion aller künstlichen Oberflächen, die mit Meerwasser in Kontakt kommen, es betrifft beispielsweise Schiffsrümpfe, Aquakulturanlagen und Sensoren. Die Verhinderung dieser unerwünschten Ablagerungen von Makromolekülen und Mikroorganismen stellt ein ungelöstes Problem mit hohem ökonomischem Interesse dar. Das komplexe Zusammenspiel von adhäsiven Grenzflächenprozessen auf verschiedenen Größen- und Zeitskalen macht die Identifizierung und Anwendung wirksamer *Antifouling*-Strategien außerdem zu einem interdisziplinären Forschungsgebiet. Um ein mechanistisches Verständnis der verschiedenen, für diese Adhäsionsprozesse relevanten Faktoren zu gewinnen, hat es sich bewährt, einzelne Modellorganismen mit gut charakterisierten Eigenschaften auf Modelloberflächen mit reduzierter Komplexität zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe verschiedener Oberflächenbeschichtungstechniken Substrate mit definierten Eigenschaften präpariert, um den Einfluss dieser auf diverse Mikroorganismen zu untersuchen. Den ausgewählten Beschichtungsklassen war ihre Hydratation gemeinsam. Sie orientierten sich an Materialien mit bekannten Potential oder Anwendungsbeispielen: Zwitterionische Polymere, hydrophile Polysaccharide und polymeres Hydroxyethylmethacrylat zeichnen sich neben ihrer ausgeprägten Fähigkeit zur Wasseranbindung durch hohe Hydrophilie aus. Diese unterschiedlichen Klassen wurden durch Modellsysteme, als selbst-assemblierte Monolagen (SAMs), immobilisierte Polymerketten oder von der Oberfläche polymerisiertes Material, repräsentiert. Im nächsten Schritt wurden die auf unterschiedlichen Wegen präparierten Oberflächen zunächst durch Kontaktwinkelgoniometrie, spektrale Ellipsometrie und Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) charakterisiert.

Zur Darstellung der SAMs dienten Mischungen aus (gelösten) Thiolen mit unterschiedlichen Endgruppen, anhand derer der Einfluss verschiedener Ladungen und zwitterionischer Eigenschaften untersucht wurde. Als positive Komponente wurde stets ein trimethylammoniumterminiertes Alkanthiol (TMAT) eingesetzt, die anionischen Gegenstücke waren SAT mit Sulfonat-, MUDA mit Carboxyl- und MUPA mit Phosphonatterminierung. Die untersuchten Lösungen mit 1 mM und 0,2 mM-Gesamtkonzentration der Thiole zeigten sich für die Präparation von MUPA-haltigen SAMs als nicht verwendbar, da Multilagen gebildet wurden. Hingegen stellte sich für die anderen anionischen Komponenten SAT und MUDA und ihrer Kombinationen mit TMAT die niedrigere Konzentration als geeignet heraus. Die Analyse ihrer Präparation zeigte, dass die Assemblierung solcher ladungsträgerterminierter Moleküle aus gemischten Ansatzlösungen anderen Mechanismen folgte, als die analoger neutraler Alkanthiole. Für letztgenannte zeigte sich ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung der verwendeten Präparationslösung und der resultierenden Oberfläche. Im Fall der geladenen Thiole dagegen war die assemblierte Monolage über einen weiten Bereich von Lösungsverhältnissen (~ 5 - 95 %iger Anteil einer Komponente) aus gleichen Anteilen beider Thiole zusammengesetzt. Diese „ideale Nichtidealität“ war auf einen Ladungsausgleich bzw. die Bildung von Ionenpaaren als dominierende Triebkraft bei der Assemblierung zurückzuführen. Die veränderte Interaktion dieser zwitterionischen Oberflächen mit

Wassermolekülen wurde durch einen signifikant niedrigeren Kontaktwinkel der gemischten Monolagen im Vergleich zu den reinen Komponenten deutlich.

Als zweite untersuchte Substanzklasse wurden immobilisierte Polysaccharide verwendet. Diese sind eine Klasse von Biopolymeren, deren vielfältige Funktionen häufig mit ihrer ausgeprägten Hydratation zusammenhängen. Glykosaminoglykane sind Vertreter dieser Gruppe, die über Carboxylgruppen verfügen, welche zur Funktionalisierung oder Anbindung an Oberflächen genutzt werden können. Ein Nachteil dieser Materialien bei Verwendung im marinen Medium ist ihre Fähigkeit zur Komplexbildung von zweiwertigen Kationen, die zu einer Versteifung des Polymerrückgrates bei gleichzeitigem Verminderung der Hydratation führt. Als Lösungsansatz sollte daher im Rahmen dieser Arbeit eine Blockierung dieser Komplexbildungsfähigkeit die Resistenzeigenschaften von immobilisierten Polysacchariden verbessern und zusätzlich amphiphile Eigenschaften im hydrophilen Polymernetzwerk etablieren. Drei strukturell ähnliche saure Polysaccharide, Alginsäure (AA), Hyaluronsäure (HA) und Chondroitinsulfat (CS), wurden daher zunächst kovalent an aminoterminierte Substrate angebunden. In einer anschließenden Derivatisierungsreaktion erfolgte die Modifizierung ungebundener Carboxylgruppen mit einem hydrophoben Amin (Trifluorethylamin, TFEA). Der Kontaktwinkel der zunächst extrem hydrophilen Beschichtungen erhöhte sich bei den resultierenden amphiphilen Oberflächen um durchschnittlich 10°. Die Ausbeute der Reaktion konnte dabei, abhängig von der Disaccharideinheit, mit (6 - 9) % der gesamt vorhandenen Säuregruppen quantifiziert werden. Des Weiteren zeigte sich die Derivatisierung homogen in der gesamten oberflächengebundenen PS-Schicht. Eine weitere direkt spektroskopisch nachweisbare Auswirkung war die Abnahme der Anbindung von Ca(II)-Ionen aus marinem Medium, was an dieser Stelle die eingangs formulierte Hypothese verifiziert.

Als weitere Klasse hydrophiler Polymere wurden in Kooperation mit der Gruppe von PROF. C. BARNER-KOWOLLIK durch Oberflächen-initiierte radikalische Polymerisation präparierte Poly(Hydroxyethylmethacrylat)-Filme (pHEMA) untersucht. In diesem Teil der Arbeit stand in erster Linie der Schichtdickeneinfluss auf die biologische Antwort im Vordergrund. Ähnlich wie bei der Immobilisierung der Polysaccharide bestand der erste Schritt in der Silanisierung der Oberflächen, die die nachfolgende Reaktion ermöglichte. Unter variierenden Bedingungen wurde im Anschluss der Einfluss des verwendeten Lösungsmittels und der Konzentrationen des kettenwachstumkontrollierenden Reagenz (CTA) auf die RAFT-Polymerisation analysiert. Es zeigte sich, dass die durchgeführten Bedingungen zu kontrollierten radikalischen Reaktionen führten. Außerdem war eine Reinitiiierung möglich, was zudem einen lebendigen Charakter des Reaktionsmechanismus bewies. Diese Eigenschaft der funktionellen Beschichtungen eröffnet die Möglichkeit, die vorliegende Funktionalität mit weiteren, wie beispielsweise zwitterionischen oder polysaccharidbasierten, zu kombinieren.

Alle präparierten Oberflächen wurden zunächst auf ihre Stabilität in einem Medium hoher Salinität untersucht. Stellvertretend für Meerwasser diente dabei eine proteinfreie Lösung von Salzen mit entsprechender Zusammensetzung, um die Anlagerung organischer Materialien zu unterbinden. In Abbildung 118 sind noch einmal die prozentual verbleibenden Schichtdicken nach sieben bzw. zehn Tagen für die verschiedenen Substanzklassen gegenüber gestellt. Im Fall der SAMs zeigte sich ein

ausreichend langes Alkylrückgrat als entscheidend für eine Widerstandsfähigkeit gegen den Abbau, was sich beispielsweise im Vergleich der beiden Ethylenglykol-(EG)-terminierten Thiole PEG (ohne Alkylkette) und EG6 (mit Alkylkette) zeigte. Auch gegenüber den untersuchten Polymeren waren diese einfachen SAM-Systeme stabiler. Die Polysaccharide wurden nach der einwöchigen Inkubation im Salzwasser signifikant dünner, während dieser Abbau für die pHEMA-Filme weniger stark ausfiel. Anhand dieser beiden Klassen zeigte sich, dass das kovalent gebundene Rückgrat auch für die polymeren Systeme der entscheidende Stabilitätsfaktor war. Für die Zeiträume der folgenden biologischen Evaluierungen ergab sich dennoch für alle Substanzklassen eine ausreichende Widerstandsfähigkeit.

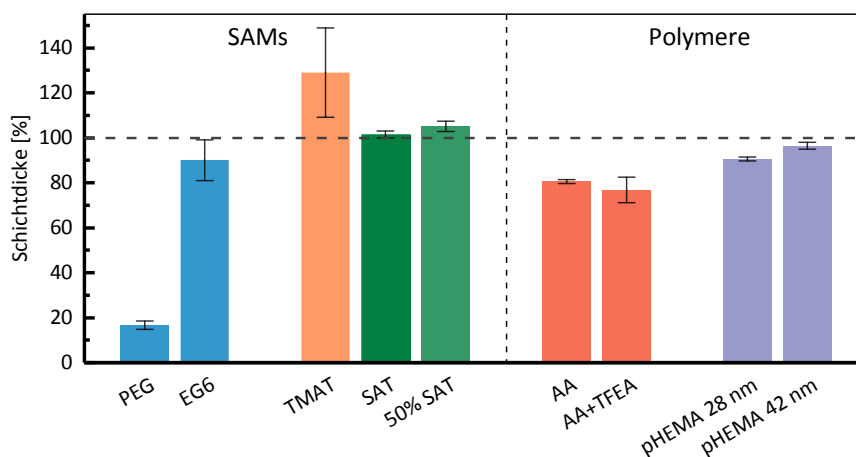


Abbildung 118. Vergleich der Stabilitäten der verschiedenen untersuchten Substanzklassen. Dargestellt sind die zurückbleibenden Schichtdicken nach einem vergleichbaren Inkubationszeitraum (SAMs: zehn Tage, Polymere: sieben Tage).

Die Proteinadsorption ist ein entscheidender Schritt beim komplexen *Biofouling*-Prozess, da einerseits ihre Anlagerung nachfolgende Organismen beeinflussen kann und andererseits die Haftmittel dieser Organismen zu großen Teilen aus solchen Makromolekülen bestehen. Die Resistenz gegen eine solche Adsorption ist daher eine Kerneigenschaft inerter Oberflächenbeschichtungen. Abbildung 119 vergleicht stellvertretend für die durchgeführten Proteinadsorptionsexperimente die adsorbierte Schichtdicke des unter den experimentellen Bedingungen negativen Fibrinogens auf Vertretern aller im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Substanzklassen. Alle Oberflächen, die die Fähigkeit zur Hydratisierung aufwiesen (gemischte geladene SAMs, Polysaccharide und pHEMA) unterdrückten die Anhaftung der Makromoleküle nahezu vollständig. Für SAMs mit variierender Benetzbarkeit (gezeigt: hydrophobes DDT und hydrophiles HUDT) zeigte sich die literaturbekannte stärkere Reduzierung der Proteinadsorption für hydrophile Substrate, wogegen bei den geladenen Monolagen der Ladungszustand bestimmend war. Für die Polysaccharid-beschichteten Oberflächen stellte sich heraus, dass die Derivatisierung die bekannte Proteinresistenz nicht verminderte. Im Fall der unterschiedlich dicken pHEMA-Substrate wurde eine Abhängigkeit von der Schichtdicke festgestellt, was wiederum mit einer zunehmender Hydratation bei zunehmender Filmdicke erklärt werden konnte.

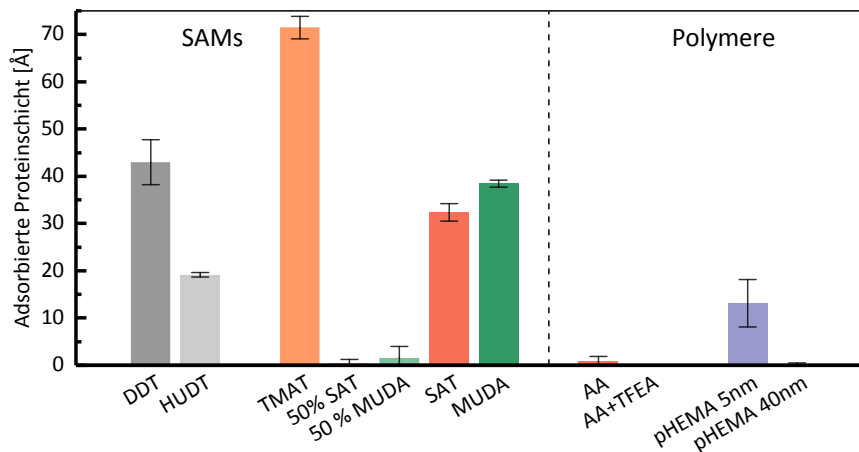


Abbildung 119. Vergleich der adsorbierten Fibrinogen-Schichten auf den unterschiedlichen evaluierten Substanzklassen.

Repräsentativ für marine, biofilm-bildende Bakterien wurde auf den Polysaccharid-Beschichtungen die kritischen Scherströmungen τ_{50} von *C. marina* in mikrofluidischen Untersuchungen evaluiert. Dieser, für das durchgeführte Experiment charakteristische Wert, beschreibt die typische Scherströmung, bei der 50 % der initial anhaftenden Organismen von der Oberfläche abgespült wurden. Für Organismen vergleichbarer Größe und Geometrie erlaubt er einen qualitativen Vergleich ihrer Haftstärken. Für die Polysaccharid-Beschichtungen lagen diese τ_{50} -Werte im Bereich von kurzkettingen EG-SAMs (EG1 und EG3). Im Fall von AA und HA nahm sie nach der Modifizierung ab, auf dem zusätzlich CS dagegen, das im Vergleich mit den anderen untersuchten Polysacchariden eine zusätzliche Sulfatgruppe trug, zu. Diese Tendenzen wurden auch in den nachfolgenden Experimenten mit marinen Spezies beobachtet und sprachen somit für unterschiedliche Wirkmechanismen der strukturell ähnlichen Disaccharid-Einheiten.

Weitere zu den *Mikrofoulern* zählende Organismen, die eine Oberfläche in mariner Umgebung zuerst besiedeln, sind Diatomeen. Ein mikrofluidisches Experiment, analog dem für *C. marina* durchgeführten, ermöglichte es, die kritische Scherströmung τ_{50} für die Spezies *N. perminuta* auf den unterschiedlichen Substanzklassen zu vergleichen (Abbildung 120). Da diese Mikroorganismen ihren Adhäsionsort passiv erreichen, ist es nicht die initiale Besiedlungsdichte, sondern die permanente Anbindung an eine Oberfläche, die im Kontext von *Antifouling*-Anwendungen relevant ist. Analoge vorangegangene Untersuchungen auf SAMs zeigten einen Einfluss der Benetzbarkeit, die in Abbildung 120 angedeutet ist. Des Weiteren wurde die Hydratation als entscheidend für eine schwache Haftung dieser Algenklasse identifiziert, was beispielsweise auf PEG-SAMs deutlich wurde. Auch die in dieser Arbeit präsentierten gemischten SAT-SAMs wiesen eine solche Hydratation auf und die τ_{50} -Werte lagen im erwarteten niedrigen Bereich. Auf dem positiven TMAT-SAM dagegen hafteten die Diatomeen fester als durch den Kontaktwinkel vermutet, was auf die positive Oberflächenladung zurückgeführt wurde. Auch auf den Polysaccharidoberflächen war die Anhaftung der Diatomeen stärker als bei anderen entsprechenden hydratisierten Oberflächen (wie beispielsweise PEG). Zudem konnten keine Veränderung durch die Modifizierungsreaktion mit TFEA festgestellt werden. In diesem Fall lag die Vermutung nahe, dass es Wechselwirkungen mit den von den Carboxylgruppen komplexierten Ca(II)-Ionen waren, die diese im Verhältnis starke Adhäsion verursachte. Die Kationen spielen im Adhäsionsprozess der Kieselalgen eine entscheidende Rolle. Zudem war die Ausbeute der

Derivatisierung gering und die damit bewirkte verminderten Ca-Komplexierung reichte nicht aus, um signifikante Änderungen auf die Mikroorganismen zu bewirken.

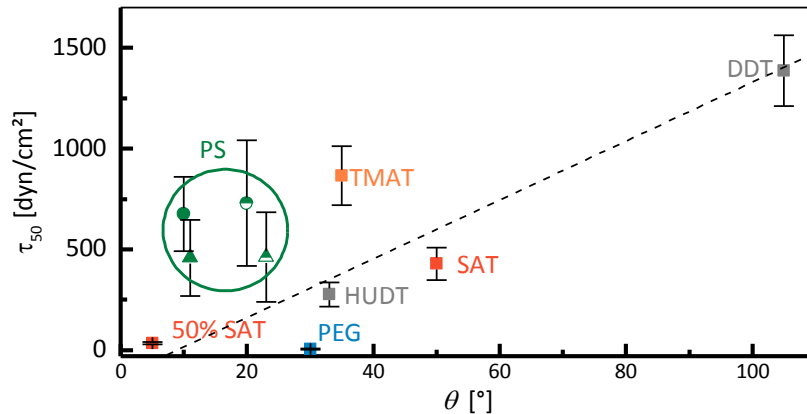


Abbildung 120. Vergleich der kritischen Scherströmungen τ_{50} von *N. perminuta* für die verschiedenen untersuchten Substanzklassen, aufgetragen gegen die statischen Wasserkontaktwinkel der Beschichtungen. Außerdem gezeigt sind die Werte für den hydrophilen HUDT- bzw. hydratisierten PEG-SAM.⁷⁶ Quadrate illustrieren die SAM-Daten, grüne Symbole Polysaccharid-Daten.

Eine mit *N. perminuta* eng verwandte Spezies ist *N. incerta*, dessen Adhäsionsverhalten in einem statischen Besiedlungsexperiment analysiert wurde. Auch hier war vor allem ein Vergleich der Zelldichten direkt nach der Inkubation und nach dem Aussetzen der adhären Organismen in einem Flusskanal mit konstanter Scherspannung von Interesse (Abbildung 121). Zusätzlich zu den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen auf ladungsterminierten SAMs sind Daten auf Polysaccharid-Oberflächen aus einer vorangegangenen Arbeit gezeigt.²⁹⁶ Im Vergleich zu den in mikrofluidischen Experimenten gewonnen Erkenntnissen fällt vor allem auf, dass das Adhäsionsverhalten der Diatomeen auf den Zuckersubstraten weniger deutlich von dem auf den SAM-Oberflächen abwich. Wie auch im Fall von *N. perminuta* konnte für diese Substanzklasse keine abgeschwächte Adhäsion aufgrund von Hydratationseffekten beobachtet werden. Ein Einfluss der Ladung konnte für die reinen Monolagen TMAT, SAT und MUDA nicht gezeigt werden, auf ihnen war die Adhäsionsstärke von der Benetzbarkeit bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse ließen sich mit der Tendenz zu einer stärkeren Adhäsion auf hydrophoberen Substraten in Einklang bringen. Die vergleichsweise schwächste Haftung zeigte sich auf sulfonathaltigen zwitterionischen Oberflächen, was auch für diese Spezies den dominierenden Einfluss von elektrostatischer Hydratation demonstrierte.

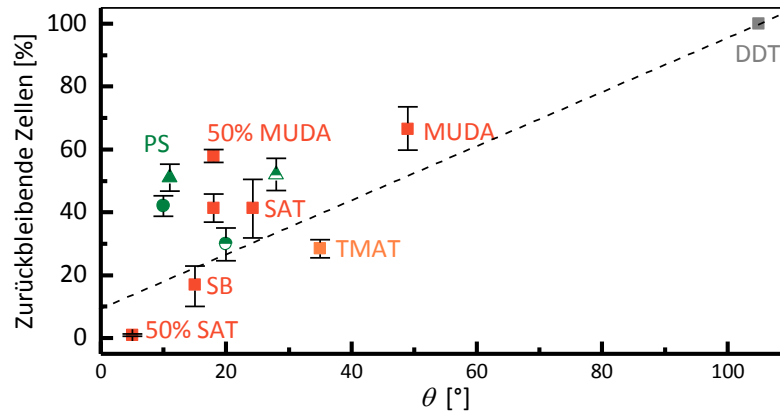


Abbildung 121. Vergleich der prozentual zurückbleibenden *N. incerta* nach der Behandlung in einem turbulenten Flusskanal für die verschiedenen untersuchten Substanzklassen, aufgetragen gegen die statischen Wasserkontaktwinkel der Beschichtungen. Die Daten zu den Polysaccharid-Oberflächen stammen aus einer vorangegangenen Studie.²⁹⁶ Quadrate illustrieren SAM-Daten, grüne Symbole Polysaccharid-Daten.

Auf den geladenen Monolagen wurde außerdem eine Veränderung der initialen Adhäsion bei Anwesenheit von Oberflächenladungen beobachtet. Diese konnte mit einer verminderten Bewegungsfähigkeit der Diatomeen auf diesen Substraten zurückgeführt werden.

Stellvertretend für weiche *MikrofoULER* sind auch Sporen der Grünalge *U. linza* ein häufig verwendeter Modellorganismus. Anders als *Navicula* sind sie im freien Wasser, also vor Erreichen eines potentiellen Adhäsionsortes, motil und damit fähig zur aktiven Selektion einer Oberfläche. Ihr Siedlungs- und Adhäsionsverhalten wurde ebenfalls in einem statischen Inkubationsexperiment untersucht, bei dem die Testoberflächen einer Sporensuspension ausgesetzt wurden. Die Dichte der adhärenen Sporen zeigte dabei zunächst, wie attraktiv eine Oberflächenbeschichtung für die Zellen war (Abbildung 122). Die quantitativen Ergebnisse von unabhängigen Experimentdurchführungen lassen sich dabei nicht direkt vergleichen, da die genaue Besiedlungsdichte stets auch vom jeweiligen Sporenzustand abhing. Da die Algen nicht kultiviert wurden und daher für jedes Experiment geerntet wurden, schwankt dieser Parameter. Eine interne Normierung der vorliegenden Experimente war ebenso nicht möglich, da unterschiedliche Referenzoberflächen verwendet wurden. Dennoch lieferten die gezeigten Daten einen Überblick über generelle Adhäsionstendenzen der Sporen: Auf den geladenen und gemischten SAMs zeigten sie ein komplexes initiales Besiedlungsverhalten, das weder eindeutig von der Benetzbarkeit noch von der Hydratation der Oberfläche bestimmt war. Dominant zeigten sich dagegen die Endgruppen der Monolagen, beispielsweise wurden die beiden anionischen Komponenten unterschiedlich dicht besiedelt. Für ungeladene SAMs dagegen ist eine lineare Abhängigkeit zwischen Kontaktwinkel und Besiedlungsdichte bekannt.¹⁶ Auch für die Polysaccharidsubstrate wurde eine starke Selektion zwischen den unterschiedlichen Einheiten beobachtet, am unattraktivsten waren sowohl die modifizierte als auch die unmodifizierte HA-Oberfläche.

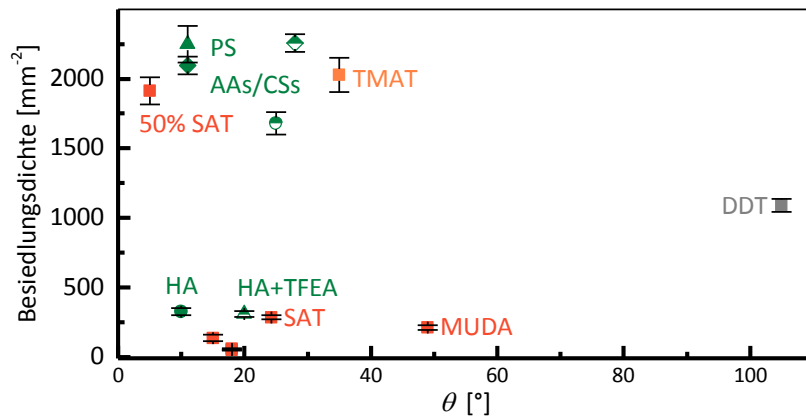


Abbildung 122. Vergleich der Besiedlungsdichte von *U. linza*-Sporen nach 45-minütiger Inkubation auf den verschiedenen Substanzklassen, aufgetragen gegen die statischen Wasserkontaktwinkel der Beschichtungen. Quadrate zeigen SAM-Daten, grüne Symbole Polysaccharid-Daten.

Ähnliche wie für *N. incerta* wurde auch der Anteil zurückbleibender Sporen der Sporen nach dem Ablösen der Organismen in einem Flusskanal verglichen. Auch hier zeigten sich keine einfachen Zusammenhänge, einheitlich war allerdings eine schwache Haftung der Sporen auf den negativen SAMs und den zwitterionischen Mischungen. Bemerkenswert war vor allem, dass nach der Behandlung im Flusskanal praktisch keine Sporen mehr auf den zwitterionischen Mischungen zu finden waren. Analog zum Besiedlungsverhalten nahmen im Vergleich der Polysaccharide wieder die HA-Filme durch einen signifikant niedrigeren Anteil zurückbleibender und somit stark anhaftender Zellen eine Sonderstellung ein.

Larven von Seepocken wie die der Spezies *B. amphitrite* sind kompliziertere Organismen als die einzelligen Algensporen und Diatomeen. Sie verfügen über hochentwickelte Schwimm- und Sensororgane, mit deren Hilfe sie Oberflächen vor einer permanenten Adhäsion zunächst untersuchen. Ihr Besiedlungs- und Explorationsverhalten wurde auf den Polysaccharidbeschichtungen analysiert. Es zeigten sich zunächst ähnliche Tendenzen wie für die Spezies der *Mikrofouler*: Die durchgeführte Modifizierung der Beschichtungen verminderte die Besiedlung für AA und HA, während für CS keine Unterschiede beobachtet wurden. Durch stereoskopische Untersuchungen konnte außerdem gezeigt werden, dass die Larven sich auf attraktiveren Oberflächen, im untersuchten Fall AA gegenüber HA-Substraten, schneller bewegten.

Um die Leistungsfähigkeit der in dieser Arbeit verwendeten Modelloberflächen im Hinblick auf ihr Verhalten im natürlichen aquatischen Raum zu testen, wurden diese einem realen marinen Umfeld ausgesetzt. Anders als auf Laborebene mit definierten Bedingungen, greift in diesem eine Vielzahl von Faktoren ineinander, die sich gegenseitig verstärken oder abschwächen können. Feldtests ermöglichen es somit, anders als Experimente mit Einzelspezies, dieses Zusammenspiel mit zu berücksichtigen. Die unterschiedlichen Modelloberflächen wurden daher an der Ostküste von Florida der dortigen marinen Population ausgesetzt, um die adhärenen Organismen zu identifizieren und zu quantifizieren. In allen Fällen wurden hauptsächlich Diatomeen unterschiedlicher Gattungen beobachtet. Auf den ladungsterminierten und gemischten SAMs wurden erst nach 48 h Unterschiede in der Anzahl der adhärenen Organismen festgestellt, nach diesem Zeitraum war diese auf Monolagen, die entgegengesetzte Ladungsträger (TMAT und SAT) enthielten, signifikant reduziert.

Auf den Polysaccharidoberflächen konnte schon nach 24 h ein differenziertes Adhäsionsverhalten beobachtet werden. Auf den drei unterschiedlichen Polysacchariden zeigten sich keine Unterschiede, ihre modifizierten Derivate dagegen wurden unterschiedlich stark besiedelt. Für AA und HA nahm dabei die Organismenzahl im Vergleich zur unmodifizierten Form ab, während sie für CS-Oberflächen zunahm.

Insgesamt zeigten die biologischen Evaluierungen der ladungsträgerterminierten SAMs, dass die Adhäsion der marinen Organismen nicht von einfachen elektrostatische Wechselwirkungen durch die sie umgebenden EPS bestimmt war. Die gleichzeitige Präsenz entgegengesetzter Ladungen, eine zwitterionische Oberflächenstruktur also, veränderte die Adsorptions- und Adhäsionsverhalten signifikant in Richtung von *Antifouling*- und *Foulingrelease*-Eigenschaften. An dieser Stelle bieten sich Anschlussstudien mit weiteren Organismen, wie beispielsweise den komplexen Cypridlarven, an. Auch das Explorationsverhalten von relevanten Modellspezies verspricht eine vielversprechende Quelle zum Informationsgewinn der Wirkungsweise dieser Substanzklasse zu sein.

Für die Polysaccharidbeschichtungen konnte die eingangs formulierte Hypothese, dass eine Veränderung der Ca(II)-Ionenkomplexierung eine entscheidende Rolle beim Adhäsionsprozess der marinen Organismen spielt, bestätigt werden. Im Vergleich mit anderen Modelloberflächen war die Hydratisierung der immobilisierten Biopolymere allerdings schwächer ausgeprägt. Für zukünftige Studien mit dieser Substanzklasse bieten sich daher zwei Ansatzpunkte: Die kovalente Anbindung der Polymere müsste in eine Richtung optimiert werden, die die Wechselwirkung mit Wasser in einem Ausmaß, wie von den freien Polymerketten bekannt, zulässt. Des Weiteren hatte die durchgeführten Derivatisierung noch Potential zur Optimierung. Im Hinblick darauf bietet sich eine weitere Modifizierung dieser Reaktion an, beispielsweise durch die Veränderung der Polymere vor der Immobilisierung.

Diese Arbeit demonstrierte anhand von repräsentativen Modellorganismen die hohe Sensitivität der marinen *Biofouler* gegenüber unterschiedlichen Hydratisierungsmechanismen. Es wurde deutlich, dass zur endgültigen Lösung des *Biofouling*-Problems die optimale Kombination verschiedener Lösungsansätze notwendig ist.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] L. D. Chambers, K. R. Stokes, F. C. Walsh, R. J. K. Wood *Modern approaches to marine antifouling coatings*, Surface & Coatings Technology **2006**, *201*, 3642-3652.
- [2] M. Wahl *Marine epibiosis. 1. Fouling and antifouling- some basic aspects*, Marine Ecology Progress Series **1989**, *58*, 175-189.
- [3] J. F. Briand *Marine antifouling laboratory bioassays: an overview of their diversity*, Biofouling **2009**, *25*, 297-311.
- [4] A. Rosenhahn, S. Schilp, H. J. Kreuzer, M. Grunze *The role of "inert" surface chemistry in marine biofouling prevention*, Physical Chemistry Chemical Physics **2010**, *12*, 4275-4286.
- [5] A. Rosenhahn, T. Ederth, M. E. Pettitt *Advanced nanostructures for the control of biofouling: The FP6 EU Integrated Project AMBIO*, Biointerphases **2008**, *3*, IR1-IR5.
- [6] Barnacles on ship hull (Woods Hole Oceanographic Institution, **2014**) http://www.whoi.edu/cms/images/oceanus/archives-MC4-en_259634.jpg.
- [7] D. M. Yebra, S. Kiil, K. Dam-Johansen *Antifouling technology - past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings*, Progress in Organic Coatings **2004**, *50*, 75-104.
- [8] K. A. Dafforn, J. A. Lewis, E. L. Johnston *Antifouling strategies: History and regulation, ecological impacts and mitigation*, Marine Pollution Bulletin **2011**, *62*, 453-465.
- [9] E. Almeida, T. C. Diamantino, O. de Sousa *Marine paints: The particular case of antifouling paints*, Progress in Organic Coatings **2007**, *59*, 2-20.
- [10] P. E. Gibbs, G. W. Bryan, P. L. Pascoe *TBT-induced imposex in the dogwhelk, Nucella lapillus: Geographical uniformity of the response and effects*, Marine Environmental Research **1991**, *32*, 79-87.
- [11] S. M. Evans *Tributyltin Pollution: the Catastrophe that Never Happened*, Marine Pollution Bulletin **1999**, *38*, 629-636.
- [12] K. Kannan, J. Falandysz *Butyltin residues in sediment, fish, fish-eating birds, harbour porpoise and human tissues from the Polish coast of the Baltic Sea*, Marine Pollution Bulletin **1997**, *34*, 203-207.
- [13] C. M. Magin, S. P. Cooper, A. B. Brennan *Non-toxic antifouling strategies*, Materials Today **2010**, *13*, 36-44.
- [14] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides *Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology*, Chemical Reviews **2005**, *105*, 1103-1169.
- [15] M. Kind, C. Woll *Organic surfaces exposed by self-assembled organothiol monolayers: Preparation, characterization, and application*, Progress in Surface Science **2009**, *84*, 230-278.
- [16] J. A. Finlay, M. E. Callow, L. K. Ista, G. P. Lopez, J. A. Callow *The influence of surface wettability on the adhesion strength of settled spores of the green alga Enteromorpha and the diatom Amphora*, Integrative and Comparative Biology **2002**, *42*, 1116-1122.
- [17] L. K. Ista, M. E. Callow, J. A. Finlay, S. E. Coleman, A. C. Nolasco, R. H. Simons, J. A. Callow, G. P. Lopez *Effect of substratum surface chemistry and surface energy on attachment of marine bacteria and algal spores*, Applied and Environmental Microbiology **2004**, *70*, 4151-4157.
- [18] T. Ederth, P. Claesson, B. Liedberg *Self-Assembled Monolayers of Alkanethiolates on Thin Gold Films as Substrates for Surface Force Measurements. Long-Range Hydrophobic Interactions and Electrostatic Double-Layer Interactions*, Langmuir **1998**, *14*, 4782-4789.

- [19] K. L. Prime, 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*, 10714-10721.
- [20] S. Herrwerth, W. Eck, S. Reinhardt, M. Grunze *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*, 9359-9366.
- [21] S. Schilp, A. Kueller, A. Rosenhahn, M. Grunze, M. E. Pettitt, M. E. Callow, J. A. Callow *Settlement and adhesion of algal cells to hexa (ethylene glycol)-containing self-assembled monolayers with systematically changed wetting properties*, Biointerphases **2007**, *2*, 143-150.
- [22] S. Schilp, A. Rosenhahn, M. E. Pettitt, J. Bowen, M. E. Callow, J. A. Callow, M. Grunze *Physicochemical Properties of (Ethylene Glycol)-Containing Self-Assembled Monolayers Relevant for Protein and Algal Cell Resistance*, Langmuir **2009**, *25*, 10077-10082.
- [23] S. Chen, S. Jiang *A new avenue to nonfouling materials*, Advanced Materials **2008**, *20*, 335-338.
- [24] M. Morra, C. Cassinelli *Non-fouling properties of polysaccharide-coated surfaces*, Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition **1999**, *10*, 1107-1124.
- [25] N. B. Holland, Y. X. Qiu, M. Ruegsegger, R. E. Marchant *Biomimetic engineering of non-adhesive glycocalyx-like surfaces using oligosaccharide surfactant polymers*, Nature **1998**, *392*, 799-801.
- [26] X. Y. Cao, M. E. Pettit, S. L. Conlan, W. Wagner, A. D. Ho, A. S. Clare, J. A. Callow, M. E. Callow, M. Grunze, A. Rosenhahn *Resistance of Polysaccharide Coatings to Proteins, Hematopoietic Cells, and Marine Organisms*, Biomacromolecules **2009**, *10*, 907-915.
- [27] C. S. Gudipati, J. A. Finlay, J. A. Callow, M. E. Callow, K. L. Wooley *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*, 3044-3053.
- [28] S. Krishnan, R. Ayothi, A. Hexemer, J. A. Finlay, K. E. Sohn, R. Perry, C. K. Ober, E. J. Kramer, M. E. Callow, J. A. Callow, D. A. Fischer *Anti-biofouling properties of comblike block copolymers with amphiphilic side chains*, Langmuir **2006**, *22*, 5075-5086.
- [29] C. J. Weinman, J. A. Finlay, D. Park, M. Y. Paik, S. Krishnan, H. S. Sundaram, M. Dimitriou, K. E. Sohn, M. E. Callow, J. A. Callow, D. L. Handlin, C. L. Willis, E. J. Kramer, C. K. Ober *ABC Triblock Surface Active Block Copolymer with Grafted Ethoxylated Fluoroalkyl Amphiphilic Side Chains for Marine Antifouling/Fouling-Release Applications*, Langmuir **2009**, *25*, 12266-12274.
- [30] O. Wichterle, D. Lim *Hydrophilic gels for biological use*, Nature **1960**, *185*, 117-118.
- [31] C. Yoshikawa, A. Goto, Y. Tsujii, N. Ishizuka, K. Nakanishi, T. Fukuda *Surface interaction of well-defined, concentrated poly(2-hydroxyethyl methacrylate) brushes with proteins*, Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry **2007**, *45*, 4795-4803.
- [32] W. Yandi, S. Mieszkin, P. Martin-Tanchereau, M. E. Callow, J. A. Callow, L. Tyson, B. Liedberg, T. Ederth *Hydration and Chain Entanglement Determines the Optimum Thickness of Poly(HEMA-co-PEG₁₀MA) Brushes for Effective Resistance to Settlement and Adhesion of Marine Fouling Organisms*, Acs Applied Materials & Interfaces **2014**, *6*, 11448-11458.
- [33] J. A. Callow, M. E. Callow, *The Ulva Spore Adhesive System in Biological Adhesives* (Eds.: A. M. Smith, J. A. Callow), Springer, Berlin, **2006**, 63-78.
- [34] A. Chiovitti, T. Dugdale, R. Wetherbee, *Diatom Adhesives: Molecular and Mechanical Properties in Biological Adhesives* (Eds.: A. Smith, J. Callow), Springer Berlin Heidelberg, **2006**, 79-103.
- [35] K. Kamino, *Barnacle underwater attachment in Biological Adhesives* (Eds.: A. M. Smith, J. A. Callow), Springer, Berlin, **2006**, 145-166.

- [36] I. Y. Phang, N. Aldred, A. S. Clare, G. J. Vancso *Towards a nanomechanical basis for temporary adhesion in barnacle cyprids (Semibalanus balanoides)*, *Journal of the Royal Society Interface* **2008**, *5*, 397-401.
- [37] C. Shea, L. J. Lovelace, H. E. Smithsomerville *Delays marina as a model organism for studies of bacterial-colonization and biofilm formation*, *Journal of Industrial Microbiology* **1995**, *15*, 290-296.
- [38] P. J. Molino, R. Wetherbee *The biology of biofouling diatoms and their role in the development of microbial slimes*, *Biofouling* **2008**, *24*, 365-379.
- [39] J. A. Finlay, M. P. Schultz, G. Cone, M. E. Callow, J. A. Callow *A novel biofilm channel for evaluating the adhesion of diatoms to non-biocidal coatings*, *Biofouling* **2013**, *29*, 401-411.
- [40] M. E. Callow, J. A. Callow, J. D. Pickett-Heaps, R. Wetherbee *Primary adhesion of Enteromorpha (Chlorophyta, Ulvales) propagules: Quantitative settlement studies and video microscopy*, *Journal of Phycology* **1997**, *33*, 938-947.
- [41] M. E. Callow, J. A. Callow *Marine Biofouling: a sticky problem*, *Biologist* **2002**, *49*, 1-5.
- [42] E. R. Holm *Barnacles and Biofouling*, *Integrative and Comparative Biology* **2012**, *52*, 348-355.
- [43] J. S. Maki, A. B. Yule, D. Rittschof, R. Mitchell *The effect of bacterial films on the temporary adhesion and permanent fixation of cypris larvae, balanus amphitrite darwin*, *Biofouling* **1994**, *8*, 121-131.
- [44] S. Mieszkin, M. E. Callow, J. A. Callow *Interactions between microbial biofilms and marine fouling algae: a mini review*, *Biofouling* **2013**, *29*, 1097-1113.
- [45] F. Casse, G. W. Swain *The development of microfouling on four commercial antifouling coatings under static and dynamic immersion*, *International Biodeterioration & Biodegradation* **2006**, *57*, 179-185.
- [46] D. A. Spratt, D. Ready, J. Pratten, *Biofilms in Medicine* in *Biofouling* (Eds.: S. Dürr, J. C. Thomason), Wiley-Blackwell, Oxford, **2010**.
- [47] N. Wisniewski, M. Reichert *Methods for reducing biosensor membrane biofouling*, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2000**, *18*, 197-219.
- [48] M. P. Schultz *Effects of coating roughness and biofouling on ship resistance and powering*, *Biofouling* **2007**, *23*, 331-341.
- [49] M. P. Schultz, J. A. Bendick, E. R. Holm, W. M. Hertel *Economic impact of biofouling on a naval surface ship*, *Biofouling* **2010**, *27*, 87-98.
- [50] J. J. Corbett, H. W. Koehler *Updated emissions from ocean shipping*, *Journal of Geophysical Research-Atmospheres* **2003**, *108*.
- [51] K. Reise, S. Gollasch, W. J. Wolff *Introduced marine species of the North Sea coasts*, *Helgolander Meeresuntersuchungen* **1998**, *52*, 219-234.
- [52] R. L. A. Townsin, C.D., *Fouling control coatings using low surface energy, foul release technology* in *Advances in marine antifouling coatings and technology* (Ed.: C. Y. Hellio, D.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, **2009**, 693-708.
- [53] J. A. Callow, M. E. Callow *Trends in the development of environmentally friendly fouling-resistant marine coatings*, *Nature Communications* **2011**, *2*.
- [54] A. Jain, N. Bhosle *Biochemical composition of the marine conditioning film: implications for bacterial adhesion*, *Biofouling* **2009**, *25*, 13-19.
- [55] S. Abarzua, S. Jakubowski *Biotechnological Investigation for the Prevention of Biofouling. 1. Biological and Biochemical Principles for the Prevention of Biofouling*, *Marine Ecology-Progress Series* **1995**, *123*, 301-312.
- [56] D. M. Yebra, S. Kiil, C. E. Weinell, K. Dam-Johansen *Effects of marine microbial biofilms on the biocide release rate from antifouling paints - A model-based analysis*, *Progress in Organic Coatings* **2006**, *57*, 56-66.

- [57] I. Thome, M. E. Pettitt, M. E. Callow, J. A. Callow, M. Grunze, A. Rosenhahn *Conditioning of surfaces by macromolecules and its implication for the settlement of zoospores of the green alga *Ulva linza**, *Biofouling* **2012**, 28, 501-510.
- [58] A. W. Decho *Microbial biofilms in intertidal systems: an overview*, *Continental Shelf Research* **2000**, 20, 1257-1273.
- [59] P. Y. Qian, H. U. Dahms, *A Triangle Model: Environmental Changes Affect Biofilms that Affect Larval Settlement*, Springer Berlin Heidelberg, **2008**, 1-14.
- [60] D. Roberts, D. Rittschof, E. Holm, A. R. Schmidt *Factors influencing nitial larval settlement-temporal, spacial and surface molecular-components*, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **1991**, 150, 203-221.
- [61] W. E. G. Muller, X. H. Wang, P. Proksch, C. C. Perry, R. Osinga, J. Garderes, H. C. Schroder *Principles of Biofouling Protection in Marine Sponges: A Model for the Design of Novel Biomimetic and Bio-inspired Coatings in the Marine Environment?*, *Marine Biotechnology* **2013**, 15, 375-398.
- [62] A. Rosenhahn, G. H. Sendra *Surface Sensing and Settlement Strategies of Marine Biofouling Organisms*, *Biointerphases* **2012**, 7.
- [63] K. Iken, S. P. Greer, C. D. Amsler, J. B. McClintock *A new antifouling bioassay monitoring brown algal spore swimming behaviour in the presence of echinoderm extracts*, *Biofouling* **2003**, 19, 327-334.
- [64] J. P. Marechal, C. Hellio, M. Sebire, A. S. Clare *Settlement behaviour of marine invertebrate larvae measured by EthoVision 3.0*, *Biofouling* **2004**, 20, 211-217.
- [65] S. Maleschlijski, G. H. Sendra, A. Di Fino, L. Leal-Taixe, I. Thome, A. Terfort, N. Aldred, M. Grunze, A. S. Clare, B. Rosenhahn, A. Rosenhahn *Three Dimensional Tracking of Exploratory Behavior of Barnacle Cyprids Using Stereoscopy*, *Biointerphases* **2012**, 7.
- [66] M. Heydt, M. Pettitt, X. Cao, M. Callow, J. Callow, M. Grunze, A. Rosenhahn *Settlement Behavior of Zoospores of *Ulva linza* During Surface Selection Studied by Digital Holographic Microscopy*, *Biointerphases* **2012**, 7, 1-7.
- [67] S. Dobretsov, H. U. Dahms, P. Y. Qian *Inhibition of biofouling by marine microorganisms and their metabolites*, *Biofouling* **2006**, 22, 43-54.
- [68] G. Swain, A. C. Anil, R. E. Baier, F. S. Chia, E. Conte, A. Cook, M. Hadfield, E. Haslbeck, E. Holm, C. Kavanagh, D. Kohrs, B. Kovach, C. Lee, L. Mazzella, A. E. Meyer, P. Y. Qian, S. S. Sawant, M. Schultz, J. Sigurdsson, C. Smith, L. Soo, A. Terlizzi, A. Wagh, R. Zimmerman, V. Zupo *Biofouling and barnacle adhesion data for fouling-release coatings subjected to static immersion at seven marine sites*, *Biofouling* **2000**, 16, 331-344.
- [69] K. A. Zargiel, J. S. Coogan, G. W. Swain *Diatom community structure on commercially available ship hull coatings*, *Biofouling* **2011**, 27, 955-965.
- [70] G. W. Swain, M. P. Schultz *The testing and evaluation of non-toxic antifouling coatings*, *Biofouling* **1996**, 10, 187-197.
- [71] G. W. Swain, B. Kovach, A. Touzot, F. Casse, C. J. Kavanagh *Measuring the Performance of Today's Antifouling Coatings*, *Journal of Ship Production* **2007**, 23, 164-170.
- [72] L. Baumann, P. Baumann, M. Mandel, R. D. Allen *Taxonomy of aerobic marine eubacteria*, *Journal of Bacteriology* **1972**, 110, 402-429.
- [73] P. Stoodley, K. Sauer, D. G. Davies, J. W. Costerton *Biofilms as complex differentiated communities*, *Annual Review of Microbiology* **2002**, 56, 187-209.
- [74] V. Smetacek *Diatoms and the ocean carbon cycle*, *Protist* **1999**, 150, 25-32.
- [75] K.-H. Linne von Berg, H. Melkonian, *Der Kosmos-Algenführer*, Kosmos, Stuttgart, **2004**.
- [76] M. Alles, *Dissertation* Mikrofluidische Adhäsionsstärkemessungen der Diatomee *Navicula perminuta*, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **2014**.

- [77] P. H. Raven, R. F. Evert, S. E. Eichhorn, *Biologie der Pflanzen*, De Gruyter, Berlin, **2006**.
- [78] J. A. Callow, M. E. Callow, *Biofilms in Antifouling Compounds*, Vol. 42 (Eds.: N. Fusetani, A. Clare), Springer Berlin Heidelberg, **2006**, 141-169.
- [79] N. Aldred, A. S. Clare *The adhesive strategies of cyprids and development of barnacle-resistant marine coatings*, *Biofouling* **2008**, 24, 351-363.
- [80] D. Maruzzo, N. Aldred, A. S. Clare, J. T. Hoeg *Metamorphosis in the Cirripede Crustacean *Balanus amphitrite**, *Plos One* **2012**, 7.
- [81] *Balanus amphitrite* (Le Loux, A., **2009**) http://en.wikipedia.org/wiki/File:Balanus_amphitrite_7631.JPG.
- [82] J. P. Marechal, C. Hellio *Antifouling activity against barnacle cypris larvae: Do target species matter (*Amphibalanus amphitrite* versus *Semibalanus balanoides*)?*, *International Biodeterioration & Biodegradation* **2011**, 65, 92-101.
- [83] N. Aldred, A. Scardino, A. Cavaco, R. de Nys, A. S. Clare *Attachment strength is a key factor in the selection of surfaces by barnacle cyprids (*Balanus amphitrite*) during settlement*, *Biofouling* **2010**, 26, 287-299.
- [84] G. Walker *The early development of the cement apparatus in the barnacle *Balanus balanoides* (L.) (Crustacea: Cirripedia)*, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **1973**, 12, 305-314.
- [85] K. B. Blodgett *Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface*, *Journal of the American Chemical Society* **1935**, 57, 1007-1022.
- [86] J. Sagiv *Organized monolayers by adsorption. 1. Formation and structure of oleophobic mixed monolayers on solid-surfaces*, *Journal of the American Chemical Society* **1980**, 102, 92-98.
- [87] R. G. Nuzzo, D. L. Allara *Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces*, *Journal of the American Chemical Society* **1983**, 105, 4481-4483.
- [88] H. Sellers, A. Ulman, Y. Shnidman, J. E. Eilers *Structure and binding of alkanethiolates on gold and silver surfaces- implications for self-assembled monolayers*, *Journal of the American Chemical Society* **1993**, 115, 9389-9401.
- [89] R. C. Hoft, M. J. Ford, A. M. McDonagh, M. B. Cortie *Adsorption of Amine Compounds on the Au(111) Surface: A Density Functional Study*, *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, 111, 13886-13891.
- [90] P. E. Laibinis, G. M. Whitesides, D. L. Allara, Y. T. Tao, A. N. Parikh, R. G. Nuzzo *Comparison of the structures and wetting properties of self-assembled monolayers of normal-alkanethiols to the coinage metal-surfaces Cu, Ag, Au*, *Journal of the American Chemical Society* **1991**, 113, 7152-7167.
- [91] G. E. Poirier, E. D. Pylant *The Self-Assembly Mechanism of Alkanethiols on Au(111)*, *Science* **1996**, 272, 1145-1148.
- [92] O. Dannenberger, M. Buck, M. Grunze *Self-Assembly of n-Alkanethiols: A Kinetic Study by Second Harmonic Generation*, *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, 103, 2202-2213.
- [93] D. K. Schwartz *Mechanisms and kinetics of self-assembled monolayer formation*, *Annual Review of Physical Chemistry* **2001**, 52, 107-137.
- [94] A. Ulman *Formation and structure of self-assembled monolayers*, *Chemical Reviews* **1996**, 96, 1533-1554.
- [95] L. Strong, G. M. Whitesides *Structures of self-assembled monolayer films of organosulfur compounds adsorbed on gold single-crystals- electron-diffraction studies*, *Langmuir* **1988**, 4, 546-558.
- [96] L. H. Dubois, R. G. Nuzzo *Synthesis, structure, and properties of model organic-surfaces*, *Annual Review of Physical Chemistry* **1992**, 43, 437-463.

- [97] L. Strong, G. M. Whitesides *Structures of self-assembled monolayer films of organosulfur compounds adsorbed on gold single crystals: electron diffraction studies*, *Langmuir* **1988**, *4*, 546-558.
- [98] L. H. Dubois, B. R. Zegarski, R. G. Nuzzo *Molecular ordering of organosulfur compounds on Au(111) and Au(100): Adsorption from solution and in ultrahigh vacuum*, *The Journal of Chemical Physics* **1993**, *98*, 678-688.
- [99] P. Fenter, P. Eisenberger, J. Li, N. Camillone, S. Bernasek, G. Scoles, T. A. Ramanarayanan, K. S. Liang *Structure of CH₃(CH₂)₁₇SH self-assembled on the Ag(111) surface- an incommensurate monolayer*, *Langmuir* **1991**, *7*, 2013-2016.
- [100] C. Vericat, M. E. Vela, R. C. Salvarezza *Self-assembled monolayers of alkanethiols on Au(111): surface structures, defects and dynamics*, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2005**, *7*, 3258-3268.
- [101] Firmen-Website PVD-Beschichtungen (Georg Albert, Silz, **2009**) http://georg-albert-pvd.de/Home/substrat_silizium.html.
- [102] R. G. Nuzzo, F. A. Fusco, D. L. Allara *Spontaneously organized molecular assemblies. 3. Preparation and properties of solution adsorbed monolayers of organic disulfides on gold surfaces*, *Journal of the American Chemical Society* **1987**, *109*, 2358-2368.
- [103] T. Fyrner, H.-H. Lee, A. Mangone, T. Ekblad, M. E. Pettitt, M. E. Callow, J. A. Callow, S. L. Conlan, R. Mutton, A. S. Clare, P. Konradsson, B. Liedberg, T. Ederth *Saccharide-Functionalized Alkanethiols for Fouling-Resistant Self-Assembled Monolayers: Synthesis, Monolayer Properties, and Antifouling Behavior*, *Langmuir* **2011**, *27*, 15034-15047.
- [104] C. D. Bain, G. M. Whitesides *Formation of 2-component surfaces by the spontaneous assembly of monolayers on gold from solutions containing mixtures of organic thiols*, *Journal of the American Chemical Society* **1988**, *110*, 6560-6561.
- [105] C. D. Bain, G. M. Whitesides *Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold - variation in the length of the alkyl chain*, *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111*, 7164-7175.
- [106] C. D. Bain, J. Evall, G. M. Whitesides *Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold - variation in the head group, tail group, and solvent*, *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111*, 7155-7164.
- [107] J. P. Folkers, P. E. Laibinis, G. M. Whitesides, J. Deutch *Phase behaviour of two-component monolayers of alkanethiolates on gold*, *Journal of Physical Chemistry* **1994**, *98*, 563-571.
- [108] T. Kakiuchi, M. Iida, N. Gon, D. Hobara, S. Imabayashi, K. Niki *Miscibility of adsorbed 1-undecanethiol and 11-mercaptoundecanoic acid species in binary self-assembled monolayers on Au(111)*, *Langmuir* **2001**, *17*, 1599-1603.
- [109] T. Doneux, Y. De Decker *A Simple Model to Describe the Effect of Electrostatic Interactions on the Composition of Mixed Self-Assembled Monolayers*, *Langmuir* **2009**, *25*, 2199-2203.
- [110] S. E. Creager, G. K. Rowe *Competitive self-assembly and electrochemistry of some ferrocenyl-*n*-alkanethiol derivatives on gold*, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1994**, *370*, 203-211.
- [111] T. Doneux, M. Steichen, T. Bouchta, C. Buess-Herman *Mixed self-assembled monolayers of 2-mercaptobenzimidazole and 2-mercaptobenzimidazole-5-sulfonate: Determination and control of the surface composition*, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2007**, *599*, 241-248.
- [112] C. H. Shen, J. C. Lin *Surface characterization and platelet compatibility evaluation of binary mixed self-assembled monolayers containing novel sulfonic acid terminated alkanethiol*, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces* **2010**, *79*, 156-163.
- [113] Y. Ooi, D. Hobara, M. Yamamoto, T. Kakiuchi *Ideal nonideality in adsorption of 2-aminoethanethiol and 2-mercaptoethane sulfonic acid to form electrostatically stabilized binary self-assembled monolayers on Au(111)*, *Langmuir* **2005**, *21*, 11185-11189.

- [114] S. F. Chen, F. C. Yu, Q. M. Yu, Y. He, S. Y. Jiang *Strong resistance of a thin crystalline layer of balanced charged groups to protein adsorption*, *Langmuir* **2006**, *22*, 8186-8191.
- [115] C. H. Shen, J. C. Lin *Improving the Surface Biocompatibility with the Use of Mixed Zwitterionic Self-Assembled Mono layers Prepared by a Proper Solvent*, *Langmuir* **2011**, *27*, 7091-7098.
- [116] C. H. Shen, J. C. Lin *Platelet Compatibility Improvement by Proper Choice of Acidic Terminal Functionality for Mixed-Charge Self-Assembled Monolayers*, *Langmuir* **2012**, *28*, 640-647.
- [117] R. de Nys, J. Günther, M. J. Uriz, *Natural Control of Fouling in Biofouling* (Eds.: S. Dürr, J. C. Thomason), Wiley-Blackwell, Oxford, **2010**, 109-120.
- [118] A. J. Scardino, R. de Nys *Mini review: Biomimetic models and bioinspired surfaces for fouling control*, *Biofouling* **2011**, *27*, 73-86.
- [119] M. Salta, J. A. Wharton, P. Stoodley, S. P. Dennington, L. R. Goodes, S. Werwinski, U. Mart, R. J. K. Wood, K. R. Stokes *Designing biomimetic antifouling surfaces*, *Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences* **2010**, *368*, 4729-4754.
- [120] R. G. Chapman, E. Ostuni, S. Takayama, R. E. Holmlin, L. Yan, G. M. Whitesides *Surveying for surfaces that resist the adsorption of proteins*, *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 8303-8304.
- [121] E. Ostuni, R. G. Chapman, M. N. Liang, G. Meluleni, G. Pier, D. E. Ingber, G. M. Whitesides *Self-assembled monolayers that resist the adsorption of proteins and the adhesion of bacterial and mammalian cells*, *Langmuir* **2001**, *17*, 6336-6343.
- [122] E. Ostuni, R. G. Chapman, R. E. Holmlin, S. Takayama, G. M. Whitesides *A survey of structure-property relationships of surfaces that resist the adsorption of protein*, *Langmuir* **2001**, *17*, 5605-5620.
- [123] M. E. Callow, R. L. Fletcher *The influence of low surface-energy materials on bioadhesion- a review*, *International Biodeterioration & Biodegradation* **1994**, *34*, 333-348.
- [124] R. E. Baier, V. A. DePalma, in *Management of Occlusive Arterial Disease* (Ed.: W. A. Dale), Year Book Medical Publishers, Chicago, **1971**, 147-163.
- [125] E. A. Vogler *Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces*, *Advances in Colloid and Interface Science* **1998**, *74*, 69-117.
- [126] J. M. Berg, L. G. T. Eriksson, P. M. Claesson, K. G. N. Borve *3-Component Langmuir-Blodgett-films with a controllable degree of polarity*, *Langmuir* **1994**, *10*, 1225-1234.
- [127] M. E. Callow, J. A. Callow, L. K. Ista, S. E. Coleman, A. C. Nolasco, G. P. Lopez *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*, 3249-3254.
- [128] J. A. Callow, M. E. Callow, L. K. Ista, G. Lopez, M. K. Chaudhury *The influence of surface energy on the wetting behaviour of the spore adhesive of the marine alga Ulva linza (synonym Enteromorpha linza)*, *Journal of the Royal Society Interface* **2005**, *2*, 319-325.
- [129] S. Krishnan, N. Wang, C. K. Ober, J. A. Finlay, M. E. Callow, J. A. Callow, A. Hexemer, K. E. Sohn, E. J. Kramer, D. A. Fischer *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*, 1449-1462.
- [130] L. Petrone, A. Di Fino, N. Aldred, P. Sukkaew, T. Ederth, A. S. Clare, B. Liedberg *Effects of surface charge and Gibbs surface energy on the settlement behaviour of barnacle cyprids (Balanus amphitrite)*, *Biofouling* **2011**, *27*, 1043-1055.
- [131] A. Di Fino, L. Petrone, N. Aldred, T. Ederth, B. Liedberg, A. S. Clare *Correlation between surface chemistry and settlement behaviour in barnacle cyprids (Balanus improvisus)*, *Biofouling* **2014**, *30*, 143-152.

- [132] T. Ederth, T. Ekblad, M. E. Pettitt, S. L. Conlan, C.-X. Du, M. E. Callow, J. A. Callow, R. Mutton, A. S. Clare, F. D'Souza, G. Donnelly, A. Bruin, P. R. Willemsen, X. J. Su, S. Wang, Q. Zhao, M. Hederos, P. Konradsson, B. Liedberg *Resistance of Galactoside-Terminated Alkanethiol Self-Assembled Monolayers to Marine Fouling Organisms*, *Acs Applied Materials & Interfaces* **2011**, *3*, 3890-3901.
- [133] Z. Zhou, D. R. Calabrese, W. Taylor, J. A. Finlay, M. E. Callow, J. A. Callow, D. Fischer, E. J. Kramer, C. K. Ober *Amphiphilic triblock copolymers with PEGylated hydrocarbon structures as environmentally friendly marine antifouling and fouling-release coatings*, *Biofouling* **2014**, *30*, 589-604.
- [134] S. Krishnan, C. J. Weinman, C. K. Ober *Advances in polymers for anti-biofouling surfaces*, *Journal of Materials Chemistry* **2008**, *18*, 3405-3413.
- [135] P. Harder, M. Grunze, R. Dahint, G. M. Whitesides, P. E. Laibinis *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*, 426-436.
- [136] R. L. C. Wang, H. J. Kreuzer, M. Grunze *Molecular Conformation and Solvation of Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers and Their Resistance to Protein Adsorption*, *The Journal of Physical Chemistry B* **1997**, *101*, 9767-9773.
- [137] J. Zheng, L. Li, S. Chen, S. Jiang *Molecular Simulation Study of Water Interactions with Oligo (Ethylene Glycol)-Terminated Alkanethiol Self-Assembled Monolayers*, *Langmuir* **2004**, *20*, 8931-8938.
- [138] R. Latour *Molecular simulation of protein-surface interactions: Benefits, problems, solutions, and future directions (Review)*, *Biointerphases* **2008**, *3*, FC2-FC12.
- [139] J. Zheng, L. Y. Li, H. K. Tsao, Y. J. Sheng, S. F. Chen, S. Y. Jiang *Strong repulsive forces between protein and oligo (ethylene glycol) self-assembled monolayers: A molecular simulation study*, *Biophysical Journal* **2005**, *89*, 158-166.
- [140] Y. He, Y. Chang, J. C. Hower, J. Zheng, S. F. Chen, S. Jiang *Origin of repulsive force and structure/dynamics of interfacial water in OEG-protein interactions: a molecular simulation study*, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2008**, *10*, 5539-5544.
- [141] L. K. Ista, G. P. López *Interfacial Tension Analysis of Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers and Their Resistance to Bacterial Attachment*, *Langmuir* **2012**, *28*, 12844-12850.
- [142] J. C. Hower, Y. He, S. Y. Jiang *A molecular simulation study of methylated and hydroxyl sugar-based self-assembled monolayers: Surface hydration and resistance to protein adsorption*, *Journal of Chemical Physics* **2008**, *129*.
- [143] K. Ishihara, H. Nomura, T. Mihara, K. Kurita, Y. Iwasaki, N. Nakabayashi *Why do phospholipid polymers reduce protein adsorption?*, *Journal of Biomedical Materials Research* **1998**, *39*, 323-330.
- [144] Y. He, J. Hower, S. Chen, M. T. Bernardis, Y. Chang, S. Jiang *Molecular Simulation Studies of Protein Interactions with Zwitterionic Phosphorylcholine Self-Assembled Monolayers in the Presence of Water*, *Langmuir* **2008**, *24*, 10358-10364.
- [145] Q. Shao, Y. He, A. D. White, S. Jiang *Difference in Hydration between Carboxybetaine and Sulfobetaine*, *The Journal of Physical Chemistry B* **2010**, *114*, 16625-16631.
- [146] T. Ekblad, O. Andersson, F. I. Tai, T. Ederth, B. Liedberg *Lateral Control of Protein Adsorption on Charged Polymer Gradients*, *Langmuir* **2009**, *25*, 3755-3762.
- [147] R. E. Holmlin, X. X. Chen, R. G. Chapman, S. Takayama, G. M. Whitesides *Zwitterionic SAMs that resist nonspecific adsorption of protein from aqueous buffer*, *Langmuir* **2001**, *17*, 2841-2850.

- [148] A. Rosenhahn, J. A. Finlay, M. E. Pettit, A. Ward, W. Wirges, R. Gerhard, M. E. Callow, M. Grunze, J. A. Callow *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*, 7-11.
- [149] T. Ederth, P. Nygren, M. E. Pettitt, M. Ostblom, C. X. Du, K. Broo, M. E. Callow, J. Callow, B. Liedberg *Anomalous settlement behavior of *Ulva linza* zoospores on cationic oligopeptide surfaces*, *Biofouling* **2008**, *24*, 303-312.
- [150] T. Ederth, M. E. Pettitt, P. Nygren, C. X. Du, T. Ekblad, Y. Zhou, M. Falk, M. E. Callow, J. A. Callow, B. Liedberg *Interactions of Zoospores of *Ulva linza* with Arginine-Rich Oligopeptide Monolayers*, *Langmuir* **2009**, *25*, 9375-9383.
- [151] A. J. Scardino, J. Guenther, R. de Nys *Attachment point theory revisited: the fouling response to a microtextured matrix*, *Biofouling* **2008**, *24*, 45-53.
- [152] A. J. Scardino, E. Harvey, R. De Nys *Testing attachment point theory: diatom attachment on microtextured polyimide biomimics*, *Biofouling* **2006**, *22*, 55-60.
- [153] A. V. Bers, M. Wahl *The influence of natural surface microtopographies on fouling*, *Biofouling* **2004**, *20*, 43-51.
- [154] J. F. Schumacher, M. L. Carman, T. G. Estes, A. W. Feinberg, L. H. Wilson, M. E. Callow, J. A. Callow, J. A. Finlay, A. B. Brennan *Engineered antifouling microtopographies - effect of feature size, geometry, and roughness on settlement of zoospores of the green alga *Ulva**, *Biofouling* **2007**, *23*, 55-62.
- [155] J. F. Schumacher, N. Aldred, M. E. Callow, J. A. Finlay, J. A. Callow, A. S. Clare, A. B. Brennan *Species-specific engineered antifouling topographies: correlations between the settlement of algal zoospores and barnacle cyprids*, *Biofouling* **2007**, *23*, 307-317.
- [156] M. Nosonovsky, B. Bhushan *Multiscale effects and capillary interactions in functional biomimetic surfaces for energy conversion and green engineering*, *Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences* **2009**, *367*, 1511-1539.
- [157] J. M. Harris, *Introduction to Biotechnical and Biomedical Applications of Poly(Ethylene Glycol) in Poly(Ethylene Glycol) Chemistry* (Ed.: J. M. Harris), Springer US, **1992**, 1-14.
- [158] T. Ekblad, G. Bergstroem, T. Ederth, S. L. Conlan, R. Mutton, A. S. Clare, S. Wang, Y. L. Liu, Q. Zhao, F. D'Souza, G. T. Donnelly, P. R. Willemsen, M. E. Pettitt, M. E. Callow, J. A. Callow, B. Liedberg *Poly(ethylene glycol)-Containing Hydrogel Surfaces for Antifouling Applications in Marine and Freshwater Environments*, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 2775-2783.
- [159] W. Senaratne, L. Andruzzi, C. K. Ober *Self-Assembled Monolayers and Polymer Brushes in Biotechnology: Current Applications and Future Perspectives*, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2427-2448.
- [160] M. Morra, *Poly(ethylene oxide) coated Surfaces in Water in Biomaterials Surface Science* (Ed.: M. Morra), Wiley, Chichester, **2001**.
- [161] S. I. Jeon, J. H. Lee, J. D. Andrade, P. G. Degennes *Protein surface interactions in the presence of polyethylene oxide 1. Simplified Theory*, *Journal of Colloid and Interface Science* **1991**, *142*, 149-158.
- [162] C. Crouzet, C. Decker, J. Marchal *Caractérisation de réactions primaires de dégradation oxydante au cours de l'autoxydation des poly(oxyéthylène)s à 25°C: Étude en solution aqueuse avec amorçage par radiolyse du solvant, 8. Étude cinétique en fonction du ph compris entre 1 et 13*, *Die Makromolekulare Chemie* **1976**, *177*, 145-157.
- [163] M. C. Shen, L. Martinson, M. S. Wagner, D. G. Castner, B. D. Ratner, T. A. Horbett *PEO-like plasma polymerized tetraglyme surface interactions with leukocytes and proteins: in vitro and in vivo studies*, *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **2002**, *13*, 367-390.

- [164] J. B. Schlenoff *Zwitteration: Coating Surfaces with Zwitterionic Functionality to Reduce Nonspecific Adsorption*, *Langmuir* **2014**, *30*, 9625-9636.
- [165] J. A. Hayward, D. Chapman *Biomembrane surfaces as models for polymer design: the potential for haemocompatibility*, *Biomaterials* **1984**, *5*, 135-142.
- [166] H. Chen, L. Yuan, W. Song, Z. K. Wu, D. Li *Biocompatible polymer materials: Role of protein-surface interactions*, *Progress in Polymer Science* **2008**, *33*, 1059-1087.
- [167] S. E. Burke, R. E. Kuntz, L. B. Schwartz *Zotarolimus (ABT-578) eluting stents*, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, *58*, 437-446.
- [168] W. J. Yang, K. G. Neoh, E. T. Kang, S. L. M. Teo, D. Rittschof *Polymer brush coatings for combating marine biofouling*, *Progress in Polymer Science* **2014**, *39*, 1017-1042.
- [169] Z. Zhang, T. Chao, S. F. Chen, S. Y. Jiang *Superlow fouling sulfobetaine and carboxybetaine polymers on glass slides*, *Langmuir* **2006**, *22*, 10072-10077.
- [170] J. Ladd, Z. Zhang, S. Chen, J. C. Hower, S. Jiang *Zwitterionic Polymers Exhibiting High Resistance to Nonspecific Protein Adsorption from Human Serum and Plasma*, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 1357-1361.
- [171] W. Yang, H. Xue, W. Li, J. Zhang, S. Jiang *Pursuing "Zero" Protein Adsorption of Poly(carboxybetaine) from Undiluted Blood Serum and Plasma*, *Langmuir* **2009**, *25*, 11911-11916.
- [172] G. Cheng, G. Z. Li, H. Xue, S. F. Chen, J. D. Bryers, S. Y. Jiang *Zwitterionic carboxybetaine polymer surfaces and their resistance to long-term biofilm formation*, *Biomaterials* **2009**, *30*, 5234-5240.
- [173] L. Zhang, Z. Cao, T. Bai, L. Carr, J.-R. Ella-Menye, C. Irvin, B. D. Ratner, S. Jiang *Zwitterionic hydrogels implanted in mice resist the foreign-body reaction*, *Nat Biotech* **2013**, *31*, 553-556.
- [174] S. Y. Jiang, Z. Cao *Ultralow-Fouling, Functionalizable, and Hydrolyzable Zwitterionic Materials and Their Derivatives for Biological Applications*, *Advanced Materials* **2009**, *21*, 1-13.
- [175] Z. Zhang, J. A. Finlay, L. Wang, Y. Gao, J. A. Callow, M. E. Callow, S. Jiang *Polysulfobetaine-Grafted Surfaces as Environmentally Benign Ultralow Fouling Marine Coatings*, *Langmuir* **2009**, *25*, 13516-13521.
- [176] S. Chen, J. Zheng, L. Li, S. Jiang *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*, 14473-14478.
- [177] H. Kitano, T. Mori, Y. Takeuchi, S. Tada, M. Gemmei-Ide, Y. Yokoyama, M. Tanaka *Structure of Water Incorporated in Sulfobetaine Polymer Films as Studied by ATR-FTIR*, *Macromolecular Bioscience* **2005**, *5*, 314-321.
- [178] S. F. Chen, L. Y. Li, C. Zhao, J. Zheng *Surface hydration: Principles and applications toward low-fouling/nonfouling biomaterials*, *Polymer* **2010**, *51*, 5283-5293.
- [179] M. J. Stein, T. Weidner, K. McCrea, D. G. Castner, B. D. Ratner *Hydration of Sulphobetaine and Tetra(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers Studied by Sum Frequency Generation Vibrational Spectroscopy*, *Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*, 11550-11556.
- [180] F. Hofmeister *Zur Lehre von der Wirkung der Salze*, *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* **1888**, *24*, 247-260.
- [181] K. D. Collins *Charge density-dependent strength of hydration and biological structure*, *Biophysical Journal* **1997**, *72*, 65-76.
- [182] Y. Zhang, P. S. Cremer *Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series*, *Current Opinion in Chemical Biology* **2006**, *10*, 658-663.

- [183] H. Zhao, O. Olubajo, Z. Song, A. L. Sims, T. E. Person, R. A. Lawal, L. A. Holley *Effect of kosmotropicity of ionic liquids on the enzyme stability in aqueous solutions*, Bioorganic Chemistry **2006**, *34*, 15-25.
- [184] Z. Yang *Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis*, Journal of Biotechnology **2009**, *144*, 12-22.
- [185] B. Hribar, N. T. Southall, V. Vlachy, K. A. Dill *How ions affect the structure of water*, Journal of the American Chemical Society **2002**, *124*, 12302-12311.
- [186] K. D. Collins, G. W. Neilson, J. E. Enderby *Ions in water: Characterizing the forces that control chemical processes and biological structure*, Biophysical Chemistry **2007**, *128*, 95-104.
- [187] N. Vlachy, B. Jagoda-Cwiklik, R. Vacha, D. Touraud, P. Jungwirth, W. Kunz *Hofmeister series and specific interactions of charged headgroups with aqueous ions*, Advances in Colloid and Interface Science **2009**, *146*, 42-47.
- [188] W. Kunz, P. Lo Nostro, B. W. Ninham *The present state of affairs with Hoffmeister effects*, Current Opinion in Colloid & Interface Science **2004**, *9*, 1-18.
- [189] K. D. Collins, M. W. Washabaugh *The Hofmeister effect and the behaviour of water at interfaces*, Quarterly Reviews of Biophysics **1985**, *18*, 323-422.
- [190] R. S. Kane, P. Deschatelets, G. M. Whitesides *Kosmotropes form the basis of protein-resistant surfaces*, Langmuir **2003**, *19*, 2388-2391.
- [191] H. Weingartner, C. Cabrele, C. Herrmann *How ionic liquids can help to stabilize native proteins*, Physical Chemistry Chemical Physics **2012**, *14*, 415-426.
- [192] H. Weingärtner *Understanding Ionic Liquids at the Molecular Level: Facts, Problems, and Controversies*, Angewandte Chemie International Edition **2008**, *47*, 654-670.
- [193] F. van Rantwijk, R. A. Sheldon *Biocatalysis in Ionic Liquids*, Chemical Reviews **2007**, *107*, 2757-2785.
- [194] P. Wasserscheid, W. Keim *Ionische Flüssigkeiten – neue „Lösungen“ für die Übergangsmetallkatalyse*, Angewandte Chemie **2000**, *112*, 3926-3945.
- [195] H. Wang, G. Gurau, S. P. Kelley, A. S. Myerson, R. D. Rogers *Hydrophobic vs. hydrophilic ionic liquid separations strategies in support of continuous pharmaceutical manufacturing*, Rsc Advances **2013**, *3*, 10019-10026.
- [196] S. Boddohi, M. J. Kipper *Engineering Nanoassemblies of Polysaccharides*, Advanced Materials **2010**, *22*, 2998-3016.
- [197] R. H. West, A. J. Paul, S. Hibbert, P. Cahalan, L. Cahalan, M. Verhoeven, M. Hendriks, B. Fouache *Correlation of the surface chemistries of polymer bioactive coatings with their biological performance*, Journal of Materials Science-Materials in Medicine **1995**, *6*, 63-67.
- [198] G. Caldwell, H. Pagett *Marine Glycobiology: Current Status and Future Perspectives*, Marine Biotechnology **2010**, *12*, 241-252.
- [199] A. M. Rich, E. Pearlstein, G. Weissmann, S. T. Hoffstein *Cartilage proteoglycans inhibit fibronectin-mediated adhesion*, Nature **1981**, *293*, 224-226.
- [200] A. Almond, A. Brass, J. K. Sheehan *Oligosaccharides as Model Systems for Understanding Water–Biopolymer Interaction: Hydrated Dynamics of a Hyaluronan Decamer*, The Journal of Physical Chemistry B **2000**, *104*, 5634-5640.
- [201] S. Despond, E. Espuche, N. Cartier, A. Domard *Hydration mechanism of polysaccharides: A comparative study*, Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics **2005**, *43*, 48-58.
- [202] I. Braccini, S. Perez *Molecular basis of Ca²⁺-induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited*, Biomacromolecules **2001**, *2*, 1089-1096.
- [203] G. T. Grant, E. R. Morris, D. A. Rees, P. J. C. Smith, D. Thom *Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model*, FEBS Letters **1973**, *32*, 195-198.

- [204] M. Wloka, H. Rehage, H. C. Flemming, J. Wingender *Rheological properties of viscoelastic biofilm extracellular polymeric substances and comparison to the behavior of calcium alginate gels*, Colloid and Polymer Science **2004**, 282, 1067-1076.
- [205] J. R. E. Fraser, T. C. Laurent, U. B. G. Laurent *Hyaluronan: Its nature, distribution, functions and turnover*, Journal of Internal Medicine **1997**, 242, 27-33.
- [206] K. Meyer, J. W. Palmer *The polysaccharide of the vitreous humor*, Journal of Biological Chemistry **1934**, 107, 629-634.
- [207] B. M. Weissman, K. *The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord*, Journal of the American Chemical Society **1954**, 76, 1753-1757.
- [208] M. Morra *Engineering of biomaterials surfaces by hyaluronan*, Biomacromolecules **2005**, 6, 1205-1223.
- [209] J. W. Park, B. Chakrabarti *Optical characteristics of carboxyl group in relation to the circular dichroic properties and dissociation constants of glycosaminoglycans*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects **1978**, 544, 667-675.
- [210] M. Cohen, E. Klein, B. Geiger, L. Addadi *Organization and Adhesive Properties of the Hyaluronan Pericellular Coat of Chondrocytes and Epithelial Cells*, Biophysical Journal, **85**, 1996-2005.
- [211] J. E. Silbert, G. Sugumaran *Biosynthesis of chondroitin/dermatan sulfate*, Iubmb Life **2002**, 54, 177-186.
- [212] P. A. S. Mourao *A carbohydrate based mechanism of species recognition in sea urchin fertilization*, Brazilian Journal of Medical and Biological Research **2007**, 40, 5-17.
- [213] C. Schiraldi, D. Cimini, M. De Rosa *Production of chondroitin sulfate and chondroitin*, Applied Microbiology and Biotechnology **2010**, 87, 1209-1220.
- [214] X. H. Zou, W. C. Foong, T. Cao, B. H. Bay, H. W. Ouyang, G. W. Yip *Chondroitin sulfate in palatal wound healing*, Journal of Dental Research **2004**, 83, 880-885.
- [215] K. L. Shephard *Functions for fish mucus*, Reviews in Fish Biology and Fisheries **1994**, 4, 401-429.
- [216] Y. Tsujii, K. Ohno, S. Yamamoto, A. Goto, T. Fukuda, *Structure and properties of high-density polymer brushes prepared by surface-initiated living radical polymerization in Surface-Initiated Polymerization I, Vol. 197* (Ed.: R. Jordan), Springer, Berlin, **2006**, 1-45.
- [217] G. Young, R. Bowers, B. Hall, M. Port *Clinical comparison of Omafilcon A with four control materials*, CLAO Journal **1997**, 23, 249-258.
- [218] J.-P. Montheard, M. Chatzopoulos, D. Chappard *2-Hydroxyethyl Methacrylate (HEMA): Chemical Properties and Applications in Biomedical Fields*, Journal of Macromolecular Science, Part C **1992**, 32, 1-34.
- [219] C. Rodriguez-Emmenegger, O. A. Avramenko, E. Brynda, J. Skvor, A. B. Alles *Poly(HEMA) brushes emerging as a new platform for direct detection of food pathogen in milk samples*, Biosensors & Bioelectronics **2011**, 26, 4545-4551.
- [220] W. K. Cho, S. M. Kang, J. K. Lee *Non-Biofouling Polymeric Thin Films on Solid Substrates*, Journal of Nanoscience and Nanotechnology **2014**, 14, 1231-1252.
- [221] S. Hansson, V. Trouillet, T. Tischer, A. S. Goldmann, A. Carlmark, C. Barner-Kowollik, E. Malmström *Grafting Efficiency of Synthetic Polymers onto Biomaterials: A Comparative Study of Grafting-from versus Grafting-to*, Biomacromolecules **2012**, 14, 64-74.
- [222] R. Barbey, L. Lavanant, D. Paripovic, N. Schüwer, C. Sugnaux, S. Tugulu, H.-A. Klok *Polymer Brushes via Surface-Initiated Controlled Radical Polymerization: Synthesis, Characterization, Properties, and Applications*, Chemical Reviews **2009**, 109, 5437-5527.
- [223] S. Schilp, *Dissertation Self-assembled monolayers and nonostructured surfaces as tools to design antifouling surfaces*, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **2009**.

- [224] M. Semsarilar, S. Perrier *'Green' reversible addition-fragmentation chain-transfer (RAFT) polymerization*, *Nat Chem* **2010**, *2*, 811-820.
- [225] S. Koltzenburg, M. Maskos, O. Nuyken, *Polymere: Synthese, Eigenschaften und Anwendungen*, Springer Spektrum, Berlin Heidelberg, **2014**.
- [226] E. Rizzardo, D. H. Solomon *On the Origins of Nitroxide Mediated Polymerization (NMP) and Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer (RAFT)**, *Australian Journal of Chemistry* **2012**, *65*, 945-969.
- [227] G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang *Living Radical Polymerization by the RAFT Process*, *Australian Journal of Chemistry* **2005**, *58*, 379-410.
- [228] P. Delduc, C. Tailhan, S. Z. Zard *A convenient source of alkyl and acyl radicals*, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1988**, 308-310.
- [229] M. Baum, W. J. Brittain *Synthesis of polymer brushes on silicate substrates via reversible addition fragmentation chain transfer technique*, *Macromolecules* **2002**, *35*, 610-615.
- [230] X. M. Li, D. Reinhoudt, M. Crego-Calama *What do we need for a superhydrophobic surface? A review on the recent progress in the preparation of superhydrophobic surfaces*, *Chemical Society Reviews* **2007**, *36*, 1350-1368.
- [231] T. Young *An essay on the cohesion of fluids*, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1805**, *95*, 65-87.
- [232] R. N. Wenzel *Resistance of Solid Surfaces to Wetting by Water*, *Industrial & Engineering Chemistry* **1936**, *28*, 988-994.
- [233] A. B. D. Cassie, S. Baxter *Wettability of porous surfaces*, *Transactions of the Faraday Society* **1944**, *10*, 546-551.
- [234] H. G. Tompkins, *A User's Guide to Ellipsometry*, 1. Auflage, Dover Publications, Mineola, NY, **1993**.
- [235] H. Fujiwara, *Spectroscopic Ellipsometry - Principles and Applications*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, U.K., **2007**.
- [236] H. Wolf, H. Ringsdorf, E. Delamarche, T. Takami, H. Kang, B. Michel, C. Gerber, M. Jaschke, H. J. Butt, E. Bamberg *End-group-dominated molecular order in self-assembled monolayers*, *Journal of Physical Chemistry* **1995**, *99*, 7102-7107.
- [237] Ellipsometrie Tutorial (J.A. Woollam Co., Lincoln, USA, **2011**) http://www.jawoollam.com/tutorial_1.html.
- [238] N. Meyerbröcker, *Dissertation* Präparation und Charakterisierung ultradünner, biokompatibler Filme und Membranen auf Basis von Polyethylenglykolen, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **2012**.
- [239] M. P. Seah, W. A. Dench *Quantitative electron spectroscopy of surfaces: A standard data base for electron inelastic mean free paths in solids*, *Surface and Interface Analysis* **1979**, *1*, 2-11.
- [240] C. D. Bain, G. M. Whitesides *Attenuation lengths of photoelectrons in hydrocarbon films*, *The Journal of Physical Chemistry* **1989**, *93*, 1670-1673.
- [241] G. J. Leggett, *Scanning Probe Microscopy in Surface Analysis- The principal Techniques*, 2 ed. (Eds.: V. J.C., I. S. Gilmore), Wiley, Chichester, **2009**.
- [242] G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber *Atomic Force Microscope*, *Physical Review Letters* **1986**, *56*, 930-933.
- [243] D. R. Kester, I. W. Duedall, D. N. Connors, R. M. Pytkowicz *Preparation of Artificial Seawater*, *Limnology and Oceanography* **1967**, *12*, 176-179.
- [244] K. A. Gunay, N. Schuwer, H. A. Klok *Synthesis and post-polymerization modification of poly(pentafluorophenyl methacrylate) brushes*, *Polymer Chemistry* **2012**, *3*, 2186-2192.
- [245] D. A. Shirley *High-Resolution X-Ray Photoemission Spectrum of the Valence Bands of Gold*, *Physical Review B* **1972**, *5*, 4709-4714.

- [246] J. J. Yeh, I. Lindau *Atomic subshell photoionization cross sections and asymmetry parameters: $1 \leq Z \leq 103$* , Atomic Data and Nuclear Data Tables **1985**, 32, 1-155.
- [247] ExpASY: SIB bioinformatics resource portal (SIB Swiss Institute of Bioinformatics, **2013**) <http://expasy.org/>.
- [248] C. Christophis, *Dissertation* Quantification of cell adhesion strength on artificial surfaces with a microfluidic shear force device, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **2011**.
- [249] F.-G. Michalec, M. Holzner, D. Menu, J.-S. Hwang, S. Souissi *Behavioral responses of the estuarine calanoid copepod Eurytemora affinis to sub-lethal concentrations of waterborne pollutants*, Aquatic Toxicology **2013**, 138–139, 129-138.
- [250] S. Maleschlijski, *Dissertation* Quantification of exploratory behaviour of barnacle cyprids on surfaces with different chemical properties, investigated using stereoscopy, Ruprecht-Karls-Universität, **2014**.
- [251] Z. G. Estephan, P. S. Schlenoff, J. B. Schlenoff *Zwitteration As an Alternative to PEGylation*, Langmuir **2011**, 27, 6794-6800.
- [252] J. Wu, W. F. Lin, Z. Wang, S. F. Chen, Y. Chang *Investigation of the Hydration of Nonfouling Material Poly(sulfobetaine methacrylate) by Low-Field Nuclear Magnetic Resonance*, Langmuir **2012**, 28, 7436-7441.
- [253] J. A. Hayward, D. Chapman *Biomembrane surfaces as models for polymer design - the potential for hemocompatibility*, Biomaterials **1984**, 5, 135-142.
- [254] Z. Zhang, H. Vaisocherova, G. Cheng, W. Yang, H. Xue, S. Y. Jiang *Nonfouling Behavior of Polycarboxybetaine-Grafted Surfaces: Structural and Environmental Effects*, Biomacromolecules **2008**, 9, 2686-2692.
- [255] A. B. Lowe, M. Vamvakaki, M. A. Wassall, L. Wong, N. C. Billingham, S. P. Armes, A. W. Lloyd *Well-defined sulfobetaine-based statistical copolymers as potential antibioadherent coatings*, Journal of Biomedical Materials Research **2000**, 52, 88-94.
- [256] N. Aldred, G. Z. Li, Y. Gao, A. S. Clare, S. Y. Jiang *Modulation of barnacle (Balanus amphitrite Darwin) cyprid settlement behavior by sulfobetaine and carboxybetaine methacrylate polymer coatings*, Biofouling **2010**, 26, 673-683.
- [257] R. J. Huxtable, *Physiological actions of taurine*, Vol. 72, **1992**.
- [258] S. A. Craig *Betaine in human nutrition*, The American Journal of Clinical Nutrition **2004**, 80, 539-549.
- [259] C. D. Bain, E. B. Troughton, Y. T. Tao, J. Evall, G. M. Whitesides, R. G. Nuzzo *Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold*, Journal of the American Chemical Society **1989**, 111, 321-335.
- [260] C. H. Shen, J. C. Lin *Solvent and concentration effects on the surface characteristics and platelet compatibility of zwitterionic sulfobetaine-terminated self-assembled monolayers*, Colloids and Surfaces B-Biointerfaces **2013**, 101, 376-383.
- [261] P. C. Rieke, D. R. Baer, G. E. Fryxell, M. H. Engelhard, M. S. Porter *Beam damage of self-assembled monolayers*, Journal of Vacuum Science & Technology A **1993**, 11, 2292-2297.
- [262] M. Zharnikov, M. Grunze *Modification of thiol-derived self-assembling monolayers by electron and x-ray irradiation: Scientific and lithographic aspects*, Journal of Vacuum Science & Technology B **2002**, 20, 1793-1807.
- [263] S. M. Mendoza, I. Arfaoui, S. Zanarini, F. Paolucci, P. Rudolf *Improvements in the characterization of the crystalline structure of acid-terminated alkanethiol self-assembled monolayers on Au(111)*, Langmuir **2007**, 23, 582-588.
- [264] T. R. Lee, R. I. Carey, H. A. Biebuyck, G. M. Whitesides *The wetting of monolayer films exposing ionizable acids and bases*, Langmuir **1994**, 10, 741-749.

- [265] D. G. Castner, K. Hinds, D. W. Grainger *X-ray photoelectron spectroscopy sulfur 2p study of organic thiol and disulfide binding interactions with gold surfaces*, *Langmuir* **1996**, *12*, 5083-5086.
- [266] R. G. Nuzzo, L. H. Dubois, 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*, 558-569.
- [267] R. Arnold, W. Azzam, A. Terfort, C. Woll *Preparation, modification, and crystallinity of aliphatic and aromatic carboxylic acid terminated self-assembled monolayers*, *Langmuir* **2002**, *18*, 3980-3992.
- [268] H. Wang, S. F. Chen, L. Y. Li, S. Y. Jiang *Improved method for the preparation of carboxylic acid and amine terminated self-assembled monolayers of alkanethiolates*, *Langmuir* **2005**, *21*, 2633-2636.
- [269] W. H. Chuang, J. C. Lin *Surface characterization and platelet adhesion studies for the mixed self-assembled monolayers with amine and carboxylic acid terminated functionalities*, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2007**, *82A*, 820-830.
- [270] G. B. Sigal, M. Mrksich, G. M. Whitesides *Effect of surface wettability on the adsorption of proteins and detergents*, *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 3464-3473.
- [271] R. Holland, T. M. Dugdale, R. Wetherbee, A. B. Brennan, J. A. Finlay, J. A. Callow, M. E. Callow *Adhesion and motility of fouling diatoms on a silicone elastomer*, *Biofouling* **2004**, *20*, 323-329.
- [272] G. Jelic-Mrcelic, M. Sliskovic, B. Antolic *Biofouling communities on test panels coated with TBT and TBT-free copper based antifouling paints*, *Biofouling* **2006**, *22*, 293-302.
- [273] D. Meseguer Yebra, S. Kiil, C. E. Weinell, K. Dam-Johansen *Presence and effects of marine microbial biofilms on biocide-based antifouling paints*, *Biofouling* **2006**, *22*, 33-41.
- [274] I. Thome, *Dissertation Influence of Surface Conditioning and Morphology on Biofouling*, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **2013**.
- [275] I. Thome, S. Bauer, S. Vater, K. Zargiel, J. A. Finlay, M. P. Arpa-Sancet, M. Alles, J. A. Callow, M. E. Callow, G. W. Swain, M. Grunze, A. Rosenhahn *Conditioning of self-assembled monolayers at two static immersion test sites along the east coast of Florida and its effect on early fouling development*, *Biofouling* **2014**, *30*, 1011-1021.
- [276] K. E. Cooksey, B. Wigglesworth-Cooksey *Adhesion of bacteria and diatoms on surfaces in the sea- a review*, *Aquatic Microbial Ecology* **1995**, *9*, 87-96.
- [277] S. Mieszkin, P. Martin-Tanchereau, M. E. Callow, J. A. Callow *Effect of bacterial biofilms formed on fouling-release coatings from natural seawater and *Cobetia marina*, on the adhesion of two marine algae*, *Biofouling* **2012**, *28*, 953-968.
- [278] S. Dobretsov, J. C. Thomason *The development of marine biofilms on two commercial non-biocidal coatings: a comparison between silicone and fluoropolymer technologies*, *Biofouling* **2011**, *27*, 869-880.
- [279] S. E. M. Thompson, A. R. Taylor, C. Brownlee, M. E. Callow, J. A. Callow *The role of nitric oxide in diatom adhesion in relation to substratum properties*, *Journal of Phycology* **2008**, *44*, 967-976.
- [280] D. V. Richmond, D. J. Fisher, *The Electrophoretic Mobility of Micro-Organisms in Advances in Microbial Physiology, Vol. Volume 9* (Eds.: A. H. Rose, D. W. Tempest), Academic Press, **1973**, 1-29.
- [281] A. Gelabert, O. S. Pokrovsky, J. Schott, A. Boudou, A. Feurtet-Mazel, J. Mielczarski, E. Mielczarski, N. Mesmer-Dudons, O. Spalla *Study of diatoms/aqueous solution interface. I. Acid-base equilibria and spectroscopic observation of freshwater and marine species*, *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **2004**, *68*, 4039-4058.

- [282] Q. Shao, S. Y. Jiang *Influence of Charged Groups on the Properties of Zwitterionic Moieties: A Molecular Simulation Study*, Journal of Physical Chemistry B **2014**, *118*, 7630-7637.
- [283] E. Osterberg, K. Bergstrom, K. Holmberg, T. P. Schuman, J. A. Riggs, N. L. Burns, J. M. Vanalstine, J. M. Harris *Protein-rejecting ability of surface-bound dextran in end-on and side-on configurations. comparison to PEG*, Journal of Biomedical Materials Research **1995**, *29*, 741-747.
- [284] M. Morra, C. Cassinelli *Surface studies on a model cell-resistant system*, Langmuir **1999**, *15*, 4658-4663.
- [285] X. Cao, *Dissertation Antifouling Properties of Smooth and Structured Polyelectrolyte Thin Films*, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **2008**.
- [286] J. G. J. van de Winkel, T. H. M. S. M. van Kuppevelt, H. M. J. Janssen, R. A. C. Lock *Glycosaminoglycans in the skin mucus of rainbow trout (salmo gairdneri)*, Comp. Biochem. Physiol. B **1986**, *85*, 473-475.
- [287] R. Dhamodharan, T. J. McCarthy *Adsorption of Alginate Acid and Chondroitin Sulfate-A to Amine Functionality Introduced on Polychlorotrifluoroethylene and Glass Surfaces*, Macromolecules **1999**, *32*, 4106-4112.
- [288] R. B. Forward Jr, D. Rittschof *Alteration of photoresponses involved in diel vertical migration of a crab larva by fish mucus and degradation products of mucopolysaccharides*, Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **2000**, *245*, 277-292.
- [289] A. Albersdorfer, E. Sackmann *Swelling behavior and viscoelasticity ultrathin grafted hyaluronic acid films*, European Physical Journal B **1999**, *10*, 663-672.
- [290] R. A. Stile, T. A. Barber, D. G. Castner, K. E. Healy *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*, 391-398.
- [291] K. Bierbaum, M. Kinzler, C. Woll, M. Grunze, G. Hahner, S. Heid, F. Effenberger *A near-edge X-ray adsorption fine structure spectroscopy and X-ray photoelectron-spectroscopy study of the film properties of self-assembled monolayers of organosilanes on oxidised Si(100)*, Langmuir **1995**, *11*, 512-518.
- [292] J. W. Park, H. Kim, M. Han *Polymeric self-assembled monolayers derived from surface-active copolymers: a modular approach to functionalized surfaces*, Chemical Society Reviews **2010**, *39*, 2935-2947.
- [293] C. K. Pandiyarajan, O. Prucker, B. Zieger, J. Rühle *Influence of the Molecular Structure of Surface-Attached Poly(N-alkyl Acrylamide) Coatings on the Interaction of Surfaces with Proteins, Cells and Blood Platelets*, Macromolecular Bioscience **2013**, *13*, 873-884.
- [294] O. Cavalleri, G. Gonella, S. Terreni, M. Vignolo, L. Floreano, A. Morgante, M. Canepa, R. Rolandi *High resolution X-ray photoelectron spectroscopy of L-cysteine self-assembled films*, Physical Chemistry Chemical Physics **2004**, *6*, 4042-4046.
- [295] B. D. Ratner, *Electron Spectroscopy for chemical analysis in Surface Analysis - The Principal Techniques* (Ed.: J. C. Vickerman), John Wiley & Sons, Chichester, UK, **1997**.
- [296] S. Bauer, *Diplomarbeit Inerte Oberflächen auf Basis von immobilisierten Polysacchariden*, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **2011**.
- [297] D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5. Auflage, W.H. Freeman, San Francisco, **2008**.
- [298] D. W. Piper, B. H. Fenton *pH stability and activity curves of pepsin with special reference to their clinical importance*, Gut **1965**, *6*, 506-8.
- [299] M. P. A. Sancet, *Dissertation Influence of surface properties on adhesion of Cobetia marina and accumulation of marine microfoulers in the ocean*, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, **2013**.

- [300] M. Arpa-Sancet, C. Christophis, A. Rosenhahn *Microfluidic Assay to Quantify the Adhesion of Marine Bacteria*, *Biointerphases* **2012**, 7, 1-9.
- [301] L. K. Ista, H. Y. Fan, O. Baca, G. P. Lopez *Attachment of bacteria to model solid surfaces: Oligo(ethylene glycol) surfaces inhibit bacterial attachment*, *Fems Microbiology Letters* **1996**, 142, 59-63.
- [302] L. K. Ista, G. P. Lopez *Thermodynamic analysis of marine bacterial attachment to oligo(ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers*, *Biointerphases* **2013**, 8.
- [303] N. Lagersson, J. Høeg *Settlement behavior and antennular biomechanics in cypris larvae of *Balanus amphitrite* (Crustacea: Thecostraca: Cirripedia)*, *Marine Biology* **2002**, 141, 513-526.
- [304] pKas of Inorganic and Oxo-Acids (Evans, D.A., Harvard University, Cambridge, **2005**) http://evans.rc.fas.harvard.edu/pdf/evans_pKa_table.pdf.
- [305] G. G. Geesey, B. Wigglesworth-Cooksey, K. E. Cooksey *Influence of calcium and other cations on surface adhesion of bacteria and diatoms: a review*, *Biofouling* **2000**, 15, 195-205.
- [306] A. J. de Kerchove, M. Elimelech *Formation of polysaccharide gel layers in the presence of Ca^{2+} and K^+ ions: Measurements and mechanisms*, *Biomacromolecules* **2007**, 8, 113-121.
- [307] D. E. Barlow, K. J. Wahl *Optical Spectroscopy of Marine Bioadhesive Interfaces*, *Annual Review of Analytical Chemistry*, Vol 5 **2012**, 5, 229-251.
- [308] L. Petrone *Molecular surface chemistry in marine bioadhesion*, *Advances in Colloid and Interface Science* **2013**, 195, 1-18.
- [309] Ajay S. Mathuru, C. Kibat, Wei F. Cheong, G. Shui, Markus R. Wenk, Rainer W. Friedrich, S. Jesuthasan *Chondroitin Fragments Are Odorants that Trigger Fear Behavior in Fish*, *Current Biology* **2012**, 22, 538-544.
- [310] J. Guenther, G. Walker-Smith, A. Warén, R. De Nys *Fouling-resistant surfaces of tropical sea stars*, *Biofouling* **2007**, 23, 413-418.
- [311] Hempel Firmen Website (Hempel, Lyngby, Dänemark, **01.11.2014**) <http://www.hempel.com/en/products/hempasil-x3-87500>.
- [312] D. Leckband, S. Sheth, A. Halperin *Grafted poly(ethylene oxide) brushes as nonfouling surface coatings*, *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **1999**, 10, 1125-1147.

7 ANHANG

7.1 Publikationsliste

- M. Hanke; H.K. Arslan; S. Bauer; O. Zybalyo; C. Christophis; H. Gliemann; A. Rosenhahn; C. Wöll *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*, 6877-6884.
- S. Bauer; M.P. Arpa-Sancet; J.A. Finlay; M.E. Callow; J.A. Callow; A. Rosenhahn *Adhesion of marine fouling organisms on hydrophilic and amphiphilic polysaccharides*. *Langmuir* **2013**, *29*, 4039-47.
- M. Zamfir; C. Rodriguez-Emmenegger; S. Bauer; L. Barner; A. Rosenhahn; C. Barner-Kowollik *Controlled Growth of Protein Resistant pHEMA Brushes via S-RAFT Polymerization*. *Journal of Materials Chemistry B* **2013**, *1*, 6027–6034.
- M.P. Arpa-Sancet; M. Hanke; Z. Wang; S. Bauer; C. Azucena; H.K. Arslan; M. Heinle; H. Gliemann; C. Wöll; A. Rosenhahn *Surface anchored metal-organic frameworks as stimulus responsive antifouling coatings*. *Biointerphases* **2013**, *8*, 29.
- S. Bauer; M. Alles; J.A. Finlay; J.A. Callow; M.E. Callow; A. Rosenhahn *Influence of zwitterionic SAMs on protein adsorption and the attachment of algal cells*. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2014**, *25*, 1530-1539.
- I. Thome; S. Bauer; S. Vater; K. Zargiel; J.A. Finlay; M.P. Arpa-Sancet; M. Alles; J.A. Callow; M.E. Callow, G. Swain; M. Grunze; A. Rosenhahn *Conditioning of self-assembled monolayers at two static immersion test sites along the east coast of Florida and its effect on early fouling development*. *Biofouling* **2014**, *30*, 1011-1021.
- S. Maleschlijski; S. Bauer; A. Di Fino; G.H. Sendra; A.S. Clare; A. Rosenhahn *Barnacle cyprid motility and distribution in the water column as an indicator of the settlement inhibiting potential of nontoxic antifouling chemistries*. *Biofouling* **2014**, *30*, 1055-1065.
- S. Maleschlijski; S. Bauer; N. Aldred; A.S. Clare; A. Rosenhahn *Classification of swimming behaviour of barnacle cyprids during surface exploration*. *Journal of the Royal Society Interface* **2014**, angenommen.

IN VORBEREITUNG:

- S. Bauer; M. Alles; M.P. Arpa-Sancet; J.A. Finlay; M.E. Callow; J.A. Callow; A.S. Clare; A. Rosenhahn *An extended study about biofoulers on amphiphilic polysaccharides*
- S. Bauer; J.A. Finlay; I. Thome, A.S. Clare; G. Swain; A. Rosenhahn *Algal cells on charged and zwitterionic SAMs – influence of the surface termination*

7.2 Konferenzliste

- 4. - 7. Dezember 2011, Las Vegas, NV, USA, *Biofouling International Workshop for Young Investigators*, Office of Naval Research ONR/Seacoat, **Posterpräsentation** (Posterpreis)
- 17. - 19. Mai 2012, Leipzig, Deutschland, *111. Bunsentagung*, **Posterpräsentation**.
- 24. - 28. Juni 2012, Seattle, WA, USA, *16th International Congress of Marine Corrosion and Fouling*, **Posterpräsentation**.
- 28. Oktober - 2. November 2012, Tampa, FL, USA, *AVS 59th International Symposium and Exhibition*, **Posterpräsentation**.
- 27. Oktober - 1. November 2013, Long Beach, CA, USA, *AVS 60th International Symposium and Exhibition*, **Vortrag**.

7.3 Finanzielle Unterstützung

Die vorliegende Doktorarbeit wurde durch das *Office of Naval Research* (ONR, USA) unterstützt (N00014-08-1-1116 und N00014-12-1-0498).

7.4 Verwendete Chemikalien

POLYSACCHARID-OBERFLÄCHEN

| | |
|--|---------------|
| Alginsäure-Natriumsalz (AA aus Braunalgen) | Fluka |
| $M = (8 - 12) \cdot 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ | |
| 3-Aminopropyltrimethoxysilan (APTMS, 99 %), | Sigma Aldrich |
| Chondroitinsulfat-Natriumsalz (aus Haiknorpel) | Sigma Aldrich |
| $M = (3,1 \pm 3,7) \cdot 10^4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ | |
| 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC, $\geq 98 \%$), | Sigma Aldrich |
| Hyaluronsäure-Natriumsalz (HA von <i>Streptococcus equi</i>) | Sigma Aldrich |
| $M = (1,5 - 1,8) \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ | |
| 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES, $\geq 99,5 \%$) | Carl Roth |
| N-Hydroxysuccinimid (NHS, 98 %), | Sigma Aldrich |

SELBST-ASSEMBLIERENDE MONOLAGEN

| | |
|--|--------------------------------------|
| 1-Dodecanthiol (DDT) | Sigma Aldrich, ProChimia Surfaces |
| Hydroxy-hexa-ethylene-glykol-1-undecanthiol (EG ₆ OH) | ProChimia Surfaces |
| Hydroxy-PEG2000-thiol (PEG) | Rapp Polymere GmbH |
| 11-Hydroxy-1-undecanthiol (HU DT) | ProChimia Surfaces |
| 11-(Mercaproundecyl)-carboxybetain (CB) | ProChimia Surfaces |
| 11-(Mercaproundecyl)-phosphonsäure (MUPA) | ProChimia Surfaces |
| 11-(Mercaproundecyl)-carbonsäure (MUDA) | Sigma Aldrich |
| 11-(Mercaproundecyl)-N,N,N-trimethylammoniumchlorid (TMAT) | ProChimia Surfaces |
| 11-(Mercaproundecyl)-sulfobetain (SB) | ProChimia Surfaces |
| Natrium-11-1(Mercaproundecyl)-sulfonat (SAT) | ProChimia Surfaces |

PROTEINE

| | |
|---------------------------------------|---------------|
| Albumin (aus bovinem Serum), BSA | Sigma Aldrich |
| Albumin (aus humanem Serum), HSA | Sigma Aldrich |
| Fibrinogen (aus bovinem Serumplasma) | Sigma Aldrich |
| Lysozym (aus Hühnereiweiß) | Fluka |
| Pepsin (aus Schweinemagenschleimhaut) | Gibco |

Pyruvatkinase (aus Hasenmuskel)

Sigma Aldrich

LÖSUNGSMITTEL, LÖSUNGEN UND PUFFER

Aceton *p.a.*

Fluka

Ethanol *p.a.*

Sigma Aldrich

Ethylacetat

Sigma Aldrich

10 × konzentriertes PBS

Gibco

Toluol

Sigma Aldrich

Glutaraldehyd, 25 %

Sigma Aldrich

Formaldehyd, 37% mit 10-15 % Methanol

Ricca Chemical Company

Natriumchlorid

Baker

Natriumsulfat

Sigma Aldrich

Kaliumchlorid

Fluka

Natriumhydrogencarbonat

Baker

Kaliumbromid

Riedel de Haën

Magnesiumdichlorid-Hexahydrat

Applichem

Calciumdichlorid-Dihydrat

Grüssing

7.5 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|---|
| AA | <i>engl. alginic acid</i> , Alginsäure |
| AES | Auger-Elektronen-Spektroskopie |
| AIBN | 2.2'-Azo-bis-(butyronitril) |
| ANOVA | <i>engl. analysis of variance</i> , Varianzanalyse |
| APTMS | 3-Aminopropyltrimethoxysilan |
| ASW | <i>engl. artificial sea water</i> , kommerzielles künstliches Meerwasser |
| ATRP | Atom Transfer Radikal Polymerisation |
| a.u. | <i>engl. arbitrary unit</i> , willkürliche Einheit |
| B.E. | Bindungsenergie |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CS | Chondroitinsulfat |
| CTA | <i>engl. chain transfer agent</i> , Kettenübertragungsreagenz |
| DCM | Dichlormethan |
| DDT | Dodecanthiol |
| EDC | <i>N</i> -(3-dimethylpropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimid |
| EG | Ethylenglykol |
| EPS | Extrazelluläre polymere Substanzen |
| FWHM | <i>engl. full width at half maximum</i> , Halbwertsbreite |
| HA | <i>engl. hyaluronic acid</i> , Hyaluronäure |
| HEMA | Hydroxyethylmethacrylat |
| HEPES | 1-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HAS | Humanes Serumalbumin |
| HUDT | 11-Hydroxy-1-undecanthiol |
| IRRAS | Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie |
| NEXAFS | <i>engl. near-edge X-Ray absorption fine structure spectroscopy</i> , Röntgen-Nahkanten-Absorptions-Spektroskopie |
| n.v. | nicht vorhanden |
| NHS | <i>N</i> -Hydroxysuccinimid |
| NMP | <i>engl. „nitroxide mediated free radical polymerization“</i> , Nitroxid-vermittelte Polymerisation |
| n.v. | nicht vorhanden |
| OD | Optische Dichte |
| OEG | Oligo(ethylenglykol) |
| p.a. | <i>pro analysi</i> , zur Analyse |
| PBS | <i>engl. phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung |
| PDMS | Polydimethoxysilan |

| | |
|------|---|
| PEG | Polyethylenglykol |
| PK | Pyruvatkinase |
| PS | Polysaccharid |
| RAFT | <i>engl. reversible addition-fragmentation chain transfer</i> , reversibeler Additions-Fragmentierungs-Kettentransfer |
| REM | Raster-Elektronenmikroskopie |
| RFA | Röntgenfluoreszenzanalyse |
| rpm | <i>engl. rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| SAM | Selbstassemblierende Monolage |
| SEM | <i>engl. standard error of the mean</i> , Standardfehler |
| sog. | so genannt |
| SW | <i>engl. sea water</i> , künstliches Meerwasser |
| TBT | <i>engl. tributyl tin</i> , Tributylzinn |
| TFEA | 2,2,2-Trifluorethylamin |
| XPS | <i>engl. X-ray photoelectron spectroscopy</i> , Röntgen-Photoelektronenspektroskopie |

DANKSAGUNG

Die letzten Jahre habe ich oft über diese speziellen und für jede Dissertation zentralen Seiten nachgedacht, in jeder Situation die dokumentationswürdig war, bei jedem (so dachte man) unvergesslichem Zitat und den vielen emotionalen Momenten. Jetzt, wo es endlich so weit ist, fehlen mir natürlich doch die Worte.

Zunächst gilt mein Dank PROF. AXEL ROSENHAHN, für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die interdisziplinäre Themenstellung, die Bereitstellung gefühlt unendlicher Mittel, grandiose Möglichkeiten die Welt zu sehen und natürlich viel Geduld und Unterstützung bei der letztendlichen Fertigstellung.

Sehr herzlichen Dank auch an APL. PROF. REINER DAHINT, für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens.

An dieser Stelle darf nicht der Institutsdirektor des IFG, PROF. CHRISTOPH WÖLL, vergessen werden, der uns die letzten Monate unkompliziert und unbürokratisch Obdach gewährt hat. Ein Riesendankeschön!

Auch meinen zahlreichen Kooperationspartnern bin ich dankbar für die produktive, interessante und lehrreiche Zusammenarbeit: PROF. JAMES CALLOW und DR. MAUREEN CALLOW von der Universität Birmingham; PROF. ANTHONY CLARE und DR. NICK ALDRED von der Universität Newcastle; PROF. GEOFFREY SWAIN und seiner Arbeitsgruppe am FIT; PROF. CHRISOPHER BARNER-KOWOLLIK, DR. LEONIE BARNER, DR. ELISE LEJEUNE, DR. MIRELA ZAMFIR und DR. NICOLAS ZYDZIAK vom ITCP; DR. SERENA TEO und ihrer Arbeitsgruppe von der Universität Singapur.

Das gleiche gilt natürlich für meine ‚internen‘ Kooperationspartner DR. MARIA PILAR ARPA SANCET, DR. MARIA ALLES, und STOJAN MALESCHLIJSKI, die unzählige meiner Proben getestet und sehr, sehr oft auf kleine Punkte geklickt habe.

Danke an die Verwaltungsabteilung in Heidelberg, KARIN JORDAN, SWETLANA DUCHNAY und BENJAMIN SCHERKE, für die Hilfe bei der Überwindung aller bürokratischen Hürden und viel Empathie.

Auch GEORG ALBERT gilt ein Riesendankeschön, für die schnelle Präparation von gefühlt 10.000 beschichteten Gold-Slides, oft in letzter Sekunde.

Danke an alle fleißigen, geduldigen Korrekturleser, die sich durch die vielen deutlichen Wortwiederholungen, Bandwurmschachtelsätze und fehlenden Kommata gewühlt haben: MARIA ALLES, PILU ARPA SENKBEIL, SVENJA VATER, ISABEL THOME, THOMAS GORNIK, TOBIAS SENKBEIL ARPA, MAX HANKE, NIKO MEYERBRÖKER und am Ende noch ANDREA BAUER.

Und jetzt zum emotionalen Teil. Viele haben dazu beigetragen, dass die letzten Jahre insgesamt eine grandiose Zeit waren. Danke, Freunde!

★ Meiner ganzen Arbeitsgruppe, vor allem meinen wechselnden Bürokollegen, für immer wieder genannte, aber eben entscheidende Dinge: Grillen vorm PCI, Geburtstagslieder hören, IT-Legastheniker-Rettungen, Laborteamaktionen, Konferenzausflüge, Waldspaziergänge und und und

- ★ MAX und STOJAN, für das Zusammenhalten, als es dann doch irgendwann richtig ernst wurde, für offene Ohren, Verständnis, Schultern, Aufmunterungen und gemeinsames im Boot sitzen (das sich in letzter Zeit mehr wie „ImRettungsboothinterhergeschlepptwerden“ angefühlt hat)
- ★ MARIA, LEO, THOMAS und NIKO für den Sommer 2011 mit unendlich vielen unvergesslichen Momenten und natürlich auch alles andere
- ★ NIKOLAUS gilt extra Aufmerksamkeit, für die Einführung in die (meisten) Geheimnisse der MAX, fürs Brechen und (fast) Wiederaufbauen, viele motivierende und (unglaublich aber wahr) NETTE Worte, das Telefonjokerdasein....
- ★ ISABEL, für die emotionale Unterstützung
- ★ MARIA, ich werde es wie Nikolaus ausdrücken: die auf nicht immer genau definierbare, aber unschätzbare und unersetzliche Weise zum Gelingen dieser Arbeit (und natürlich noch viel mehr) beigetragen hat
- ★ Meiner gesammelten Familie, den BOHLANDERS, OMA und PETRA, ihr wart immer da, ohne euch wäre ich nicht, wo ich jetzt bin
- ★ Danke MAMA, PAPA und LILLI, dass ihr immer an mich geglaubt und auch in meinen schlimmsten Monsterkreissägezeiten festedicht zu mir gehalten habt
- ★ Danke Jo, du weißt schon