
Materialeinflüsse bei der Abtötung von Bakterien durch metallisches Kupfer

Dissertation

zur Erlangung des Grades des Doktors der Ingenieurwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften der



**UNIVERSITÄT
DES
SAARLANDES**

vorgelegt von: Michael Hans

Saarbrücken

2015

Tag des Kolloquiums: 25.06.2015

Dekan: Prof. Dr. Dirk Bähre

Berichterstatter: Prof. Dr. Frank Mücklich

Prof. Dr. Eduard Arzt

Vorsitz: Prof. Dr. Guido Kickelbick

Akad. Mitarbeiter: Dr. Frank Aubertin

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Danksagung	iii
Kurzfassung	v
Abstract	vi
Liste der verwendeten Abkürzungen und Symbole	vii
Einleitung	1
1. Bedrohung durch Infektionskrankheiten.....	1
2. Antimikrobielle Werkstoffe zur Infektionsprävention.....	2
3. Fokus und Aufbau der Arbeit.....	4
Grundlagenteil	
Bakteriologie	7
1. Zellaufbau.....	7
2. Klassifizierung.....	9
3. Ionentransportprozesse.....	11
Methoden	12
1. Kultivierung von Bakterien.....	12
2. Evaluation der antibakteriellen Wirkung.....	13
2.1 Hemmhoftest.....	14
2.2 Lebend/Tot-Färbung.....	14
2.3 Wachstumstest.....	15
2.4 Abtötungstest.....	16
3. Laser-Materialbearbeitung.....	20
4. Laser-Interferenzstrukturierung.....	23
5. Laser Cladding.....	25
6. ICP-Massen- und Atomemissionsspektroskopie.....	26
7. Ellipsometrie.....	26
Materialeigenschaften	27
1. Grundlegende Eigenschaften.....	27
2. Korrosionsverhalten von Kupfer.....	28
2.1 Atmosphärische Korrosion.....	28
2.2 Elektrochemische Korrosion.....	29
2.3 Kupferlegierungen.....	31
Antimikrobielle Werkstoffe	33
1. Kupfer.....	33
1.1 Wirkmechanismus.....	36
1.2 Materialeinfluss.....	39
2. Silber.....	41
2.1 Wirkmechanismus.....	41
2.2 Materialeinfluss.....	42
3. Kombination von Kupfer und Silber.....	43
3.1 Wirkmechanismus.....	43
3.2 Materialeinfluss.....	44

4. Titan	45
4.1 Wirkmechanismus.....	45
4.2 Materialeinfluss	46
5. Weitere Materialien und Werkstoffkonzepte	48
Zentrale Fragestellungen	51

Ergebnisteil

Versuchskonzept	53
Oxidations- und Mikrostruktureinfluss	54
1. Rolle der Oxidation von Kupfer	54
1.1 Oxidation während Abtötungsversuchen.....	54
1.2 Abtötungsverhalten von Kupferoxiden	57
1.3 Diskussion.....	61
1.4 Versuchsparameter.....	65
2. Mikrostruktureinfluss am Beispiel Kupfer-Silber.....	66
2.1 Legierungsbildung durch Laser Cladding.....	66
2.2 Abtötungsverhalten	69
2.3 Diskussion.....	70
2.4 Versuchsparameter.....	72
Oberflächeneinfluss	74
1. Bedeutung des Oberflächenkontakts.....	74
1.1 Quantifizierung der Bakterienanlagerung	74
1.2 Inerte, nanoskalige Abstandshalter	76
1.3 Abtötungsverhalten	78
1.4 Diskussion.....	80
1.5 Versuchsparameter.....	84
2. Oberflächenstrukturierung und -analyse	86
2.1 Adhäsionssteuerung durch Oberflächenstrukturierung.....	86
2.2 Kontakt- und Strukturanalyse mittels FIB	88
2.3 Laser-Strukturierung von Kupferwerkstoffen	92
2.4 Versuchsparameter.....	94
Elementübergreifende Betrachtung	96
1. Eigenschaftskorrelation bei Metallen.....	96
2. Kupfer- und Silberwerkstoffe im Vergleich	103
3. Legierungseinfluss bei Kupferwerkstoffen.....	105
3.1 Methoden- und Präparationseinfluss.....	108
3.2 Einfluss der Legierungszusammensetzung.....	110
Zusammenfassung	114
Literaturverzeichnis	116
Abbildungsverzeichnis	133
Tabellenverzeichnis	136
Anhang	137

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Frank Mücklich (Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe, UdS) dafür, dass er mir die Möglichkeit, das Vertrauen und die notwendige Unterstützung gab, mein Wunschthema als Dissertation unter seiner Betreuung durchzuführen. Für die durchgehend hilfreichen Diskussionen und Kooperationsratschläge bedanke ich mich ausdrücklich. Bei Herrn Prof. Dr. Eduard Arzt (Leibniz Institut für neue Materialien, UdS) bedanke ich mich für seine Bereitschaft, meine Arbeit als weiterer Gutachter zu bewerten.

An nächster Stelle richte ich mich an Kollegen und Institutsmitarbeiter, die in verschiedenster Weise zu dieser Arbeit beigetragen haben. Dies betrifft insbesondere Herrn Dr. Carsten Gachot und Herrn Dr. Andreas Rosenkranz, die mir beide kompetente Diskussionspartner zum Thema Laser-Materialbearbeitung waren und wesentliche Teile des Manuskripts Korrektur gelesen haben. Als weiteren kritischen Lesern gilt mein ausdrücklicher Dank Herrn Christoph Pauly und Herrn Kim Trinh. Für die exzellente Unterstützung bei experimentellen Arbeiten möchte ich mich bei Herrn Benjamin Bax, Herrn Sebastian Slawik und Herrn Thomas Kreuter (inzwischen Karlsruher Institut für Technologie) bedanken. Während der Schreibphase haben mich Herr Leander Reinert, Herr Björn Lechthaler und Herr Philipp Grützmacher erheblich entlastet und zu meinem Wohlbefinden im Büro beigetragen. Vielen Dank dafür! Einige Teile der vorgestellten Arbeit entstanden im Rahmen von studentischen Abschlussarbeiten. Bei (Reihenfolge der Abschlussarbeiten) Herrn Andreas Hegetschweiler, Frau Bettina Zimmer, Herrn Juan Carlos Támara, Frau Anna-Lena Rojan, Herrn Simon Bonk, Frau Duan Wang und Herrn Adrian Thome bedanke ich mich insbesondere für Ihre wissenschaftlichen Beiträge.

Während des Projekts hatte ich das Vergnügen, mit einigen Wissenschaftlern aus dem Fachbereich Mikrobiologie zusammenzuarbeiten. Zu sehr großem Dank verpflichtet bin ich hierbei Herrn Prof. Dr. Marc Solioz und Frau Dr. Salima Mathews (beide ehemals klinische Forschung an der Universität Bern), die mir die Grundlagen mikrobiologischer Laborarbeit vermittelt haben. Außerdem danke ich beiden für die Unterstützung bei der Einrichtung des hiesigen mikrobiologischen Labors, die fruchtbare wissenschaftliche Diskussion und die Beratung während des Verfassens von *peer-review* Arbeiten. Sehr dankbar bin ich ebenfalls Frau Claudia Hahn und Herrn Dr. Ralf Möller (beide Strahlenbiologie am Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt) für die präzise Korrektur der mikrobiologischen Aspekte meiner Arbeit. Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Mathias Herrmann, Herrn PD Dr. Markus Bischoff, Frau Martina Birke (alle Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Campus Homburg) und Herrn Prof. Dr. Gert-Wieland Kohring (Lehrstuhl für angewandte Mikrobiologie, UdS), die das Forschungsprojekt vor Ort mit unterstützt haben.

Abschließend möchte ich wichtige Kooperationspartner adressieren. Mein ausdrücklicher Dank geht an Herrn Dr. Andreas Erbe und Herrn Dr. Ying Cheng (beide ehemals Max Planck-Institut für Eisenforschung, Düsseldorf) für die aufschlussreiche Diskussion elektrochemischer Effekte und die ellipsometrischen Messungen. Für die hervorragende Unterstützung bei der Bestimmung der bakteriellen Adhäsion und der Oberflächenanalyse mittels XPS bedanke ich mich insbesondere bei Frau Prof. Dr. Karin Jacobs, Herrn Dr. Frank Müller, Herrn Dr. Christian Zeitz, Herrn Christian Kreis, Herrn Dr. Peter Loskill und Herrn Samuel Grandthyll (alle Lehrstuhl für Physik kondensierter Materie, UdS, bzw. Ehemalige). Weiterhin gilt mein Dank Herrn PD Dr. Ralf Kautenburger und Frau Dr. Christina Hein (anorganische Festkörperchemie, UdS), die bei der Spurenelementanalyse von Lösungen wichtige Erkenntnisse beigetragen haben. An dieser Stelle möchte ich auch Herrn Dr. Anton Klassert, Herrn Dr. Ladjik Tikana und Herrn Dr. Klaus Ockenfeld vom Deutschen Kupferinstitut danken, die wesentlich zur Vernetzung des Projekts beigetragen haben. Für die Bereitstellung von Kupfer-Probematerialien bedanke ich mich bei Herrn Dr. Uwe Hofmann (Leiter Zentrallabor und Entwicklung, Wieland-Werke AG), und bei Herrn Dr. Dirk Rode (Leiter Forschung und Entwicklung, KME Germany GmbH und Co. KG).

In ganz besonderer Weise möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen lieben Eltern bedanken. Sie haben mich während des Studiums durchgehend unterstützt und es mir damit erst ermöglicht, meine Interessen frei zu entfalten.

Kurzfassung

Die Motivation dieser Arbeit besteht darin, die Entwicklung von antibakteriell wirkenden Kupferwerkstoffen voranzutreiben, die im medizinischen Anwendungsbereich zur Reduktion von infektionsbedingten Krankheits- und Todesfällen beitragen können. Über die mikrobiologischen Wirkmechanismen von Kupfer ist bisher wenig, über materialgesteuerte Effekte bei der Abtötung von Bakterien durch Kupferwerkstoffe noch weniger bekannt.

Um dieses Wissensdefizit zu verringern und gleichzeitig ein optimiertes Materialdesign abzuleiten, ist es Ziel der vorgestellten Arbeit, die grundlegenden Materialeinflüsse bei der Abtötung von Bakterien durch Kupferwerkstoffe zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Oxidations-, Mikrostruktur- und Oberflächeneffekte bei Kupfer mit der antibakteriellen Wirkung korreliert. Es wurde gezeigt, dass die Steuerung der Kupferionenabgabe durch geeignete Mikrostrukturgestaltung und Oxidbildung sowie die direkte Interaktion der metallischen Oberfläche mit den Bakterien wichtige Einflussfaktoren für das Abtötungsverhalten darstellen. Auf Basis der für Kupfer gewonnenen Erkenntnisse wurde ein allgemeines Modell zur Beschreibung der antibakteriellen Wirkung von Metallen abgeleitet und der Legierungseinfluss bei Kupferwerkstoffen interpretiert.

Abstract

This work is motivated by the development of copper-based materials with antibacterial properties, which should help to reduce infection-related cases of illness and death in the healthcare sector. Little is known about the related governing microbiological mechanisms of copper and even less about material-related influences.

In order to abate this lack of knowledge and to derive an optimized material design, the main objective of this thesis is to study the governing influence of material properties on the bactericidal effect of copper-based materials. For this purpose, oxidational, microstructural and surface-related effects of copper have been correlated to its antibacterial efficiency. It was shown, that a controlled copper ion release by tailoring the microstructure and the oxide formation as well as the direct interaction of the metallic surface with bacteria represent important factors regarding the antibacterial capacity. Based on the findings for copper, a universal model was derived to describe the antibacterial efficiency of metals. Furthermore, the influence of alloying for copper-based materials was interpreted.

Liste der verwendeten Abkürzungen und Symbole

AFM	<i>atomic force microscopy</i>
[A]	Platzhalter
α	zwischen interferierenden Laserstrahlen eingeschlossener Winkel (°)
α_j	Winkel (°)
β_j	Winkel (°)
c	Lichtgeschwindigkeit (m s^{-1})
cfu	<i>colony forming units</i>
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DGKH	Deutsche Gesellschaft für Krankenhaushygiene
DLR	Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DP	<i>dry plating</i>
Δ	ellipsometrischer Parameter
ΔD	Protonendiffusionspotential (V)
$\Delta\psi$	Membranpotential (V)
ρ	komplexes Verhältnis der Reflexionskoeffizienten
E	Energie (J) oder elektrisches Feld (C) oder elektrochemisches Potential (V)
E_0	elektrochemisches Standardpotential (V)
EC	praktischer Edelcharakter laut ^[1]
EDX	<i>energy dispersive x-ray spectroscopy</i>
EM	Ellipsometrie
EPA	<i>environmental protection agency</i>
ESEM	<i>environmental scanning electron microscopy</i>
ϵ_0	Permittivitätskonstante des Vakuums
f	Pulsfrequenz bei Laser (Hz)
F_G	globale, gemittelte Laserfluenz (J cm^{-2})
FIB	<i>focused ion beam</i>
GLAD	<i>glancing angle deposition</i>
I	Intensität (W m^{-2})
IR	infrarot
I_{syn}	Synergieindex
IE	erste Ionisierungsenergie
ICP-MS	<i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
ICP-AES	<i>inductively coupled plasma atomic emission spectrometry</i>
JIS	Japanischer Industriestandard
k	Wellenzahl (m^{-1}) oder Abtötungsrate entsprechend ^[2]
K_L	Löslichkeitsprodukt
λ	Wellenlänge (nm)
L	mittlere Laserleistung (W)
LC	<i>laser cladding</i>
LIL	Laser-Interferenzlithographie
LIS	Laser-Interferenzstrukturierung

Me	Metall
MIC	<i>minimal inhibitory concentration</i>
MPIE	Max-Planck-Institut für Eisenforschung
MRSA	methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
$n_{(t)}$	zeitabhängige Anzahl an Bakterien
OD	optische Dichte
OxR	thermisch oxidierte Kupferreferenz
OxL	mit Laser linienstrukturierte Kupferprobe
P	laterale Periodizität (μm)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pK_L	Logarithmus des Löslichkeitsprodukts K_L
PVD	<i>physical vapor deposition</i>
ΔP	Protonenpotential (V)
R	antimikrobielle Effizienz definiert nach JIS Z 2801:2000
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RG	Risikogruppe
\vec{r}	Ausbreitungsvektor
rms	<i>root mean square roughness</i>
RNS	Ribonukleinsäure
r_p	Reflexionskoeffizient parallel zur Einfallsebene
r_s	Reflexionskoeffizient senkrecht zur Einfallsebene
S	bestrahlte Fläche (cm^2)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UdS	Universität des Saarlandes
UHR	<i>ultra high resolution</i>
UV	ultraviolett
VBNC	<i>viable but not culturable</i>
WHO	<i>world health organisation</i>
WLI	Weißlichtinterferometrie
XPS	<i>x-ray photoelectron spectroscopy</i>
XRD	<i>x-ray diffraction</i>
χ	Elektronegativität
x	Längenkoordinate oder Platzhalter für ganze Zahl
y	Längenkoordinate oder Platzhalter für ganze Zahl
ψ	ellipsometrischer Parameter
ω	Frequenz (Hz)
ω_p	Plasmarequenz (Hz)
WP	<i>wet plating</i>
z	Längenkoordinate
Z	vereinheitlichte Abtötungsrate ($\log(\text{cfu}) \text{min}^{-1}$)

Einleitung

1. Bedrohung durch Infektionskrankheiten

Jedes Jahr erfährt das Thema „Infektionskrankheiten“ in Deutschland verstärkte mediale Aufmerksamkeit, wenn aktuelle Abschätzungen zu den daraus resultierenden Todesfällen von der Deutschen Gesellschaft für Krankenhaushygiene (DGKH) bekannt gegeben werden. Insbesondere stehen hierbei die sogenannten **nosokomialen Infektionen** im Vordergrund. Dies sind Infekte, die Patienten durch und während eines Aufenthalts im Krankenhaus erwerben, wobei ein beim Patienten zumeist geschwächtes Immunsystem auf eine größere Vielfalt von Krankheitserregern im direkten Umfeld trifft. Die durch derartige Infekte verursachten Todesfälle belaufen sich deutschlandweit nach aktuellen Schätzungen auf bis zu 30.000 pro Jahr.^[3] Die Bedeutung dieser Zahl wird erst durch den direkten Vergleich mit einem Referenzwert, wie etwa der pro Jahr registrierten Verkehrstodesfälle, deutlich. Diese belaufen sich laut dem statistischen Bundesamt auf ca. 3.300 im Jahr 2013.^[4] Auf europäischer Ebene werden ca. 148.000 Todesfälle durch nosokomialen Infektionen pro Jahr geschätzt.^[5] Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) geht von weltweit über 30 Millionen nosokomialen Infektionen pro Jahr mit tödlichem Ausgang aus.^[6] Nach Schätzungen der WHO sind, je nach Land, zwischen 3,5 - 19 % der Bevölkerung von nosokomialen Infektionen betroffen.^[7]

Neben den unmittelbar spürbaren, humanitären Konsequenzen ziehen nosokomiale Infekte durch neu anfallende Folgebehandlungen auch einen erheblichen ökonomischen Aufwand nach sich. Das amerikanische Zentrum für Krankheitskontrolle und Prävention schätzte beispielsweise den 2009 durch diese Art von Infektionen in den USA verursachten Folgekosten auf umgerechnet 20 - 25 Milliarden €.^[8]

Verschärft wird die Situation durch die weltweit **zunehmenden Antibiotikaresistenzen** bei krankheitserregenden Keimen, wie in Abbildung 1 verdeutlicht.^[9] Ein aus den Medien bekanntes Beispiel hierfür ist der MRSA-Erreger. Hierbei steht MRSA für methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), eine Bakterienart, die gegen das Antibiotikum Methicillin unempfindlich ist und gefährliche Hautkrankheiten überträgt.^[10] Mit zunehmendem Einsatz von Antibiotika steigt die Wahrscheinlichkeit, dass Bakterien eine Resistenz entwickeln und die eingesetzten Wirkstoffe damit unwirksam werden. Diese Entwicklung stellt ein noch nicht einzuschätzendes, steigendes Risiko für zukünftige Generationen dar.

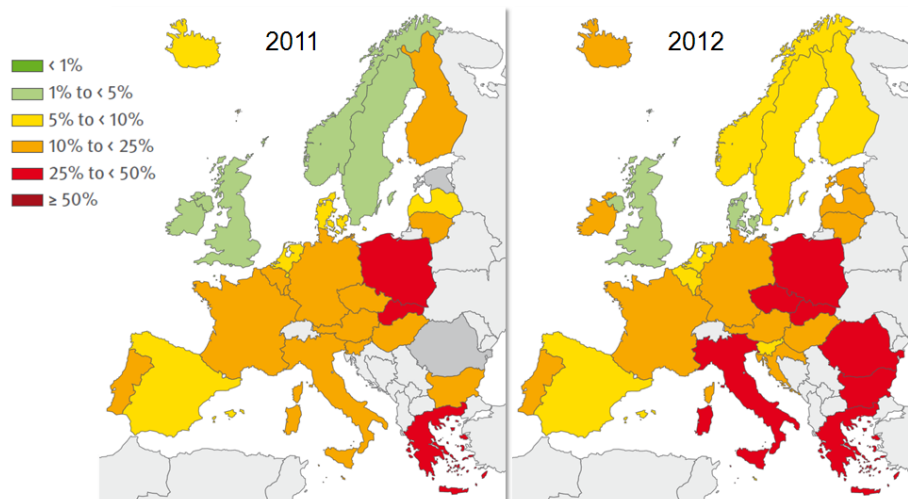


Abbildung 1: Steigende Antibiotikaresistenz am Beispiel von *Pseudomonas aeruginosa*, einem oft als nosokomialer Erreger auftretenden Bakterium. Im Ländervergleich dargestellt sind die Prozentsätze an *P. aeruginosa*, die gegen Piperacillin, ein gängiges Antibiotikum, resistent sind. Im direkten Vergleich zwischen 2011 und 2012 ist ein deutlicher, für andere Bakterienarten repräsentativer, Resistenzanstieg zu beobachten.^[11,12]

Eine bewährte Strategie zum Eindämmen der Resistenzentwicklung bei Bakterien ist daher der reduzierte Einsatz von Antibiotika. Dies setzt jedoch adäquate Alternativen zur Infektionsbekämpfung voraus. Bereits 2011 stellte die WHO den Weltgesundheitstag unter das Motto „Antimikrobielle Resistenzen – Heute keine Maßnahmen, morgen kein Heilmittel“ und proklamiert in ihrem Aktionsplan mit weltweitem Anspruch ausdrücklich die Notwendigkeit der Erforschung alternativer Strategien für die Bekämpfung von Infektionskrankheiten.^[13]

2. Antimikrobielle Werkstoffe zur Infektionsprävention

Eine wirksame Methode zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten stellt die aktive Prävention einer Erstinfektion dar. Zusätzlich zur direkten Übertragung von Mensch zu Mensch werden Materialoberflächen oft zur Zwischenstation für Bakterien, die generell in der Lage sind, mehrere Monate auf diesen zu überleben.^[14] Übertragungswege im klinischen Umfeld können sich somit bereits über den Hautkontakt mit oft gebrauchten Werkzeugen oder fest installierten Elementen wie Lichtschaltern, Türgriffen oder Armaturen ergeben (siehe Abbildung 2).^[15,16] Mit der Haut aufgenommene Keime werden dabei indirekt unter Patienten und über das Pflegepersonal übertragen. Um diese Infektionsschleife zwischen Mensch und Materialoberflächen zu unterbrechen, werden in Krankenhäusern aufwändige, regelmäßige Desinfektionsmaßnahmen durchgeführt. Diese gewähren einen wirksamen, aber lediglich temporären Schutz, weshalb seit einigen Jahren Werkstoffe mit intrinsischen, dauerhaft antimikrobiellen Eigenschaften in den Fokus rücken.

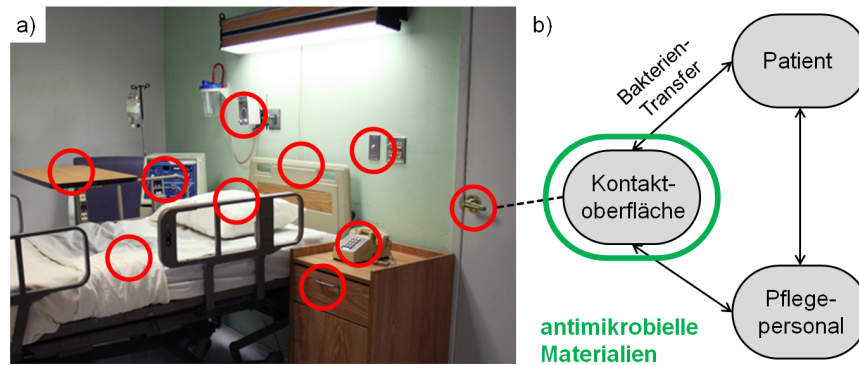


Abbildung 2: a) Rot markiert in einem repräsentativen Krankenzimmer sind Kontaktoberflächen, auf denen in Studien eine starke Keimbelastung nachgewiesen wurde.^[17-20] b) Möglicher Lösungsansatz: Durchbrechen der nosokomialen Infektionsschleife durch den Einsatz antimikrobieller Materialien.^[21]

Besonders hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang die metallischen Elemente Kupfer und Silber. Beide Metalle sind in der Lage, nicht nur Bakterien, sondern auch Viren und Pilze effektiv abzutöten und werden damit auch als antimikrobiell bezeichnet.^[22,23] Feldstudien, in denen z.B. Türklinken aus Edelstahl durch Klinken aus Kupferlegierungen ersetzt wurden, zeigen, dass sich die nosokomiale Infektionsrate durch antimikrobielle Kontaktoberflächen effektiv senken lässt. Diese Studien belegen eine Keimreduktion von 30 - 90 % und beschreiben eine um bis zu 50 % reduzierte, nosokomiale Infektionsrate durch derartige Maßnahmen.^[24-27] Mit Blick auf die zahlreichen, durch nosokomiale Infekte verursachten Todesfälle wird daher klar, welches enorme Potential im Einsatz und der Entwicklung antimikrobieller Materialien steckt.

Ein im Vergleich zu Antibiotika angeführter Vorteil ist der, dass Kupfer und Silber eine antibakterielle Breitbandwirkung zeigen und nur in geringem Maße bakterienspezifisch wirken.^[28] Weiterhin gilt als erwiesen, dass beide Metalle über mehrere, gleichzeitig ablaufende Abtötungsmechanismen verfügen, was diese gegen ansonsten multi-resistente Keime (wie z.B. MRSA) ebenfalls wirksam macht und eine Resistenzausbildung bei Bakterien zusätzlich erschwert.^[23,29] Somit stellt die Infektionsprävention durch antimikrobielle Werkstoffe auf Kupfer- und Silberbasis eine einzigartige Alternative zum risikobehafteten Einsatz von Antibiotika dar.

Obwohl Kupferlegierungen sich bereits in einigen Feldstudien bewährt haben und 2008 in den USA bereits die ersten fünf Legierungen durch die Umweltschutzbehörde offiziell als antimikrobiell registriert wurden, steht der Akzeptanz und dem unbedenklichen Einsatz von metallischen, antimikrobiellen Werkstoffen ein erhebliches Wissensdefizit gegenüber. Der maßgebende Einfluss der Materialgestaltung dieser Werkstoffe und die Verknüpfung mit den resultierenden biologischen Wirkmechanismen sind bisher weitgehend unbekannt.

3. Fokus und Aufbau der Arbeit

Diese Arbeit verfolgt einen interdisziplinären Ansatz zur Aufklärung der fundamentalen physikalisch-chemischen Prozesse und Materialparameter, die der antibakteriellen Wirkung von metallischem Kupfer zu Grunde liegen. Hierbei liefert die Materialwissenschaft die notwendigen Kenntnisse und Methoden, um modellhafte Werkstoffsysteme mit eingestellten Gefüge- und Oberflächeneigenschaften zu erzeugen und zu charakterisieren. Die antibakterielle Wirksamkeit dieser Modellwerkstoffe wird wiederum durch etablierte, mikrobiologische Verfahren untersucht.

Als anschauliche Darstellung lässt sich eine Brücke über die Größenordnung der involvierten materialwissenschaftlichen und biologischen Strukturen herleiten (siehe Abbildung 3). Sowohl mikrostrukturelle Merkmale als auch die möglichen Strukturgrößen der hier eingesetzten Laser-Interferenzstrukturierung von Oberflächen umfassen genau die durchschnittliche Größe von Bakterien (1 - 10 μm). Mit Hilfe dieser Methoden lassen sich somit einzigartige Wechselwirkungen zwischen Material- bzw. Oberflächenstrukturen und Bakterien erzeugen und studieren.

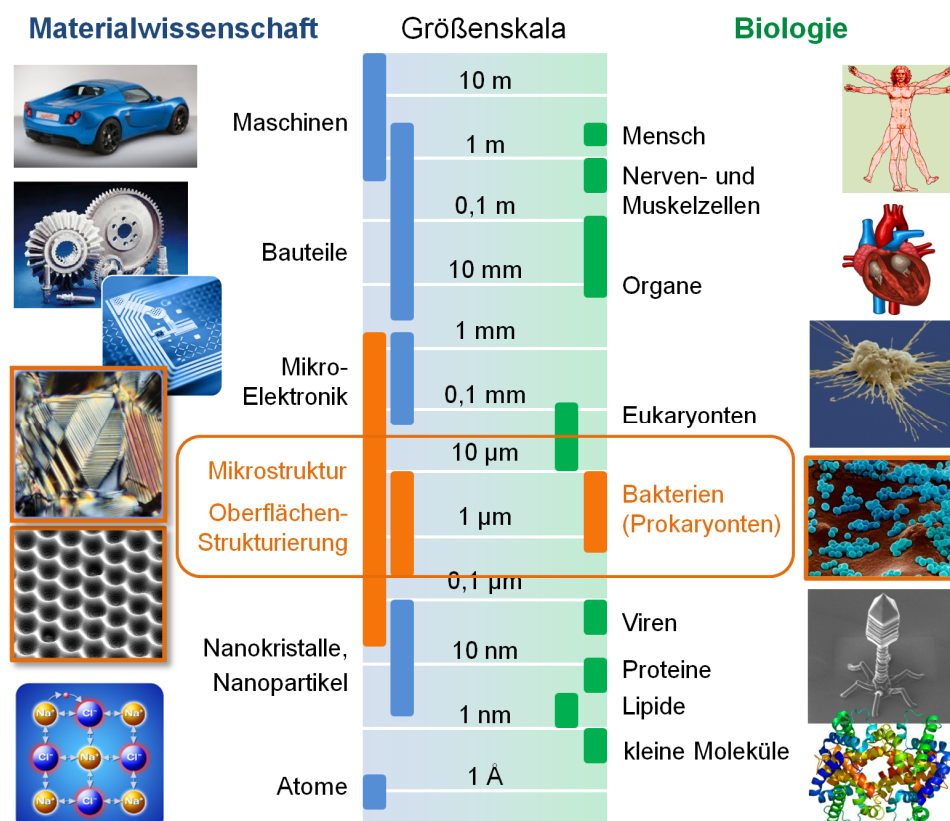


Abbildung 3: Gegenüberstellung elementarer Strukturen der Materialwissenschaft und Biologie mit entsprechendem Skalenverhältnis. Die relevanten Schnittstellen der Arbeit liegen auf Ebene der Mikrostruktur, der Laser-Interferenzstrukturierung von Oberflächen und der durchschnittlichen Bakteriengröße. Quellen: eigene Aufnahmen und nicht geschützte Internetquellen.

Die Qualität und Relevanz der biologischen Untersuchungen wurden durch die enge Zusammenarbeit mit Experten auf dem Gebiet der Kupferresistenzforschung bei Bakterien, namentlich AG Prof. Marc Solioz (ehemals: Universität Bern, Schweiz; momentan: Staatliche Universität Tomsk, Russland) abgesichert. Ein wesentlicher Teil der dargestellten Ergebnisse wurde im Rahmen der DFG-Förderprojekte MU959/26-1 & 2 erarbeitet.

Aufbau

Die Arbeit ist in zwei Hauptbereiche, den Grundlagen- und den Ergebnisteil, gegliedert.

Der **Grundlagenteil** besteht aus einer Zusammenfassung mikrobiologischer Grundlagen, der wichtigsten, eingesetzten mikrobiologischen und materialwissenschaftlichen Methoden, der relevanten Materialeigenschaften sowie einer umfassenden Darstellung des momentanen Forschungsstands zu antimikrobiellen, metallischen Werkstoffen. Hierbei liegt ein deutlicher Fokus auf Methoden zur Evaluation antibakteriellen Materialverhaltens, auf der Laser-Materialbearbeitung und auf Kupfer als für diese Arbeit wichtigstem Werkstoff.

Der **Ergebnisteil** besteht aus drei thematischen Kapiteln. Die ersten beiden befassen sich mit kupferbasierten Werkstoffen und Wirkmechanismen, die entweder durch Oxidations- und Mikrostruktureinflüsse oder durch Oberflächenstrukturen hervorgerufen werden. Auf Basis der für Kupferwerkstoffe hergeleiteten Mechanismen wird im dritten Kapitel eine allgemeine, elementübergreifende Diskussion des antimikrobiellen Verhaltens bei Metallen durchgeführt.

Grundlagenteil

Bakteriologie

Das folgende Kapitel soll eine kurze Einführung in wichtige Aspekte der Mikrobiologie von Bakterien liefern. Dies beinhaltet Grundlagen zum Zellaufbau und der Klassifizierung von Bakterien sowie Ionentransportprozesse bei Bakterien.

1. Zellaufbau

Lebewesen werden in drei Reiche eingeteilt: Eukaryonten, Archaeobakterien und Eubakterien. Die letzteren beiden werden allgemein als Prokaryonten zusammengefasst, was synonym zum Begriff Bakterien ist. Tiere und Pflanzen werden dem Bereich der Eukaryonten zugeordnet.^[30] Diese Einteilung ist auf grundlegende Unterschiede im Zellaufbau zurück zu führen, der in folgender Abbildung für Bakterien beispielhaft dargestellt ist.

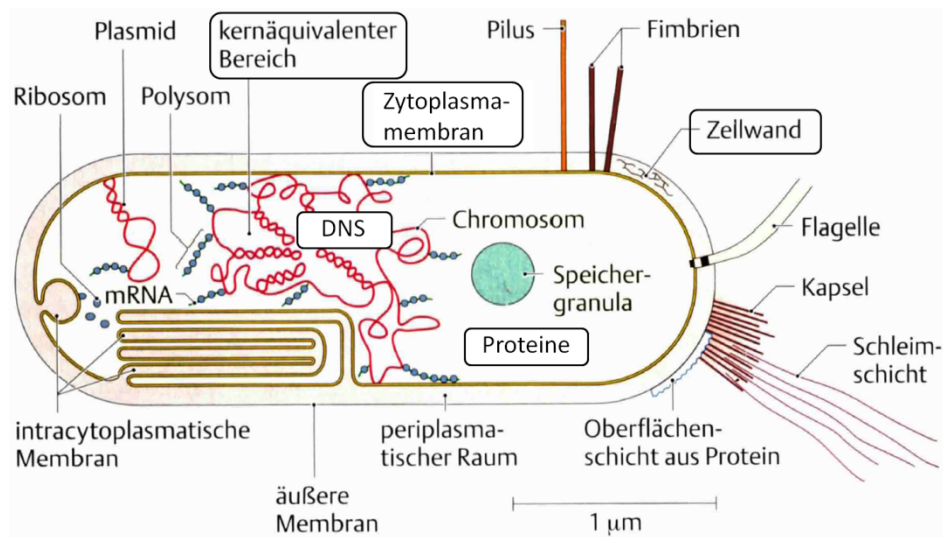


Abbildung 4: Schematischer Aufbau von Bakterien am Beispiel des stäbchenförmigen Modellorganismus *Escherichia coli* (*E. coli*). Die für antimikrobiellen Effekte relevanten Bausteine der Zellwand und des Zellinneren sind eingerahmt. Modifiziert aus ^[30].

Bakterienzellen sind in der Regel etwa zehnmal kleiner als eukaryontische Zellen und besitzen im Gegensatz zu diesen keinen echten Kern. Die Desoxyribonukleinsäure (DNS), in der die Erbinformationen gespeichert sind, liegt bei Bakterien als ringförmig geschlossenes Molekül (Nucleoid) im sogenannten kernäquivalenten Bereich vor. Innerhalb einer Bakterienzelle gibt es keine separaten Funktionsräume oder Organellen, wie dies bei eukaryontischen Zellen der Fall ist. Folgende Zellbestandteile werden aufgrund ihrer Rolle während des Abtötungsprozesses durch Kupfer und Silber näher betrachtet:

Zellwand und -Membran

Um bei einem Zellinnendruck von ca. 0,2 - 2,5 MPa die strukturelle Integrität zu erhalten, sind Bakterien mit einer stabilisierenden Zellwand aus Peptidoglykan (Makromoleküle aus Zuckern und Aminosäuren, synonym: Murein) umgeben, welche in folgender Abbildung blau dargestellt ist.

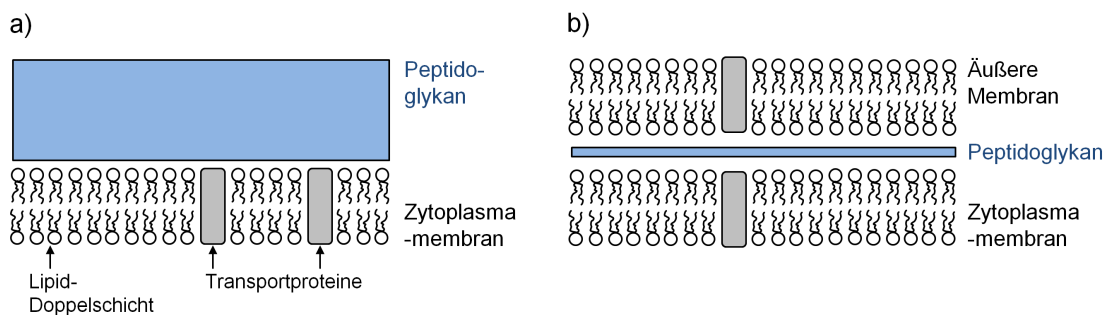


Abbildung 5: Schema des Zellwandaufbaus von a) Gram-positiven und b) Gram-negativen Bakterien.

Innen an dieser Zellwand liegt eine Zytoplasmamembran bestehend aus einer Lipiddoppelschicht an, die eine Permeabilitätsbarriere für den Austausch von Stoffen mit der Umgebung darstellt. Je nach Aufbau der Zellwand unterscheidet man zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterienarten. Die Bezeichnung geht zurück auf die Gram-Färbemethode (H.H. Gram, 1853 - 1938), während der die Peptidoglykanschicht mikroskopisch sichtbar eingefärbt wird. Während Gram-negative Bakterien eine dünnere Zellwand mit doppelter Membran aufweisen, verursacht die dickere Peptidoglykanschicht bei Gram-positiven Bakterien eine ausgeprägte Gram-Färbung.

Zu den nosokomial relevanten Bakterien zählen sowohl Gram-positive (z.B. *S. aureus*) als auch Gram-negative (z.B. *E. coli*) Vertreter. Gram-negative Bakterien sind wegen ihrer zusätzlichen, äußeren Zellmembran generell unempfindlicher gegenüber Antibiotika.^[10]

Desoxyribonukleinsäure

Die im Zytoplasma befindliche Desoxyribonukleinsäure (DNS) liegt als doppelsträngiges, helikal gewundenes Molekül vor. Beide Hauptstränge bestehen aus Desoxyribose, Phosphat und einem Nukleotid (Adenin, Guanin, Cytosin oder Thymin). Adenin kann mit Thymin und Guanin mit Cytosin jeweils eine Wechselwirkung eingehen. Diese Basenpaare sind durch die jeweilig vorgegebenen Bindungsverhältnisse und -abstände eindeutig festgelegt und definieren durch ihre Sequenz die Erbinformation des Bakteriums. Über die Verdopplung der DNS findet die Weitergabe von Informationen (z.B. Antibiotikaresistenzen) als erster Schritt während der Zellteilung statt.

Proteine

Proteine sind Makromoleküle, die strukturelle, regulatorische und katalytische (enzymatische) Funktionen erfüllen. Sie steuern elementare zelluläre Prozesse wie chemische Signalerkennung, Nährstoffaustausch und Zellatmung. Wichtige funktionelle Gruppen bei Proteinmolekülen sind beispielsweise die Carboxylgruppe (-COOH), die Aminogruppe (-NH₂) oder die Sulfhydrylgruppe (-SH).

Einige Bakterienarten sind in der Lage, in einer für sie lebensfeindlichen Umgebung in die sogenannte Sporenform zu wechseln, die einen wesentlich robusteren Aufbau bei extrem reduziertem Nährstoffbedarf aufweist. Ändern sich die Umgebungsbedingungen in einer positiven Weise, so kehrt die Zelle in ihren vegetativen „Normalzustand“ zurück. Hauptaufgabe der Sporenform ist der Schutz der im Nucleoid befindlichen, größtenteils dehydrierten DNS durch eine extreme Verstärkung der Zellwand.^[31,32] Kupfer und Silber sind in der Lage, auch Bakteriosporen abzutöten.^[33,34]

2. Klassifizierung

Auf und in einem Menschen (z.B. Haut und Darm) leben ungefähr 10¹⁴ Bakterien, was in etwa der zehnfachen Anzahl der körpereigenen, eukaryontischen Zellen entspricht. Bis heute sind rund 60.000 Bakterienarten bekannt, was nach Schätzungen lediglich 1 % der gesamten Bakterienflora ausmacht. Die Klassifizierung und Namensgebung von Bakterien unterliegt klaren Vorschriften nach dem *international code of nomenclature of bacteria* (ICNB).^[35] Ziel dieser Regelung ist es, wichtige Merkmale zur Klassifizierung eines Bakteriums durch eine eindeutige Bezeichnung sichtbar zu machen (siehe folgende Abbildung).

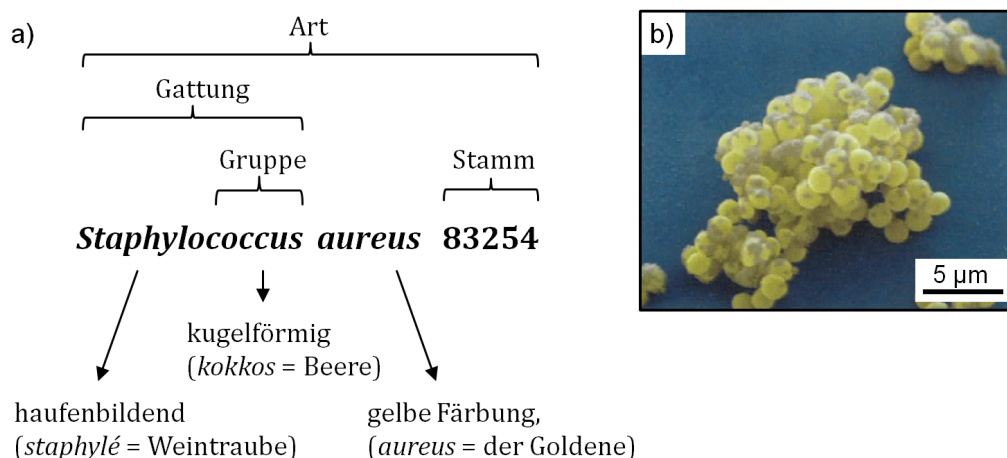


Abbildung 6: a) Namensgebung und ableitbare Eigenschaften am Beispiel von *S. aureus*, der in b) rasterelektronenmikroskopisch dargestellt ist.^[30] Die für den Keim typische Gelbfärbung wurde hier durch Bildnachbearbeitung erzeugt.

Im Folgenden werden die für diese Arbeit relevanten Klassifizierungsmerkmale bei Bakterien betrachtet.

Wie zuvor bereits beschrieben, stellt der **Aufbau der Zellwand** ein wichtiges Merkmal dar. Hier wird zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Aufbau unterschieden. Die **Morphologie** der prokaryontischen Standardzelle leitet sich entweder von einem Zylinder oder einer Kugel ab. Demnach lassen sich die meisten Bakterienarten in runde (Kokken), stäbchenförmige oder stäbchenförmig gewundene Typen (Spirillen, Vibrionen) einteilen. Bei Kokken unterscheidet man entsprechend dem Zellverbund zusätzlich zwischen Haufenkokken (Staphylokokken) und Kettenkokken (Streptokokken). Ein weiteres Klassifizierungsmerkmal stellt der bakterielle **Stoffwechsel** dar. Je nach benötigter Sauerstoffzufuhr lassen sich Bakterien sauerstoffreichen (aeroben) oder -armen (anaeroben) Wachstumsbedingungen zuordnen. Bakterien, die unter beiden Bedingungen gedeihen können, werden als fakultativ anaerob bezeichnet, solche die sich in Gegenwart von Sauerstoff nicht vermehren können als obligat anaerob. Abhängig von der Schwere und des Verbreitungsrisikos auftretender Krankheiten werden Bakterienarten entsprechend ihres **Gefahrenpotentials** in Risikogruppen (RG) eingestuft, die auch die Sicherheitsvorschriften für deren Handhabung vorgeben (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Einstufung der Biostoffe in Risikogruppen mit beispielhaften Bakterienvertretern.^[36] In dieser Arbeit verwendete Bakterienarten sind mit * gekennzeichnet.

RG	Krankheit	Verbreitung in Bevölkerung	Vorbeugung/ Behandlung	Beispiel
1	nicht wahrscheinlich	ohne Bedeutung	nicht erforderlich	<i>Staphylococcus carnosus</i> * <i>Pseudomonas fluorescens</i> * <i>Lactococcus lactis</i> <i>E. coli</i> K12 *
2	möglich	nicht wahrscheinlich	möglich	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> W3110 * <i>Enterococcus hirae</i> *
3	schwer	möglich	möglich	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Chlamydia psittaci</i>
4	schwer	wahrscheinlich	nicht möglich	<i>Shigella dysenteriae</i> (Ruhr) <i>Salmonella typhi</i> (Typhus)

Die Wirkmechanismen von Kupfer und Silber gegen Bakterien werden meist anhand ungefährlicher Keime der RG1 erforscht, die sich strukturell nur geringfügig von den gefährlicheren, pathogenen Varianten unterscheiden.

3. Ionentransportprozesse

Die antimikrobielle Wirkung von Kupfer und Silber beruht zum Großteil auf der Wirkung derer Ionen, weshalb die bei Bakterien möglichen, chemischen Transportprozesse für Ionen von Bedeutung sind.

Da die Zytoplasmamembran von Bakterien undurchlässig für Ionen und nicht elektrisch leitend ist, kann ein Ladungstransport nur durch den Transfer von Protonen über spezifische, in die Membran eingelagerte Transportproteine erfolgen (siehe Abbildung 5). Einige essentielle Stoffwechselreaktionen bei Bakterien sind an eine Elektronenzufuhr gebunden. Diese ist nur indirekt durch den chemischen Transport von Protonen nach außen gegeben. In Folge dessen stellt sich ein positives Membranpotential $\Delta\psi$ von etwa 0,1 - 0,2 V bei den meisten Bakterienzellen ein. Ein zusätzliches Potential, das Protonendiffusionspotential ΔD , entsteht durch den relativen pH-Unterschied zwischen Zellinnerem (leicht alkalisch) und der Umgebung. Das resultierende Protonenpotential ΔP setzt sich aus beiden Größen zusammen:

$$\Delta P = \Delta\psi - \Delta D = \Delta\psi - Z \Delta\text{pH} \quad (1)$$

Hierbei ist Z eine temperaturabhängige Konstante. Das Protonenpotential ΔP eines Bakteriums bei 30°C entspricht ca. 60 mV.^[30]

Einige Bakterien benötigen auch Kupfer in geringer Konzentration für ihren Stoffwechsel. Daher existiert auch mindestens ein bisher bekanntes Kupfertransportsystem in der Bakterienmembran, die sogenannte CusCBA Effluxpumpe für einwertige Kupferionen (Cu^+).^[37] Bei Gram-negativen Bakterien setzt sich diese aus drei Bestandteilen zusammen, zwei Transportproteinen in der jeweils inneren und äußeren Membran und einem dazwischenliegenden Bindeprotein.^[38] Diese Effluxpumpe kann aufgrund der großen chemischen Ähnlichkeit zwischen Kupfer und Silber auch zum Abtransport von einwertigen Silberionen (Ag^+) zweckentfremdet werden. Es wird vermutet, dass diese durch gezieltes Abtransportieren von toxischen Metallionen eine Rolle bei der Resistenzentwicklung von Bakterien gegenüber metallischen, antimikrobiellen Materialien spielen könnte.^[39]

Methoden

Dieses Kapitel fasst die wichtigsten eingesetzten Verfahren und Analysemethoden sowie deren Grundlagen zusammen. Hierbei liegt ein besonderer Fokus auf der Diskussion mikrobiologischer Methoden zur Evaluierung von antibakteriellen Materialeigenschaften und auf Laserverfahren zur Modifizierung der Materialoberfläche und Mikrostruktur.

Etablierte materialwissenschaftliche Analysemethoden oder Prozesse, die in dieser Arbeit nicht explizit weiterentwickelt oder in größerem Umfang eingesetzt wurden, werden an dieser Stelle nicht ausführlich betrachtet. Dies betrifft beispielsweise die Rasterelektronenmikroskopie (REM), die energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX), die Röntgendiffraktometrie (XRD), die Weißlichtinterferometrie (WLI), die Photoelektronenspektroskopie (XPS), die Rasterkraftmikroskopie (AFM) und das *spin-coating* Verfahren. Wichtige Anpassungen dieser Methoden mit Bezug zu den hier untersuchten Fragestellungen werden im entsprechenden Ergebnisabschnitt behandelt.

1. Kultivierung von Bakterien

Zur kontrollierten Erzeugung einer Lösung mit konstanter Ausgangskonzentration an Bakterien ist die Kultivierung eines Bakterienstamms erforderlich. In flüssigem Nährmedium erfolgt das Wachstumsverhalten von Bakterien nach dem in Abbildung 7 dargestellten Schema.

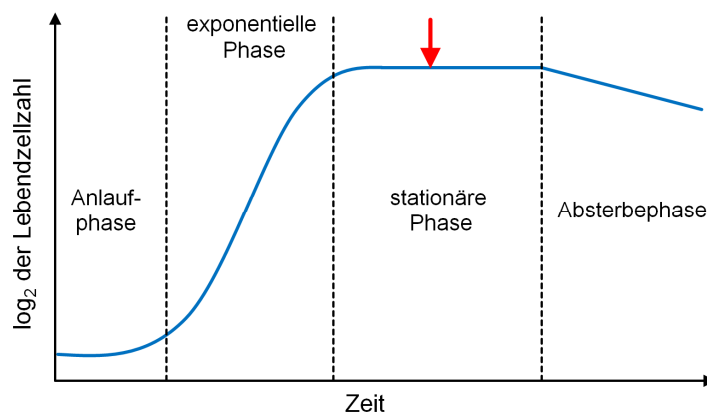


Abbildung 7: Idealierte Wachstumskurve einer Bakterienkultur in flüssigem Nährmedium.

Wichtige Phasen hierbei sind die exponentielle Phase, in der das Wachstum der Bakterien durch die minimale Generationszeit des Bakterienstamms (ca. 15 - 30 min^[30]) bestimmt wird, sowie die stationäre Phase, in der das Bakterienwachstum aufgrund von Nährstoffmangel erliegt. Um für Abtötungsversuche eine reproduzierbar konstante Konzentration an Bakterien zu erhalten, wird die Flüssigkultur in der stationären Phase, die sich oft nach ca. 24 h einstellt, in das Puffermedium überführt.^[30]

Jede hier verwendete Versuchskultur wurde durch Animpfen einer konstanten Menge an Nährmedium aus einer Grundkultur (*frozen stock*) gezüchtet. Diese wird bei -80 °C in einem frostschtzenden Medium (z.B. Glycerol) gelagert, um gleichbleibende physiologische Bakterieneigenschaften zu gewährleisten. Zur Kultivierung werden optimale Wachstumsbedingungen für die Bakterien geschaffen. Dies bedeutet zumeist eine Umgebungstemperatur von ca. 30 -40 °C und eine ausreichende Nährstoffzufuhr. Im Falle von aeroben Bakterien wird die Nährlösung zusätzlich mit Umgebungsluft durchspült oder durch gleichmäßiges Schütteln konstant mit Sauerstoff versorgt.

Die Bestimmung der tatsächlichen Bakterienkonzentration einer Lösung innerhalb weniger Minuten kann über optische Methoden erfolgen. Diese beruhen entweder auf einer mikroskopischen Auszählung (Zählkammer)^[30], dem Absorptionsverhalten (Photometrie)^[40] oder der diffusen Streuung (Nephelometrie)^[41] der Lösung. Derartige optische Verfahren erlauben im Gegensatz zum Ausplattieren (siehe „Abtötungstest“ S.16) keine Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen.

2. Evaluation der antibakteriellen Wirkung

Zur Abstufung der antibakteriellen Wirkung unterscheidet man generell zwischen bakterio-statischen Effekten, die die Vermehrung von Bakterien verhindern, und einem aktiv abtötenden (bakteriziden) Effekt.^[42] Um die antibakterielle Wirkung eines Materials zu charakterisieren, werden in aktuellen Arbeiten verschiedene qualitative und quantitative Methoden eingesetzt (siehe Tabelle 2). Unter Anbetracht der Vielzahl von biologischen, physikalischen und chemischen Variablen bei dieser Art von Versuch setzt die korrekte Interpretation der Ergebnisse eine detaillierte Kenntnis der Methoden und ihrer spezifischen Einflüsse voraus. Im Folgenden werden die wichtigsten Methoden im Hinblick auf materialspezifische Effekte sowie Vor- und Nachteile diskutiert.

Tabelle 2: Zusammenfassung der wichtigsten, etablierten Methoden zur Evaluierung antibakterieller Eigenschaften von Materialien und deren Merkmale.

Methode	Messgröße	Anwendung	Aussage
Hemmhoftest	Hofbreite	Oberflächen, Partikel, Lösungen	qualitativ
Lebend/Tot-Färbung	Fluoreszenz	Oberflächen, Partikel, Lösungen	qualitativ, mechanistisch
Wachstumstest	optische Dichte	Partikel, Lösungen	quantitativ
Abtötungstest	<i>colony forming units</i> (cfu)	Oberflächen	quantitativ

2.1 Hemmhofstest

In vielen Studien wird als qualitativer, einfach umzusetzender Test die Ausbildung einer Hemm- bzw. Absterbezone (Hemmhof) um das zu testende Material auf einem mit Bakterien besiedelten Nährboden betrachtet (siehe Abbildung 8).^[43-49]

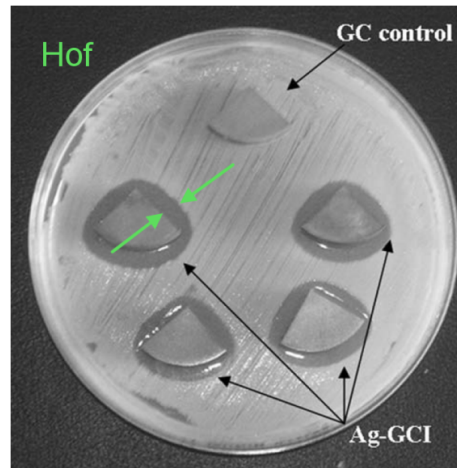


Abbildung 8: Ausbildung eines Hemmhofs um vier silberbeschichtete Glasbruchstücke (Ag-GCI) auf einem mit *S. aureus* besiedelten Nährboden. Modifiziert aus ^[49].

Diese Methode wurde vom amerikanischen Textilchemie- und Färberverband eingeführt und findet verstärkt bei der antimikrobiellen Charakterisierung von Textilfasern Anwendung.^[48] Generell ist diese Art von Nachweis nur bei antibakteriellen Materialien möglich, die einen Wirkstoff freisetzen, der im feuchten Nährmedium diffundieren kann. Die Breite des ausgebildeten Hemmhofs ist hierbei als Maß für die Diffusionseigenschaften des Wirkstoffs anzusehen und kann nicht ohne Vorbehalte als quantitativer Vergleich der antimikrobiellen Wirkung herangezogen werden.

2.2 Lebend/Tot-Färbung

Die Methode der Lebend/Tot-Färbung (*live/dead-staining*) wird oft als indirekter Nachweis für den Zelltod bei Bakterien eingesetzt.^[50-53] Sie beruht auf der unterschiedlichen Membranpermeabilität lebender Bakterien für bestimmte Färbemittel. Diese Färbemittel sind Nukleinsäuren, die, gebunden an bestimmte Moleküle und bei geeigneter Anregung, selbst mit einer spezifischen Wellenlänge fluoreszieren. Hierbei hat sich ein Standardsystem etabliert (LIVE/DEAD® BacLight™), welches das sogenannte SYTO9 (grün) und Propidiumiodid (rot) einsetzt. SYTO9 ist in der Lage, die Membran lebender Bakterien zu durchdringen und grün zu fluoreszieren, nachdem es sich an der DNS angelagert hat. Für Propidiumiodid hingegen ist die Membran lebender Bakterien undurchlässig. Wird die Membran beschädigt, kann auch Propidiumiodid in die Zelle eindringen und überlagert die grüne Fluoreszenz des SYTO9 mit roter Fluoreszenz. So erscheinen Bakterien mit intakter Membran grün, Bakterien

mit zerstörter Membran rot (siehe Abbildung 9). Die Anregungs-/Emissionswellenlängen liegen bei 488/522 nm für SYTO9 und bei 543/590 nm für Propidiumiodid.

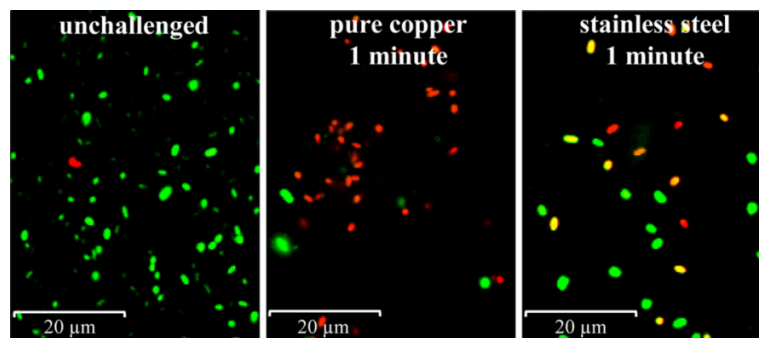


Abbildung 9: Lebend/Tot-Färbung von *E. coli* auf Kupfer und Edelstahl im Vergleich.^[51] Die Aufnahme erfolgte mittels Fluoreszenzspektroskopie. Bakterien mit intakter Membran werden grün, welche mit beschädigter Membran rot dargestellt.

Ein eindeutiger Nachweis des Zelltods kann durch die Lebend/Tot-Färbung nicht erfolgen. Die Rotfärbung durch Propidiumiodid ist als Indiz für die Zerstörung der Bakterienmembran zu interpretieren, die Grünfärbung durch SYTO9 als Indiz für eine intakte DNS. Daher eignen sich beide Färbestoffe vorwiegend für mechanistische, mikrobiologische Studien zur antibakteriellen Wirkung von Werkstoffen.^[51,54–57]

2.3 Wachstumstest

Bei dieser Methode werden antibakterielle Stoffe oder Partikel einem flüssigen Medium mit bekannter Bakterienkonzentration kontrolliert beigemischt.^[42,58–61] Dabei handelt es sich um ein Nährmedium, welches anschließend unter optimalen Wachstumsbedingungen gelagert wird. Die Bakterienkonzentration und damit der Wachstumsverlauf der Kultur kann über die optische Dichte (OD) der Lösung ermittelt werden (siehe Abbildung 10), die in einem bestimmten Konzentrationsintervall proportional zur Bakterienkonzentration ist.

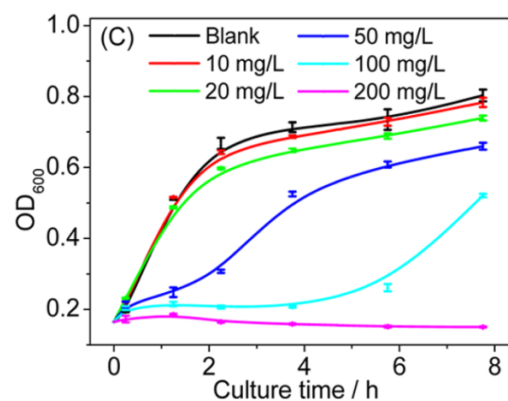


Abbildung 10: Exemplarische Darstellung der Ergebnisse eines Wachstumstests mit *E. coli* bei verschiedenen Konzentrationen von antibakteriell wirkenden Silber-Nanopartikeln. Zeitabhängig aufgetragen ist die relative optische Dichte der Lösung bei $\lambda = 600$ nm.^[61]

Eine wichtige Vergleichsgröße des Verfahrens ist die minimale, wachstumshemmende Konzentration (*minimal inhibitory concentration*, MIC). Diese ist definiert als die niedrigste Konzentration des antibakteriellen Materials oder Wirkstoffs, bei der gerade kein Bakterienwachstum stattfindet (200 mg L^{-1} in Abbildung 10).^[62]

Der Wachstumstest eignet sich für Stoffe und Partikel im feuchten Einsatzbereich, bei denen eine Konzentrationsangabe möglich ist und nicht für massive Probekörper. Ein Nachteil der Methode besteht darin, dass lediglich eine bakteriostatische, jedoch keine bakterizide Wirkung abgebildet werden kann, da auch abgetötete Bakterien zur Lichtbrechung beitragen.

2.4 Abtötungstest

Unter dem Begriff Abtötungstest werden hier alle Methoden zusammengefasst, die die Anzahl von überlebenden Bakterien auf Werkstoffoberflächen durch erneute Inkubation zeitabhängig ermitteln. In Abbildung 11 sind der Versuchsablauf eines derartigen Tests und die verschiedenen etablierten Varianten zusammengefasst.

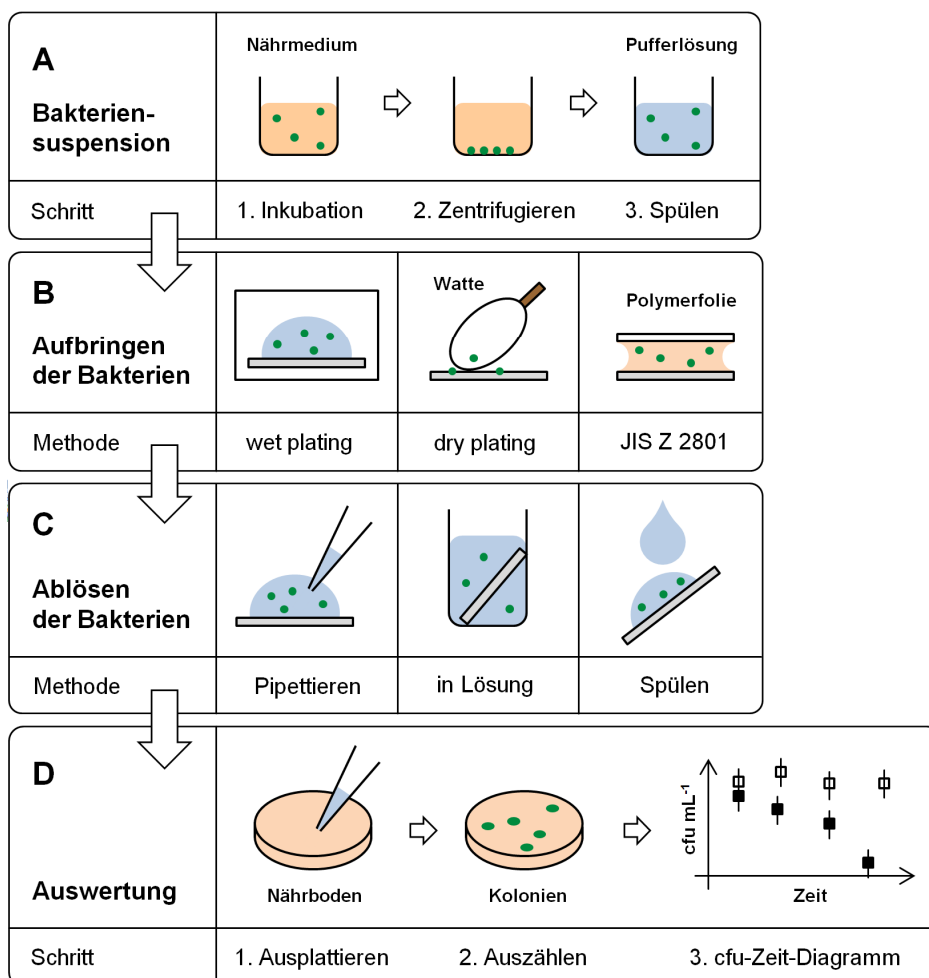


Abbildung 11: Schematische Darstellung des generellen Ablaufs und etablierter Versuchsvarianten bei einem bakteriellen Abtötungstest auf Festkörperoberflächen.

Zur Vorbereitung wird zunächst die im Nährmedium herangezüchtete Bakterienkultur durch mehrmaliges Zentrifugieren in ein neutrales, nährstoffarmes Puffermedium überführt. Schwankungen des pH-Werts, die sich durch den bakteriellen Stoffwechsel ergeben können, werden so abgefangen und eine weitere Vermehrung wird verhindert. Abhängig von Bakterienart und Inkubationsbedingungen ergeben sich so typischerweise Konzentrationen von 10^6 - 10^9 Bakterien mL⁻¹.

Für das Aufbringen der Bakterienlösung auf die Probekörper und die Lagerung während des Versuchs haben sich verschiedene Protokolle etabliert. Generell kann zwischen nassen (*wet plating*) und teiltrockenen Verfahren (*dry plating*) sowie Abstufungen beider Varianten unterschieden werden. Nach festgelegten Zeitintervallen werden die verbleibenden Bakterien vom Material gelöst, gleichmäßig auf Nährböden verteilt (ausplattiert) und inkubiert. Auf den Nährböden kann die Zahl der sich neu bildenden Kolonien (*colony forming units, cfu*) als Anhaltspunkt für die Anzahl an überlebenden Bakterien bestimmt werden. Eine übliche Form der Ergebnisdarstellung ist das vergleichende Auftragen der Konzentration überlebender Bakterien in cfu mL⁻¹ für verschiedene Werkstoffe im zeitlichen Verlauf (siehe z.B. Abbildung 24 auf S. 59).

Im Gegensatz zu optischen Methoden der Konzentrationsbestimmung, die auch tote Zellen erfassen, werden durch das Ausplattieren nur reproduktionsfähige Bakterien berücksichtigt. Hiermit ist gleichzeitig ein Kritikpunkt des Verfahrens verbunden. Einige Bakterienarten sind in der Lage, in einen Zustand zu verfallen, in dem sie zwar lebendig sind, sich aber nicht vermehren und damit auch keine neue Kolonie bilden können (*viable but not culturable, VBNC-Zustand*).^[63] Unter günstigeren Umgebungsbedingungen können diese später wieder „erwachen“ (resusziieren).^[64] Durch die Methode der cfu-Zählung kann die Abtötungswirkung beim Auftreten des VBNC-Zustands daher tendenziell als zu stark erfasst werden. Der VBNC-Zustand wurde verstärkt im Zusammenhang mit Biofilmen und Langzeiteinwirkung in flüssiger Umgebung beobachtet.^[65] Er kann mithilfe eines Redox-Nachweisstoffes über die aktive Zellatmung sichtbar gemacht werden. Exemplarisch wurde so gezeigt, dass *E. coli* und *Klebsiella pneumoniae* auf massiven Kupferoberflächen nicht in den VBNC-Zustand übergehen, sondern tatsächlich absterben.^[57]

Trotz dieses Kritikpunkts stellen Abtötungstests die momentan effektivste und weitverbreitetste Option dar, antibakterielle Eigenschaften von massiven Materialien bzw. Oberflächen zu quantifizieren. Etablierte Methodenvarianten entsprechend Abbildung 11 werden im Folgenden detailliert vorgestellt.

wet plating

Unter dem Begriff „*wet plating*“ werden in dieser Arbeit alle Varianten von Abtötungstests zusammengefasst, bei denen während der gesamten Testdauer ein konstantes Volumen an bakterienhaltiger Pufferlösung in Kontakt zur untersuchten Oberfläche steht. Dies wird meist durch das Auftropfen der Bakterienlösung und eine konstant feuchte und/oder abgeschlossene Atmosphäre bei Raumtemperatur bewerkstelligt. Auf diese Weise werden das Verdunsten von Flüssigkeit und damit Konzentrationsänderungen während des Versuchs vermieden. Das Ablösen der Bakterien erfolgt durch leichtes Spülen innerhalb des Tropfens und Abpipettieren eines Teilvolumens. Das *wet plating* liefert bei relativ geringem Aufwand und guter Reproduzierbarkeit quantitative Aussagen zum Vergleich der antibakteriellen Wirkung verschiedener Materialien.^[66-69]

Ein Kritikpunkt der *wet plating* Verfahren stellt der verstärkt abgebildete, korrosive Einfluss des Puffermediums während der gesamten Testdauer dar.^[66] Es ist weiterhin vorstellbar, dass während des *wet platings* die real benetzte, aktive Oberfläche und damit die Benetzungseigenschaften des Werkstoffs einen Einfluss auf das erfasste Abtötungsverhalten ausüben.^[70-72]

JIS Z 2801:2000

Der japanische Industriestandard JIS Z 2801:2000 (im Folgenden: JIS) wurde daraufhin konzipiert, die antibakterielle Wirkung von flachen Festkörperoberflächen zu erfassen. Das Standardprotokoll sieht vor, eine Nährlösung mit Bakterien auf eine konstante Konzentration ($10^5 - 10^6$ cfu mL⁻¹) zu verdünnen und 50 µL auf die Proben zu geben. Diese werden dann durch eine sterile Polyethylen-Folie abgedeckt, durch die das Verdunsten der Lösung verhindert und die benetzte Oberfläche vergrößert wird. Die Proben werden bis zu 24 h bei $35 \pm 1^\circ\text{C}$ unter 90 % relativer Luftfeuchtigkeit gelagert. Anschließend wird sowohl die Folie als auch die Probe mit Nährmedium abgespült und die aufgefangene Lösung ausplattiert.^[2,42,73] Aus dem cfu-Wert für 24 h wird die antimikrobielle Effizienz R definiert als

$$R = \log(A/B) \quad (2)$$

wobei A den durchschnittlichen Wert an cfu mL⁻¹ auf dem inerten Referenzmaterial und B den durchschnittlichen Wert auf dem antibakteriellen Material nach 24 h angeben.

Michels *et al.* kritisierten die Testphase von 24 h als zu lange Dauer, um einen deutlichen, materialabhängigen Unterschied in R zu erkennen und sehen den Test als nicht repräsentativ für Anwendungen im Innenbereich an.^[74] Kawakami *et al.* werten den nach JIS definierten R-Wert als nicht aussagekräftig, weil er die Dynamik des Absterbeverhaltens nicht berücksichtigt.^[2] Da der JIS als Sonderform des *wet platings* betrachtet werden kann, steht auch hier der korrosive Einfluss des Puffermediums in der Diskussion, der durch die größere, benetzte

Oberfläche und die relativ lange Testdauer tendenziell stärker zu erwarten ist.^[66] Ein direkter Ergebnisvergleich mit anderen *wet plating* Verfahren ist erschwert, da der JIS eine bakterienhaltige Nährlösung und keine nährstoffarme Pufferlösung vorschreibt.

dry plating

Mit Hinblick auf die Anwendung antimikrobieller Werkstoffe als Kontaktoberflächen in größtenteils trockener Innenraumatmosfera wurde das *dry plating* Verfahren als praxisnahe Variante des Abtötungstests entwickelt.^[55,75] Hierbei wird die Bakteriensuspension nicht in Tropfenform, sondern mit Hilfe eines sterilen Wattebauschs aufgetragen, der Hautkontakt simulieren soll. Dieser wird mit einem konstanten Volumen an Bakterienlösung getränkt und anschließend auf einer gleichbleibenden Fläche des zu untersuchenden Materials abgestreift. Die Proben werden unter atmosphärischen Bedingungen gelagert, was zur Folge hat, dass die Oberfläche bereits innerhalb weniger Sekunden trocknen kann.^[51] Zum Ablösen der Bakterien wird die gesamte Probe in Pufferlösung mittels Vortexen, Ultraschall oder anderer unterstützender Methoden behandelt.

Bei Anwendung des *dry plating* Verfahrens ist es möglich, dass auch bei nicht antimikrobiell wirkenden Referenzmaterialien eine wesentliche Reduzierung der cfu mL⁻¹ über die Zeit auftritt.^[51] Diese kann in zusätzlichen Stressfaktoren für die Bakterien wie dem Trocknungsprozess oder dem Ablöseverfahren begründet sein und muss bei der Darstellung der absoluten antibakteriellen Effizienz von Werkstoffen im Vergleich mit anderen Studien berücksichtigt werden.^[39]

abgeleitete Versuchsvarianten

Eine Zwischenform von *wet* und *dry plating* besteht darin, die Bakterienlösung in Form eines Tropfens aufzubringen und diesen dann unter atmosphärischen Bedingungen zu lagern, so dass Verdunsten und Austrocknen zu einem späteren Zeitpunkt möglich sind.^[54,76-83] Unter atmosphärischen Bedingungen trocknet die aufgebrachte Bakterienlösung, abhängig vom Flüssigkeitsvolumen und anderen Faktoren, dabei durchschnittlich innerhalb von 10 - 20 min.^[56,66,73] Die amerikanische Umweltschutzbehörde (EPA) hat zur Evaluation antibakterieller Legierungen ein derartiges Verfahren standardisiert.^[66,69,73] Sie stellt an eine antibakteriell wirksame Legierung die Anforderung, dass 99,9% an repräsentativen Erregern unter den vorgegebenen Testbedingungen innerhalb von 2 h abgetötet werden.^[84]

Um das antibakterielle Verhalten eines Materials in einer dynamischen, flüssigen Umgebung zu charakterisieren, wurde eine Variante des Abtötungstests entwickelt, bei der die Werkstoffprobe in einer bakterienhaltigen Pufferlösung kontinuierlich bewegt wird (ASTM E2149).^[85,86] Diese Methode findet oft bei Faserwerkstoffen Anwendung.

Eine weitere Versuchskategorie stellen zyklisch wiederholte Abtötungstests auf Oberflächen in Kombination mit Abnutzungs- und Benetzungstests dar.^[73,87,88] Derartige Testprotokolle

sollen in erster Linie den Einfluss von regelmäßiger Flächendesinfektion und mechanischer Beanspruchung im Krankenhausumfeld auf das Langzeitabtötungsverhalten massiver Werkstoffe simulieren.

3. Laser-Materialbearbeitung

In dieser Arbeit wurden Laserverfahren zur Mikrostruktur- und Oberflächengestaltung von Kupferwerkstoffen eingesetzt. Im folgenden Abschnitt werden daher die wesentlichen Grundlagen für die Laserbearbeitung von metallischen Werkstoffen und Fotolacken mittels Laser-Interferenz und *laser cladding* (LC) unter prozessrelevanten Gesichtspunkten betrachtet. Eine ausführliche, mathematisch-physikalische Betrachtung der allgemeinen Wechselwirkung zwischen elektromagnetischer Strahlung und Materie ist in den Quellen [89] und [90] zu finden.

Die Wechselwirkung von Laserstrahlung mit Materialien ist stark material- und zeitabhängig. Da die relevanten, physikalischen Größen nur für wenige Materialsysteme umfassend bekannt sind, lassen sich generalisierte Regeln der Wechselwirkung für verschiedene Materialgruppen ableiten, die jedoch keinen strikten Grenzen unterliegen.[89]

Absorptionsverhalten

Die Wechselwirkung von Laserlicht mit **Metallen** findet hauptsächlich über die Anregung von Elektronen im Leitungsband statt. Vereinfacht dargestellt wird diese durch das modifizierte Drude-Modell, welches die Elektronen eines Metalls als freie Elektronen in einem Potentialtopf beschreibt.[91] Aus der dielektrischen Funktion eines Metalls nach dem Drude-Modell geht die Plasmafrequenz ω_p als elementare Konstante hervor, die das Absorptionsverhalten in zwei Bereiche einteilt. Für Frequenzen $\omega < \omega_p$ stellt sich eine hohe, für Frequenzen $\omega > \omega_p$ eine niedrige Reflektivität ein. Der Übergang dieser Regime findet, wie in Abbildung 12 dargestellt, relativ stetig statt.

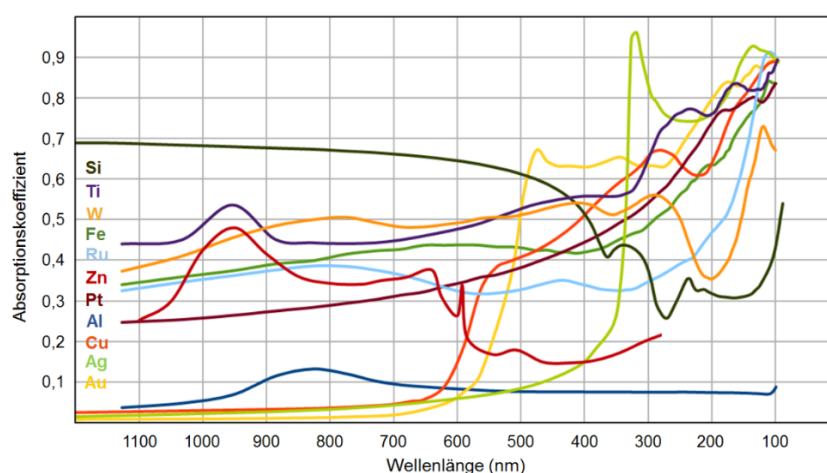


Abbildung 12: Absorptionsverhalten von verschiedenen Metallen und Silizium in Abhängigkeit der Wellenlänge. Rohdaten aus [93].

Die entsprechende Wellenlänge zur Plasmafrequenz liegt bei Metallen typischerweise im UV-Bereich, weshalb die Anregungswellenlänge des Lasers zur Materialbearbeitung entsprechend niedrig gewählt werden sollte, um eine hohe Absorption zu erzielen. In dieser Arbeit wurde aus diesem Grund eine Wellenlänge von 355 nm für die gepulste Laser-Interferenzmethode verwendet, die durch Frequenzverdreifung erzeugt wird.

Eine weitere Ursache für den generell hohen Reflexionsgrad von Metallen im sichtbaren Wellenlängenbereich ist die relativ geringe Eindringtiefe für Lichtwellen. Sie beträgt bei Kupfer ca. 6 nm für $\lambda = 10 \mu\text{m}$ und 0,6 nm für $\lambda = 0,1 \mu\text{m}$.^[92]

Im Gegensatz zum relativ stetigen Verlauf des Absorptionsverhaltens bei den meisten Metallen zeigen Polymere überwiegend diskrete Absorptionsspektren, deren Maxima speziellen chemischen Gruppen bzw. Vibrations- oder Schwingungszuständen von Molekülen zugeordnet werden können.^[89] Im Falle von **Fotolacken** werden funktionelle Gruppen eingesetzt, die bestimmte Anregungsfrequenzen stark absorbieren und dadurch eine spezielle Reaktion auslösen (siehe etwa Wellenlängenbereich $330 < \lambda < 360 \text{ nm}$ in Abbildung 13).

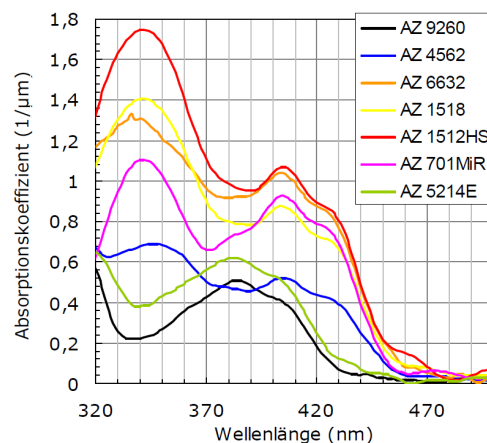


Abbildung 13: Absorptionsspektren einiger positiv-Fotolacke (MicroChemicals GmbH).^[94]

Unter ausreichender Lichtdosis von $\lambda \approx 345 \text{ nm}$ wird bei dem in dieser Arbeit verwendeten positiv-Lack (AZ1518 von MicroChemicals GmbH) eine Karbonsäure gebildet, die die belichteten Bereiche durch einen Entwickler löslich macht. Unbelichtete Bereiche verbleiben im vernetzten, unlöslichen Zustand.

Anregungsdauer

Die Art der Wechselwirkung von Strahlung und Materie kann je nach Anregungsdauer als thermisch, photophysikalisch oder photochemisch kategorisiert werden.^[89] Wechselwirkungen werden als thermisch bezeichnet, wenn die Überführung der Energie der angeregten Elektronen zu thermischer Energie schnell im Vergleich zur ihrer Anregungsrate, in diesem Fall der Laserpulsdauer, erfolgt. Bei Kupfer liegt die zum Energieübertrag von Elektronen zum Metallgitter benötigte Zeit in der Größenordnung von 10^{-12} s.^[95] Im Gegensatz hierzu dominieren photochemische Wechselwirkungen, wenn die Umwandlung in thermische Energie wesentlich länger dauert als die Anregungsdauer. Das gleichzeitige Auftreten beider Regime wird als photophysikalische Wechselwirkung zusammengefasst.^[89]

Bei der Laserbearbeitung von Metallen können mit steigendem Wärmeeintrag Aufheiz-, Schmelz-, Verdampfungs- und Plasmaprozesse auftreten. Hierbei dominieren bei kontinuierlichen Lasersystemen, wie beispielsweise dem LC, Aufheiz- und Schmelzprozesse.^[96] Mit kürzer werdender Pulsdauer stellt sich eine Mischung aus Aufheizen, Schmelzen und Ablation durch Verdampfen ein. Dies entspricht dem typisch photophysikalischen Regime eines Nanosekunden-Lasers, wie er in dieser Arbeit zur Laser-Interferenzstrukturierung (LIS) eingesetzt wurde.^[95] Für Pulsdauern im Bereich von Pico- und Femtosekunden (Ultrakurzpulslaser) wird nahezu die gesamte, eingebrachte Energie zum Sublimieren des Metalls verwendet und der Wärmeeintrag minimiert (photochemisches Regime). Beide in dieser Arbeit verwendeten Laserverfahren, LIS und LC, rufen einen signifikanten Wärmeeintrag hervor.

Energiedichte

Bei der Laser-Materialbearbeitung hat sich die globale, gemittelte Energiedichte (Fluenz) F_G als wichtiger Parameter etabliert. Sie berechnet sich als Energie E pro bestrahlter Fläche S zu:

$$F_G = \frac{L}{f \cdot S} = \frac{E}{t \cdot f \cdot S} \quad (3)$$

wobei L die mittlere, messbare Leistung über die Zeit t und f die Frequenz bei gepulsten Lasersystemen in Hz angibt. Durch das Einbeziehen der Laserfrequenz f (und nicht der theoretischen, aufsummierten Pulsdauer) sinkt die physikalische Signifikanz von F_G zur Voraussage physikalischer Wechselwirkungen. Im Vergleich von Laserverfahren mit ähnlicher Pulsdauer stellt sie jedoch eine wichtige relative Größe dar, der – für genau diese Gruppe von Lasersystemen – auch physikalische Regime zugeordnet werden.^[97] Somit können bei Metallen bestimmte Schwellfluenzen definiert werden, die zum Aufschmelzen, Verdampfen oder zur Plasmabildung unter Verwendung eines bestimmten Lasersystems überschritten werden müssen. Die zur Plasmabildung mindestens notwendigen Fluenz F_G liegen bei den meisten Metallen im Bereich mehrerer $J \text{ cm}^{-2}$.^[97] Im Vergleich hierzu sind die für die Laser-Litho-

graphie von Fotolacken notwendigen Leistungsdichten wesentlich geringer. Laut Herstellerangaben werden für die Belichtung des hier verwendeten AZ1518 Positiv-Lacks Lichtdosen von etwa $20 - 30 \text{ mW cm}^{-2}$ empfohlen, was einer Fluenz von $2 - 3 \text{ mJ cm}^{-2}$ entspricht.

4. Laser-Interferenzstrukturierung

Die Laser-Interferenzstrukturierung (LIS) stellt in dieser Arbeit ein entscheidendes Werkzeug dar, um funktionelle Oberflächen mit periodischen Strukturen (Periodizität P von ca. 500 nm bis $50 \mu\text{m}$) in der Größenordnung von Bakterien (ca. $1 \mu\text{m}$) zu erzeugen. Die Technik basiert auf der Interferenz mehrerer gepulster Laserstrahlen, durch die spezifische, periodische Intensitätsverteilungen hervorgerufen werden (siehe Abbildung 14). Deren laterales Muster wird wiederum durch photothermische Prozesse auf die Werkstoffoberfläche übertragen. Im Folgenden werden die für diese Arbeit wesentlichen Aspekte des Verfahrens behandelt.

Die Grundlage für die LIS stellt die Interferenz von mehreren, kohärenten Laserstrahlen dar, die mathematisch durch die Aufsummierung der Einzelwellen unter Berücksichtigung ihrer räumlichen Ausrichtung berechnet werden kann (siehe Anhang).^[98] In der vorliegenden Arbeit wurden Oberflächenstrukturen auf Basis der 2-Strahl- und 3-Strahlinterferenz erzeugt, deren geometrische Strahlanordnungen und typische Intensitätsverteilungen in Abbildung 14 b) bzw. c) dargestellt sind.

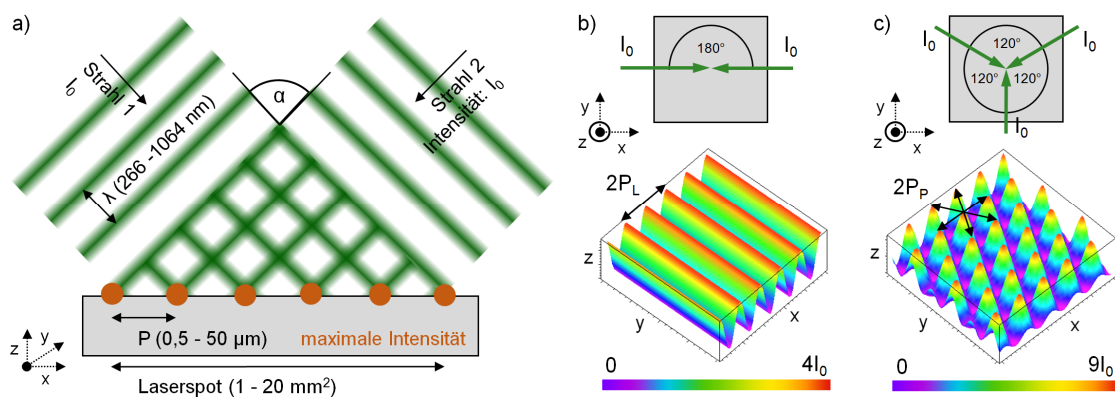


Abbildung 14: a) Schema der Laser-Interferenzstrukturierung von Oberflächen und laterale Größenordnungen am Beispiel der Zweistrahlinterferenz. Rechts dargestellt sind die geometrischen Laserstrahlkonfigurationen (oben) sowie die resultierenden Intensitätsverteilungen (unten) im Falle von b) 2-Strahl- bzw. c) 3-Strahlinterferenz. Berechnete Intensitätsverteilungen modifiziert aus ^[99].

Überlagern sich zwei Laserstrahlen mit gleicher Ausgangsintensität I_0 entsprechend der in Abbildung 14 dargestellten Geometrie unter dem Winkel α , so berechnet sich die resultierende Intensitätsverteilung in x-Richtung zu

$$I(x, \alpha) = 4I_0 \cdot \cos^2(kx \cdot \sin(\alpha)) \quad (4)$$

wobei $k = 2\pi/\lambda$ die Wellenzahl darstellt. Durch eine Projektion der \cos^2 -Kurve in y-Richtung ergibt sich eine **linienartige** laterale Intensitätsverteilung in der x-y-Ebene, die während des Strukturierungsprozesses parallel zur Werkstoffoberfläche ausgerichtet ist.

Im Falle der Dreistrahlinterferenz bilden sich komplexere Intensitätsverteilungen aus, die keine Projektion entlang der y-Achse erlauben. Für den hier verwendeten Spezialfall maximaler Symmetrie bei gleichem, kleinsten eingeschlossenen Winkel α der Laserstrahlen zueinander und gleichem Einfallswinkel zur Werkstoffoberfläche ergibt sich die in Abbildung 14 c) dargestellte Intensitätsverteilung, die vereinfacht beschrieben werden kann als:

$$I(x, y, \alpha) = 9I_0 \cdot [A] \quad (5)$$

Hierbei stellt $[A]$ einen Term aus trigonometrischen Funktionen dar, der im Anhang vollständig hergeleitet wird. Da die Wechselwirkung zwischen Laser und Werkstoff in den Bereichen maximaler Intensität auftritt, bilden sich im Spezialfall der beschriebenen, gleichbleibend symmetrischen Anordnung **punktartige** Oberflächenstrukturen aus. Von besonderer Bedeutung bei beiden Strahlkonfigurationen ist die Amplitude der berechneten Intensitätsverteilungen, die jeweils dem Quadrat der aufsummierten Intensitäten der Ausgangsstrahlen entspricht.

Die Periodizität P_L des Linienmusters und die 3-fache Periodizität P_P des Punktmusters kann jeweils durch Variation des von den Laserstrahlen eingeschlossenen Winkels α gesteuert werden:

$$P_L = \frac{\lambda}{2 \sin(\alpha)} \quad (6)$$

$$P_P = \frac{\lambda}{\sqrt{3} \sin(\alpha)} \quad (7)$$

wobei λ die konstante Wellenlänge der eingesetzten Laserstrahlung darstellt.

Auf Basis der messbaren, globalen Fluenz F_G , der einstellbaren, lateralen Periodizität und der hergeleiteten Intensitätsamplituden können reale, lokale Intensitätswerte abgeschätzt werden. Unter Berücksichtigung der materialabhängigen Reflektivität ist damit eine Voraussage möglich, wann materialspezifische Schwellfluenzen lokal überschritten und damit bestimmte Laser-Material-Wechselwirkungen ausgelöst werden.^[89,97]

5. Laser Cladding

Beim *laser cladding* (LC) bzw. Laser-Auftragsschweißen wird ein kontinuierlicher Laser eingesetzt, um über Schmelzprozesse einen Materialauftrag auf metallischen Oberflächen zu erzeugen. Hierzu werden sowohl der Laserstrahl als auch die Pulverzufuhr nahe der Substratoberfläche, wie in Abbildung 15 dargestellt, fokussiert. Die Durchmischung zwischen geschmolzenem Auftrag und Substrat kann kontrolliert erhöht werden, indem der Laserfokus und damit der Wärmeeintrag zum Substrat hin verschoben wird.^[96,100]

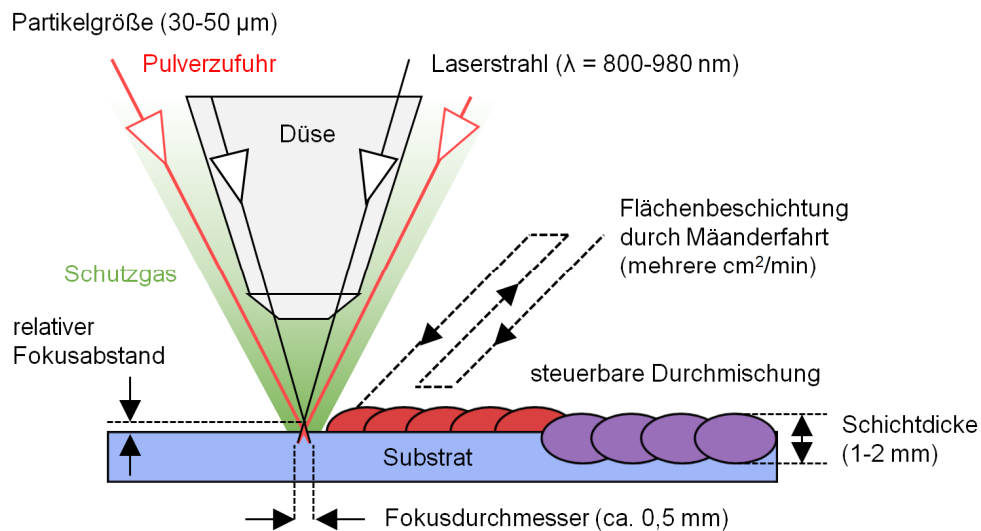


Abbildung 15: Schema und wichtige Größenordnungen des LC Prozesses.

Typische Strukturgrößen während des LC-Prozesses (Schichtdicke, Fokusbereich, Schweißspurbreite) liegen im Millimeterbereich. Elementare Parameter, die den Wärmeeintrag während des LC-Prozesses beeinflussen sind Laserleistung, Durchmesser und Abstand des Laserfokus zur Oberfläche, Pulverfluss, Schutzgasfluss und Verfahrensgeschwindigkeit. Eine flächendeckende Beschichtung ist mit dieser Methode durch überlappenden Auftrag, etwa in Mäanderform, möglich.

6. ICP-Massen- und Atomemissionsspektroskopie

Zur Bestimmung der Ionenabgabe von Werkstoffen in flüssigem Medium wurden in dieser Arbeit Massenspektroskopie und Atomemissionsspektroskopie mittels induktiv gekoppelten Plasmas (ICP-MS und ICP-AES) eingesetzt. Beide Methoden nutzen die Ionisierung der zerstäubten Probenflüssigkeit in einem Plasma, welches durch ein hochfrequentes Wechselstromfeld in Argongas bei bis zu 10.000 K aufrechterhalten wird.^[101]

Bei der **ICP-MS** werden die ionisierten Teilchen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis aufgespalten und in einem Quadrupol-Massenanalysator qualitativ und quantitativ analysiert. Der Ionenstrom verläuft hierbei zwischen vier parallelen, leitenden Stäben. Durch geeignete Überlagerung von gegenüberliegender Gleichspannung und phasenverschobenen, hochfrequenten Wechsellspannungen werden die Ionen beschleunigt und auf eine spiralförmige Bahn gezwungen. Die Frequenz und Amplitude der angelegten Hochfrequenzspannung können als Filter so angepasst werden, dass jeweils nur Ionen mit einem bestimmten Masse-zu-Ladungs-Verhältnis den Analysator passieren.

Bei der **ICP-AES** findet eine Intensitätsanalyse des Emissionsspektrums der ionisierten Atome statt. Im Vergleich zur ICP-MS ist hier wegen der verschiedenen, notwendigen Detektoren oft nur eine wellenlängen- und damit elementspezifische Analyse möglich. Die theoretische Nachweisgrenze der ICP-MS (ng L^{-1}) liegt unterhalb der der ICP-AES ($\mu\text{g L}^{-1}$).^[101,102] In beiden Verfahren wird die Probelösung mit verdünnter Salpetersäure versetzt, die die Oberflächenadsorption von Spurenelementen im Analysator verhindern soll.

7. Ellipsometrie

In dieser Arbeit wurde Ellipsometrie (EM) in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Eisenforschung (MPIE, Düsseldorf) zur Identifikation und Wachstumsanalyse von Kupferoxidschichten eingesetzt.

Mit Hilfe der EM können der komplexe Brechungsindex sowie die Schichtdicke dünner, dielektrischer Materialien im \AA - μm -Bereich bestimmt werden. Die EM nutzt die Eigenschaft von polarisiertem Licht, seine Polarisation beim Durchqueren von oder bei der Reflexion an dielektrischen Materialien zu verändern. Die Änderung des Polarisationszustands wird durch das komplexe Verhältnis ρ der beiden Reflexionskoeffizienten r_s (senkrecht zur Einfallsebene: s-polarisiert) und r_p (parallel zur Einfallsebene: p-polarisiert) ausgedrückt. Dieses Verhältnis wird oft auch über die sogenannten ellipsometrischen Parameter ψ und Δ definiert:

$$\rho = \frac{r_p}{r_s} = |\rho| \cdot e^{i\Delta} = \tan(\psi) \cdot e^{i\Delta} \quad (8)$$

wobei Δ die Änderung der Phasendifferenz zwischen s- und p-polarisiertem Anteil vom einfallenden zum reflektierten Strahl und $\tan(\psi)$ die Amplitude von ρ darstellt.^[103]

Materialeigenschaften

Der folgende Abschnitt befasst sich mit materialwissenschaftlichen Grundlagen zu reinem Kupfer und relevanten Kupferverbindungen. Aufgrund der Interaktion mit biologischen Organismen und dem damit verbundenen Feuchtigkeitseinfluss liegt ein besonderer Fokus auf Kupferoxiden und dem Korrosionsverhalten von Kupfer.

1. Grundlegende Eigenschaften

Die folgende Tabelle fasst projektrelevante physikalisch-chemische Eigenschaften von Kupfer im Vergleich zu Silber und Kupferoxiden zusammen. Weitere stoffspezifische Größen, die in Bezug zu dem antibakteriellen Verhalten metallischer Elemente stehen könnten, werden ab S. 96 für ein größeres Elementspektrum betrachtet.

Tabelle 3: Physikalisch-chemische Größen und Eigenschaften von Kupfer, Silber und Kupferoxiden.^[93] Temperaturabhängige Größen sind bei 25 °C angegeben. Das elektrochemische Standardpotential bezieht sich auf Cu^{2+} und Ag^+ . *: Bezug zur LIS, ^v: Bezug zum LC der Kupfer-Silber-Legierung.

Größe/Eigenschaft (Einheit)	Cu	Ag	CuO	Cu ₂ O
Ordnungszahl	29	47	-	-
absolute Atom-/Molekülmasse (u)	63,55	107,87	79,55	143,09
elektrochem. Standardpotential (V)	+ 0,34	+ 0,79	-	-
Dichte (g cm ⁻³)	8,92	10,5	6,3-6,49	6,0
Schmelztemperatur (°C) * ^v	1084,62	961,93	1326	1235
Wärmeleitfähigkeit (W m ⁻¹ K ⁻¹) * ^v	401	429	k. A.	5,58
Temperaturleitfähigkeit (10 ⁻⁶ m ² s ⁻¹) *	117	173	k. A.	k. A.
Absorptionsgrad bei $\lambda = 355 \text{ nm}$ *	0,63	0,31	k. A.	k. A.
Absorptionsgrad bei $\lambda = 900 \text{ nm}$ ^v	0,03	0,02	k. A.	k. A.
Kristallstruktur ^v	kfz	kfz	monoklin	kubisch
Gitterkonstanten (Å, °) ^v	3,608	4,077	a ₀ = 4,684 b ₀ = 3,425 c ₀ = 5,129 β ₀ = 99,47	4,25

Die absolute Atommasse von Kupfer ergibt sich aus dem Vorkommen natürlichen Kupfers, welches in Form der beiden Isotope ⁶³Cu (zu 69,15 %) und ⁶⁵Cu vorliegt.^[104] Die Kupferoxide Kupfer(I)-Oxid, Cu₂O (Cuprit) und Kupfer(II)-Oxid, CuO (Tenorit) sind p-Halbleiter mit Bandlücken im Bereich von 1,8 - 2,5 eV bzw. 1,21 - 2,0 eV.^[105,106]

Im Vergleich zur Wärmeleitfähigkeit, die den Energietransport durch Wärme wieder gibt, beschreibt die Temperaturleitfähigkeit die räumliche Temperaturverteilung in einem Werkstoff aufgrund von Temperaturgradienten. Sie berechnet sich als Quotient der Wärmeleitfähigkeit über der Dichte und der spezifischen Wärmekapazität eines Stoffs. In Verbindung mit

der Laserpulsdauer und Strukturperiode erlaubt sie eine Vorhersage zur Strukturausprägung während der LIS. Sowohl bei Kupfer als auch bei Silber liegen beide Werte im Vergleich zu anderen Metallen relativ hoch, was der photothermischen Erzeugung homogener Oberflächenstrukturen kleiner als ca. 2 μm durch die LIS auf diesen Metallen entgegensteuert.^[107]

Obwohl die theoretische Elektronenkonfiguration von Kupfer nach dem Pauli-Prinzip ein voll besetztes s-Orbital beschreibt (Ar 3d⁹ 4s²), ist die reale Konfiguration des Kupferatoms aus energetischen Gründen Ar 3d¹⁰ 4s¹. Dies ist bei allen natürlichen Elementen der Kupfergruppe (Cu, Ag, Au) die Ursache für eine hohe thermische und elektrische Leitfähigkeit. Im Fall von Kupfer hat dies weiterhin zur Folge, dass Kupferionen sowohl im Cu⁺- (Ar 3d¹⁰ 4s⁰) als auch im Cu²⁺-Oxidationszustand (Ar 3d⁹ 4s⁰) stabil vorliegen.^[104] Diese Eigenschaft gilt als elementspezifische Ursache für den durch Redozyklen zwischen verschiedenwertigen Kupferionen möglichen Schädigungsmechanismus gegenüber Mikroorganismen (siehe 38).^[24]

2. Korrosionsverhalten von Kupfer

2.1 Atmosphärische Korrosion

Bereits 1933 beschrieb Wagner unter anderem für Kupferoxid bei erhöhten Temperaturen ein parabolisches Oxidwachstumsgesetz, welches sich aus diffusionsgesteuerten Transportmechanismen von Kupfer- und Sauerstoffionen innerhalb der Oxidschicht ableitet.^[108] Cabrera *et al.* erweiterten dieses Wachstumsgesetz an dem Modell Kupfer für niedrigere Temperaturen, indem sie ein homogenes, uniformes Oxidschichtwachstum bis ca. 10 nm durch feldgesteuerten Ionentransport annahmen.^[109] Leibsle und Tanaka *et al.* konnten jedoch nachweisen, dass ein anfänglich inselartiger Oxidwachstumsprozess für Kupfer auch bei Zimmertemperatur wahrscheinlicher ist.^[110,111]

Bisher konnte in mehreren Studien an einkristallinem Kupfer nachgewiesen werden, dass sich unter atmosphärisch feuchten Bedingungen zunächst eine geschlossene Cu₂O-Schicht auf Kupfer ausbildet, auf der innerhalb mehrerer Monate eine zusätzliche CuO-Schicht entstehen kann.^[112-114] Studien an polykristallinem Kupfer unter Raumtemperatur kommen zu ähnlichen Ergebnissen und beschreiben die Bildung der CuO-Schicht als abschließenden Wachstumsschritt.^[115,116] Platzman *et al.* unterteilten den Bildungsprozess derartiger Doppelschichten unter atmosphärischen Bedingungen in mehrere Phasen.^[117] Nach der anfänglichen Ausbildung einer Cu₂O-Schicht beobachteten sie Cu(OH)₂ als metastabiles Zwischenprodukt, welches durch die Interaktion mit Hydroxylgruppen aus atmosphärischer Luftfeuchtigkeit entstehen kann. Dieses wandelt sich dann zu CuO um. Die vorgeschlagenen Reaktionen werden als konkurrierend und voneinander abhängig gewertet.^[117]

Eine Temperatursteigerung führt ebenfalls zur Ausbildung von Cu_2O bzw. $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$ -Doppelschichten. Unter atmosphärischem Sauerstoffpartialdruck und Temperaturen bis zu ca. 250 °C bildet sich eine thermodynamisch stabile Cu_2O -Schicht auf Kupfer aus. Diese reagiert bei noch höheren Temperaturen mit Luftsauerstoff unter Bildung einer zusätzlichen CuO -Schicht weiter.^[118–121]

Kupferpatina

Kommen Kupferwerkstoffe über einen längeren Zeitraum mit Feuchtigkeit und atmosphärischen Spurenelementen (z.B.: Schwefel, Eisen) in Kontakt, kann sich eine sogenannte Patina ausbilden. Im Gegensatz zu Kupferoxidschichten zeichnet sich diese durch eine extrem hohe Porosität und eine starke Wasserabsorption aus.^[122] Eine Kupferpatina besteht aus mehreren Schichten verschiedener Kupferverbindungen, deren charakteristische Farbgebung von Zusammensetzung und Schichtdicke abhängen. Die dem Metall am nächsten liegende Schicht besteht vorwiegend aus Cu_2O .^[122] Die typische Färbung kommt durch zusätzliche Schichten zustande. In industrieller Umgebung beispielsweise wird die Bildung von grünlichem Brochantit ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$) durch sauren Regen begünstigt. Bei ausreichend vorhandenen Eisen-Spurenelementen kann sich ein Brochantit-Mischkristall mit bis zu 10 Atom-% gelösten Eisenatomen ausbilden, der eine rostbraune Färbung zeigt.^[122] Das ebenfalls grünliche Mineral Atacamit ($\text{Cu}_2\text{Cl}(\text{OH})_3$) tritt als Hauptbestandteil der Kupferpatina in mariner Umgebung auf.^[122] Im Gegensatz zu Carbonat- und Nitratverbindungen sind die Schwefel- und Chlorverbindungen von Kupfer unlöslicher in Wasser (Löslichkeitsprodukte um den Faktor 10^3 niedriger) und damit stabiler.^[123]

Eine antimikrobielle Wirkung dieser Verbindungen wurde bisher nicht explizit untersucht. Goidanich *et al.* stellten bei einer auf CuZn15 bzw. CuZn20 gebildeten, mehr als 5 Jahre alten Patina eine durchschnittliche Kupferfreisetzung von $1,4 \text{ g m}^{-2} \text{ y}^{-1}$ fest.^[124] Dies lässt vermuten, dass auch die für die Patina verantwortlichen Kupferverbindungen in gewissem Maße ionenbasierte Effekt hervorrufen könnten.

2.2 Elektrochemische Korrosion

Die chemische Korrosion von Metallen durch Wasser kann thermodynamisch über Gleichgewichtsreaktionen zwischen Ionen und Feststoffen beschrieben werden. Entsprechend Nernst können unter Berücksichtigung der elektrochemischen Spannungsreihe (siehe später Tabelle 6, S. 97) die zugehörigen Potentialverläufe in Abhängigkeit des pH-Werts beschrieben werden. Das Korrosionsverhalten eines metallischen Werkstoffs lässt sich so thermodynamisch in Form eines Potential-pH- bzw. Pourbaix-Diagramms, wie in Abbildung 16 gezeigt, zusammenfassen.

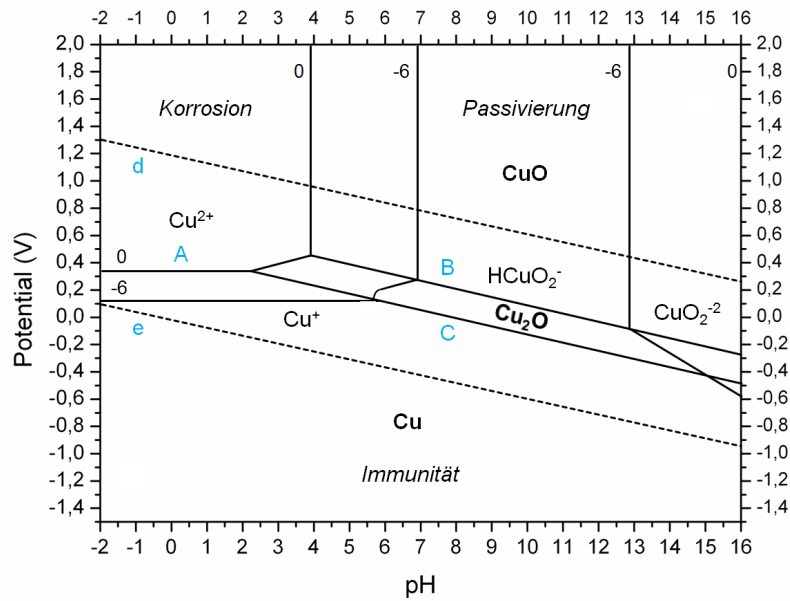


Abbildung 16: Potential-pH-Diagramm (Pourbaix-Diagramm) für das System Cu-H₂O bei 25°C.^[1] Cu(OH)₂ ist im Diagramm nicht berücksichtigt. Die Geraden A, B und C ergeben sich aus den im Folgenden beschriebenen Gleichungen.

Das dargestellte Pourbaix-Diagramm für Kupfer und Wasser setzt sich aus folgenden Gleichgewichtsreaktionen und Potentialverläufen (E) zusammen:^[1]



Hierbei trennt die potentialunabhängige Horizontale A (Gl. 9) die Bereiche der Immunität und der Korrosion. Die beiden Parallelen B und C (Gl. 10 & 11) begrenzen die Stabilitätsgebiete von CuO und Cu₂O (Passivbereiche). Senkrechte Begrenzungen entsprechen potentialunabhängigen Lösungsgleichgewichten von Feststoffen. Das durch das Diagramm beschriebene Verhalten entspricht jeweils einer spezifischen Konzentration an ionischen Spezies, standardmäßig 10⁻⁶ M (Geraden mit Beschriftung -6). Mit steigenden Konzentrationen verschiebt sich das Diagramm tendenziell in Richtung der 0-Geraden (1 M Konzentration). Die gestrichelten Geraden d und e entsprechen den pH-abhängigen Gleichgewichtspotentialen der H₂/H⁺ (e) bzw. O₂/H₂O-Elektroden (d) und geben den Stabilitätsbereich von Wasser wieder.

Anhand des Diagramms ist ersichtlich, dass Sauerstoff Kupfer oxidieren kann, da sein Gleichgewichtspotential höher als das des Kupfers liegt. Säurekorrosion durch Reduktion von H⁺-Ionen kann bei Kupfer jedoch nicht auftreten, da das Gleichgewichtspotential von Wasserstoff zu niedrig liegt. Wasser ist daher mit Kupfer und seinen Oxiden koexistent.^[125]

Weiterhin ist erkennbar, dass sich bei neutralen pH-Werten in reinem Wasser hauptsächlich Cu_2O ausbildet, welches allerdings nur über einen schmalen pH- und Potentialbereich beständig ist. Bei leicht alkalischen pH-Werten ist CuO die vorherrschende Oxidmodifikation in flüssiger Umgebung.^[125] Kupfer kann entsprechend des Diagramms durch Säuren und starke Basen mit oxidierenden Bestandteilen korrodiert werden.^[1] Das in obigem Diagramm nicht betrachtete Kupfer(II)-Hydroxid ($\text{Cu}(\text{OH})_2$) kann potentialabhängig und konkurrierend zu CuO entstehen und mit diesem Mischschichten ausbilden.^[126]

Die Gültigkeit von Pourbaix-Diagrammen wird unter realen Bedingungen durch schnellere Reaktionskinetik, Abweichungen von Normaldruck und -temperatur sowie unreine Stoffgemische eingeschränkt. Komplexbildende und ausfällende Stoffe können einen starken Potentialabfall durch eine relative Verringerung der Kupferionenkonzentration bewirken und Korrosionsmechanismen dadurch tendenziell beschleunigen. Komplexbildner sind beispielsweise Ammoniak, und Cyanide.^[127] Kupfer zeigt, neben Sauerstoff, eine ebenfalls starke Affinität zu Chlor, was die Oberflächenchemie in Kontakt mit chlorhaltigen Lösungen relativ komplex gestaltet.^[128]

2.3 Kupferlegierungen

Die Korrosionsmechanismen und -Produkte bei Kupferlegierungen sind äußerst vielfältig und bisher nicht detailliert untersucht.^[129] Daher erfolgt an dieser Stelle eine zusammenfassende und exemplarische Betrachtung der Korrosion und Oxidbildung bei den wichtigen Legierungsgruppen Bronze und Messing.

Messinglegierungen besitzen eine hohe Korrosionsbeständigkeit gegenüber Trinkwasser, Kondensat und Dampf.^[130] Bronzelegierungen sind generell auch in Meerwasser und mariner Umgebung korrosionsbeständig, wobei die Korrosionsresistenz mit steigendem Zinnanteil zunimmt.^[131,132] Ein typischer, korrosiver Schädigungsmechanismus bei Messinglegierungen ist die anodische Auflösung von Zink (Entzinkung).^[133] Diese kann durch Zulegieren kleiner Mengen von Antimon, Arsen oder Zinn verringert werden.^[130,134] Um die Korrosionsbeständigkeit beider Legierungstypen weiter zu erhöhen, kann Nickel zulegiert werden, der in beiden Systemen gut löslich ist. Aluminium wird wegen der verstärkten Passivierung speziell zur Verbesserung der Korrosionsbeständigkeit von Kupferlegierungen gegenüber Meerwasser zugesetzt.^[127]

Im Folgenden werden exemplarische, empirische Studien zu Korrosionsprodukten bei Messing- und Bronzelegierungen betrachtet. Hierbei sind atmosphärische und flüssige Korrosionsbedingungen in Präsenz von NaCl von besonderem Interesse, da diese Rückschlüsse auf den Innenanwendungsbereich und die Interaktion mit Hautschweiß auf Kontaktflächen erlauben könnten.

Unter atmosphärischen Bedingungen identifizierten Qiu *et al.* auf **Messing** (CuZn20) Cu₂O und ZnO als Hauptoxidationsprodukte, wobei das Wachstum von Cu₂O als flächenmäßig und ZnO als lokal kolumnar beschrieben wurde.^[135] In flüssigem Medium wurde für Cu77Zn21Al2 eine Mischung aus beiden Kupferoxiden, ZnO und verschiedenen Hydroxiden nachgewiesen.^[136] Kabasakaloğlu *et al.* identifizierten auf CuZn30 in NaCl-Lösung (1 M) ZnO und CuCl als Hauptreaktionsprodukte.^[137] Auf Messing mit niedrigen Zinkanteilen wurde in regelmäßiger Interaktion mit künstlichem Hautschweiß Cu₂O als maßgebliches Oxidationsprodukt nachgewiesen.^[134] Fredj *et al.* konnten dies in einer Feldstudie mit echtem Hautschweiß (Handkontakt durch Testpersonen) für höhere Nickelanteile bestätigen und wiesen nach, dass die Dicke der Cu₂O-Oxidschicht mit steigendem Kupferanteil der Messinglegierung ebenfalls zunahm.^[138]

Bei **Bronzen** (CuNi15Si8, CuSn5Al5) wurden in leicht alkalischem Milieu Cu₂O, SnO₂, NiO und verschiedene Hydroxide als Korrosionsprodukte nachgewiesen.^[139] Für CuSn10 in einer NaCl-Lösung (1 M) identifizierten Robbiola *et al.* SnO, CuO, Cu₂O, CuCl und mehrere Hydroxide als Reaktionsprodukte, die sich mehrschichtig anordneten.^[140]

Es lässt sich zusammenfassen, dass in neutralem, wässrigem Medium Cu₂O die thermodynamisch wahrscheinlichste Oxidform bei reinem Kupfer darstellt. Dies kann jedoch in Abhängigkeit der Medienzusammensetzung stark abweichen. Unter atmosphärisch-feuchten Bedingungen sowie bei erhöhten Temperaturen bilden sich tendenziell Cu₂O/CuO-Doppelschichten auf reinem Kupfer aus. Die Korrosion von Kupferlegierungen gestaltet sich als komplex. Tendenzuell treten hier verschiedene Oxide sowie Hydroxide des Kupfers in Verbindung mit Oxiden der Legierungselemente und CuCl in NaCl-haltigen Lösungen aus. Bei Messing in Interaktion mit Hautschweiß zeichnet sich Cu₂O als ein Hauptoxidationsprodukt ab.

Antimikrobielle Werkstoffe

In diesem Kapitel wird der aktuelle Forschungsstand zu antimikrobiellen Materialien vorgestellt. In erster Linie umfasst dies massive Werkstoffe und Legierungen auf Kupfer-, Silber- und Titanbasis. Chemische antimikrobielle Wirkstoffe und Arzneistoffe werden nicht betrachtet. Der umfassende Begriff antimikrobiell bezeichnet dabei eine hemmende oder toxische Wirkung gegenüber Mikroorganismen (umgangssprachlich: Mikroben), womit in den meisten Fällen Bakterien, Viren und Pilze zusammengefasst werden.

1. Kupfer

Kupfer und Kupferlegierungen stehen aufgrund vorteilhafter mechanischer und korrosiver Eigenschaften sowie der geringeren Materialkosten und des direkteren Anwendungsbezugs zu massiven Werkstoffen im Fokus dieser Arbeit. Wie historische Daten belegen, macht sich die Menschheit empirisch motiviert bereits seit mehr als 4000 Jahren die keimtötende Wirkung von Kupfer für die verschiedensten Anwendungen zu Nutze (siehe Folgetabelle).

Tabelle 4: Meilensteine und historische Anwendungen von antimikrobiellem Kupfer.

Datierung	Anwendung/Ereignis	Quelle
ca. 2400 v. Chr.	früheste bekannte Aufzeichnung über den Gebrauch von Kupfer zur Wundreinigung (Smith Papyrus, Ägypten)	[141]
ca. 1300 v. Chr.	Phönizier nutzen Kupferbeschläge an ihren Handelsschiffen, um mikroorganische Anlagerungen zu verhindern	[142]
ca. 400 v. Chr.	Kupferpulver mit Honig wird im antiken Griechenland gegen Lungen- und Mandelkrankheiten verschrieben	[141]
50 n. Chr.	im Römischen Imperium wird Kupfer-Essgeschirr benutzt, um das Verderben von Lebensmitteln hinauszuzögern	[141]
1790	Pioniere in Amerika setzen Kupfermünzen in Holzfässern zum Frischhalten von Trinkwasser ein	[142]
1832	Kupferarbeiter in Frankreich sind scheinbar immun gegen den Ausbruch der Cholera	[143]
1893	W. von Nägeli definiert den Begriff der Oligodynamie für die antimikrobielle Wirkung einiger metallischer Kationen	[144]
1982	erste wissenschaftliche Abhandlung zur Verringerung der Keimbelastung im Krankenhaus durch Kupferlegierungen	[145]
2008	die amerikanische Umweltschutzbehörde registriert die ersten 5 Kupferlegierungen als antimikrobiell wirksam	[84]

Erst nach entscheidenden Entdeckungen und methodischen Fortschritten der Mikrobiologie im neunzehnten Jahrhundert wurde eine wissenschaftliche Ursachenforschung zur antimikrobiellen Wirkung von Metallen möglich.^[146] W. von Nägeli beschrieb 1893 seine Beobachtungen zu metallischen Kationen, die in der Lage waren, lebende Zellen abzutöten.^[144] Er bezeichnete dies mit dem Begriff der Oligodynamie (*oligos* = klein, wenig; *dynamis* = Kraft), womit er zum Ausdruck brachte, dass bereits eine relativ geringe Konzentration bestimmter Metallionen eine starke, zelltötende Wirkung ausüben kann. Zwischen 1890 und 1930 wurden, angestoßen durch von Nägelis Entdeckung, über 130 Forschungsarbeiten und mehrere Patente zur oligodynamischen Wirkung von Metallsalzen verfasst.^[147] Bei diesen Arbeiten fällt bereits auf, dass sich eine Vielzahl vorwiegend mit Kupfer- und Silbersalzen befasst.

Einer der ersten, wissenschaftlichen Wirksamkeitsnachweise zu massiven Kupferlegierungen als antimikrobielle Kontaktflächen im klinischen Umfeld fand 1982 statt. Phyllis Kuhn demonstrierte qualitativ anhand von Abklatschproben eine deutlich reduzierte Keimbelastung auf Messingtürgriffen im Vergleich zu Edelstahl (siehe Abbildung 17).^[145]

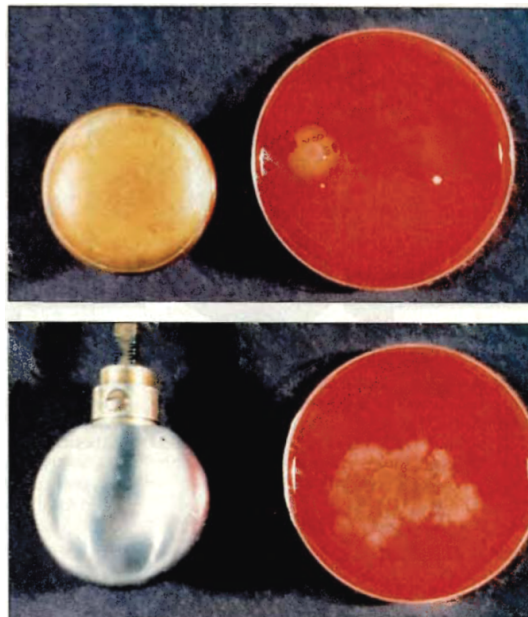


Abbildung 17: Dargestellt ist die Keimbelastung durch Kontakt auf bluthaltigen Nährböden (rechts) eines schwach belasteten Messingtürgriffs (oben, CuZn33) im Vergleich zu einem stark belasteten Edelstahlgriffs (unten). Quelle: Kuhn, 1982 ^[145].

In 2008 wurden durch die amerikanische Umweltschutzbehörde (EPA) fünf Kupferlegierungen als antimikrobiell wirksam registriert. Dies besagt, dass die Legierung in der Lage ist, 99,9 % von repräsentativen, pathogenen Erregern nach dem EPA-Versuchsprotokoll (siehe S. 19) innerhalb von 2 h abzutöten. Bis 2011 erhielten insgesamt 479 verschiedene Kupferlegierungen dieses Prädikat.

Bisher wurde bei mindestens 90 Bakterienarten, 30 Pilzarten und 20 verschiedenen Viren eine toxische Wirkung von Kupfer wissenschaftlich nachgewiesen.^[28,143] Entsprechend dieser antimikrobiellen Breitbandwirkung werden Kupferwerkstoffe zur Bekämpfung von Problemkeimen auch außerhalb der medizinischen Branche eingesetzt. Beispiele sind die Lebensmittelverarbeitung^[26,67,77,148], Textilbranche^[48,86,149], Wasseraufbereitung^[62,150,151] und der maritime Einsatzbereich^[152,153].

Neben exemplarischen Wirksamkeitsnachweisen und der Erforschung der eigentlichen Wirkmechanismen von antimikrobiell wirkendem Kupfer stellen Feldstudien im klinischen Umfeld eine wesentliche Grundlage für die Etablierung der Werkstoffe dar. In Feldversuchen wird oft die relative Reduktion der mikrobiellen Besiedlung von Oberflächen als wesentliche Größe erfasst. Klinische Studien, in denen Kupferlegierungen als antimikrobielle Kontaktmaterialien eingesetzt wurden, fanden innerhalb der letzten Jahre in Südafrika (2010)^[154], Deutschland (2010)^[24], Finnland (2010)^[155], England (2010, 2012)^[26,27] und den USA (2012, 2013)^[25,156,157] statt. Die Ergebnisse schwanken aufgrund der variierenden Randbedingungen von Studie zu Studie relativ stark (Reduzierung der Keimbelastung um 30 - 90 %) und sind nur schwer vergleichbar.^[22]

1.1 Wirkmechanismus

Allgemein akzeptiert und ausführlich belegt ist die Tatsache, dass Kupferionen in Lösung für Bakterien, Viren und Pilze bereits ab sehr geringen Konzentrationen ($< 0,1 \text{ mg L}^{-1}$)^[158] toxisch wirken.^[29,142,159,160] Dies bedeutet, dass der antimikrobielle Effekt von Kupferwerkstoffen maßgeblich auf die Freisetzung von Kupferionen aus dem Wirkstoff und der Interaktion dieser mit den Mikroorganismen zurückzuführen ist.^[48,80,143,160-162] Hinreichend belegt ist, dass die schädigende Interaktion zwischen gelösten Kupferionen und Bakterien über mehrere, teilweise parallel ablaufende Toxizitätsmechanismen geschehen kann.^[28,29,142,143] Borkow und Gabbay beschrieben, wie in Abbildung 18 schematisch dargestellt, bereits im Jahr 2005 mögliche, mikrobiologische Schädigungsmechanismen durch Kupferionen.^[29]

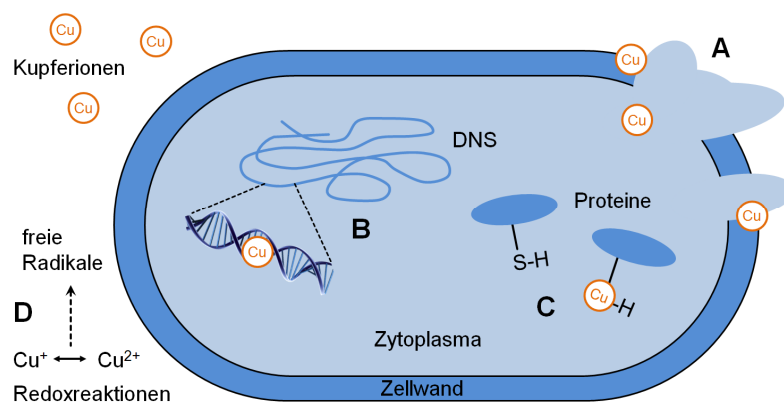


Abbildung 18: Schematische Darstellung möglicher mikrobiologischer Toxizitätsmechanismen von Kupferionen an einer Bakterienzelle. A: Zellwandschädigung; B: Fragmentierung der DNS; C: Deaktivierung von Proteinen; D: Redoxreaktionen.

A: Zellwandschädigung

Die Schädigung der Zellwand von Bakterien durch Kupferionen kann sowohl bei Gram-positiven als auch bei Gram-negativen Arten auftreten.^[55,56] Warnes *et al.* beobachteten bei dem Gram-negativen *E. coli* eine Depolarisierung der Zellwand unter hoher Kupferionenkonzentration, die bei dem Gram-positiven *S. aureus* nicht auftrat. Daraus schlossen sie auf verschiedenen ablaufende Schädigungsmechanismen bei Gram-positiven und -negativen Bakterienarten.^[53] Mögliche Schäden können von der Beeinflussung der Permeabilität bis hin zur kompletten Zerstörung der Zellwand reichen, was ein Auslaufen der Zelle und damit den direkten Zelltod zur Folge hat.^[29] Die oxidative Degradation der Lipiddoppelschicht (Lipidperoxidation) durch freie Radikale, die durch die in Abbildung 18 beschriebenen Redoxreaktionen entstehen können, stellt dabei einen wichtigen, nachgewiesenen Angriffsmechanismus dar.^[56] Durch einen Abtötungsversuch mit Kupferionen an Hefepilzen wurde die Zellwandschädigung generell als primärer Schädigungsmechanismus bei Pilzen identifiziert.^[54]

Die Schädigung der bakteriellen Zellwand findet einigen Studien zufolge verstärkt bei höheren Kupferionenkonzentrationen statt und kann als Primärmechanismus fungieren, auf den sekundäre, intrazelluläre Tötungsmechanismen, wie die Fragmentierung der DNS, folgen können.^[29,55,56] Nach Santo *et al.* stellt die Membranschädigung den primären Abtötungsmechanismus bei Einsatz der *dry plating* Methode dar.^[51] Allerdings weisen nach Warnes *et al.* nicht alle durch Kupfer abgetötete Bakterien zwangsweise eine Zellwandschädigung auf, was so interpretiert wurde, dass auch intrazelluläre Abtötungsmechanismen eine Primärrolle einnehmen können.^[52,53]

B: Fragmentierung der DNS

Kupferionen, insbesondere Cu^{2+} , zeigen eine starke chemische Affinität zu mindestens zwei spezifischen Bindungsstellen innerhalb der DNS.^[159,163] Dies bedeutet, dass sie bestimmte Bausteine innerhalb des Doppelhelixaufbaus ersetzen und dabei durch ihre unterschiedliche Bindungslänge die Struktur zerstören können. Viren, die hauptsächlich aus DNS bestehen, werden in erster Linie durch diesen Mechanismus inaktiviert.^[159] Auf gleiche Weise können auch Ribonukleinsäuren (RNS), die vorwiegend der Proteinsynthese im Zytoplasma dienen, durch Kupferionen geschädigt werden.^[164]

Die Fragmentierung der DNS durch Kupferionen wurde als primärer Abtötungsmechanismus ohne wesentliche Kompromittierung der Zellwand bei *S. aureus* nachgewiesen.^[165] Macomber *et al.* zeigten allerdings bei *E. coli*, dass durch Kupferionen keine wesentliche DNS-Schädigung auftreten muss und dass eine DNS-Schädigung durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) im Beisein von Kupferionen sogar verringert werden kann.^[166] Sagripanti *et al.* zeigten, dass der Grad der DNS-Schädigung durch Kupferionen ebenfalls stark von der Präsenz anderer Metallionen abhängt.^[159] Die genaue Rolle der DNS-Schädigung als antibakterieller Mechanismus von Kupfer sowie der Einfluss der Bakterienart sind bislang nicht hinreichend aufgeklärt. Es wird vermutet, dass eine mögliche Resistenzausbildung gegen Kupfer bei späteren Generationen von Bakterien durch die Zerstörung der Erbinformationen in der DNS erschwert wird.^[29,57,78,143]

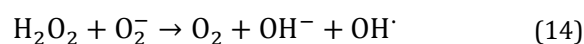
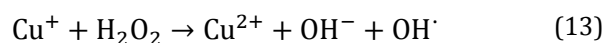
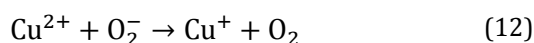
C: Deaktivierung von Proteinen

Kupferionen sind in der Lage, Proteine durch Substitution wichtiger Elemente in funktionellen Gruppen oder durch oxidative Prozesse zu deaktivieren.^[39,167] Diese können dadurch die vorgesehene Rolle im Stoffwechsel nicht mehr übernehmen, dessen Zusammenbruch den Zelltod nach sich zieht. Österberg hat bereits 1977 die Vermutung aufgestellt, dass Kupferionen in erster Linie mit schwefelhaltigen Gruppen interagieren.^[168] Nach seinen Überlegungen wäre bei einem Kupferüberschuss in biologischen Systemen ein Cu^{2+} -Ion in der Lage, sechs SH-Gruppen durch die Bildung miteinander verknüpfter Schwefelverbindungen zu deaktivieren. In aktuelleren Arbeiten konnte ebenfalls eine Affinität von Cu^+ zu schwefel-

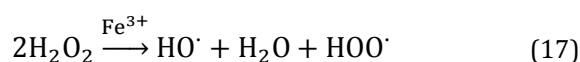
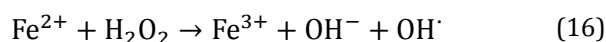
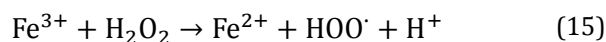
haltigen, funktionellen Proteingruppen bei *E. coli* nachgewiesen werden.^[59] Hierbei wurden spezifische Eisen-Schwefel-Enzyme außer Kraft gesetzt. Xu *et al.* formulierten die These, dass die Toxizität von metallischen Ionen generell mit ihrer Thiophilizität zusammenhängen könnte.^[58]

D: Redoxreaktionen

Kupferionen können in sauerstoffhaltiger Umgebung ihren Oxidationszustand zwischen Cu^+ und Cu^{2+} wechseln. Dies kann innerhalb eines Redoxzyklus geschehen, durch den aus reaktiven Sauerstoffverbindungen, wie H_2O_2 , aggressive Hydroxylradikale ($\text{OH}\cdot$) gebildet werden. Solche Radikale sind ebenfalls in der Lage, DNS, Proteine und Lipide in der Zellwand zu zersetzen und können zum Zelltod führen.^[75] Der Redoxzyklus wird durch folgende Reaktionen beschrieben:



Cross *et al.* stellten fest, dass diese Reaktion und damit das Abtöten von Bakteriensporen durch Kupfer im Beisein von Ascorbinsäure beschleunigt werden kann.^[33] Gleichung 13 stellt hierbei einen Teil einer durch Kupferionen katalysierten Fenton-Reaktion (Gleichung 16) dar. Die ursprüngliche Fenton-Reaktion gibt die katalysierte Zersetzung von H_2O_2 durch Eisen wieder und wurde 1894 erstmals durch H.J.H. Fenton formuliert:^[169]



Die Nettoreaktion (Gleichung 17) beschreibt damit die ionenkatalysierte Entstehung von Hydroxyl- und Hydroperoxyradikalen durch den Zyklus zwischen höherem und niedrigerem Oxidationszustand eines Übergangsmetallions in Interaktion mit H_2O_2 .

Die so entstehenden, radikalen Verbindungen wirken oxidierend gegenüber organischen Verbindungen.^[33] Obwohl die Fenton-Reaktion ursprünglich an Eisen nachgewiesen wurde, kann sie analog durch Redoxzyklen von Cu^{2+} und Cu^+ Ionen stattfinden.^[143] Die Rolle von Hydroxylradikalen und Kupfer als Katalysator der Fenton-Reaktion scheint nicht abschließend aufgeklärt und wird in aktuellen Arbeiten kontrovers diskutiert.^[52,53]

Park *et al.* vertreten die These, dass speziell Cu^{2+} -Ionen die vorhandene bakterizide Wirkung von H_2O_2 bei *E. coli* durch das Abfangen von Hydroxylradikalen auch abschwächen könnten.^[170] Ein verstärktes Abtötungsverhalten bei höherer Kupferkonzentration wurde hierbei primär der direkten Interaktion von Kupferionen mit Zellbestandteilen zugeschrieben.

Zusammenfassend lassen sich die aufgeführten Abtötungsmechanismen (A - D) eindeutig exemplarisch belegen. Es ist zu vermuten, dass, je nach Versuchsbedingungen, einige Mechanismen verstärkt und/oder schneller auftreten als andere.^[55] Eine generelle Priorisierung scheint jedoch bisher nicht möglich.

Resistenzbildung

Obwohl Kupfer verschiedene, parallel ablaufende Abtötungsmechanismen zeigt und dies die Ausbildung von Resistenzen generell erschwert, wird eine Resistenzentwicklung bei Bakterien als möglich erachtet.^[28,29] Bakterielle Verteidigungsstrategien, die gegen Kupferionen effektiv sein könnten, wurden von Borkow *et al.* aufgelistet.^[29] Offensichtlich kupferresistente Bakterien, die von europäischen 50 Cent-Münzen („Nordisches Gold“: $\text{CuAl}_5\text{Zn}_5\text{Sn}_1$) isoliert wurden, zeigten sich als Zuchtkultur in Laborversuchen ebenfalls anfällig gegenüber Kupfer.^[171] Hieraus wurde gefolgert, dass Bakterien in speziellen Schutzformen, wie beispielsweise als Sporen oder im VBNC-Zustand, vorübergehend stärkere Resistenzen aufweisen könnten.

1.2 Materialeinfluss

Dieser Abschnitt fasst die bisher untersuchten Zusammenhänge zwischen Materialgestaltung und antimikrobiellem Verhalten von Kupferwerkstoffen zusammen. Da die antimikrobielle Wirksamkeit nach momentanem Kenntnisstand in erster Linie auf die mikrobiologische Wirkung von Kupferionen zurückzuführen ist, erfolgt eine verstärkte Betrachtung der ionenfreisetzenden, oberflächennahen Materialzusammensetzung.

Je nach Anwendungsfeld wird Kupfer zur Bekämpfung von Mikroorganismen meist als metallische Legierung, Beschichtung oder in Form von Nanopartikeln eingesetzt.^[172-174] Kupfernanopartikel wiederum werden in keramischen^[175], polymeren^[176] oder natürlichen^[86] Verbundwerkstoffen als antimikrobiell wirkende Komponente verarbeitet. Im Vergleich zu einer massiven Legierung bieten Nanopartikel ein stark erhöhtes Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis, wodurch die relative Interaktionsfläche mit der Umgebung vergrößert wird. Díaz-Visurraga *et al.* stellten die These auf, dass Kupfernanopartikel über das Eindringen in die Bakterienzelle durch eine vorgeschädigte Membran den Abtötungsprozess im Vergleich zu massiven Werkstoffen beschleunigen könnten.^[177] Speziell bei Kupfernanopartikeln und unter feuchten Bedingungen kann die oberflächliche Oxidbildung verstärkt und damit der Einfluss metallischen Kupfers während des Abtötungsprozesses verringert werden.^[44]

Kupferoxide

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass Kupferoxid in Form von Nanopartikeln oder beschichteten Textilfasern generell antimikrobielle Eigenschaften besitzt.^[48,149,173,178–180] Unter atmosphärischen Bedingungen bildet sich auf Kupfer Kupferoxid, das als Cu_2O , CuO oder einer Kombination aus diesen auftritt.^[181] Für beide Oxidtypen wurde eine antimikrobielle Wirkung separat nachgewiesen. Christy *et al.* beobachteten eine deutliche Hemmhofausbildung bei qualitativen Wirksamkeitstests an CuO -Nanostäbchen für mehrere Bakterienarten.^[178] Eine zeitaufgelöste, quantitative Analyse wurde in der Studie nicht durchgeführt. Lee *et al.* konnten bei *E. coli* eine deutliche wachstumshemmende Wirkung von Cu_2O -Kristalliten feststellen.^[182] Dabei registrierten sie eine Abhängigkeit des bakteriostatischen Effekts vom Kristallhabitus. Elguindi *et al.* führten quantitative Abtötungsversuche mit *E. coli* und *E. faecium* auf mehreren Kupferwerkstoffen durch und kamen zu dem Schluss, dass thermisch oxidiertes Kupfer im Vergleich zu reinem Kupfer eine abgeschwächte bakterizide Wirkung zeigt.^[66] Dies wurde so interpretiert, dass Kupferoxide eine passivierende Schicht im Hinblick auf die antimikrobielle Effizienz von metallischem Kupfer bilden. Eine Differenzierung zwischen CuO und Cu_2O wurde in der betrachteten Studie nicht vorgenommen.

Einen Hinweis auf den Einfluss des Kupferoxidtyps auf das bakteriostatische Verhalten liefert eine Studie von Vargas-Reus *et al.*, die mit verschiedenen Bakterien durchgeführt wurde, welche für die biofilmartige Plaqueausbildung auf Zahnimplantaten verantwortlich sind.^[173] Mit Hilfe von Wachstumstests wurde die MIB von Silber-, Cu_2O -, CuO -, ZnO -, TiO_2 - und WO_3 -Nanopartikeln sowie Kompositen aus diesen bestimmt. Vargas-Reus *et al.* ordneten die getesteten Nanopartikel entsprechend ihrer MIB nach absteigender wachstumshemmender Wirkung folgendermaßen ein: $\text{Ag} > \text{Ag} + \text{CuO} > \text{Cu}_2\text{O} > \text{CuO} > \text{Ag} + \text{ZnO} > \text{ZnO} > \text{TiO}_2 > \text{WO}_3$

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Kupferoxide ebenfalls einen antimikrobiellen Effekt ausüben. Dieser wird bei thermisch gebildetem Oxid im Vergleich zu metallischem Kupfer als schwächer eingestuft.^[66] Der spezifische Einfluss des Oxidtyps auf das Abtötungsverhalten ist bislang nicht bekannt.

Kupferlegierungen

Generell wird vermutet, dass Kupferlegierungen im Vergleich zu reinem Kupfer eine abgeschwächte Abtötungswirkung zeigen.^[66,80] Ein klarer Zusammenhang zwischen der antibakteriellen Wirkung und der Zusammensetzung einer Kupferlegierung konnte bisher jedoch nicht ermittelt werden. Eine umfassende Zusammenstellung von Abtötungsstudien an Kupferlegierungen findet sich in Tabelle 7 (S. 106), mit deren Hilfe das Thema „Legierungseinfluss“ unter Einbezug der in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse detailliert diskutiert wird.

2. Silber

Historische Anwendungen von antimikrobiellen Silberwerkstoffen lassen sich bis etwa 550 v. Chr. belegen.^[183] Im antiken Persien beispielsweise wurde Trinkwasser auf Anordnung des persischen Königs auf längeren Strecken in Silbergefäßen transportiert, da es sich auf diese Weise länger frisch hielt.^[184] Für die Erforschung der antimikrobiellen Mechanismen bei Silber stellt von Nägelis Arbeit zur Oligodynamie von Metallionen ebenfalls den entscheidenden Meilenstein dar^[144], der in den darauffolgenden 40 Jahren ca. 200 Studien an fungizid und antibakteriell wirkenden Silbersalzen motivierte.^[185] Heutige Anwendungen von antimikrobiellen Silberwerkstoffen finden sich in erster Linie im klinischen und hygienischen Sektor sowie in der Wasseraufbereitung.^[186]

2.1 Wirkmechanismus

Silber zeigt ebenfalls eine toxische Breitbandwirkung gegenüber Bakterien, Pilzen und Viren, die auf der Interaktion von Silberionen mit organischen Bestandteilen beruht.^[23] Aufgrund der chemischen Ähnlichkeit von Kupfer und Silber können sich beide Elemente in biologischen Systemen mimetisch verhalten, weshalb teilweise identische antimikrobielle Wirkmechanismen vermutet werden.^[23,29]

Feng *et al.* erbrachten einen mechanistischen Nachweis für die durch AgNO_3 verursachte **Zellwandschädigung** bei Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien.^[187] In deren Studie wurde weiterhin eine starke **Degradation der DNS** bei beiden Bakterienarten nachgewiesen. Die Schädigung der RNS wurde ebenfalls als möglicher Toxizitätsmechanismus belegt.^[188] Kawahara *et al.* stellten die These auf, dass Gram-positive Bakterien im Gegensatz zu Gram-negativen resistenter gegen Silberionen sein könnten.^[189] Begründet wird dies mit der möglichen Tendenz der Silberionen, sich an der, bei Gram-positiven Bakterien stärker ausgeprägten Peptidoglykanschicht anzulagern. Auf diese Weise können aus Sicht der Autoren weniger Silberionen das Zellinnere erreichen. Silvestry-Rodriguez *et al.* beschrieben die Anlagerung von Silber an schwefelhaltigen, funktionellen Gruppen von Proteinen als wesentlichen Toxizitätsmechanismus von Silber.^[23] Auch bei der **Deaktivierung von Proteinen** wird, analog zu Kupferionen, die Thiophilizität von Silberionen als entscheidender Faktor hervorgehoben.^[23,190] Für durch Silberionen katalysierte Redoxreaktionen, die die Bildung freier, aggressiver Radikale als Toxizitätsmechanismus beschleunigen, existieren nach bestem Wissen des Autors keine Nachweise.

2.2 Materialeinfluss

Silber wird als antimikrobieller Werkstoff vorwiegend in Form von Silbrenanopartikeln, die umgangssprachlich oft auch als kolloidales Silber bezeichnet werden, eingesetzt.^[183,191] Im klinischen Anwendungsbereich werden diese als funktioneller Füllstoff für Polymere verwendet, um die Adhäsion und Biofilmbildung von Bakterien im direkten Kontakt mit Körperflüssigkeiten aktiv zu verringern.^[192-197] Hierbei sind der Flüssigkeitsgehalt sowie die Diffusionseigenschaften des Polymers für Silberionen von entscheidender Bedeutung.^[195,197]

Gibbard *et al.* zeigte bereits 1932, dass erst durch die Oberflächenoxidation von Silber eine messbare antimikrobielle Wirkung auftritt.^[185] Die Tatsache, dass Silberoxid im Vergleich zu metallischem Silber einen wesentlich stärkeren antimikrobiellen Effekt aufweist, ist inzwischen vielfach nachgewiesen.^[45,183,184,186] Davies *et al.* erklärten die starke, antimikrobielle Wirkung von Silberoxid durch die spezielle Affinität von Silber zu Sauerstoff^[184], wohingegen Landau über die Silberionenlöslichkeit aus dem Oxid argumentiert^[186]. Eine eindeutige materialwissenschaftliche Aufklärung des Phänomens ist bisher nicht erfolgt.

3. Kombination von Kupfer und Silber

Werkstoffkonzepte, die Kupfer und Silber zur Infektionsprävention verbinden, werden dadurch motiviert, dass additive bzw. synergetische Effekte durch die Kombination beider Metalle erwartet werden.

3.1 Wirkmechanismus

Entsprechend der chemischen Ähnlichkeit von Kupfer- und Silberionen werden für beide Ionentypen teilweise ähnliche, multiple, mikrobiologische Toxizitätsmechanismen beschrieben.^[23,29] In einigen Studien wurde jedoch nachgewiesen, dass Bakterienarten verschieden sensitiv auf Kupfer- bzw. Silberionen ähnlicher Konzentration reagieren können.^[2,44,158,198] Ruparella *et al.* zeigten durch Wachstumstests, dass *E. coli* und *S. aureus* unter den gegebenen Versuchsbedingungen sensibler auf Silbernanopartikel zu reagieren scheinen, wohingegen *B. subtilis* stärker durch Kupfernanopartikel im Wachstum gebremst werden.^[44] Als Ursache wurde der artabhängige Aufbau und damit verbundene, spezifische Interaktionen mit den jeweiligen Ionen benannt. Hierdurch motiviert stellten einige Arbeitsgruppen die These auf, dass eine Kombination aus Kupfer- und Silberionen durch ergänzende und sogar synergetische Wirkmechanismen einen umfassenderen und stärkeren antimikrobiellen Effekt als die jeweils einzelnen Ionen ausüben könnten.^[150,158,199] Lin *et al.* beschrieben einen synergetischen Effekt von Kupfer- und Silberionen bei *L. pneumophila* über deren wachstumshemmende Wirkung und die notwendigen Ionenkonzentrationen in separaten und einer gemischten Ionenlösung.^[62] Hierzu definierten Sie einen Synergieindex I_{syn} der sich von der MIC der Einzellösungen ableitet:

$$I_{\text{syn}} = \frac{[\text{Cu}]}{\text{MIC}_{\text{Cu}}} + \frac{[\text{Ag}]}{\text{MIC}_{\text{Ag}}} \quad (18)$$

wobei [Cu] und [Ag] die Kupfer- bzw. Silberionenkonzentration in einer gemischten Ionenlösung angeben, die gerade wachstumshemmend wirkt. Die in der Gleichung verwendeten MIC-Werte wurden für die separaten Ionenlösungen bestimmt. Entsprechend dieser Darstellung können für einen Synergieindex $I_{\text{syn}} < 1$ synergetische, für $1 < I_{\text{syn}} < 2$ additive und für $2 > I_{\text{syn}}$ antagonistische Effekte der verschiedenen Ionentypen angenommen werden. Lin *et al.* ermittelten für Kupfer- und Silberionen einen Synergieindex von 0,75 und begründeten dies mit unterschiedlichen primären Abtötungsmechanismen von Kupfer- und Silberionen.^[62] Es wurde die These aufgestellt, dass Kupferionen in erster Linie zur Zersetzung der Zellwand beitragen und damit das Eindringen von Silberionen in die Zelle erleichtern, welche dort wiederum effektiver als Kupferionen agieren könnten.

3.2 Materialeinfluss

Es wurde mehrfach nachgewiesen, dass Kupferwerkstoffe tendenziell unter trockenen und Silberwerkstoffe unter feuchten Bedingungen ein effektiveres Abtötungsverhalten aufzeigen.^[52,66,74] Hieraus wurde von Michels *et al.* gefolgert, dass für Kontaktflächen im trockenen Innenbereich vorwiegend Kupferwerkstoffe eingesetzt werden sollten und dass Abtötungsversuche unter feuchten Bedingungen, wie etwa der JIS, zur antimikrobiellen Charakterisierung dieser Werkstoffe ungeeignet seien.^[74] Diese Feuchtigkeitsabhängigkeit des Abtötungsverhaltens beider Elemente wurde bisher nicht eindeutig materialwissenschaftlich aufgeklärt.

Aufgrund der vermuteten synergetischen Wirkung von Kupfer- und Silberionen befassten sich bereits einige Arbeitsgruppen mit der Kombination beider metallischer Elemente in antimikrobiell funktionalisierten Werkstoffen. Jing *et al.* demonstrierten, dass das Abtötungsverhalten von Kupfer gegen *E. coli* durch eine zusätzliche „dünne Silberbeschichtung“ gesteigert wird.^[200] In dieser Studie wird durch die Beschichtung eine Verschlechterung des Korrosionsverhaltens beobachtet. Die Rolle von Kupfer- und Silberionen wurde hierbei nicht näher untersucht. Hahn *et al.* betteten Kupfer-, Silber- und Goldnanopartikel in Kombination in einer Siliziummatrix ein.^[162] Die bei diesen Materialien festgestellten Ionenabgaberraten ließen darauf schließen, dass die Freisetzung von Kupfer- und Silberionen unter feuchten Bedingungen durch elektrochemische Prozesse gezielt gesteuert werden kann. Eine Korrelation zum Abtötungsverhalten der Werkstoffe wurde in der betrachteten Studie nicht durchgeführt. Torres-Urquidy *et al.* demonstrierten durch Abtötungsversuche an kupfer- und silberhaltigem Zeolit, dass Bakterien, die gegen einen der Ionentypen eine Resistenz zeigten, durch die Kombination beider Elemente effektiv abgetötet werden konnten.^[201]

Zusammenfassend lässt sich anhand der betrachteten Studien ableiten, dass zwischen Kupfer- und Silberwerkstoffen generelle Unterschiede hinsichtlich des Abtötungsverhaltens auftreten, die direkt mit dem Feuchtigkeitsgehalt der Umgebung zusammenzuhängen scheinen. Bei der Kombination von Kupfer- und Silberionen in Lösung können synergetische Effekte die antimikrobielle Wirkung verstärken. Bisher existieren wenige und unvollständige Studien zu entsprechenden kombinierten Werkstoffansätzen.

4. Titan

Der bakterienabtötende Mechanismus von Titan unterscheidet sich wesentlich von dem des Kupfers und Silbers. Der antimikrobiellen Wirkung von Titanoberflächen liegt, im Gegensatz zu einer oligodynamischen Ionenwirkung, ein photokatalytischer Prozess zu Grunde, der nur bei Titandioxid (TiO_2) auftritt.^[202]

4.1 Wirkmechanismus

Allgemein beschrieben wurde die photokatalytische Wirkung von TiO_2 erstmals 1920 von C. Renz, der „im Licht bei Gegenwart eines geeigneten organischen Akzeptors dunkel gefärbte Reaktionsprodukte“ auf Titan beobachtete.^[203] Die ablaufenden photochemischen Mechanismen sind heute weitestgehend bekannt und werden in aktuellen Studien detailliert beschrieben.^[202,204]

TiO_2 ist ein Halbleiter mit einer Bandlücke von etwa 3,2 eV, was bedeutet, dass Photonen mit einer Wellenlänge von weniger als 385 nm (UVA-Bereich) Elektronen in das Leitungsband anheben können. Auf diese Weise werden auf TiO_2 durch UV-Bestrahlung Elektronen-Loch-Paare gebildet. An der Materialoberfläche können diese, etwa durch die Interaktion mit Wasser, zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffverbindungen und von H_2O_2 führen. Diese können weiterreagieren und schließlich zur Bildung von aggressiven Hydroxyl- ($\text{OH}\cdot$) und Hydroperoxyradikalen ($\text{OOH}\cdot$) führen. Genaue Reaktionsgleichungen sind in ^[202] beschrieben. Die so entstehenden Radikale schädigen wichtige Bestandteile bei Bakterien, Viren und Pilzen wie Membran, Lipide, DNS oder Proteine, indem Sie diese zu Kohlendioxid und Wasser zersetzen.^[202] Aufgrund dieses Mechanismus wird der photokatalytische Effekt von TiO_2 generell zur chemischen Reaktionskatalyse und der Zersetzung von organischen Reststoffen in der Wasseraufbereitung eingesetzt.^[205]

Bei der UV-Bestrahlung von oxidierten Titanoberflächen findet, unabhängig von der vorliegenden TiO_2 -Modifikation, ein weiterer photochemisch ausgelöster Prozess statt. Dieser steht nicht in direktem Zusammenhang mit dem antimikrobiellen Effekt und muss daher klar differenziert werden. UV-Licht löst auf TiO_2 eine lokale Photoreduktion von Ti^{4+} zu Ti^{3+} aus, was zur bevorzugten Adsorption von Hydroxylgruppen an freierwerdenden Sauerstoffbindungen führt.^[206] Auf diese Weise bildet sich eine extrem hydrophile Oberfläche. Durch eine Bestrahlung mit IR-Licht kann der Prozess über die Trocknung der Oberfläche rückgängig gemacht werden, wodurch der ursprüngliche, eher hydrophobe Oberflächencharakter von TiO_2 wiederhergestellt wird. Mit diesem reversiblen Verfahren ist die photoaktivierte Kontrolle des Benetzungsverhaltens von Titanoberflächen möglich.^[207]

4.2 Materialeinfluss

Titan wird aufgrund seiner geringen Dichte, hohen Duktilität, guten Korrosionsbeständigkeit und Fähigkeit zur Osseointegration als Implantatwerkstoff in orthopädischen und osteosynthetischen Systemen eingesetzt.^[208] Eine wichtige Anwendung von TiO_2 in Partikelform ist die Weißpigmentierung von Farben und Lacken. Beide Einsatzgebiete profitieren von der photokatalytischen Zersetzung organischer Verbindungen, die im ersten Fall zur Vorbeugung von Infektionen, im letzteren für Reinigungszwecke relevant ist.

Als reaktives Metall bildet Titan eine passivierende Schutzschicht aus, die, abhängig von Temperatur und Feuchtigkeit aus TiO , Ti_2O_3 , TiO_2 oder einer Mischung aus diesen besteht. Generell wird bei höheren Temperaturen die Bildung von TiO_2 begünstigt.^[209] Titandioxid kann in fünf Formen vorliegen, wobei Anatas, Rutil und Brookit die wichtigsten, stabilen Modifikationen darstellen. Miyagi *et al.* wiesen nach, dass hauptsächlich die Anatas-Modifikation bzw. eine Kombination aus Anatas und Rutil für das photokatalytische Abtöten von Bakterien verantwortlich sind.^[210] TiO_2 -Partikel in Suspension zeigten eine deutlich stärkere Abtötungswirkung im Vergleich zu auf Oberflächen gebundenem Oxid, was auf die vergrößerte Oberfläche sowie die verbesserte Möglichkeit zum direkten Kontakt zwischen Oxidoberfläche und Mikroorganismus zurückgeführt wurde.^[202]

Kombination mit Kupfer und Silber

Da sich die antibakteriellen Mechanismen von Kupfer bzw. Silber und TiO_2 deutlich unterscheiden, wurden mehrere Studien daraufhin konzipiert, mögliche Vorteile einer Kombination von Titanwerkstoffen mit Kupfer, Silber und deren Oxiden zu erforschen.^[60,161,211-217]

Hassan *et al.* wiesen bei *E. coli* und *S. aureus* nach, dass Komposit-Nanostäbchen bestehend aus CuO und TiO_2 das bakterielle Wachstum unter Bestrahlung mit Weißlicht stärker einschränkten als reine TiO_2 -Nanostäbchen.^[60] Qiu *et al.* ordneten CuO - und Cu_2O -Nanopartikeln in Verbindung mit TiO_2 verschiedene mechanistische Rollen im Abtötungsprozess von Mikroorganismen zu.^[211] Cu_2O wird hierbei aufgrund der oligodynamischen Wirkung ein antibakterieller Effekt in Abwesenheit einer Lichtanregung zugeschrieben. Cu^{2+} -Ionen können aus Sicht der Autoren als Elektronenakzeptoren und damit als Katalysator für die Elektronen/Loch-Paarbildung bei UV-angeregtem TiO_2 agieren. Bei der Kombination beider Kupferoxide auf TiO_2 wurde die effektivste Abtötungsrate in einer wechselnd gleichteilig dunklen und beleuchteten Umgebung für einen Cu_2O -Anteil von 56 % festgestellt.^[211] Ein ähnlicher, photokatalytischer und zusätzlich lichtunabhängiger Effekt wird auch im Falle von silberbeschichtetem TiO_2 vermutet.^[215] Kubacka *et al.* demonstrierten, dass der katalytische Effekt von oxidiertem Kupfer bzw. Silber als Elektronenakzeptor während der Elektronen-Loch-Paarbildung bei Ti_2O jedoch stark wellenlängen- und elementspezifisch ist.^[217] Für Anregungswellenlängen von 280 bzw. 500 nm wurde nachgewiesen, dass die Hydroxylradikal-

bildung auf TiO_2 im Beisein von Kupfer im Vergleich zu reinem TiO_2 herabgesetzt wird, wohingegen Silber diese verstärkt.^[217]

Speziell für chirurgische Anwendungen ist neben dem einmaligen, sterilen Einsetzen des Implantats in den Körper ein länger anhaltender, antimikrobieller Effekt erwünscht, um eine nachträgliche Infektion des geschädigten Gewebes aus körpereigenen Quellen zu vermeiden.^[212] Bei mit Kupfer bzw. Silber funktionalisierten Implantaten wird als entscheidend angesehen, die Metallionenabgabe in den Körper derart zu steuern, dass diese für Krankheitserreger tödlich, für Gewebezellen jedoch unbedenklich ist.^[213] Wan *et al.* betrachten die Ionenimplantation von Kupfer in Titan für Implantatmaterialien als kritisch, da im durchgeführten Experiment zwar mit steigendem Kupfergehalt die antibakterielle Wirkung zunahm, das Korrosionsverhalten der Legierung sich jedoch verschlechterte.^[216]

Zusammenfassend ist die antimikrobielle Wirkung von Titan beleuchtungsabhängig, beruht nicht auf einer oligodynamischen Ionenwirkung und nutzt daher im Vergleich zu Kupfer und Silber abweichende Wirkmechanismen. Im chirurgischen Anwendungsbereich stellen kombinierte Werkstoffkonzepte aus kurzzeitiger, starker, photokatalytischer Wirkung beim Einsetzen des Implantats und einer langanhaltenden, oligodynamischen Wirkung mit kontrollierter Ionenabgabe einen vielversprechenden Ansatz dar.

5. Weitere Materialien und Werkstoffkonzepte

Kawakami *et al.* untersuchten eine Auswahl an **Metallen** auf ihr Abtötungsvermögen gegenüber *S. aureus* und *E. coli* Bakterien mittels der feuchten JIS-Methode.^[2] Sie definierten hierzu eine exponentiell genäherte Absterberate k nach folgender Gleichung:

$$\frac{dn(t)}{dt} = k \cdot n(t) \quad (19)$$

wobei $n(t)$ dem cfu-Wert zum Zeitpunkt t (in Stunden) entspricht. Laut dieser Studie zeigen neben den stark antimikrobiellen Metallen Kupfer und Silber auch Cobalt und Nickel ein mittelstarkes und Aluminium und Zink sowie weitere Metalle ein schwach antibakterielles Verhalten (siehe folgende Abbildung).

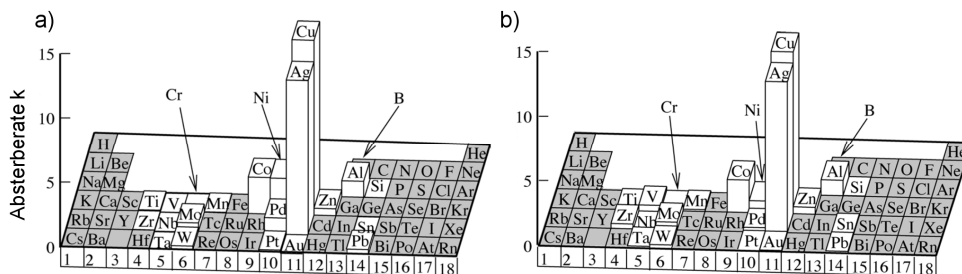


Abbildung 19: Absterberaten k von a) *E. coli* (Gram-negativ) und b) *S. aureus* (Gram-positiv) auf verschiedenen Metallen ermittelt nach JIS. Modifiziert aus ^[2].

Im Fall von **Kobalt** wird ein antibakterieller und antiviraler Effekt durch spezielle Co^{3+} -Komplexe in Lösung vermutet, wobei der genaue Mechanismus bisher nicht aufgeklärt wurde.^[218] Ein ähnliches Verhalten zeigte sich bei bestimmten **Nickel**ionenkomplexen.^[219] Es ist daher bei diesen beiden Metallen anzunehmen, dass sich eine antibakterielle Wirkung vorwiegend unter feuchten Bedingungen und entsprechenden Voraussetzungen zur Bildung dieser Komplexe ausbildet. Für **Zink** wurde exemplarisch nachgewiesen, dass dessen antibakterielle Wirkung ebenfalls auf einer Ionenwirkung beruht.^[58] Im Gegensatz hierzu zeigen einige anorganische Oxide, wie etwa **Aluminium(III)-Oxid** (Al_2O_3) oder SiO_2 , eine wachstumshemmende bzw. schwach bakterizide Wirkung, die nachweislich nicht mit ihren gelösten Ionen zusammenhängt.^[220] Obwohl der genaue Wirkmechanismus hier nicht vollständig verstanden ist, wird vermutet, dass die Oberflächenladung der Oxide und die Wechselwirkung mit der Bakterienmembran hierbei eine Rolle spielen.^[221] Dies wurde dadurch belegt, dass die antibakterielle Wirkung von Al_2O_3 in Nanopartikelform im Vergleich zum Bulk-Oxid verstärkt auftrat. Eine positive Oberflächenladung des Oxids wirkt sich nach Jiang *et al.* positiv auf den antibakteriellen Effekt aus, da die Anlagerung der Oxidpartikel an den generell negativ geladenen Membranoberflächen der Bakterien begünstigt wird.^[221]

Die allgemeinen Ursachen des antimikrobiellen Verhaltens bei Metallen werden ab S. 96 elementübergreifend unter Zuhilfenahme der in Abbildung 19 dargestellten Studienergebnisse detaillierter diskutiert.

Werkstoffübergreifende Konzepte

Neben antimikrobiell wirkenden Metallen existieren auch einige Werkstoffkonzepte für Nichtmetalle bzw. werkstoffunabhängige Oberflächenkonzepte (chemische antimikrobielle Wirkstoffe und Arzneistoffe ausgenommen), die ebenfalls einen antibakteriellen Effekt zum Ziel haben.

In einigen Studien wurde bei **Kohlenstoff** in Form von Nanodiamanten und Graphen eine bakterizide Wirkung nachgewiesen.^[222,223] Deren Ursache war eine unvollständige chemische Oberflächenoxidation, die durch das Syntheseverfahren kontrolliert wurde. Auf diese Weise erzeugten Wehling *et al.* Säureanhydride als reaktive funktionelle Oberflächengruppen auf Nanodiamanten, die Membranproteine von Bakterien angriffen.^[222] Neben dem chemischen Effekt wurde in dieser Studie eine anisotrope Ladungsverteilung auf den Nanodiamanten und deren Einfluss auf die Bakterienmembran als Abtötungsfaktoren vorgeschlagen. Hu *et al.* wiesen die Zellwandschädigung bei *E. coli* qualitativ als Schädigungsmechanismus auf Graphenoxid und reduziertem Graphenoxid nach.^[223]

Bei **Polymeren** mit polykationischen Oberflächen (Bsp. Polyethyleneimin) wird ein chemisch-mechanischer Mechanismus genutzt, um eine antibakterielle und antivirale Wirkung zu erzielen.^[224] Hierbei ziehen hydrophobe Polymerketten auf der Oberfläche das Bakterium an, bleiben während der Adhäsion jedoch aufgrund positiv gleichgeladener Kettenelemente aufgerichtet und dringen somit schädigend in die Bakterienmembran ein.^[224] Generell stellt die Bakterienadhäsion bei Polymeren mit vorwiegend hydrophobem Oberflächencharakter ein Problem dar.^[225] Im medizinischen Bereich werden bakterienabweisende Oberflächen und Materialien daher oft als antibakteriell bezeichnet, obwohl sie keine aktiv toxische Wirkung auf Bakterien ausüben.^[21,85] Hierbei ist die Generierung von zwitterionischen Oberflächen, die einen konstant hohen, lokalen Wassergehalt und damit einen künstlich hydrophilen Oberflächencharakter aufrecht erhalten, eine verbreitete Methode zur Verringerung der bakteriellen Adhäsion.^[225]

Neben chemischen Abtötungsmechanismen kann auch die **Topographiegestaltung** von Oberflächen einen antibakteriellen Effekt hervorrufen. Bei biologisch inspirierten, nanostrukturierten Titanoberflächen konnte eine mechanisch-bakterizide Wirkung nachgewiesen werden.^[226] Sengstock *et al.* zeigten, dass Bakterien auf Titan, welches unter extrem flachem Einstrahlwinkel (*glancing angle deposition*, GLAD) abgeschieden wurde, schneller abstarben als auf glatt beschichteten Titan-Referenzflächen.^[226] Die nadelartige Nanostruktur der Titanoberflächen unter GLAD wurde hierbei als Wirkursache identifiziert. Gram-negative Bakte-

rien schienen gegenüber dieser Art von antibakteriellem Mechanismus sensibler zu reagieren als Gram-positive Vertreter mit dickerer Zellwand. Die Tatsache, dass ein derartiger Effekt auch bei sogenanntem *black silicon*, Silizium mit ebenfalls nadelartiger Nanostruktur, beobachtet wurde, legt nahe, dass es sich um einen rein topographisch-mechanischen Abtötungsmechanismus handeln könnte.^[227]

Wie bereits erwähnt kann auch die Beeinflussung der Bakterienadhäsion auf Oberflächen als indirekte antimikrobielle Funktionalisierung interpretiert werden. Die topographische Oberflächengestaltung zur Kontrolle der Bakterienadhäsion stellt einen eigenen, komplexen Forschungsbereich dar, der an dieser Stelle nicht detailliert betrachtet wird. Es sei lediglich erwähnt, dass elementaren Strukturgrößen wie Strukturtiefe, Periodizität und Aspektverhältnis und deren Relation zur Bakteriengröße eine wichtige Rolle bei der bakteriellen Adhäsion auf strukturierten Oberflächen zugeordnet wird.^[228,229] Generell scheint in einer Mehrzahl von Studien die Tendenz erkennbar, dass Bakterien auf topographischen Strukturen ähnlicher Größenordnung verstärkt adhäreren, wohingegen wesentlich kleinere Strukturgrößenordnungen die Adhäsion zu erschweren scheinen.^[230-232]

Zentrale Fragestellungen

Kupfer- und Silberwerkstoffe nutzen multiple Toxizitätsmechanismen gegenüber Bakterien, die auf der chemischen Affinität ihrer Ionen beruhen. Innerhalb der Gruppe metallischer, antimikrobieller Werkstoffe heben diese sich durch ein relativ starkes und im Vergleich zu TiO_2 lichtunabhängiges Abtötungsverhalten hervor. Kupferwerkstoffe zeigen vorwiegend in trockener Umgebung eine erhöhte Abtötungsrate, wohingegen Silberwerkstoffe in feuchter Umgebung wirksamer zu sein scheinen. Silberoxid stellt bei Silberwerkstoffen die aktive, antimikrobiell wirkende Verbindung dar. Eine Materialkombination beider Elemente könnte nach Urteil einiger Studien durch synergetische Effekte vorteilhafte antimikrobielle Eigenschaften aufweisen. Diese These wurde bisher nicht anhand entsprechender Materialsysteme untersucht. Bei Kupferoxiden wurde ebenfalls eine antimikrobielle Wirkung festgestellt, die im Vergleich zum reinen Metall als schwächer beurteilt wird. Sowohl der elementabhängige Feuchtigkeitseinfluss, als auch die genaue Rolle von Kupferoxiden auf das Abtötungsverhalten wurden bisher nicht vollständig aufgeklärt.

Entsprechend dem dargestellten Stand der Forschung motivieren sich zentrale Fragestellungen die im folgenden Ergebnisteil der Arbeit behandelt werden:

- Wie gestaltet sich der genaue Einfluss der Oxidation auf die antimikrobielle Wirkung von Kupferwerkstoffen?
- Tritt bei der direkten Kombination von metallischem Kupfer und Silber ein synergetischer, wirkungsverstärkender Effekt auf?
- Was ist der Ursprung der augenscheinlich feuchtigkeitsabhängigen, unterschiedlichen Abtötungswirkung bei Kupfer- und Silberwerkstoffen?
- Lässt sich die starke antimikrobielle Wirkung von Kupfer- und Silberwerkstoffen im Vergleich zu anderen metallischen Elementen grundlegend herleiten?
- Kann die antimikrobielle Wirkung von Kupferwerkstoffen durch eine gezielte Gestaltung der Mikro- bzw. Oberflächenstruktur kontrolliert werden?

Ergebnisteil

Versuchskonzept

Den durchgeführten Versuchen gingen Vorversuche und methodische Weiterentwicklungen voraus, die hier einleitend vorgestellt werden. Detaillierte experimentelle Parameter werden jeweils im Anschluss an die Diskussion jedes Kapitels aufgeführt.

Zur Bestimmung der Ionenkonzentration wurde in früheren Versuchen während des *wet plating* Verfahrens aus dem aufsitzenden Tropfen Probevolumina entnommen. Im Laufe der Arbeit wurde eine inerte Versuchskammer entwickelt, die bei späteren Experimenten eine vereinfachte, flächennormierte Messung der Ionenabgabe erlaubte.^[233]

Um den Einfluss der Oberflächenrauheit zu minimieren, wurden alle getesteten metallischen Proben bis auf durchschnittlich 50 nm quadratisch gemittelte Oberflächenrauheit feinpoliert. Zum Einbetten wurde ein chemisches Mittel auf Basis von Methylmethacrylat (Demotec 33, Demotec Demel e.K.) verwendet. Mögliche Überreste des Einbettmittels auf der Oberfläche wurden durch ein zehnminütiges Ultraschallbad in Chloroform als wirksames Lösemittel entfernt. Die Lagerung und der Versand metallischer Proben erfolgten grundsätzlich in Exsikkatoren bzw. unter Schutzgasatmosphäre (N₂).

Die verschiedenen verwendeten Bakterienarten ergeben sich dadurch, dass ein Teil der Versuche zu Projektbeginn in einem Labor der Sicherheitsstufe 2 für RG2-Keime mit pathogenen Erregern durchgeführt wurde (*E. hirae*, *E. coli* W3110). Spätere Abtötungsversuche fanden im institutseigenen Labor (Sicherheitsstufe 1) statt, weshalb auch relevante ungefährliche Bakterienarten eingesetzt wurden (*E. coli* K12, *S. carnosus*, *P. fluorescens*).

In Vorversuchen zeigte sich, dass Dünnschichtsysteme in der Regel nicht ausreichend mechanisch resistent für die Abtötungsversuche waren (feuchtigkeitsbedingte Delamination während des *wet plating* Verfahrens, abrasive Zerstörung der Schichten während des Auftragens und Vortexens beim *dry plating* Verfahren). Aus diesem Grund wurden keine Kupferdünnschichten, sondern 1 mm dickes Kupferblech (99,9 %, KME Germany GmbH und Co. KG) als Kupferreferenz verwendet.

Als inertes Referenzmaterial wurden in früher durchgeführten Versuchen Borosilikatglas eingesetzt. Im Anschluss an die Experimente, die den metallischen Charakter des getesteten Materials als Einflussgröße nahelegen (siehe S. 74ff), wurde dieses durch Edelstahl (AISI 304: X5CrNi18-10) ersetzt.

Die Puffer- und Nährmedien wurden mit Stoffen analytischer Reinheit und mit vollentsalztem Wasser angesetzt. Gebrauchsfertige Lösungen wurden bei 120 °C in einem Autoklavensystem sterilisiert.

Oxidations- und Mikrostruktureinfluss

Dieses Kapitel befasst sich generell mit dem Einfluss von Feuchtigkeit auf das Materialverhalten von Kupferwerkstoffen und dessen Korrelation zur antibakteriellen Wirkung. Hierzu werden Oxidationsprozesse auf reinem Kupfer und synergetische Effekte bei einer Kupfer-Silber-Legierung mit modellhafter Mikrostruktur untersucht.

1. Rolle der Oxidation von Kupfer

Aus dem Stand der Forschung geht hervor, dass verschiedene Varianten von Abtötungstests einen starken Einfluss auf das ermittelte Abtötungsverhalten eines Materials ausüben. In diesem Abschnitt werden daher zunächst die grundlegenden, oxidativ-korrosiven Prozesse während eines standardisierten Abtötungstest nach dem *wet plating* Verfahren auf Kupfer und deren Einfluss auf Material sowie Abtötungsverhalten untersucht. Ein Großteil der vorgestellten Ergebnisse wurde in ^[234] veröffentlicht.

1.1 Oxidation während Abtötungsversuchen

Korrosionsprozesse während des *wet platings* definieren sich durch die Interaktion zwischen dem Werkstoff und dem Puffermedium, in dem die Bakterien aufgetragen werden. Bei nahezu allen standardisierten Abtötungsversuchen wird entweder eine phosphatgepufferte Kochsalzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) oder eine Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Pufferlösung ((HOCH₂)₃CNH₂, TRIS) eingesetzt, welche beide einen neutralen pH-Wert von 7 einstellen. In den Lösungen auftretende Elemente sind mit abnehmender Konzentration Na, Cl, P (PBS) und C, N, Cl (TRIS). Genaue Rezepturen der Lösungen sind im Anhang aufgeführt.

Nach dem Pourbaix-Diagramm für Kupfer in Wasser (siehe S. 30) ist bei pH 7 ohne äußere elektromotorische Kraft eine Oxidschichtbildung auf Kupfer zu erwarten. Aus diesem Grund wurde ein *in situ* ellipsometrisches Flusskammerexperiment in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Eisenforschung (MPIE, Düsseldorf) durchgeführt. In diesem wurden Schichtwachstumsprozesse auf reinem Kupfer in Kontakt mit PBS- und TRIS-Pufferlösung über den typischen Zeitraum eines Abtötungsversuchs von bis zu 3 h untersucht. Reine, polierte Kupferproben wurden hierzu in einer Kammer installiert, die mit Lösungen im Durchfluss gespült werden konnte und eine *in situ* ellipsometrische Analyse durch ein einseitig angebrachtes, transparentes Fenster erlaubte.

Identifizierung der Korrosionsprodukte

Die Identifizierung des entstehenden Oxids erfolgte durch einen Abgleich von experimentell ermittelten und simulierten Spektren für den ellipsometrischen Parameter ψ . Für Cu₂O und CuO wurden am MPIE auf Basis von Literaturdaten komplette Spektren von ψ über den Wellenlängenbereich 300 – 800 nm für verschiedene Oxidschichtdicken simuliert.^[234–236] Von diesen wurde in einem nächsten Schritt das gemessene Spektrum von reinem Kupfer in

Wasser als Hintergrund subtrahiert, um die in Abbildung 20 a) und b) dargestellten Differenzspektren $\delta\psi$ als Referenzverläufe für beide Oxidtypen zu erzeugen. Die in Abbildung 20 c) und d) dargestellten Differenzspektren $\delta\psi$ geben den zeitlichen Verlauf des gemessenen, ellipsometrischen Spektrums für die aufwachsenden Schichten in TRIS- bzw. PBS-Pufferlösung wieder. Hierbei wurde jeweils das initial aufgenommene Spektrum für ψ von den zeitlich folgenden als Hintergrund subtrahiert.

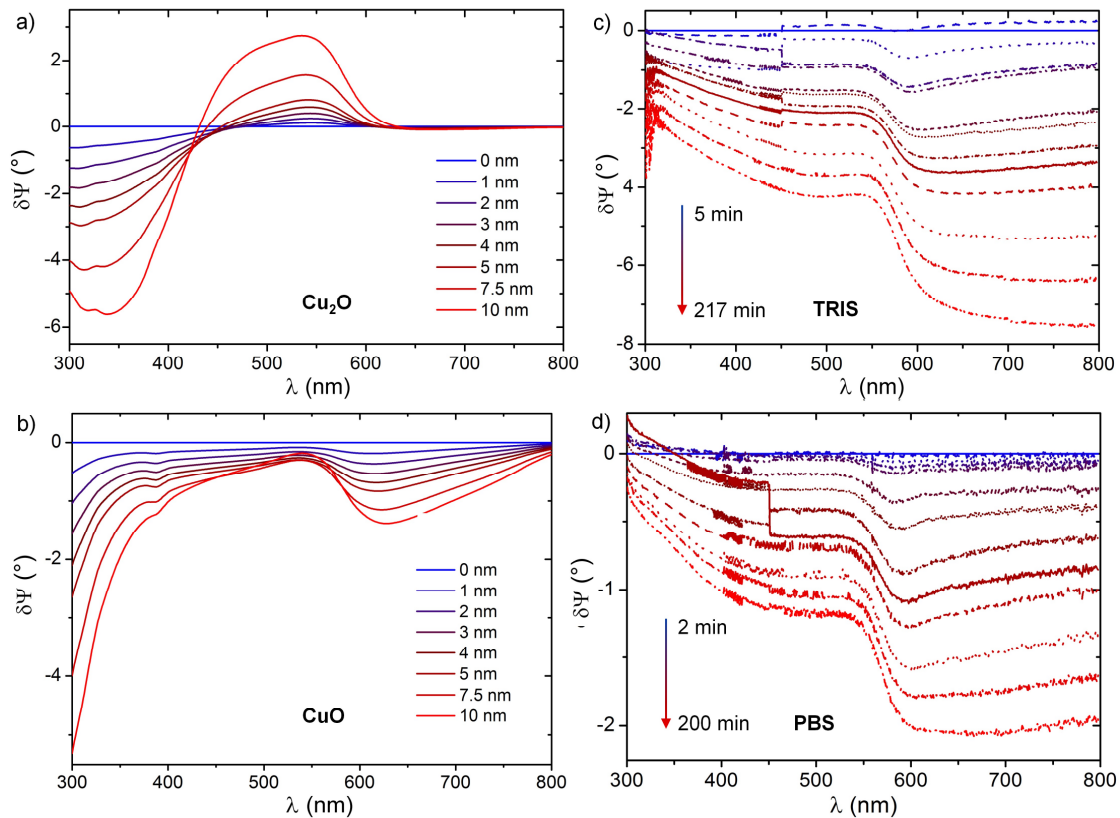


Abbildung 20: Ellipsometrische Differenzspektren $\delta\psi$ für Kuperoxide. Die Referenzspektren a) und b) wurden für verschiedene Oxidschichtdicken von Cu_2O und CuO auf Basis von Literaturdaten berechnet. In c) und d) dargestellt sind die gemessenen Differenzspektren in TRIS- bzw. PBS-Pufferlösung im zeitlichen Verlauf.

Die Interpretation der Spektralverläufe gestaltet sich sehr komplex und wird in ^[234] eingehender diskutiert. Eine wesentliche Erkenntnis ist die, dass sich bei beiden Pufferlösungen in c) und d) ein qualitativ ähnlicher Spektralverlauf einstellt, was auf eine vergleichbare Schichtbildung schließen lässt. Charakteristisch für die Referenzspektren a) und b) sind ein Maximum bei ca. 540 nm für Cu_2O , sowie ein Minimum bei ca. 622 nm für CuO , welche sich bei dicker werdenden Schichten stärker ausprägen. Beide aufgenommenen Spektren c) und d) zeigen kein ausgeprägtes Maximum bei 540 nm, jedoch eine starke, zeitabhängige Abnahme für $\lambda > 600$ nm. Dies lässt auf die verstärkte Bildung von CuO schließen. Da unter idealisierten Bedingungen Cu_2O die thermodynamisch wahrscheinlichste Verbindung in

neutralen Lösungen darstellt (siehe Pourbaix-Diagramm S.30) ist anzunehmen, dass die spezielle Chemie der Pufferlösungen für die Bildung von CuO verantwortlich ist. Durch eine anschließende XPS-Analyse von exponierten Probenoberflächen konnte die Präsenz weiterer Feststoffverbindungen von Cl, Na und P bei PBS, sowie N und Cl bei TRIS ausgeschlossen werden.^[234]

Wachstumsverhalten

Die zuvor gezeigten Ergebnisse legen nahe, dass, unabhängig von der Pufferlösung, CuO das priorisierte Oxidationsprodukt während standardisierter Abtötungstests auf Kupfer darstellt. Mit diesem Wissen war es möglich, den Wachstumsverlauf der CuO-Schicht abzuschätzen. Hierzu wurde der ellipsometrische Parameter Δ mit Literaturwerten dielektrischer Eigenschaften für das System CuO auf Cu in H₂O am MPIE simuliert.^[234] Der theoretische, schichtdickenabhängige Verlauf von Δ wurde mit einem Polynom 2.ter Ordnung angefitet, welches wiederum verwendet wurde, um aus der zeitlichen Abnahme des gemessenen Parameters Δ die reale Schichtdicke abzuleiten. Entsprechend dieser Vorgehensweise wurden die in Abbildung 21 dargestellten Wachstumskurven von CuO in PBS- und TRIS-Medium ermittelt.

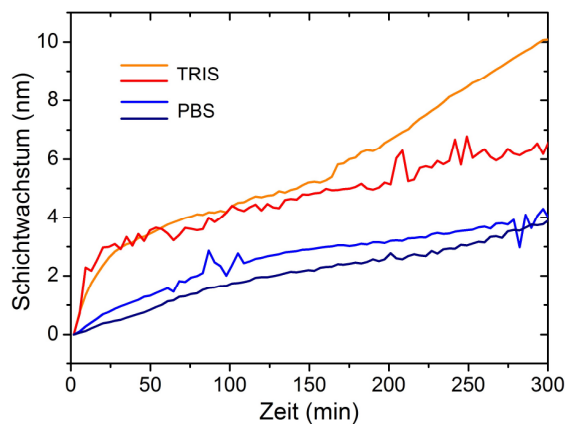


Abbildung 21: Ellipsometrisch bestimmter Wachstumsverlauf für CuO auf Kupfer in PBS- und TRIS-Puffermedium. Dargestellt sind jeweils zwei Einzelmessungen, die mittlere Schichtwachstumsrate beträgt etwa $0,01 \text{ nm min}^{-1}$.

Entsprechend Abbildung 21 fand in beiden Lösungen ein stetiges, im späteren Verlauf lineares Wachstum von CuO mit einer Rate von ca. $0,01 \text{ nm min}^{-1}$ statt. Innerhalb von 300 min wurden Oxidschichtdicken von 2,5 - 4 nm in PBS und 6 - 10 nm in TRIS erreicht. Die TRIS-Lösung verursachte ein zu Beginn verstärktes Wachstum und dadurch eine tendenziell dickere Oxidschicht, was nicht explizit begründet werden konnte. Die abweichende, höhere Steigung einer TRIS-Kurve ab ca. 150 min kann durch stochastisch auftretende Lokalkorrosion erklärt werden, die ein ortsabhängig verstärktes Oxidwachstum verursachte.

1.2 Abtötungsverhalten von Kupferoxiden

Wie zuvor gezeigt bildet sich im spezifischen Milieu eines standardisierten bakteriellen Abtötungsversuchs auf reinem Kupfer primär eine CuO-Schicht mit einer Wachstumsrate von ca. 1 nm pro 100 min aus. Aus dem Stand der Forschung geht hervor, dass bei Kupferoxiden im Vergleich zu reinem Kupfer allgemein ein Passivierungseffekt hinsichtlich des Abtötungsverhaltens vermutet wird. Somit stellt sich die Frage, ob die Abtötungswirkung von Kupferwerkstoffen durch Oxidbildung während eines Abtötungstests maßgeblich beeinflusst wird.

Um den generellen Einfluss von Kupferoxid und den spezifischen Einfluss des Kupferoxydtyps auf das Abtötungsverhalten aufzuschlüsseln, wurden für ein weiteres Experiment CuO- bzw. Cu₂O-Modelloberflächen thermisch generiert. Deren Zusammensetzung und Struktur wurden mittels XRD und REM geprüft. Anschließend wurden auf diesen Oberflächen im Vergleich zu reinem Kupfer und inertem Glas Abtötungsversuche mit Bakterien durchgeführt. Zur Interpretation der Ergebnisse wurde in einem weiteren Schritt die Kupferionenabgabe der Oberflächen mit Hilfe von Spurenelementanalysen ermittelt.

Generierung von CuO- und Cu₂O-Modelloberflächen

Da mittels PVD generierte Dünnschichten sich als nicht ausreichend stabil für die durchgeführten Abtötungsversuche herausgestellt hatten, wurden für diesen Versuch eine Cu₂O- sowie eine Cu₂O/CuO-Doppelschicht thermisch auf massivem Kupfer generiert.^[129] Entsprechend dem im Stand der Forschung beschriebenen Stabilitätsbereich wurde Cu₂O durch thermische Behandlung von Kupfer bei 200 °C für 20 h erzeugt. Für den zweiten Probenatz wurde eine zusätzliche CuO-Oxidschicht durch thermische Behandlung von reinem Kupfer bei 350 °C für 150 min induziert. REM-Aufnahmen der Oberflächen sowie der schematische Aufbau dieser Schichten sind in Abbildung 22 wiedergegeben. Die Schichtdicken wurden an mehreren Probenquerschnitten mittels fokussiertem Ionenstrahl (FIB) im REM ermittelt.

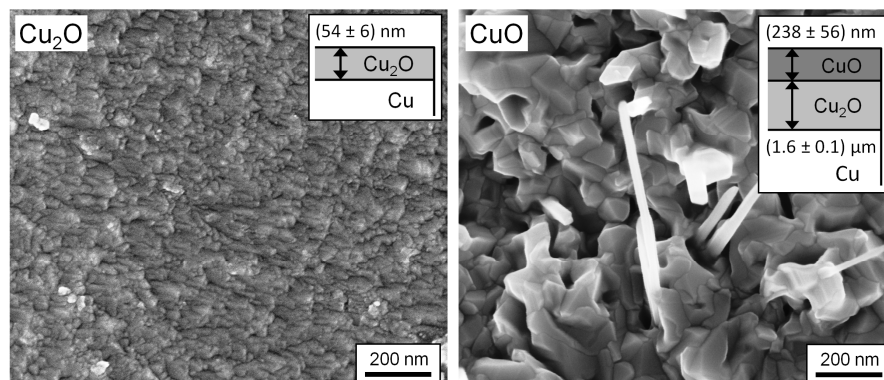


Abbildung 22: REM-Aufnahmen und schematischer Schichtaufbau der thermisch auf Kupfer generierten Cu₂O- und Cu₂O/CuO-Doppelschichten.

Beide Oxidschichtdicken, 54 ± 6 nm für Cu_2O und 238 ± 56 nm für CuO , werden in Anbetracht des angenäherten Oxidschichtwachstums weniger nm (Abbildung 21) als ausreichend hoch bewertet, damit der Charakter des äußeren Oxids während eines Abtötungstests wiedergegeben wird.

In Abbildung 22 ist auf beiden Oberflächen eine durch das Oxidwachstum entstandene Rauheit zu erkennen, die sich speziell bei der CuO -Schicht durch vereinzelte Whisker auszeichnet. Um die entstandene Rauheit zu bewerten, wurden die Rauheitszustände verschiedener Proben, wie in Tabelle 5 wiedergegeben, verglichen.

Tabelle 5: Quadratisch gemittelte Oberflächenrauheit (rms) von poliertem, reinem Kupfer (Cu), thermisch generierten Cu_2O - und CuO -Oberflächen und von polierten Kupferproben, die 300 min in Kontakt mit PBS- (Cu-PBS) bzw. TRIS-Lösung (Cu-TRIS) standen.

Oberfläche	Cu	Cu_2O	CuO	Cu-PBS	Cu-TRIS
rms (nm)	13 ± 8	22 ± 6	671 ± 234	73 ± 10	552 ± 129

Bei Betrachtung der gemittelten Rauheitswerte wird deutlich, dass durch die thermische Erzeugung der $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$ -Doppelschicht eine ähnlich hohe Rauheit generiert wurde, wie nach einem Abtötungsversuch mit TRIS-Medium auf poliertem Kupfer durch Wachstum der CuO -Schicht. Aus diesem Grund wird der Einfluss unterschiedlicher Oberflächenrauheit auf das Abtötungsverhalten in dem betrachteten Rauheitsintervall als vernachlässigbar eingestuft.

Die Zusammensetzung der thermisch generierten Oxidoberflächen wurde durch XRD-Messungen unter streifendem Einfallswinkel überprüft. In Abbildung 23 sind die entsprechenden XRD-Diffraktogramme der Cu_2O -Schicht (oben) und der $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$ -Doppelschicht (unten) dargestellt.

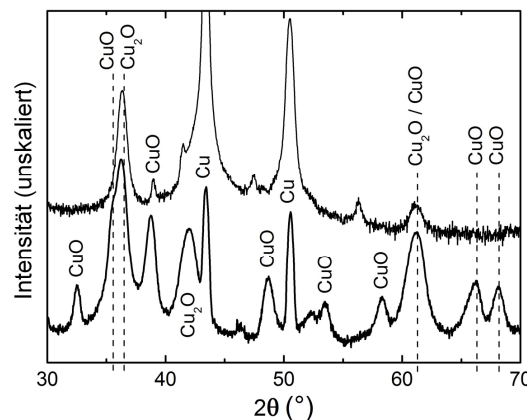


Abbildung 23: XRD-Diffraktogramme der auf Kupfer thermisch generierten Cu_2O -Schichten (oben) und $\text{Cu}_2\text{O}/\text{CuO}$ -Doppelschichten (unten).

Die Diffraktogramme in Abbildung 23 bestätigen reines Kupfer und die vermuteten Kupferoxide als vorliegende Verbindungen und korrelieren sehr gut mit anderen XRD-Studien an thermisch generierten Kupferoxiden.^[106] Reines Kupfer wurde volumenmäßig stark miterfasst, da die theoretisch berechneten Analysetiefen unter den gegebenen Versuchsparametern ca. 1,1 μm für reines Kupfer, 1,8 μm für Cu_2O und 3,7 μm für CuO betragen und damit oberhalb der erzeugten Schichtdicken lagen.

Abtötungsversuche

Die vorangegangenen Materialanalysen bestätigen die ausreichende Dicke und die angestrebte Zusammensetzung der thermisch generierten Oxidschichten. Diese wurden, zusammen mit reinem Kupfer und Glas als inertem Referenzmaterial einem Abtötungstest in PBS und TRIS-Medium entsprechend der *wet plating* Methode mit *Enterococcus hirae* (*E. hirae*) unterzogen. *E. hirae* stellt einen Gram-positiven, nosokomialen Erreger dar, der eng mit MRSA verwandt ist.^[234] In Abbildung 24 werden die Ergebnisse der Abtötungsversuche in Kooperation mit AG Prof. Solioz zusammengefasst.

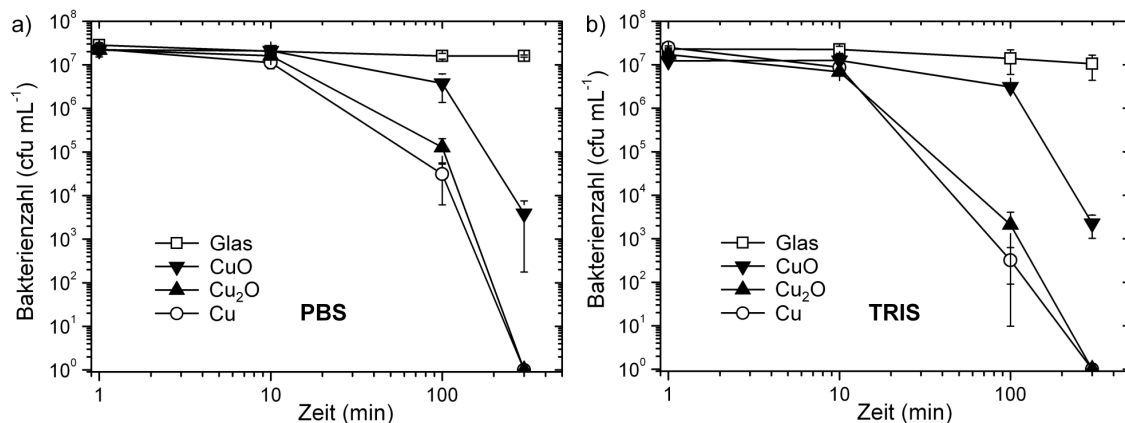


Abbildung 24: Zeit-Abtötungsdiagramme für Abtötungsversuche auf Glas, Kupfer und thermisch generierten Kupferoxidoberflächen in a) PBS- und b) TRIS-Medium nach dem *wet plating* Verfahren.

Während auf Glas wie erwartet keine Abtötung stattfand, zeigten die Cu_2O -Oberflächen eine mit reinem Kupfer vergleichbare antimikrobielle Wirkung. Es erfolgte für Kupfer und Cu_2O eine vollständige Abtötung von $3 \cdot 10^8$ Zellen nach 300 min. Im Gegensatz hierzu überlebten auf den CuO -Oberflächen nach 300 min ca. 10^3 Zellen. Dieses Experiment belegt erstmalig, dass das Abtötungsverhalten bei Kupferoxiden von dem gebildeten Oxidtyp abhängig ist. Eine derartige Tendenz zeigte sich in beiden Pufferlösungen, die Abtötung auf Cu_2O und reinem Kupfer fand im TRIS-Medium jedoch schneller statt als im PBS-Medium (siehe 100 min).

Ionenabgabe

Um das beobachtete Verhalten weiter aufzuschlüsseln, wurde die Cu-Ionenabgabe der verschiedenen Oberflächen bestimmt. Dies geschah ebenfalls in beiden Puffermedien über einen Zeitraum von 300 min, wie in Abbildung 25 dargestellt. Hierbei war auffällig, dass die Ionenabgabe unter den gegebenen Versuchsbedingungen bei allen Materialien linear erfolgte, weshalb diese in Form einer Abgaberate angefitet wurde. Um dem unterschiedlichen Benetzungsverhalten der Oberflächen in diesem Versuch Rechnung zu tragen, wurde die Abgaberate zusätzlich auf die Oberfläche normiert. Die durch das bakterienführende Puffermedium (40 μL) benetzten Flächen betragen $22,27 \pm 9,21 \text{ mm}^2$ auf Kupfer, $20,13 \pm 2,38 \text{ mm}^2$ auf den Cu_2O - und $15,55 \pm 6,65 \text{ mm}^2$ auf den CuO -Oberflächen.

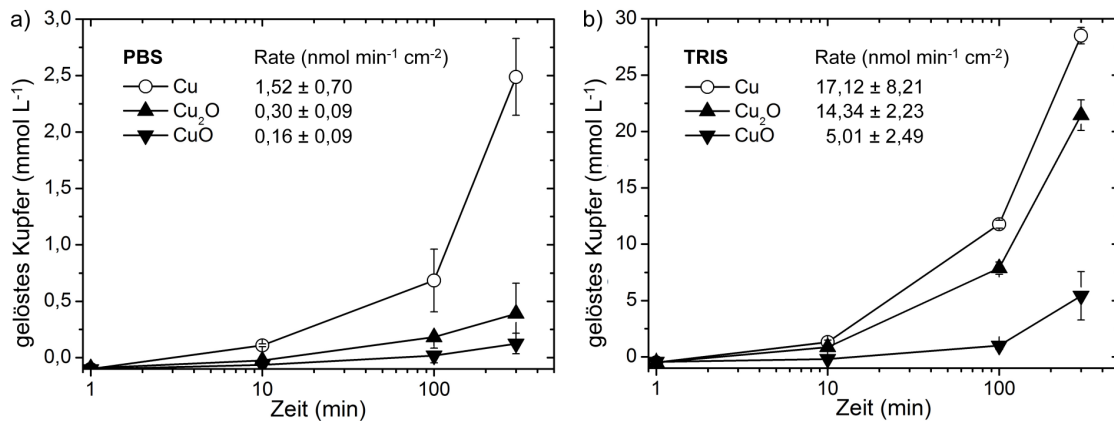


Abbildung 25: Cu-Ionenkonzentration in PBS- und TRIS-Medium auf Kupfer und thermisch generierten Kupferoxidoberflächen im zeitlichen Verlauf sowie linear gefittete, oberflächennormierte Abgaberraten. Für Kupfer entspricht 1 mmol L^{-1} genau $63,54 \text{ mg L}^{-1}$.

Reines Kupfer, welches die stärkste Abtötungsrate bei *E. hirae* zeigte, wies ebenfalls die stärkste Abgaberate an Kupferionen auf. Auf CuO bildete sich die niedrigste, auf Cu_2O eine mittlere Ionenkonzentration aus. In beiden Pufferlösungen korrelierte die Cu-Konzentration direkt mit der Abtötungswirkung der Oberflächen. Beim Vergleich beider Medien fällt auf, dass die Kupferabgabe bei TRIS in Relation zu PBS um den Faktor 10 (Cu) - 50 (Cu_2O) erhöht war. Die relativ starke Abweichung der Ionenkonzentration zwischen Cu_2O und Cu in PBS wird als Indiz dafür angesehen, dass die Cu_2O -Schichtdicke ausreichend hoch war, um den Charakter des Oxids und nicht den des darunterliegenden Kupfers während eines Abtötungstests abzubilden. Der abgeschätzte, korrosive Materialverlust beträgt zwischen 11 pm min^{-1} (CuO in PBS) und $1,2 \text{ nm min}^{-1}$ (Cu in TRIS).

1.3 Diskussion

Die direkte Korrelation der Kupferkonzentration im Puffermedium mit dem beobachteten Abtötungsverhalten legt nahe, dass die Menge der vom Werkstoff abgegebenen Kupferionen einen wesentlichen Faktor für das antibakterielle Materialverhalten darstellt. Dies deckt sich mit der Aussage anderer Studien an Kupferwerkstoffen.^[52,66,160]

Ein möglicher Einfluss der unterschiedlichen Oberflächenrauheit der generierten Oxidschichten wurde im Vergleich zur dominierenden Ionenabgabe als vernachlässigbar bewertet. Durch Rauheit und Topographie verursachte Bakterienabtötung sollte nach früheren Studien an Kupfer und Titan einen reduzierenden Faktor von ca. 0,6 über mehrerer Stunden nicht überschreiten.^[226,237] Die hier ermittelten Abtötungsraten lagen mit einer Reduktion von $3 \cdot 10^8$ Bakterien während 300 min um mehrere Größenordnungen höher.

Einfluss der Puffermedien

Wie durch XPS überprüft wurde, entstanden bei der Wechselwirkung von Kupfer und Puffermedien außer den Oxiden keine maßgeblichen, weiteren schwerlöslichen Feststoffverbindungen. Dies legt nahe, dass sich der Einfluss der Puffermedien primär auf die Oxidbildungsprozesse beschränkte.

Qualitativ fand in beiden Puffermedien ein ähnliches CuO-Wachstum und Abtötungsverhalten statt. Sowohl das anfängliche Oxidschichtwachstum als auch die Abtötung auf Cu und Cu₂O nach 100 min liefen im TRIS-Medium allerdings schneller ab als im PBS-Medium. Der gravierendste Unterschied zeigt sich in der Ionenabgaberate. Hier war die Kupferabgabe im TRIS-Medium im Vergleich zu PBS um den Faktor 10 – 50 erhöht. Eine Erklärung hierfür ist die starke Neigung des TRIS-Mediums zur Bildung von Kupferkomplexen, die die effektive Kupferkonzentration für elektrochemische Prozesse verringern.^[66,160] Dieser Effekt wird als wesentlich stärker eingeschätzt als die bei PBS-Lösungen ebenfalls mögliche Komplexbildung mit Phosphaten.^[238] Das anfänglich beschleunigte Oxidwachstum sowie die leicht schnellere Abtötung werden als direkte Folge der bei TRIS erhöhten Kupferionenabgabe gedeutet.

Generell wird durch eine Cu-Komplexierung die für antibakterielle Mechanismen zur Verfügung stehende Zahl an Kupferionen tendenziell eingeschränkt.^[66] Exemplarisch wurde jedoch nachgewiesen, dass einige Kupferkomplexe wie beispielsweise (TRIS)₂-Cu und Cl₂-Cu den Transport von Kupfer in das Bakterieninnere vereinfachen können und somit Schädigungsmechanismen im Zellinneren erleichtern könnten.^[160]

Oxidspezifische Abtötung

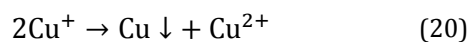
Die Erkenntnis, dass sich Cu₂O und CuO in ihrem Abtötungsverhalten wesentlich unterscheiden, stellt den aufschlussreichsten Aspekt der durchgeführten Experimente dar. Zur Interpretation dieses Phänomens werden zwei Theorien angeführt. Die zunächst betrachtete These beschreibt ein **löslichkeitsgesteuertes Abtötungsverhalten**.

Kupfer und Kupferoxide befinden sich während des Abtötungstests in einem Löslichkeitsgleichgewicht mit der Lösung. Dieses wird thermodynamisch über das Löslichkeitsprodukt K_L von Feststoffen in Lösungen beschrieben. Der p_{K_L} -Wert wiederum ist definiert als $\log(K_L)$. Je niedriger das Löslichkeitsprodukt bzw. der p_{K_L} -Wert ist, desto unlöslicher ist ein Stoff. Da die antibakterielle Wirkung im gezeigten Experiment mit der Konzentration an gelösten Cu-Ionen korrelierte, wäre es denkbar, dass diese auch mit dem Löslichkeitsprodukt des entsprechenden Oxids zusammenhängt.

Generell werden CuO und Cu₂O als unlöslich bzw. schwerlöslich in Wasser betrachtet. Literaturangaben zu deren p_{K_L} -Werten schwanken je nach Studie (Jahr; Quelle) zwischen -20,1 (1974; [1]), -20,5 (1965; [239]), -22 (1944; [240]) und -23,5 (1976; [241]) für CuO und zwischen -14,6 (1982; [242]), -14,8 (1976; [241]) und -15 (1995; [243]) für Cu₂O unter Standardnormalbedingungen in Wasser. Etwas hiervon abweichend steht der aktuellste p_{K_L} -Wert von -9 für Cu₂O in Wasser aus den Arbeiten von Palmer *et al.* (2008 und 2009).^[244,245] Dementsprechend lässt sich dem Oxid mit stärkerem Abtötungsverhalten (Cu₂O) tatsächlich ein höheres Löslichkeitsprodukt in Wasser zuordnen. Die in den Pufferlösungen ablaufenden, elektrochemischen Prozesse involvieren allerdings eine Vielzahl komplexer Gleichgewichtsreaktionen, die an dieser Stelle nicht im Detail diskutiert werden.^[238,244] Dennoch scheint es so, dass bei schwerlöslichen Kupferverbindungen die Ionenlöslichkeit in Wasser als Materialkennwert zur Abschätzung des antibakteriellen Verhaltens herangezogen werden kann.

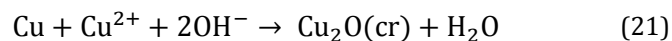
Nach dieser Auslegung sollte sich die höhere Rauheit der CuO-Oxidschicht wegen der größeren, zur Verfügung stehenden Oberfläche tendenziell positiv auf das Abtötungsverhalten auswirken. Ein möglicher derartiger Effekt wäre, ebenso wie die rauheitsinduzierte Abtötung, durch wesentlich stärkere Effekte überlagert und wurde daher vernachlässigt.

Eine weitere Interpretation der beobachteten, oxidspezifischen Abtötung bezieht sich auf die Wertigkeit der in Lösung tretenden Kupferionen und beschreibt somit ein **ionengesteuertes Abtötungsverhalten**. Palmer wies einwertige Cu⁺-Ionen als die relevante, in Lösung gehende Spezies bei Cu₂O in Wasser nach.^[244] Dies wurde trotz der für Cu⁺ in wässrigen Lösungen möglichen Disproportionierungsreaktion (Gl. 20) beobachtet.



Abicht *et al.* zeigten, dass Cu^+ -Ionen einen wesentlich toxischeren Effekt als Cu^{2+} -Ionen bei grampositiven *Lactococcus lactis* Bakterien ausübten.^[246] Hierin könnte ebenfalls begründet sein, dass Cu_2O , welches vorwiegend Cu^+ in Lösung gibt, einen stärkeren, antibakteriellen Effekt als CuO aufweist. Falls sich die Abtötungswirkung gegenüber Bakterien tatsächlich als in dieser Form ionenspezifisch darstellt, könnte hiermit auch das bei reinem Kupfer im Vergleich zu seinen Oxiden stärkere Abtötungsverhalten hergeleitet werden.

Auf reinem Kupfer kann während eines Abtötungstests eine anodische Auflösung im Elektrolyten stattfinden. Diese tritt zusätzlich zu der chemischen Löslichkeit auf, welche die Ionenabgabe bei Kupferoxiden steuert. Auf diese Weise kann zunächst die im Vergleich zu den Oxiden erhöhte Kupferionenabgabe erklärt werden. Bei einer derartigen, anodischen Auflösung von Kupfer in chlorhaltigen Medien entstehen vorwiegend Cu^+ -Ionen, wie Klemm *et al.* zeigten.^[247] Baes *et al.* wiesen nach, dass die Löslichkeit von Cu^{2+} in Anwesenheit von metallischem Kupfer durch das Ausfällen von Cu_2O entsprechend folgender Reaktion eingeschränkt werden kann:^[241]



Entsprechend dieser Überlegungen führt auch die Lokalkorrosion von metallischem Kupfer in Pufferlösungen sehr wahrscheinlich zu einer gesteigerten Konzentration von Cu^+ -Ionen. Somit ließe sich die höhere, antimikrobielle Wirksamkeit von Kupfer gegenüber seinen Oxiden und von Cu_2O gegenüber CuO auch als ionenspezifischer Effekt deuten.

Je nach experimentellen Bedingungen und priorisiertem Abtötungsmechanismus können allerdings auch Cu^{2+} -Ionen als Katalysator der Fenton-Reaktion (siehe S. 38) eine Verstärkung des antibakteriellen Effekts von Kupfer hervorrufen.^[33] Die hier angeführte Theorie der stärker toxisch wirkenden Cu^+ -Spezies würde dafür sprechen, dass die Generierung von aggressiven, freien Radikalen nach der Fenton-Reaktion in dem hier durchgeführten Experiment mechanistisch vernachlässigbar ist. Generell wäre sogar denkbar, das Verhältnis von Cu^+ - zu Cu^{2+} -Ionen während eines bakteriellen Abtötungstest als Indikator für die ablaufenden Toxizitätsmechanismen zu untersuchen.

Folgen der Oxidbildung

CuO zeigt eine im Vergleich zu Cu und Cu_2O schwächere Abtötungswirkung, stellt jedoch gleichzeitig das primäre gebildete Oxid im Milieu eines standardisierten Abtötungstest auf Kupfer dar. Daher ist es vorstellbar, dass **während eines Abtötungstests** eine durch den Test selbst induzierte, inhibierende Wirkung auftritt. Tatsächlich zeigten einige antimikrobielle Studien an Kupferwerkstoffen ein bei längeren Versuchszeiten abnehmendes oder stagnierendes Abtötungsverhalten.^[52,68,78,80] Derartige „Plateauphasen“ könnten durch die Ausbildung einer passivierenden CuO -Schicht erklärt werden.

Unter **atmosphärischen Bedingungen** bildet sich innerhalb von Sekunden eine native, dünne Oxidschicht aus.^[121] Im Stand der Forschung wurde gezeigt, dass diese Oxidschicht unter trockenen Bedingungen hauptsächlich aus Cu_2O besteht. Es ist daher anzunehmen, dass sich dieses auch im relevanten Innenanwendungsbereich auf Kupfer ausbildet. Die hier durchgeführten Experimente belegen, dass Cu_2O eine dem reinen Kupfer ähnlich hohe Abtötungswirkung gegenüber Bakterien zeigt. Dies würde bedeuten, dass sich die antimikrobielle Wirkung von Kupferoberflächen im trockenen Anwendungsbereich durch Oxidation nicht maßgeblich verschlechtert bzw. auch auf längere Zeit hin ähnlich stark erhalten bleibt.

Die Oxidausbildung auf **Kontaktflächen** aus Kupfer- und Kupferlegierungen in Interaktion mit NaCl-haltigen und schweißähnlichen Lösungen oder bei echtem Hautkontakt gestaltet sich als sehr komplex und wurde bisher nicht hinreichend untersucht (siehe S. 31). Um auch auf Kupferlegierungen eine möglichst starke und langanhaltende antimikrobielle Wirkung zu erzielen, könnte eine Strategie darin bestehen, die Ausbildung von Cu_2O gegenüber CuO durch geeignete Legierungszusammensetzung gezielt zu priorisieren. Einige exemplarische Studien an Messingwerkstoffen belegen die Tendenz, dass bei entsprechender Legierungszusammensetzung unter regelmäßigem Hautkontakt Cu_2O als Hauptoxidationsprodukt ausgebildet wird.^[134,138] Dies könnte im Idealfall bedeuten, dass beispielweise auch im komplexen Belastungsumfeld einer Türklinke die Bildung von eher passivierendem CuO durch entsprechende Legierungsgestaltung eingeschränkt werden kann.

Neben den wissenschaftlich zu klärenden Fragestellungen existieren laut Aussage der Kupferhalbzeug-Hersteller zwei subjektive Hürden, die die **Akzeptanz von Kupferwerkstoffen** als antimikrobielle Kontaktflächen in der Öffentlichkeit erschweren. Diese sind zum einen die als schmutzig empfundene Oberflächenoxidation (CuO = schwarz, Cu_2O = dunkelbraun) und zum anderen der sich bei Hautkontakt ausbildende, typische „Kupfergeruch“. Interessanterweise ist der als unangenehm empfundene „Kupfergeruch“ ebenfalls auf die Ionenwirkung von Kupfer zurückzuführen. Dieser entsteht, ähnlich wie bei Eisen^[248], während der oxidativen Zersetzung von Körperfetten durch Kupferionen und kann damit sogar näherungsweise als Indiz für eine aktiv wirkende, antimikrobielle Kupferoberfläche betrachtet werden. Die hier vorgestellten Ergebnisse zum Oxideinfluss könnten einen Beitrag leisten, die negative Wahrnehmung von oxidierten Kupferoberflächen für hygienische Anwendungen abzubauen.

1.4 Versuchsparmeter

Die ellipsometrischen Messungen wurden an einem UV-VIS spektroskopischen Ellipsometer (SE 800, Sentech Instruments) bei 1,5 – 4,4 eV durchgeführt. Als Lichtquelle diente eine Xenonlampe. Die zeitliche Auflösung der Differenzspektren ergibt sich aus der Dauer einzelner Messungen der Parameter ψ bzw. Δ und liegt bei ca. 40 - 50 s. Details zum Design der Flusskammer sind in [249] zu finden. Unmittelbar vor Messung des Schichtwachstums wurden die polierten Kupferproben in der Kammer mit Amidosulfonsäure (5 Vol.-%) gespült, um bereits vorhandene Oxide zu lösen. Die mit XPS analysierten Proben wurden den Pufferlösungen über 900 min ausgesetzt.

Die thermische Behandlung der Kupferproben wurde in einem Kammerofen (Carbolite) unter atmosphärischem Druck durchgeführt. Zur Bestimmung der Oberflächenrauheit wurden WLI-Messungen (New View 7300, Zygo LOT) und AFM-Messungen (Dimension 3100, Digital Instruments) im Tapping-Mode mit 300 kHz und einer Federkonstanten von 42 N m⁻¹ durchgeführt. Die REM-Aufnahmen wurden an einer Dual-Beam Anlage (FEI Strata DB 235) bei 5 kV im Sekundärelektronenkontrast erstellt. Die XRD-Analyse erfolgte an einem X'PERT PRO-System (PANalytical) mit CuK α -Strahlung unter 1° Einfallswinkel.

Für die Abtötungsversuche wurde *E. hirae* ATCC 9790 bei 37 °C stationär in 10 mL N-Medium (Rezept siehe Anhang) gezüchtet. Die Zellen wurden 3x zentrifugiert und gewaschen und in 10 mL PBS- bzw. TRIS-Medium überführt. Mittlere Zelldichten lagen bei 2 – 8 · 10⁸ cfu mL⁻¹. Die Abtötungsversuche wurden entsprechend der im Stand der Forschung beschriebenen *wet plating* Technik durchgeführt.^[160] Es wurden 40 μ L Puffermedium auf die Proben appliziert und später 20 μ L zur Verdünnung und Ausplattierung auf Agarplatten mit N-Medium entnommen. Die zur Ionenabgabe untersuchten Lösungen wurden ebenfalls entsprechend der *wet plating* Methode, nur ohne Bakterien, präpariert. Probevolumina von 20 μ L wurden 50-fach mit HNO₃ (0,065 Vol.-%) verdünnt und mittels ICP-AE bei 324,754 nm an einem „Jobin Yvon JY 24“-System (HORIBA Jobin Yvon) untersucht.

In den zeitlichen Verläufen der Abtötung und Ionenabgabe sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung dargestellt.

2. Mikrostruktureinfluss am Beispiel Kupfer-Silber

Nach dem momentanen Forschungsstand zeigt sich beim Vergleich von Kupfer und Silber in jeweils trockener und feuchter Umgebung ein maßgeblicher Unterschied der antibakteriellen Effizienz. Werkstoffwissenschaftlich stellt sich die Frage, worin dieser Unterschied begründet ist und ob sich dieser zur Gestaltung von antimikrobiell optimierten Materialien unter Verwendung beider Elemente ausnutzen lässt.

Der folgende Abschnitt befasst sich daher mit der Generierung und Charakterisierung einer exemplarischen Kuper-Silber-Legierung. Diese wurde mittels LC als anwendungsorientierte Beschichtungsmethode erzeugt, mikrostrukturell charakterisiert und im Vergleich zu den reinen Metallen unter feuchten sowie trockenen Bedingungen auf Abtötungsverhalten und Ionenabgabe untersucht. Die Ergebnisse hierzu wurden in ^[250] veröffentlicht.

2.1 Legierungsbildung durch Laser Cladding

Das LC wurde wegen der Möglichkeit zur kontrollierten Beschichtung und damit zusätzlichen antibakteriellen Funktionalisierung von metallischen Elementen und Bauteilen gewählt. Für die hier durchgeführten Versuche wurde, wie in Abbildung 26 dargestellt, eine einfache Cu-Ag-Legierungsschicht von ca. 1 mm Stärke flächendeckend auf Edelstahl aufgeschweißt und anschließend poliert.^[250,251] Als Ausgangspulver wurden hierzu 90 Gew.-% Cu-Pulver und 10 Gew.-% Ag-Pulver mittels Kugelmahlen homogen gemischt.

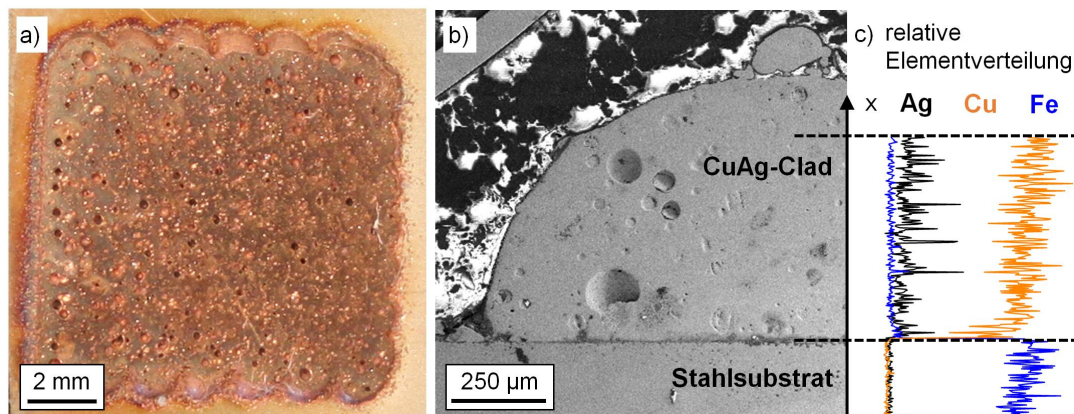


Abbildung 26: a) flächenmäßig auftragsgeschweißte und polierte Cu-Ag-Legierung auf Edelstahlsubstrat; b) REM-Aufnahme eines FIB-Querschnitts durch Cu-Ag-Legierung und Substrat; c) Eine in diesem Querschnitt durchgeführte EDX-Linienmessung senkrecht zur Substratoberfläche belegt eine minimale Durchmischung zwischen Beschichtung und Substrat.

Ziel bei der Gestaltung der Cu-Ag-Oberflächenlegierung war die Ausbildung einer homogenen, kontinuierlichen Beschichtung mit ausreichender Substrathaftung. Die Durchmischung mit dem Edelstahlsubstrat wurde durch Variation der Prozessparameter minimiert, um die Reinheit der binären Cu-Ag-Legierung zu gewährleisten (siehe Abbildung 26 b) und c)). Der

genaue Einfluss und die Entwicklung der verschiedenen Prozessparameter wurden in [251] detailliert beschrieben und werden hier unter den Versuchsparametern zusammengefasst.

Substratwahl

Als repräsentatives, inertes Substrat- und Referenzmaterial wurde in dieser Studie Edelstahl gewählt, da dieser für viele metallische Oberflächenelemente im Gesundheitswesen, oft auch konkurrierend zu Kupferlegierungen, eingesetzt wird und somit potentiell das Interesse einer antimikrobiellen Oberflächenfunktionalisierung von Edelstahl besteht.[252]

Mit dem eingesetzten Lasersystem und der damit vorgegebenen Wellenlänge konnte Kupfer nicht als Substratmaterial verwendet werden, da eine zu hohe Reflexion eine ausreichende Substraterhitzung verhinderte. In Pulverform wurde das Aufschmelzen von Kupfer durch ein ausreichend hohes Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis und eine im Vergleich zum Substrat geringe Wärmeableitung begünstigt. Die Möglichkeit, Kupfer bzw. Kupferlegierungen mittels Laser aufzuschmelzen und durch oberflächennahes Zulegieren von Silber zu funktionalisieren, besteht jedoch mit LC-Systemen abweichender Wellenlänge.

Porosität

Die polierte Oberfläche der Cu-Ag-Legierung wies eine arithmetisch gemittelte Rauheit von $0,64 \pm 1,4 \mu\text{m}$ im Vergleich zu $40 \pm 20 \text{ nm}$ bei den polierten Referenzoberflächen auf. Der Rauheitsunterschied kam durch die in Abbildung 26 a) und b) erkennbaren Poren in der Cu-Ag-Legierungsschicht zu Stande. Diese waren überwiegend voneinander separiert und kugelförmig, was auf eingeschlossene Gasblasen während des LC-Prozesses schließen lässt. Als entscheidender Prozessparameter zur Beeinflussung des Porenvolumens wurde der Schutzgasfluss identifiziert.[251] Eine separate EDX-Analyse der Poren bestätigte stellenweise eine dünne Cu_2O Schicht auf der Poreninnenfläche. Davon abgesehen wurden keine weiteren mikrostrukturellen Abweichungen zum Gesamtschichtvolumen festgestellt. Ein Einfluss der Poren auf das untersuchte antibakterielle Verhalten wird daher als unwahrscheinlich betrachtet.

Mikrostrukturanalyse

Die verwendete Zusammensetzung von 90 Gew.-% Cu und 10 Gew.-% Ag wurde als hypoeutektische Referenzlegierung für das System Cu-Ag ausgewählt. Das eutektische Phasendiagramm von Cu-Ag (max. Löslichkeit von Ag in Cu: 8 Gew.-%, von Cu in Ag: 8,8 Gew.-%, Eutektikum bei 71,9 Gew.-% Ag bei 779 °C) beschreibt für die Legierung eine zweiphasige Mikrostruktur mit eutektischen Anteilen. Es existieren keine intermetallischen Verbindungen im Gleichgewichtszustand. Wie in Abbildung 27 a) dargestellt, wurde die Reinheit der Legierungsschicht durch ein XRD-Diffraktogramm und die Berechnung der Elementanteile bestätigt.

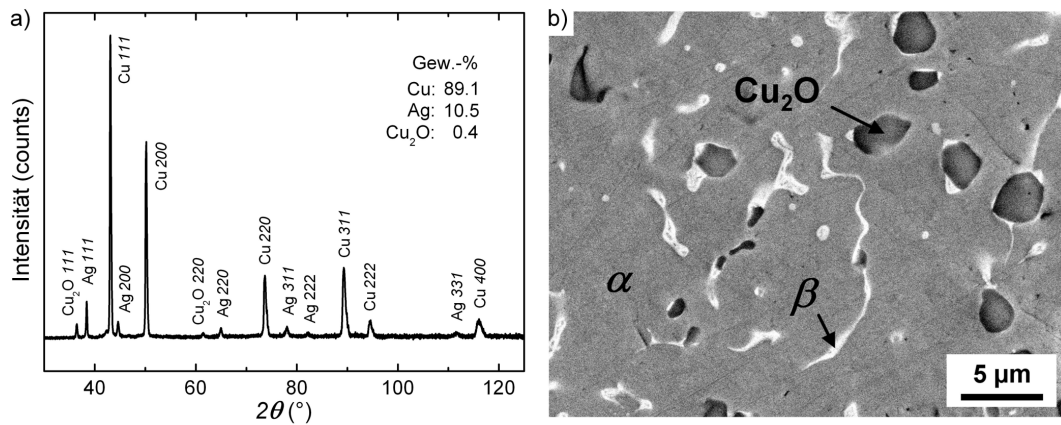


Abbildung 27: a) XRD-Diffraktogramm mit berechneter Zusammensetzung und b) Mikrostrukturentwicklung (REM-Aufnahme) der auftragsgeschweißten Cu-Ag-Legierung. Gekennzeichnet sind die kupferreiche α -, die silberreiche β -Phase sowie Cu_2O -Einschlüsse.

Auffällig war das Auftreten von 0,4 Gew.-% Cu_2O innerhalb der Legierung, welches wahrscheinlich von der Laserbehandlung stammt. Es wurden keine Signale von CuO bzw. Silberoxiden gefunden, was in Einklang mit dem ternären System Cu-Ag-O steht.^[253]

Eine REM-Aufnahme der polierten Oberflächen in Abbildung 27 b) verdeutlicht die Mikrostrukturentwicklung der erzeugten Cu-Ag-Legierung. Die kupferreiche α -Phase bestand aus 94,77 Gew.-% Cu und 5,23 Gew.-% Ag (beide $\pm 0,01$ Gew.-%), wie durch lokale EDX-Analyse ermittelt wurde. Wegen des im Verhältnis zum EDX-Analysevolumen geringen Volumens der silberreichen β -Phase konnte deren Zusammensetzung nur auf mehr als 45 Gew.-% Ag abgeschätzt werden. Die dunklen Einschlüsse entsprachen Cu_2O , wie ebenfalls durch EDX-Analyse und Dunkelfeldmikroskopie bestätigt wurde. Volumenanteile der entsprechenden Phasen wurden anhand mehrerer Gefügebilder zu 89 ± 1 % für die α -Phase, $5,5 \pm 1,5$ % für die β -Phase und $5,7 \pm 0,3$ % für Cu_2O berechnet. Aufgrund der mit reinem Kupfer vergleichbaren antibakteriellen Wirkung und des geringen Volumenanteils der Cu_2O -Einschlüsse wurde der Einfluss dieser Phase auf das Abtötungsverhalten für die folgenden Experimenten vernachlässigt.

Insgesamt entsprach die Gefügebildung, abgesehen von dem Cu_2O , den Vorhersagen des Cu-Ag-Phasendiagramms, was dafür spricht, dass sich die erzeugte Legierung im thermodynamischen Gleichgewicht befand. Das Auftreten metastabiler Phasen ist unwahrscheinlich und kinetische Effekte sind für das Cu-Ag-System erst ab Abkühlgeschwindigkeiten von mehr als 10^8 K s^{-1} zu berücksichtigen. Bei LC-Prozessen sind hingegen Abkühlgeschwindigkeiten von $10^5 - 10^6 \text{ K s}^{-1}$ realistisch.^[254,255] Die Cu-Ag-Gefügebildung mittels LC in dieser Studie kann damit mit klassischen Legierungsmethoden verglichen werden.

2.2 Abtötungsverhalten

Die Abtötungsversuche wurden entsprechend der *wet plating* und *dry plating* Methode mit *E. coli* Bakterien an der beschriebenen Cu-Ag-Legierung, reinem Kupfer und Silber, sowie einer Edelstahlreferenz durchgeführt. *E. coli* wurde als umfassend untersuchtes Modellbakterium und wegen seiner engen Verwandtschaft zu nosokomialen Erregern gewählt.

Die Ergebnisse der Abtötungsversuche nach dem *wet plating* Verfahren und die Ionenabgabe der Oberflächen in PBS-Medium sind in folgender Abbildung zusammengefasst.

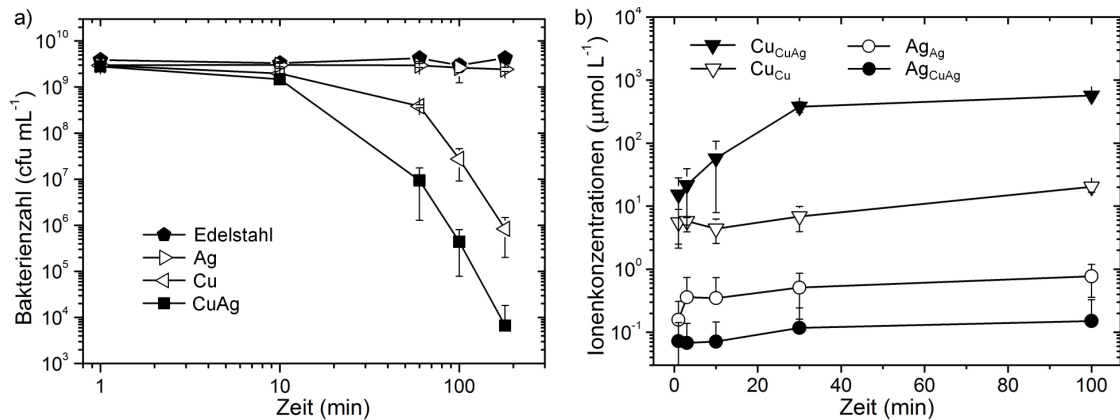


Abbildung 28: a) Zeit-Abtötungsdiagramme für Abtötungsversuche auf Edelstahl, Silber, Kupfer und der auftragsgeschweißten Cu-Ag-Legierung in PBS-Medium nach dem *wet plating* Verfahren. b) Cu- und Ag-Ionenkonzentrationen in PBS-Medium auf reinen Metallen und der auftragsgeschweißten Cu-Ag-Legierung (tiefgestellt: Cu, Ag bzw. CuAg) im zeitlichen Verlauf. Für Kupfer entspricht 1 µmol L⁻¹ genau 63,54 µg L⁻¹, für Silber 107,87 µg L⁻¹.

Im *wet plating* Versuch erzielte die Cu-Ag-Legierung mit einer Abtötungsrate von 6 log-Stufen innerhalb von 180 min den stärksten antimikrobiellen Effekt, gefolgt von reinem Kupfer mit einer Abtötungsrate von 4 log-Stufen im selben Zeitraum. Sowohl auf Edelstahl als auch auf Silber wurde innerhalb des betrachteten Zeitintervalls kein signifikanter antibakterieller Effekt beobachtet.

Die Bestimmung der abgegebenen Ionenkonzentrationen erfolgte bei diesem Experiment mittels ICP-MS (Abbildung 28 b)), welche eine Mehrelementanalyse erlaubte. Nach 100 min wurden Ionenkonzentrationen von $20,3 \pm 3,6$ µmol L⁻¹ für Kupfer und $0,8 \pm 0,4$ µmol L⁻¹ für Silber gemessen. Im Vergleich ergaben sich Konzentrationen von 568 ± 18 µmol L⁻¹ für Cu-Ionen und weniger als 0,2 µmol L⁻¹ für Ag-Ionen für die Cu-Ag-Legierung im selben Zeitraum. Ein analoger Versuch in reinem Wasser führte zur gleichen Tendenz, allerdings bei einer maximalen Cu-Ionenkonzentration von ca. 20 nmol L⁻¹ für die Cu-Ag-Legierung. Bei keinem der Materialien konnte die Abgabe weiterer ionischer Spezies von Fe, Cr oder Ni nachgewiesen werden.

In Abbildung 29 sind die Ergebnisse der Abtötungsversuche mit der *dry plating* Methode dargestellt. Bei diesem Verfahren wird eine konzentrierte Bakterienlösung mit einem sterilen Wattebausch durch Reiben auf der Probenoberfläche aufgetragen und anschließend unter trockenen, atmosphärischen Bedingungen gelagert.^[51]

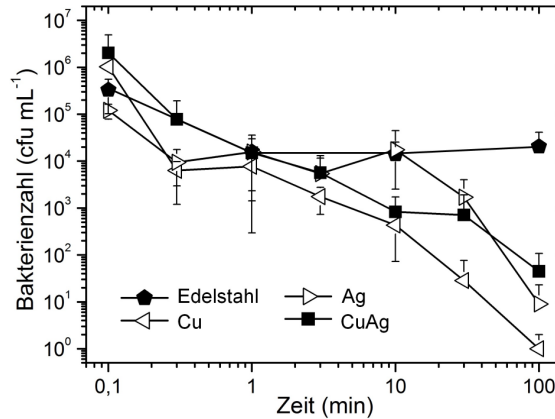


Abbildung 29: Zeit-Abtötungsdiagramme für Abtötungsversuche auf Edelstahl, Silber, Kupfer und der auftragsgeschweißten Cu-Ag-Legierung mit PBS-Medium nach dem *dry plating* Verfahren.

Nach der *dry plating* Methode stellte sich die stärkste Abtötungswirkung nach 100 min auf reinem Kupfer mit einer Reduzierung um 6 log-Stufen ein, gefolgt von Silber und der Cu-Ag-Legierung mit jeweils 4 log-Stufen. Auf allen Materialien wurde eine anfängliche Reduzierung der Bakterienzahl festgestellt, was trocknungsbedingt als typisch für das *dry plating* Verfahren gewertet wird.^[51] Auffällig waren die im Vergleich zum *wet plating* relativ hohen Standardabweichungen, die wahrscheinlich in den schwerer konstant zu reproduzierenden Verfahrensschritten der *dry plating* Methode begründet sind.

2.3 Diskussion

Die Ergebnisse des *wet plating* Versuchs belegen, dass durch die Werkstoffkombination von Kupfer und Silber in Legierungsform eine im Vergleich zu den reinen Elementen maßgeblich gesteigerte Abtötungswirkung in flüssigem Umfeld erzielt werden konnte. Als Hauptursache für dieses Verhalten wird die im Vergleich zu Kupfer bis zu 28-fach gesteigerte Cu-Ionenabgabe der Cu-Ag-Legierung vermutet. Die im Vergleich zu reinen Silber stark verringerte Ag-Ionenabgabe der Legierung legt nahe, dass die verstärkte Abgabe von Kupferionen durch elektrochemische Lokalreaktionen verursacht wurden. Das unedlere Kupfer beugt der chemischen Auflösung des edleren Silbers vor und wird dabei selbst verstärkt gelöst. Aufgrund der in reinem Wasser stark abgeschwächten Ionenabgabe ist anzunehmen, dass hierbei auch die Art und Qualität des Elektrolyts eine entscheidende Rolle spielt. Die verstärkte Abtötungswirkung der Legierung während des *wet platings* im Vergleich zum *dry plating* spricht ebenfalls für elektrochemische dominierte Wirkprozesse.

Eine derartige Interpretation bedeutet ebenfalls, dass die im Stand der Forschung beschriebenen, synergistischen Effekte für Kupfer- und Silberionen nicht der maßgebende Faktor für die gesteigerte antibakterielle Wirkung von kombinierten metallischen Kupfer-Silber-Werkstoffen sind.

Im Gegensatz zum *wet plating* Versuch ermöglicht das ***dry plating*** Experiment keine klare Klassifizierung der Materialien nach antibakterieller Wirksamkeit. Das beobachtete, unter trockenen Bedingungen leicht stärkere Abtötungspotential von reinem Kupfer im Vergleich zu Silber bestätigte den aktuellen Stand der Forschung, der Kupferwerkstoffen eine höhere antimikrobielle Wirksamkeit im trockenen Umfeld zuordnet. Es ist anzunehmen, dass sich unter trockenen Bedingungen auf der Cu-Ag-Legierung überwiegend Kupferoxide ausbilden.^[253] Dies würde die im Vergleich zu reinem Kupfer im trockenen Umfeld langsamere Abtötungsrate erklären.

Obwohl Silberwerkstoffe in nasser Umgebung antibakteriell effektiver als Kupferwerkstoffe eingeschätzt werden^[52,74], fiel bei den durchgeführten Versuchen mittels *wet plating* auf, dass innerhalb des betrachteten Zeitintervalls keine merkliche Abtötung durch reines Silber auftrat. Eine Erklärung hierfür könnte die Abwesenheit von Silberoxid sein, welches als die eigentlich antimikrobielle Verbindung bei Silberwerkstoffen angesehen wird.^[185,256] In dieser Arbeit wurden alle metallischen Proben nach der Politur und vor den Experimenten in Schutzgasatmosphäre gelagert, um die Dicke einer nativen Oxidschicht möglichst gering zu halten. Silber verhält sich in wässrigen Lösungen sehr viel stabiler als Kupfer, was die im Vergleich der Reinmetalle niedrigere Ionenabgaberrate erklärt.^[1] Während der Abtötungsversuche in PBS-Medium ist eine Oberflächenoxidation allerdings nicht auszuschließen. Es ist jedoch fraglich, ob diese innerhalb des betrachteten Zeitraums eine für ein ausgeprägtes antibakterielles Verhalten notwendige Schichtstärke, wie in anderen Studien^[74], erreicht. Natürlich kann die Ausbildung einer gezielten Resistenz gegen Silberionen bei manchen Bakterienstämmen ebenfalls nicht ausgeschlossen werden.^[44]

Mikrostruktur und Legierungsgestaltung

Da eine gemeinsame, synergetische Wirkung von Cu- und Ag- Ionen für diese Art von metallischen Werkstoffen in feuchter Umgebung ausgeschlossen werden kann, wäre es denkbar, ein anderes edleres Element als Legierungspartner zu wählen. Aus Kostengründen wäre es jedoch dennoch sinnvoll, Silber einzusetzen und dies in möglichst geringen Mengen zuzulegieren. Aufgrund der relativ geringfügigen mikrostrukturellen Änderungen, können für Cu-Ag-Legierungen mit niedrigerem Silbergehalt ähnliche wie die hier beobachteten elektrochemischen Wirkmechanismen vermutet werden.

Zusätzlich zu der hier untersuchten Cu-Ag-Modelllegierung wurde ein weiteres Prozessparameterset für die LC-Methode erarbeitet, welches eine homogene Durchmischung des

Edelstahlsubstrats mit Kupfer und Silber gewährleistet.^[251] Diese Art von Ansatz ist relevant für inerte, metallische Komponenten, die aufgrund anderer Anforderungen kein Kupfer enthalten, jedoch durch das oberflächennahe Zulegieren geringer Mengen von Kupfer und/oder Silber zusätzlich antimikrobiell funktionalisiert werden könnten.^[257-260]

Anwendungsrelevanz

Während Abtötungstests in Labors meist entweder in rein trockenem oder nassem Milieu durchgeführt werden, erfährt eine antimikrobielle Oberfläche zur Prävention nosokomialer Infekte über Hautkontakt stark wechselnde Umgebungsbedingungen. Überwiegend befinden sich Oberflächen für diese Anwendung in relativ trockener Normalatmosphäre. Durch die Berührung mit Hautschweiß und durch die in Krankenhäusern vorgeschriebenen Reinigungs- und Desinfektionsprozeduren werden diese jedoch auch zyklisch mit Feuchtigkeit und wechselnden Elektrolyten benetzt.^[87] Weiterhin werden metallische antimikrobielle Materialien im medizinisch-hygienischen Sektor auch für chirurgische Anwendungen oder zur Befreiung der Wasserversorgung von Keimen eingesetzt, wodurch sogar ein kontinuierlich nasses Milieu vorgegeben wird.^[151,161,256]

Wie anhand der durchgeführten Experimente gezeigt wurde, ist es möglich, die antimikrobielle Effizienz von Kupferwerkstoffen durch die Kombination mit Silber für den feuchten Anwendungsbereich effektiv zu steigern. Da die Wirkungssteigerung durch elektrochemische Prozesse erreicht wird, gilt es, je nach Anwendung, einen Kompromiss zwischen Materialkorrosion und gewünschter antibakterieller Wirkung zu finden. Opferanoden aus einer Cu-Ag-Legierung beispielweise könnten zur effektiven Wasseraufbereitung eingesetzt werden, wohingegen die Ionenabgabe bei Kontaktoberflächen unter wechselnd feucht-trockenen Bedingungen oder bei Implantatwerkstoffen durch das kontrollierte Zulegieren weiterer Elemente gesteuert werden könnte.

2.4 Versuchparameter

Bei dem hier verwendeten LC-System handelte es sich um einen kontinuierlichen Diodenlaser (LDM-500-20, Laserline) mit einer Durchschnittsleistung von 500 W bei einer Wellenlänge von $800 \text{ nm} < \lambda < 980 \text{ nm}$. Der zugehörige Pulverförderer (TWIN-10-C) stammte von Sulzer Metco, das 3-Achsen-Verfahrenssystem von Bosch Rexroth. Für die untersuchte Cu-Ag-Legierung wurden die folgenden, optimierten Prozessparameter ermittelt: mittlere Leistungsdichte: 400 W mm^{-2} , Fokusbereich: 1,17 mm, Pulverfluss: $1,5 \text{ g min}^{-1}$, Laser-Verfahrensgeschwindigkeit: 60 cm min^{-1} . Das verwendete sphärische Kupfer- bzw. Silberpulver (Alfa Aesar) hatte eine Reinheit von 99,9 % bzw. 99,92 % bei Korngrößen $< 44 \text{ } \mu\text{m}$ ($< 325 \text{ mesh}$). Als Referenzmaterialien wurden poliertes Kupfer- und Silberblech mit einer Reinheit von

jeweils 99,9 % (KME, Goldschmiedebedarf zu Jeddelloh) und Edelstahl (X5CrNi18-10, BRIO Kontrollspiegel) eingesetzt.

Das XRD-Diffraktogramm wurde an einem X'PERT PRO-System (PANalytical) mit CuK α -Strahlung in Bragg-Brentano Konfiguration aufgenommen. Zur EDX-Analyse und REM-Aufnahme wurde eine Dual Beam Anlage Strata DB 235 (FEI) bei 5 kV bzw. 20 kV und ein Si-Li EDX Detektor (EDAX) bzw. Sekundärelektronenkontrast verwendet. Die Oberflächenrauheit wurde an einem New View 7300 WLI-System (Zygo LOT) gemessen.

Für die Abtötungsversuche wurde *E. coli* W3110 bei 37 °C aerob in 10 mL LB-Medium (Rezept siehe Anhang) gezüchtet. Die Zellen wurden 3x zentrifugiert und gewaschen und in PBS-Medium überführt. Mittlere Zelldichten lagen bei 2 – 4·10⁹ cfu mL⁻¹. Die Abtötungsversuche wurden entsprechend der im Stand der Forschung beschriebenen *wet plating* und *dry plating* Methoden durchgeführt.^[51,160] Für das *wet plating* wurden 20 μ L Puffermedium auf die Proben appliziert und später 15 μ L zur Verdünnung und Ausplattierung auf LB-Nährböden entnommen. Für das *dry plating* wurden 60 μ L von 20-fach konzentriertem, bakterienführenden PBS-Medium mit einem sterilen Wattestäbchen aufgenommen und auf den Proben abgestreift. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch Zentrifugieren der Proben in 50 ml PBS-Lösung für 1 min.

Zur Bestimmung der Ionenabgabe wurde für diese Studie eine inerte Nasskammer entwickelt, die es erlaubte, benetzungsunabhängig eine konstante Interaktionsfläche von 3,24 cm² mit 20 mL PBS-Medium bei allen Materialien zu betrachten.^[233] Die ICP-MS-Messung erfolgte an einem Agilent 7500cx-System (Agilent Technologies). Die eingesetzte Leistung war 1550 W bei einer Dwell-Time von 1 s pro analysiertem Element. Jeder untersuchten Lösung wurden zur zeitlichen Kalibration Sc-Standards sowie eine schwache HNO₃-Lösung zur Vermeidung der Adsorption an Oberflächen im Gerät beigemischt. Zur Kalibration der Elementkonzentrationen wurden Standards von Perkin Elmer eingesetzt.

In den zeitlichen Verläufen der Abtötung und Ionenabgabe sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung dargestellt.

Oberflächeneinfluss

Dieses Kapitel befasst sich mit Abtötungsfaktoren, die direkt mit Oberflächeneigenschaften verknüpft sind. Hierbei werden die LIS zur Gestaltung und die Materialanalyse mittels REM zur Charakterisierung der an der Oberfläche ablaufenden Prozesse eingesetzt. Ein Schwerpunkt liegt auf dem Kontakt zwischen Bakterien und Werkstoff sowie Adhäsionsprozessen.

1. Bedeutung des Oberflächenkontakts

Im vorherigen Kapitel wurde gefolgert, dass das Abtötungsverhalten von Kupfer-, Kupferoxiden und auch bei Kupferlegierungen maßgeblich von der abgegebenen Kupferionenkonzentration abhängt. Dies steht im Einklang mit dem momentanen Stand der Forschung. Dennoch motivieren einige Phänomene, wie beispielsweise die schnellere Abtötung von Bakterien auf Kupfer unter trockenen Bedingungen oder die Ausprägung des Begriffs des *contact killings* auf Kupfer^[51,237] die Frage, ob auch der Kontakt zwischen Bakterium und Kupferoberfläche einen Einfluss auf das Abtötungsverhalten ausübt.

Um dies aufzuklären, wurde zunächst die quantitative Oberflächenanlagerung von Bakterien während eines standardisierten Abtötungsversuchs untersucht. Als weiterer Schritt wurde in einem exemplarischen Experiment der direkte Kontakt zwischen Bakterien und Kupferoberfläche während eines Abtötungsversuchs künstlich unterbunden. Hierzu wurden mit dem Verfahren der Laser-Interferenzlithographie (LIL) nanoskalige, inerte Oberflächenstrukturen als „Abstandshalter“ auf Kupfer erzeugt und das Abtötungsverhalten auf diesen Strukturen mit dem auf unbeschichtetem Kupfer verglichen. Ein Großteil der vorgestellten Ergebnisse wurde in ^[261] veröffentlicht.

1.1 Quantifizierung der Bakterienanlagerung

Ziel dieses ersten Teilversuchs war es, die absolute und relative Anzahl von Bakterien abzuschätzen, die sich während eines standardisierten Abtötungsversuchs auf metallischen Materialien anlagern. Zu diesem Zweck wurde die Anzahl adhärrierender *E. coli* Bakterien auf einer Messinglegierung (CuZn23Al3Co) und auf Edelstahl in ruhendem H₂O mit mikroskopischen Methoden bestimmt. Dies geschah mit Hilfe eines speziell entwickelten Messaufbaus, der einen Tropfen Bakterienlösung mit einem transparenten Deckglas in passender Fokushöhe von 600 µm abdeckt.^[262] Die Wahl von H₂O als bakterienführendem Medium und der korrosionsresistenten Messinglegierung wurde dadurch motiviert, korrosive Prozesse an der Metalloberfläche zu minimieren, die die mikroskopische Auszählung der angelagerten Bakterien erschweren. *E. coli* wurde als Testorganismus gewählt, der in der Lage war, auch über längere Zeiträume in Wasser zu überleben. In Abbildung 30 sind die zeitliche Bakterienanlagerung und das Abtötungsverhalten auf beiden Materialien dargestellt.

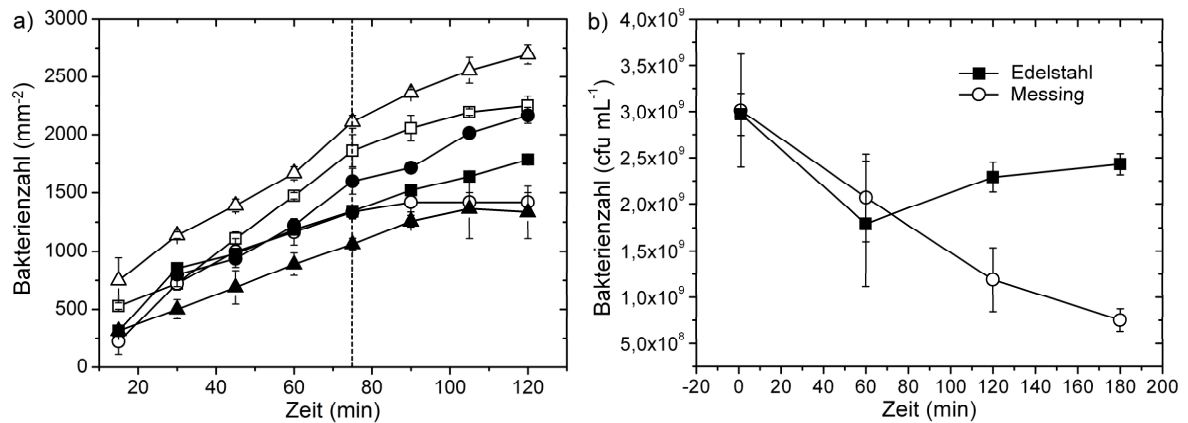


Abbildung 30: a) Zeitlicher Verlauf der Anzahl sich anlagernder Bakterien unter statischen Bedingungen in H_2O auf poliertem Messing (leere Symbole) und Edelstahl (volle Symbole). Dargestellt sind jeweils drei unabhängige Versuche. Ab ca. 75 min (vertikalen Markierung) wurde ein Übergang zu nicht-linearem Verhalten beobachtet. b) Zeit-Abtötungsdiagramme zu den gleichen Oberflächen ermittelt durch *wet plating* in PBS-Medium.

Die Zahl an sich anlagernden Bakterien stieg in allen Versuchen bis zu ca. 75 min linear mit Raten von $19,09 \pm 1,53 \text{ min}^{-1} \text{ mm}^{-2}$ auf Messing und $15,60 \pm 1,41 \text{ min}^{-1} \text{ mm}^{-2}$ auf Edelstahl an. Im weiteren Kurvenverlauf zeichnete sich tendenziell ein Abfall der Anlagerungsrate bis hin zu teils konstanten Werten ab. Die in Abbildung 30 b) dargestellten Zeit-Abtötungsdiagramme belegen eine Abtötung auf der Messingoberfläche im betrachteten Zeitraum von ca. 70 %.

Generell ist eine Materialabhängigkeit bzw. eine Abhängigkeit vom Lebend/Tot-Zustand der Zellen bei bakteriellen Adhäsionsprozessen nicht auszuschließen.^[50,263] Aufgrund der auf beiden Materialien relativ ähnlichen linearen Anlagerungsrate werden jedoch hauptsächlich gravitationsgesteuerte Ablagerungsprozesse vermutet. Hierfür spräche ebenfalls die Ausbildung eines Plateauwerts, wie in einigen Versuchen erkennbar, der dann auftritt, wenn sich alle in der Lösung vorhandenen Bakterien auf der Materialoberfläche abgesetzt haben. Unter Berücksichtigung von Konzentration und betrachteter Fläche wurde die maximal pro Volumenelement enthaltene Anzahl an Bakterien auf ca. 1.250 abgeschätzt. Dieser Wert deckte sich sehr gut mit dem Plateauwert einiger Kurven, wurde jedoch in anderen Messungen deutlich überschritten. Mögliche Fehlerursachen für einen zu geringen Schätzwert sind eine nachträgliche Bakterienvermehrung während des Versuchs bzw. eine mögliche Mehrfachzählung abgetöteter, in mehrere Teilstücke fragmentierter Bakterien.

Grundsätzlich lässt sich aus den erreichten Plateauwerten und den allgemein abfallenden Kurvenverläufen abschätzen, dass sich bereits nach 120 min ein Großteil bzw. nahezu alle der in der Lösung vorhandenen Bakterien auf den Probeoberflächen abgesetzt haben. Der direkte Kontakt zwischen Bakterium und Materialoberfläche ist daher auch bei standardisierten Abtötungstests mit der *wet plating* Methode im Zeitraum weniger Stunden äußerst relevant.

1.2 Inerte, nanoskalige Abstandshalter

Um die Rolle dieses Kontakts während der Abtötung aufzuschlüsseln, wurden Modelloberflächen entwickelt, die es erlaubten, die sich während eines Abtötungsversuchs absetzenden Bakterien in einem minimalen Abstand zur Oberfläche abzustoppen, gleichzeitig jedoch die Ionenfreisetzung der Oberfläche nicht wesentlich einzuschränken.

Zur Generierung derartiger Strukturen wurde die LIL als Werkzeug eingesetzt, welche es mit geeignetem Fotolack ermöglichte, laterale Strukturen mit einer Periodizität P von weniger als $1\ \mu\text{m}$, der durchschnittlichen Größe eines Bakteriums, zu gestalten. Für die Erzeugung dieser nanoskaligen „Abstandshalter“ wurde poliertes Kupfer durch *spin coating* mit einem positiv-Fotolack beschichtet. Die Schichtdicke wurde durch Variation der Rotationsgeschwindigkeit und Viskosität der Lacklösung kontrolliert. Daraufhin erfolgte die Belichtung durch einen einzelnen ns-Laserpuls dreier sich überlagernder Laserstrahlen mit resultierender punktartiger Intensitätsverteilung (siehe Abbildung 31). Während der anschließenden Entwicklung der positiv-Fotolackschicht wurden stark belichtete Bereiche gelöst und resultierten daher in Löchern. Die Periodizität der so erzeugten, wabenartigen Strukturen wurde hierbei durch Variation der Strahleneinfallswinkel und die Tiefe durch Variation der mittleren Fluenz F_G eingestellt. Eine detaillierte Entwicklung der Prozessparameter sowie eine Untersuchung der jeweiligen Abhängigkeiten wurden in ^[264] beschrieben. Die folgende Abbildung zeigt die so generierten Modellstrukturen auf poliertem Kupfer.

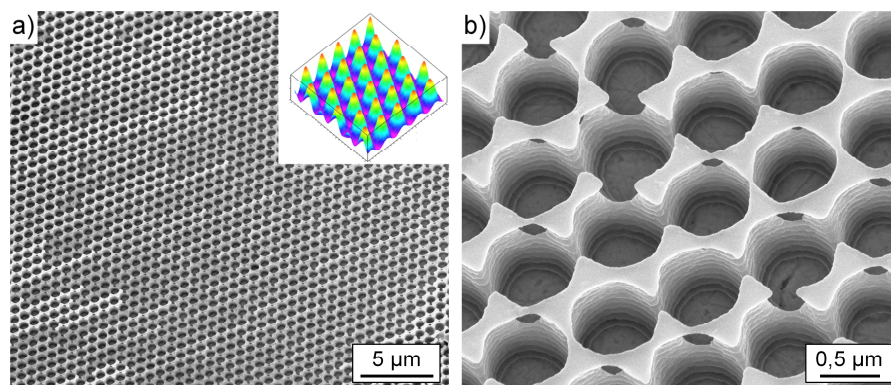


Abbildung 31: REM-Aufnahmen der flächenmäßig auf poliertem Kupfer generierten, inerten Abstandstrukturen aus positiv-Fotolack in a) Übersichts- und b) Nahansicht. Der Einschub in a) zeigt die zur Belichtung eingesetzte laterale Intensitätsverteilung der interferierenden Laserstrahlen.

Die dargestellten Abstandstrukturen wurden durch benachbarte, leicht überlappende Mehrfachbelichtung flächendeckend auf mehreren cm^2 erzeugt. Als finale Strukturgrößen wurden eine physikalische Schichtdicke von $1,74 \pm 0,05\ \mu\text{m}$ und ein Lochdurchmesser von ca. $700\ \text{nm}$ gewählt, der somit kleiner als der Durchmesser der untersuchten Bakterien ($1 - 2\ \mu\text{m}$) war.

Auffallend in Abbildung 31 ist die Ausbildung von riffelartigen Sekundärstrukturen, die sich auf der Innenseite der erzeugten Löcher kreisförmig vom Kupfersubstrat bis zur Schichtoberfläche hin ausbreiten. Diese entstanden durch Interferenz des einfallenden und des von der Kupferoberfläche reflektierten Laserstrahls, die zusammen eine stehende Welle ausbilden.^[265] Die Periodizität dieser Sekundärstrukturen hängt von den optischen Schichteigenschaften sowie der Laserwellenlänge ab und wurde gemäß ^[265] zu ca. 140 nm berechnet, was sich gut mit der beobachteten Größenordnung deckte. Für die nachfolgenden Untersuchungen waren diese Sekundärstrukturen allerdings vernachlässigbar.

Im nächsten Schritt wurde die Funktionalität der erzeugten „Abstandshalter“ durch REM-Aufnahmen, wie in folgender Abbildung dargestellt, geprüft.

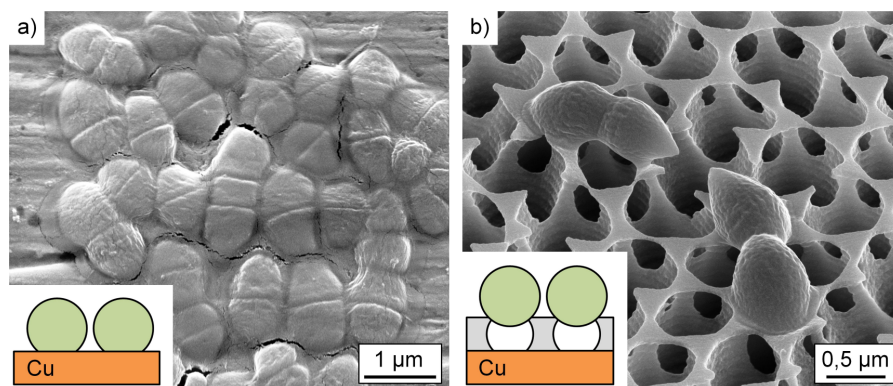


Abbildung 32: Exemplarische REM-Aufnahmen und schematische Querschnitte von getrockneten *Enterococcus hirae* Bakterien nach 100 min *wet plating* in TRIS-Medium auf a) poliertem Kupfer und b) Abstandsstrukturen.

Für diesen Versuch wurde *Enterococcus hirae* (*E. hirae*) als nosokomial relevantes, grampositives Pathogen mit ca. 1 µm Zelldurchmesser gewählt. *E. hirae* tritt oft paarweise mit einer Gesamtgröße von ca. 2 µm auf^[30], was die Effektivität der Abstandshalter zusätzlich erhöhte. Um einen repräsentativen Zustand in den REM-Aufnahmen abzubilden, wurden die Bakterien nach 100 min *wet plating* durch Trocknung präpariert. Tendenziell erscheinen die in Abbildung 32 dargestellten Bakterien durch die Trocknung kleiner als im Lebendzustand. Eine gezielte Probenpräparation zur Erhaltung der ursprünglichen Bakterienform durch chemische Zellfixierung war in diesem Fall aufgrund der Lösungsmittlempfindlichkeit der Fotolackstrukturen jedoch nicht möglich.

Anhand der REM-Aufnahmen war deutlich zu erkennen, dass sich die auf reinem Kupfer exponierten Bakterien auf der metallischen Oberfläche agglomerierten, wohingegen der Kontakt zur metallischen Oberfläche durch die Abstandsstrukturen unterbunden wurde.

1.3 Abtötungsverhalten

Abtötungsversuche mit *E. hirae* wurden auf beiden Oberflächentypen sowie Glas und einer geschlossenen Fotolackschicht auf Kupfer von ebenfalls 1,7 μm Dicke als Referenzoberflächen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in folgender Abbildung dargestellt.

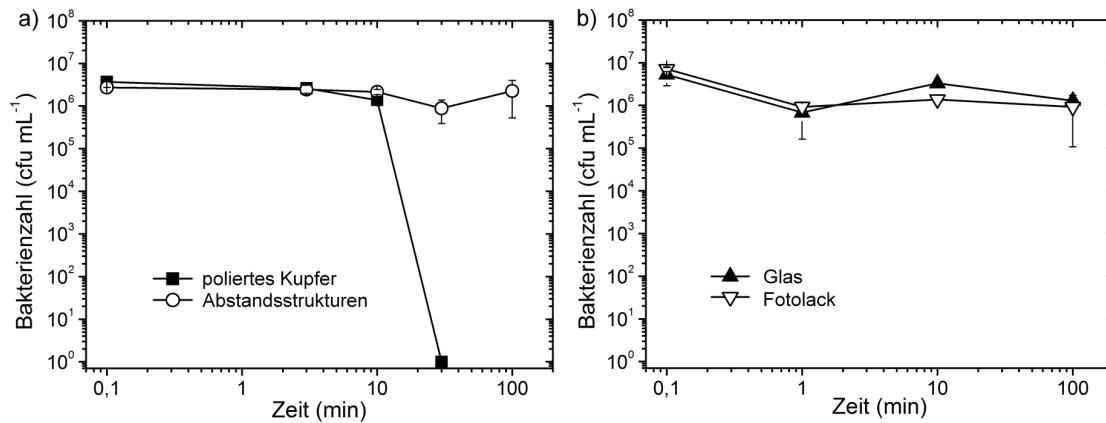


Abbildung 33: Zeit-Abtötungsdiagramme für Abtötungsversuche auf reinem Kupfer, Abstandsstrukturen auf Kupfer, einer Glasreferenz und deckend mit Fotolack beschichtetem Kupfer in TRIS-Medium nach dem *wet plating* Verfahren.

Wie zu erwarten zeigte sich auf reinem Kupfer eine starke Reduzierung der Bakterienzahl um 6 log-Stufen nach bereits 30 min. Auf den Abstandsstrukturen auf Kupfer konnte interessanterweise auch nach 100 min keine maßgebliche Abtötungswirkung festgestellt werden. Diese Oberflächen verhielten sich ähnlich inert wie die Glasreferenz und die unstrukturierte Fotolackdeckschicht auf Kupfer (siehe Abbildung 33 b)).

Um diese Ergebnisse mit der entsprechenden Konzentration an gelöstem Kupfer zu korrelieren, wurde die Kupferionenabgabe beider Oberflächen, wie in folgendem Graphen zusammengefasst, mit Hilfe der ICP-AES ermittelt.

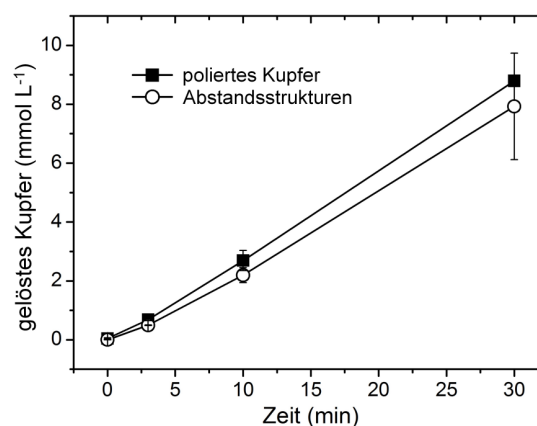


Abbildung 34: Cu-Ionenkonzentration in TRIS-Medium auf reinem Kupfer und Abstandsstrukturen auf Kupfer im zeitlichen Verlauf. Für Kupfer entspricht 1 mmol L⁻¹ genau 63,54 mg L⁻¹.

Nach 30 min stellte sich auf reinem Kupfer eine Ionenkonzentration von $8,8 \pm 0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ und auf den Abstandsstrukturen von $7,9 \pm 1,8 \text{ mmol L}^{-1}$ ein. Beide Oberflächentypen zeigten damit eine vergleichbar hohe Kupferionenabgabe im relevanten Zeitintervall. Durch die geschlossene Fotolackschicht auf Kupfer wurde keine Ionenabgabe detektiert.

Überraschenderweise zeigten sich die mit Abstandsstrukturen versehenen Kupferoberflächen also trotz einer ähnlich hohen Kupferkonzentration wie auf reinem Kupfer als nahezu inert. Es scheint, dass während der durchgeführten Experimente der direkte Kontakt zur Oberfläche offensichtlich das entscheidende Kriterium für das Abtötungsverhalten darstellte und nicht, wie bisher vermutet, die reine Menge an abgegebenen Kupferionen. Da dies der erstmalige Nachweis eines derartigen Effekts war, wurde ein Folgeversuch konzipiert, der diese Ergebnisse bestätigen sollte.

Für den **Folgeversuch** wurden Glas und nahezu reines Eisen als inerte Probematerialien ausgewählt. Auf diesen wurden Abtötungsversuche mit *E. hirae* in jeweils reinem und durch Zugabe von Cu_2SO_4 bereits kupferführendem TRIS-Medium durchgeführt. Diese Versuchsanordnung erlaubte es, eine vom Grundwerkstoff unabhängige, zur Abtötung von Bakterien relevante Kupferionenkonzentration von 4 mmol L^{-1} im Puffermedium einzustellen und somit den Einfluss der Oberfläche getrennt von deren Ionenabgabe zu erfassen. Die Ergebnisse des Versuchs werden in folgender Abbildung zusammengefasst.

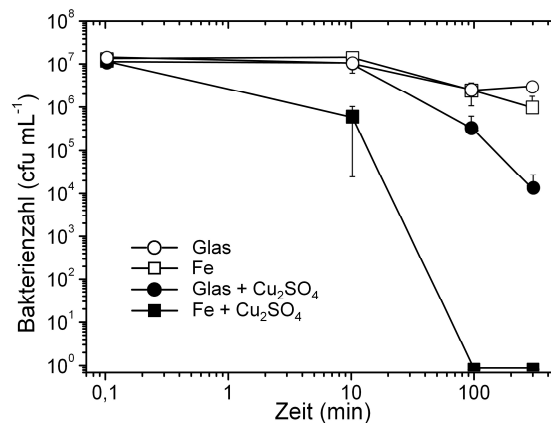


Abbildung 35: Zeit-Abtötungsdiagramme für Abtötungsversuche auf Glas und Eisen nach dem *wet plating* Verfahren in reinem TRIS-Medium (leere Symbole) und TRIS-Medium mit Cu_2SO_4 einer Gesamtkonzentration von 4 mmol L^{-1} (volle Symbole).

Wie zu erwarten zeigte sich in reinem TRIS-Medium auf Eisen und Glas keine wesentliche Abtötung nach 300 min. Die Zugabe von Cu_2SO_4 zum TRIS-Medium hingegen rief auf Eisen eine starke Bakterienreduktion von 7 log-Stufen innerhalb von 100 min hervor. Auf Glas wurde eine um mehrere Größenordnungen geringere Abtötung von 3 log-Stufen innerhalb von 300 min beobachtet. Somit stellte sich auf der metallischen Eisenoberfläche im Vergleich zu Glas eine wesentliche stärkere Abtötungswirkung bei gleicher Cu-Ionenkonzentration ein.

Weiterhin wurde gezeigt, dass die Abtötungsrate auf Eisen mit steigender Konzentration an Cu_2SO_4 zunahm.^[261] Hierbei fand bereits nach 10 min eine vollständige Abtötung auf Eisen bei 10 mmol L^{-1} an Cu_2SO_4 statt.

1.4 Diskussion

Aus den durchgeführten Versuchen lässt sich folgern, dass für die antibakterielle Wirkung von Kupferwerkstoffen nicht alleinig eine hohe Konzentration an gelöstem Kupfer, sondern auch der physische Kontakt zwischen Bakterium und metallischer Oberfläche entscheidend ist. Es stellt sich die Frage, welche Effekte das Abtötungsverhalten auf metallischen Oberflächen begünstigen.

Synergie metallischer Oberflächen mit Kupferionen

Das Abtötungsverhalten auf reinem Eisen gegenüber Bakterien wurde nach bestem Wissen des Autors zuvor nicht untersucht. Im Zusammenhang mit den hier durchgeführten Experimenten musste speziell die katalytische Zersetzung von H_2O_2 durch die Fenton-Reaktion (siehe S. 38) und die damit verbundene Generierung von zellschädigenden, radikalen Verbindungen berücksichtigt werden. Zum einen katalysieren sowohl Kupfer- als auch Eisenionen die Fenton-Reaktion, zum anderen ist H_2O_2 speziell bei den zu den Milchsäurebakterien gehörenden *E. hirae* Bakterien ein in größeren Mengen erzeugtes Stoffwechselprodukt.^[266,267]

Um die Abtötungsmechanismen auf Eisen näher zu interpretieren, wurden daher die im Puffermedium vorherrschenden Eisenkonzentrationen ermittelt. Diese betragen nach 100 min $5,5 \pm 2,8 \text{ mmol L}^{-1}$ in reinem TRIS-Medium und $12,6 \pm 0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ im Beisein von Cu_2SO_4 (4 mmol L^{-1}). Nach 300 min stiegen die Werte auf $15,6 \pm 4,4 \text{ mmol L}^{-1}$ bzw. $22,4 \pm 1 \text{ mmol L}^{-1}$ an. Eisen ist bei einem pH-Wert von 7 unter aeroben Bedingungen nur schwer löslich.^[1] Daher wird angenommen, dass der Großteil des Eisens in Hydroxid-Form vorlag und die Konzentration an freien Fe^{3+} -Ionen im Puffermedium relativ gering war. Diese Annahme wurde durch die Ausbildung eines sichtbaren Films auf der Tropfenoberfläche bestärkt. Der Einfluss gelöster Eisenionen während der Abtötung auf Eisenoberflächen und damit auch deren Rolle als möglicher Katalysator der Fenton-Reaktion, wurde folglich vernachlässigt.

Schließt man dies aus, weisen die erzielten Ergebnisse stark auf einen synergetischen Effekt zwischen gelöstem Kupfer und der metallischen Eisen bzw.- Kupferoberfläche hin. Dieser wird so interpretiert, dass die bakterielle Zellwand bzw. Membran durch den Kontakt zur metallischen Oberfläche beeinflusst bzw. geschwächt wurde und das Bakterium damit anfälliger für toxische Effekte durch Kupferionen wurde. In Abwesenheit von Kupferionen könnte eine derartige Beeinträchtigung der Zellwand unter optimalen Nährstoffbedingungen während des Ausplattierens wieder repariert werden.

In vielen vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass die Zellwandschädigung bei Hefepilzen und sowohl bei Gram-positiven als auch Gram-negativen Bakterien einen Schlüsselprozess während des Abtötens auf Kupferwerkstoffen darstellt.^[51,54–56,268,269] Verknüpft man dies mit den hier erzielten Ergebnissen, so lässt sich die Hypothese formulieren, dass der Kontakt zwischen Metalloberfläche und Bakterium die Zellmembran auf bestimmte Weise permeabilisiert und damit den Zugang von Kupferionen in den intrazellulären Bereich erleichtert. Kupferionen im Zellinneren können dann wiederum bereits in geringer Konzentration irreversible Schäden hervorrufen, die unmittelbar zum Zelltod führen. Ein derartiger Mechanismus wiederum würde die Beobachtung in einigen Studien stützen, dass die Membranschädigung als primärer Mechanismus weitere, sekundäre Abtötungsmechanismen einleiten kann.^[29,55,56]

Laut Jiang *et al.* spielt bei metallischen, bzw. Oxid-Nanopartikeln, die Oberflächenladung und deren Wechselwirkung mit der größtenteils negativ geladenen Membranoberfläche von Bakterien eine entscheidende Rolle bei deren Abtötung.^[221] Somit wäre es auch denkbar, dass der hier beobachteten, begünstigten Abtötung bei metallischem Oberflächenkontakt eine Potential- bzw. Ladungsänderung der Bakterienmembran zu Grunde liegt, die den Kupfertransport durch die Zellwand wesentlich verändert. Ein Parameter, der bei zukünftigen Forschungsarbeiten zur Aufklärung dieses Phänomens betrachtet werden sollte, ist das Zeta-Potential von Festkörperoberflächen, welches u.A. die Ionenkonzentration in direkter Oberflächennähe beschreibt und die Adhäsion von Bakterien beeinflusst.^[50,270]

Kontakt-Abtötung auf trockenen Oberflächen

Durch eine derartige Interpretation könnte das sogenannte *contact killing* während des *dry plating* Verfahrens und auf trockenen Oberflächen bei Kupferwerkstoffen erklärt werden.^[51,237]

Im Falle des *wet plating* Verfahrens wurde durch die vorangehenden Experimente demonstriert, dass sich nahezu alle Bakterien im applizierten Puffermedium nach ca. 2 h auf der Materialoberfläche absetzen. Während des *dry plating* Verfahrens ist hingegen anzunehmen, dass sich die durch Abstreifen applizierten Bakterien nach Verdunsten des geringen Wasseranteils wesentlich schneller und komplett an der Werkstoffoberfläche anlagern. Durch einen derartig erzwungenen, kontinuierlichen Kontakt mit der metallischen Oberfläche könnten die initiiierenden Membranschäden, und damit auch die folgenden, intrazellulären Abtötungsprozesse extrem beschleunigt werden. Somit würde die hier aufgestellte These zum Oberflächenkontakt auch das bei Kupferwerkstoffen beobachtete, schnellere Abtötungsverhalten bei „trockener“ im Vergleich zu nasser Bakterienapplikation erklären.

Sehr wahrscheinlich wird auch während des *dry platings* ein dünner Wasserfilm zwischen Bakterium und Oberfläche erhalten bleiben, durch den Ionen migrieren können. Daher stellt

auch die Ionenabgabe von Kupferoberfläche bei beiden Methodenvarianten weiterhin einen entscheidenden Faktor dar, wobei eine höhere Abgaberate mit stärkerer antimikrobieller Wirkung verknüpft ist.^[66,160]

Anwendungsrelevanz

Träfe die Hypothese des begünstigenden Kontakts zwischen Bakterium und Oberfläche zu, würde dies auch bedeuten, dass sich die antimikrobielle Wirkung von Kupferwerkstoffen verringert, sobald dieser Kontakt eingeschränkt wird.

Tatsächlich konnten Airey *et al.* beobachten, dass die antimikrobielle Effizienz von Kupfer durch **Verschmutzung** bzw. ineffektive Reinigung herabgesetzt wurde.^[87] Dieser Studie nach wurde die Abnahme der Abtötungswirkung durch verbleibende, organische Überreste abgetöteter Bakterien verursacht, was jedoch nicht weiter interpretiert wurde. Es wäre denkbar, dass in diesem Fall eine effiziente Abtötung verhindert wurde, weil der Kontakt zwischen neu hinzukommenden, lebenden Bakterien und dem Kupferwerkstoff durch derartige organische Verschmutzung verringert wurde.

Auch die augenscheinliche Kupferresistenz von Bakterien auf kupferhaltigen 50-Cent-Münzen, die bei Nachzucht im Labor und Abtötungstests auf reinem Kupfer nur bedingt nachgewiesen werden konnte^[171], kann so neu interpretiert werden. Es wäre möglich, dass Bakterien in der sehr feindlichen Umgebung einer trockenen Kupferlegierungsoberfläche nur überleben konnten, weil diese relativ stark verschmutzt war und kein direkter Kontakt der Bakterien mit dem Werkstoff zu Stande kam.

Dies würde bedeuten, dass der Oberflächenreinigung trockener, antimikrobieller Oberflächen auf Kupferbasis eine wesentliche Bedeutung zukommt. Eine effektive Langzeitwirkung wäre daher dadurch abzusichern, dass Verschmutzungen und abgetötete Bakterien regelmäßig entfernt werden und nosokomiale Erreger somit möglichst direkt mit dem Grundwerkstoff in Kontakt kommen. Da im klinischen Umfeld Desinfektions- und Reinigungsprozeduren für Kontaktflächen routinemäßig vorgeschrieben sind^[3,87], würde dies keinen maßgeblichen Mehraufwand in diesem Anwendungsfeld darstellen.

Auch in wässriger Umgebung lagern sich Bakterien auf Oberflächen an und bilden dabei sogenannte **Biofilme**.^[271] Diese stellen eine besondere, schutzbringende Form einer bakteriellen Lebensgemeinschaft dar, durch die ebenfalls gefährliche Infektionen übertragen werden können.^[271] Interessanterweise wurde die Biofilmbildung in wässrigem Medium auch auf antimikrobiell wirkendem Kupfer beobachtet.^[272,273] Obwohl durch den ständigen Kontakt mit dem wässrigen Medium kontinuierlich Kupferionen gelöst werden, scheint dies bei Biofilmen auf Kupferoberflächen nicht maßgeblich zur Abtötung der Bakterien zu führen. Es wurde vielmehr beobachtet, dass die Bakterien dazu tendieren, in den passiven VBNC-Zustand zu verfallen, um unter günstigeren Umgebungsbedingungen später wieder zu erwa-

chen.^[65,274] Augenscheinlich bietet ein Biofilm daher effektive Überlebensstrategien für Bakterien auf Kupferoberflächen. Eine dieser Strategien könnte entsprechend der gewonnenen Erkenntnisse mit dem eingeschränkten, metallischen Kontakt zusammenhängen. Da ein Biofilm Dicken von bis zu mehreren Millimetern erreichen kann^[271], ist anzunehmen, dass nur ein sehr geringer Prozentsatz an Bakterien in direktem Kontakt zur Kupferoberfläche steht. Es wäre vorstellbar, dass die erste, sich auf Kupfer anlagernde Bakteriensicht als Opferschicht agiert, welche zwar abstirbt, allerdings den direkten Kontakt weiterer, sich anlagernder Bakterien zur Kupferoberfläche effektiv unterbindet und deren Abtötungswirkung somit wesentlich einschränkt. Um Biofilme mit antibakteriellen Metallen wirksam zu bekämpfen, setzten Agarwala *et al.* Kupfernanopartikel ein, die in der Lage waren, in den Biofilm einzudringen.^[275] Der Erfolg dieser Strategie spräche ebenfalls dafür, dass eine relativ vergrößerte, metallische Oberfläche und damit der direkte Kontakt zwischen Werkstoff und Bakterien einen begünstigenden Faktor bei Kupfer darstellen.

Aktuelle, noch unveröffentlichte Forschungsergebnisse in Kooperation mit dem Deutschen Zentrum für Luft und Raumfahrt (DLR), die im Rahmen der Doktorarbeit von M.Sc. Claudia Hahn erzielt wurden, belegen einen ähnlichen Effekt. Hier wurden Abtötungsversuche an *E. coli* Bakterien auf reinem Kupfer nach dem *wet plating* Verfahren mit verschiedenen Ausgangskonzentrationen an Bakterien durchgeführt. Bei einer Bakterienkonzentration von 10^6 cfu mL⁻¹ wurde ein Abtötung von ca. 20 % innerhalb von 4 h registriert, wohingegen bei einer Ausgangskonzentration von 10^9 cfu mL⁻¹ unter ansonsten gleichen Bedingungen eine wesentlich stärkere Bakterienreduktion um ca. 4 log-Stufen stattfand. Diese Beobachtung legt ebenfalls nahe, dass eine bei hoher Bakterienkonzentration angelagerte Bakteriensicht als Schutzschicht für weitere Bakterien agieren könnte.

Rolle der Adhäsion

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen einerseits klar, dass der direkte Kontakt zur metallischen Oberfläche die Abtötung von Bakterien begünstigt. Andererseits ist zu vermuten, dass dieser Effekt durch eine zu starke Anlagerung von Bakterien oder gar die Bildung von Biofilmen auf längere Sicht abgeschirmt wird.

Für kupferbasierte Kontaktoberflächen im überwiegend trockenen Innenbereich könnte es sich daher als vorteilhaft erweisen, eine möglichst hohe und schnelle bakterielle Adhäsion einzustellen und den Kontakt der Bakterien zur Oberfläche zu maximieren. Solange gleichzeitig für eine regelmäßige und gründliche Oberflächenreinigung gesorgt wird, wie bereits standardmäßig im klinischen Bereich vorgeschrieben^[87,252], ist anzunehmen, dass derartige, kupferbasierte Oberflächen eine optimierte Abtötungswirkung erzielen. Nan *et al.* beschrieben in einigen Studien auf mit Kupfer funktionalisierten Edelstahloberflächen eine im Vergleich zu reinem Edelstahl erhöhte Adhäsionskraft von Bakterien.^[257,260] Obwohl man dies als ein Indiz

dafür sehen kann, dass die Adhäsion von Bakterien auf reinem Kupfer aufgrund intrinsischer Materialeigenschaften leichter erfolgt als auf Edelstahl, sind hier weitere Studien zur Aufklärung und statistischen Absicherung dieses Effekts notwendig.

Für antibakterielle kupferbasierte Oberflächen im wässrigen Einsatzfeld bzw. ohne Möglichkeit zur regelmäßigen Reinigung wäre es hingegen vorteilhaft, die bakterielle Adhäsion durch entsprechende Oberflächengestaltung möglichst gering zu halten. Durch diese Strategie würde einer verstärkten Anlagerung von Bakterien und der Bildung von Biofilmen entgegengewirkt und die Werkstoffoberfläche möglichst lange als direkt kontaktierbare Oberfläche zur Verfügung gestellt. Idealerweise würde dies erfordern, dass aktiv adhärerende, lebende Bakterien nach deren Kontakt-Abtötung wieder von der Oberfläche entfernt würden. Dies wäre beispielsweise durch geeignete Strömungsintensität oder zyklische Strömungswechsel in flüssigen Systemen denkbar.

Die Kontrolle der Bakterienadhäsion auf Kupferwerkstoffen kann daher, neben der Optimierung der Kupferionenabgabe, als wesentlicher, sekundärer Einflussparameter auf das antibakterielle Verhalten betrachtet werden.

1.5 Versuchsparemeter

Für die Adhäsions- und Abtötungsversuche wurde *E. coli* K12 bei 37 °C aerob in 20 mL LB-Medium gezüchtet. Die Zellen wurden 3x zentrifugiert und gewaschen und in H₂O überführt. Zur Bestimmung der Bakterienanlagerung wurde die Bakterienlösung auf eine optisch ermittelte Bakterienkonzentration von ca. $2 \cdot 10^5 \text{ mL}^{-1}$ verdünnt, da die Ausgangslösung mit hoher Bakterienkonzentration eine zu starke Lichtstreuung verursachte, die eine mikroskopische Auszählung unmöglich machte. Die Abtötungsversuche mit *E. coli* auf Stahl und Messing wurden entsprechend der *wet plating* Methode durchgeführt.^[160] Hierbei wurden 20 µL Puffermedium auf die Proben appliziert und später 10 µL zur Verdünnung und Ausplattierung auf LB-Nährböden entnommen.

Die Abstandsstrukturen wurden auf reinem (99,99 Gew.-%), poliertem Kupferblech mit AZ 1518 positiv-Fotolack (MicroChemicals) unter Reinraumbedingungen erzeugt. Dieser wurde zur Einstellung der Viskosität 1:4 mit 2-methoxy-1-methylethylacetat verdünnt und mittels *spin coating* bei einer Beschleunigung von 3.000 rpm s^{-1} und einer Rotationsgeschwindigkeit von 3.500 rpm für 60 s aufgetragen. Die beschichteten Proben wurden unmittelbar bei 100 °C für 60 s getrocknet. Zur LIL wurde ein gepulster Nd:YAG-Laser (Quanta-Ray PRO210, Spectra Physics) bei einer mittleren, globalen Fluenz F_G von 33 mJ cm^{-2} und einer Wellenlänge von 355 nm eingesetzt. Die Laserpulsdauer betrug 10 ns bei einer Frequenz von 10 Hz. Der Interferenzaufbau wurde durch Strahlteiler erzeugt (33:33:33 für 3-Strahlinterferenz). Die belichteten Proben wurden in einer säurebasierten Lösung (AZ 351 B, MicroChemicals) während 60 s entwickelt, mit Wasser gespült und luftgetrocknet. Die REM-

Aufnahmen der Strukturen und Bakterien erfolgten an einer Dual-Beam Anlage (FEI Strata DB 235) bei 5 kV im Sekundärelektronenkontrast.

Für die REM-Aufnahmen und Abtötungsversuche wurde *E. hirae* Wildtyp ATCC 9790 bei 37 °C anaerob in 10 mL N-Medium gezüchtet. Die Zellen wurden 3x zentrifugiert und gewaschen und in TRIS-Medium überführt. Mittlere Zelldichten lagen bei $2 - 8 \cdot 10^8$ cfu mL⁻¹. Die Abtötungsversuche wurden mittels *wet plating* durchgeführt.^[160] Hierfür wurden 25 µL TRIS-Medium auf die Proben appliziert und später 20 µL zur Verdünnung und Ausplattierung auf N-Nährböden entnommen. Um das Einschließen von Luftblasen auf den Abstandsstrukturen zu verhindern und eine vollständige Benetzung während des *wet platings* zu gewährleisten, wurden die Proben für 5 s einem reduzierten Umgebungsdruck von 2 kPa ausgesetzt. Die verwendeten Eisenproben waren 98,3 % rein (1,4 Gew.-% Mn, 0,17 Gew.-% C, DIN 5512-1). Bei den Glasproben handelte es sich um inertes Borosilikatglas.

Die zur Cu- und Fe-Ionenabgabe untersuchten Lösungen wurden ebenfalls entsprechend der *wet plating* Methode, nur ohne Bakterien, präpariert. Probevolumina von 20 µL wurden 50-fach mit HNO₃ (0,065 Vol.-%) verdünnt und mittels ICP-AE bei 324,754 nm an einem „Jobin Yvon JY 24“-System (HORIBA Jobin Yvon) untersucht.

In den zeitlichen Verläufen der Abtötung und Ionenabgabe sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung dargestellt.

2. Oberflächenstrukturierung und -analyse

Im folgenden Kapitel werden Ansätze zur gezielten Funktionalisierung von antimikrobiellen Kupferwerkstoffen mittels direkter LIS der Oberfläche behandelt. Weiterhin wird das Potential der zerstörenden Materialanalyse mittels REM/FIB zur Aufklärung der auf diesen Strukturen und während des *contact killings* ablaufenden Adhäsions- und Abtötungsprozesse an Bakterien auf Werkstoffoberflächen untersucht.

2.1 Adhäsionssteuerung durch Oberflächenstrukturierung

Die bisher gezeigten Ergebnisse legen nahe, dass der Kontakt zwischen Bakterium und metallischer Oberfläche und damit die bakterielle Adhäsion bei der Abtötung durch Kupferwerkstoffe wichtige Einflussgrößen darstellen. Bakterienadhäsion kann durch geeignete, topographische Oberflächengestaltung bedingt gesteuert werden, wobei die genauen, ablaufenden Mechanismen komplex sind und der Einfluss verschiedener Strukturparameter bisher nicht vollständig aufgeklärt sind.^[230,231,271] Die im Folgenden gezeigten Ergebnisse sind daher als Ausblick auf vielversprechende Effekte zu verstehen, die in vertiefenden, weiterführenden Studien detaillierter erforscht werden müssen.

Um die Kontaktabhängigkeit der Abtötung auf antibakteriellen Oberflächen auszunutzen, wurde untersucht, ob die bisher zur Generierung von Abstandshaltern eingesetzte LIS auch zur gezielten Beeinflussung der bakteriellen Adhäsion durch topographische Oberflächenstrukturierung Potential zeigt. Dies wurde zunächst auf nicht antimikrobiell aktiven, metallischen Modelloberflächen durchgeführt, da Adhäsionsversuche auf Kupfer wegen des nicht klar zu erfassenden Lebendzustands der Zellen schwer zu interpretieren sind.^[276] Hierzu wurden auf Polyimid Linienstrukturen mittels 2-Strahl-Laserinterferenz generiert und anschließend mit inertem Gold (Schichtdicke ca. 100 nm) beschichtet. Polyimid wurde gewählt, da sich auf diesem im Vergleich zu metallischen Oberflächen generell kleinere Strukturen mit höherer Variabilität erzeugen lassen. Als finale Strukturgrößen wurden eine laterale Periodizität von 2,1 μm und eine Strukturtiefe von $1,24 \pm 0,07 \mu\text{m}$ ausgewählt, um die Größenordnung von Bakterien (ca. 1 μm) anzunähern.^[277] Auf diese Weise wurde eine chemisch inerte, homogene, strukturierte metallische Oberfläche, wie in Abbildung 36 a) dargestellt, erzeugt.

Im Gegensatz zu dem zuvor verwendeten, statischen Aufbau wurde in diesem Versuch eine konstante Flussgeschwindigkeit der Bakterienlösung von $0,05 \text{ mL min}^{-1}$ vorgegeben, um den Gravitationseinfluss zu minimieren und repräsentative Umgebungsbedingungen für die Biofilmbildung in wasserführenden Systemen zu schaffen. Der hierzu eingesetzte Flusskammeraufbau wurde am Lehrstuhl für Physik kondensierter Materie der Universität des Saarlandes entwickelt und ist in ^[278] näher beschrieben. Die zeitabhängige, quantitative Bakterienadhäsion auf strukturierten und glatten Oberflächen, die in Abbildung 36 b) dargestellt

ist, wurde mit lichtmikroskopischen Methoden bestimmt. Als ungefährlicher Verwandter des nosokomialen Erregers *S. aureus* wurden in diesem Versuch kugelförmige *Staphylococcus carnosus* Bakterien (*S. carnosus*) eingesetzt.

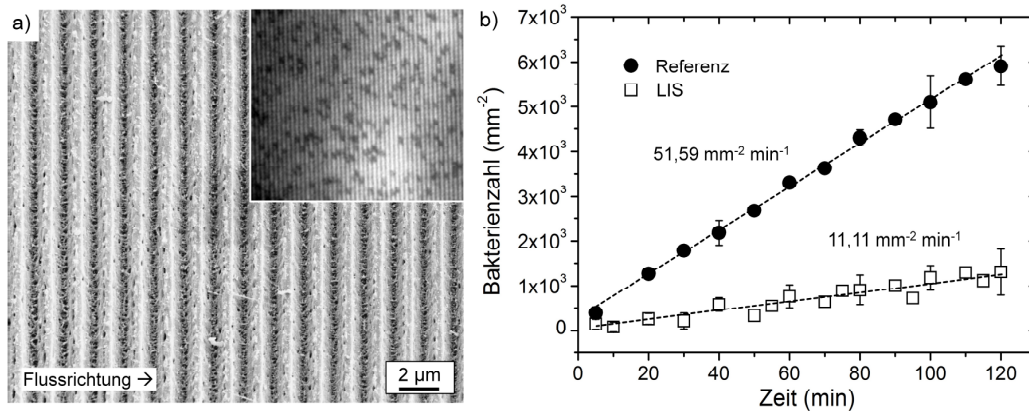


Abbildung 36: a) REM-Aufnahme einer linienstrukturierten und goldbeschichteten Polyimidoberfläche und kontrastoptimierte, lichtmikroskopische Aufnahme von auf dieser Oberfläche adhären den *S. carnosus* Bakterien (Einschub). b) Bakterienadhäsion während eines Fließversuchs auf den in a) dargestellten Oberflächen (LIS) im Vergleich zu einer unstrukturierten, goldbeschichteten Polyimidoberfläche (Referenz) im zeitlichen Verlauf.

Auf beiden Oberflächentypen stellte sich eine lineare Bakterienanlagerung ein. Im Vergleich zur Referenzoberfläche ($51,59 \text{ mm}^{-2} \text{ min}^{-1}$) zeigte sich auf der laserstrukturierten Oberfläche eine auf etwa ein Fünftel reduzierte, bakterielle Anlagerungsrate von $11,11 \text{ mm}^{-2} \text{ min}^{-1}$.^[277] Auf weiteren LIS-Oberflächen mit variierendem Aspektverhältnis konnte das Adhäsionsverhalten nicht präzise bestimmt werden, da der durch die Strukturen verursachte Dunkelkontrast den Kontrast der adhären den Bakterien stark überlagerte. Dies ist im Einschub in Abbildung 36 a) ansatzweise zu erkennen.^[277] Eine alternative Auszählmethode zur Vermeidung dieses Problems bei zukünftigen Versuchen wäre die Fluoreszenzmikroskopie.^[279]

Da durch die homogene Goldbeschichtung ein chemischer Einfluss der Laserbearbeitung ausgeschlossen wird, kann der beobachtete Effekt allein auf die generierte Topographie zurückgeführt werden. Rauheitsbedingte oberflächennahe Strömungsturbulenzen können aufgrund der sehr geringen Strömungsrate von $0,05 \text{ mL min}^{-1}$ als Ursache für die verringerte Adhäsion vernachlässigt werden. Mehrere Studien beschreiben eine verstärkte bakterielle Adhäsion auf topographischen Oberflächenstrukturen in der Größenordnung von Bakterien.^[279,280] Diese trat genau dann auf, wenn die Geometrie der Oberflächenstrukturen mit der der Bakterien übereinstimmte, so dass eine maximale Kontaktfläche gegeben war. In einigen Studien wurde eine gezielte Ausrichtung von stäbchenförmigen, adhären den Bakterien auf Linienstrukturen beobachtet und ebenfalls durch eine maximierte Kontaktfläche begründet.^[276,281,282] Es ist daher anzunehmen, dass die Geometrie der in diesem Experiment erzeug-

ten Gräben nicht exakt der der Bakterien entsprach und somit kein Vollkontakt stattfinden konnte. Whitehead *et al.* fanden heraus, dass generell auf rauen Oberflächen die Anzahl an möglichen Kontaktpunkten des Bakteriums zur Oberfläche für das Adhäsionsverhalten entscheidend sein könnte. Sie beobachteten eine mit steigender Zahl an Kontaktpunkten verbesserte Bakterienadhäsion.^[283] Auch Lüdecke konnte auf rauen TiO₂-Oberflächen einen Zusammenhang zwischen bakterieller Adhäsion und Kontaktpunkten zur Oberfläche erkennen.^[284] Die hier beobachtete, verringerte Bakterienadhäsion auf LIS-Oberflächen könnte somit durch die Einschränkung der möglichen Kontaktpunkte des Bakteriums zur Oberfläche erklärt werden.

Zusammenfassend wurde exemplarisch nachgewiesen, dass die bakterielle Adhäsion auf Oberflächen durch geeignete Gestaltung der Topographie mittels LIS stark reduziert werden kann. Eine derartige Funktionalisierung von antibakteriellen Kupferwerkstoffen wäre im feuchten Einsatzbereich für eine langanhaltende Abtötungswirkung vorteilhaft. Die genauen Ursachen müssen in weiterführenden Versuchen mit passenden Methoden erforscht werden, wobei die angebotene Kontaktfläche und die realen Kontaktpunkte zwischen Bakterium und Oberfläche eine wichtige Rolle spielen könnten.

2.2 Kontakt- und Strukturanalyse mittels FIB

Zur Untersuchung der Adhäsions- und Abtötungswirkung von Kupferoberflächen ist es daher entscheidend, die oben angesprochenen Zustände genauer abzubilden. Im Zuge dieser Arbeit wurde hierfür die in der Materialwissenschaft zur rasterelektronenmikroskopischen Strukturanalyse etablierte, zerstörende FIB-Schnitttechnik^[285] auf mikrobiologische Fragestellungen übertragen.

Die für biologische Proben optimierte *environmental scanning electron microscopy* (ESEM) kann nicht in Verbindung mit der FIB-Schnitttechnik eingesetzt werden, da diese Ultrahochvakuum voraussetzt. Generell stellt bei der Untersuchung von biologischen Proben mittels FIB daher die vakuumbeständige und strukturerhaltende REM-Präparation eine Herausforderung dar.^[286] Die REM-Präparation von Bakterien kann mit ansteigender Komplexität entweder durch einfache Trocknung, chemische Strukturfixierung und anschließende Dehydrierung oder Einfrieren (Kryo-REM) erfolgen.^[286,287] Es existieren einige Arbeiten, die sich mit der FIB-Untersuchung von biologischen Materialien und Zellen befassen und hierzu verschiedene Präparationsrezepte vorschlagen.^[286-289] Die dort durchgeführten FIB-Schnitte fanden jedoch auf wesentlich größerer Skala statt und hatten keine hochauflösende Analyse einzelner Bakterien zum Ziel.

Kontaktflächenanalyse

Um die entscheidende Schnittstelle zwischen Material und Bakterium sichtbar zu machen, wurden *S. carnosus* Bakterien inklusive des strukturierten und beschichteten Polyimids aus dem zuvor gezeigten Adhäsionsversuch senkrecht zu Oberfläche und Strukturausrichtung mittels FIB-Querschnitt präpariert und unter Ultrahochauflösung (UHR) abgebildet (siehe Abbildung 37). Für die Aufnahmen wurde eine LIS-Probe nach einem Flusskammerversuch mit reinem Wasser abgespült und luftgetrocknet, wodurch nur stark adhärierende Bakterien auf der Probenoberfläche zurückblieben. Zum Schutz der Oberfläche und des aufliegenden Bakteriums wurde vor dem zerstörenden FIB-Schnitt eine schützende Platinschicht aufgetragen.

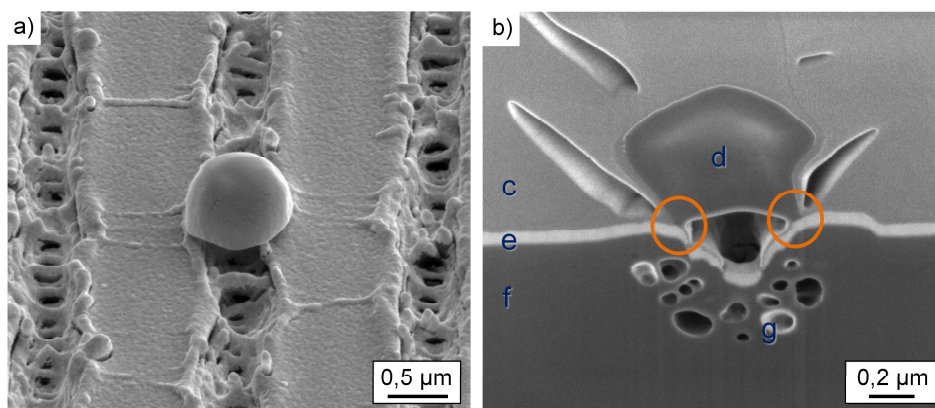


Abbildung 37: a) REM-Aufnahme eines adhärierenden, getrockneten *S. carnosus* Bakteriums auf linienstrukturiertem und goldbeschichtetem Polyimid. b) FIB-Querschnitt im aufsitzenden Bakterium (d) mit c: Pt-Schutzschicht, e: Au-Beschichtung, f: Polyimidsubstrat und g: Poren. Markiert sind die Kontaktpunkte des Bakteriums zur Oberfläche.

Das dargestellte Bakterium adhärert auf dem topographischen Tal der Linienstruktur, dem Bereich der maximalen Laser-Intensität. Wie in Abbildung 37 b) erkennbar, konnten Polymer (f), Metall (e, c) und Bakterium (d) mit stufenweise verringertem FIB-Strahlstrom artefaktfrei und homogen im Querschnitt präpariert werden. Die Innenstruktur und Außenhülle des Bakteriums erscheinen intakt, wohingegen die ursprüngliche Kugelform durch den Trocknungsprozess deformiert wurde. Die im Polyimid sichtbaren Poren (g) entstanden durch Erhitzung und Verdampfung des Polymers während der Laserbehandlung, sind jedoch für die Adhäsionseffekte zu vernachlässigen. Deutlich zu erkennen sind zwei separate Kontaktbereiche des Bakteriums mit der strukturierten Oberfläche (orange Markierung).

Die FIB-Methodik konnte demnach entsprechend angepasst werden, um reale Kontaktpunkte von Bakterien auf rauen und strukturierten Oberflächen darzustellen, die bisher nur theoretisch beschrieben wurden.^[283] Laut Whitehead *et al.* und Lüdecke könnte die Anzahl derartiger Kontaktpunkte die bakterielle Adhäsion auf rauen Oberflächen bestimmen.^[283,284] Es ist vorstellbar, dass auch die Form und Größe des jeweiligen Kontaktpunkts und somit die

Form des gesamten Kontaktbereichs Einfluss auf die Bakterienhaftung ausüben. In diesem Zusammenhang wäre zukünftig zu untersuchen, ob durch die ebenfalls zur Werkstoffanalyse etablierte FIB-Serienschnitttechnik eine dreidimensionale Rekonstruktion des bakteriellen Kontaktbereichs möglich ist. Dies würde genauere, mechanistische Einblicke in bakterielle Adhäsionsmechanismen erlauben und somit zur Optimierung des *contact killings* auf funktionalisierten antibakteriellen Kupferoberflächen beitragen.

Strukturanalyse

Nachdem demonstriert wurde, dass die FIB-Technik zur Untersuchung von Bakterien im Querschnitt eingesetzt werden kann, stellt sich die Frage, wie detailliert und repräsentativ der innere, strukturelle Aufbau eines einzelnen Bakteriums mit REM-Analysenmethoden erfasst werden kann und ob eine Aufklärung von mikrobiologischen Wirkmechanismen auf diese Weise möglich ist.

Zu diesem Zweck wurden auf inerten SiO₂-Wavern und reinem, poliertem Kupfer Abtötungsversuche mit *Pseudomonas fluorescens* Bakterien (*P. fluorescens*) durchgeführt, von denen Proben nach 120 min als Momentaufnahme des Bakterienzustands chemisch fixiert und für das REM präpariert wurden. Die Ergebnisse des Abtötungsversuchs in Abbildung 38 belegen, dass auf diese Weise der Zustand überlebender und durch Kupfer abgetöteter Bakterien repräsentativ abgebildet wurde.

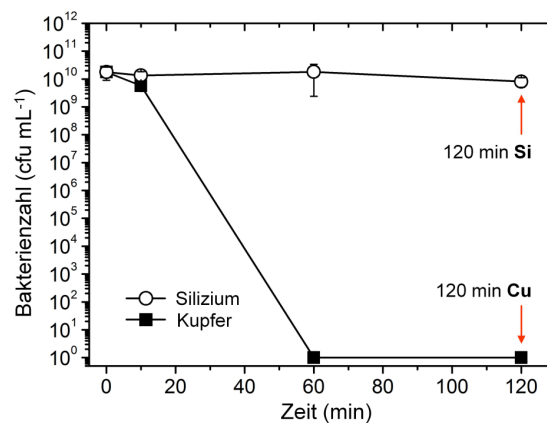


Abbildung 38: Zeit-Abtötungsdiagramme für Abtötungsversuche auf SiO₂ und Kupfer in PBS-Medium nach dem *wet plating* Verfahren. Nach 120 min wurde jeweils eine Probenserie im Testzustand ohne Bakterienabnahme für REM-Untersuchungen präpariert (120 min Si bzw. Cu).

Wie sich im vorherigen Versuch gezeigt hat, bleibt durch das Trocknungsverfahren die ursprüngliche Bakterienform nur bedingt erhalten (siehe Abbildung 37). Um die während der Abtötung durch Kupfer vorliegende äußere und innere Bakterienstruktur möglichst genau zu konservieren, wurden verschiedene Präparationsverfahren getestet.^[290] Die konsistentesten Ergebnisse wurden mit einer mehrstufigen Präparation erzielt, während der zunächst eine

Fixierung der Bakterienzelle im flüssigen Zustand mit Glutaraldehyd erfolgte. Dieses vernetzt Zellproteine und erhält somit in einem gewissen Grad die interne Zellstruktur.^[286] Danach wurde eine stufenweise Dehydrierung der Zelle in zunehmend starken Alkohollösungen und eine Lufttrocknung der fixierten Probe vorgenommen. Auf beiden Proben wurden mehrere Querschnitte an willkürlich gewählten Bakterien durchgeführt, wie in folgender Abbildung an einem jeweils repräsentativen Beispiel dargestellt.

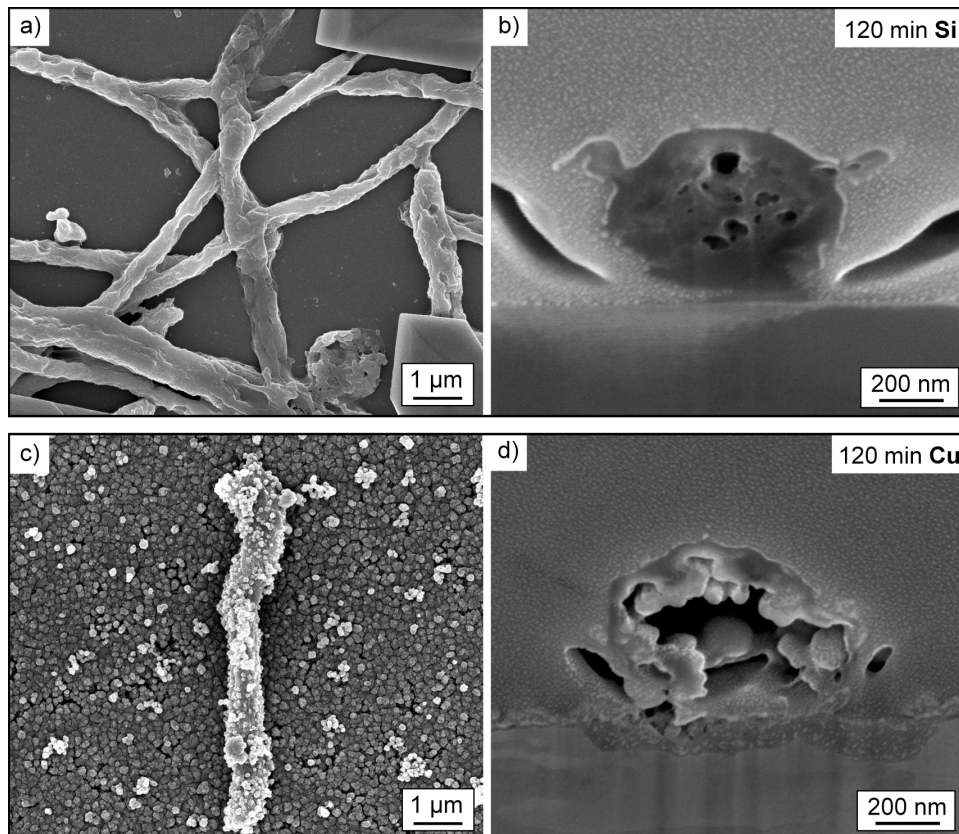


Abbildung 39: Chemisch präparierte, stäbchenförmige *P. fluorescens* Bakterien auf SiO₂- (a, b)) und Cu-Oberflächen (c, d)) nach 120 min *wet plating* mit PBS-Medium. Dargestellt sind Oberflächenaufnahmen im Sekundärelektronenkontrast (a, c)) und jeweils ein repräsentativer FIB-Querschnitt eines einzelnen, aufliegenden Bakteriums in UHR (b, d)).

Die Übersichtsaufnahmen (links) zeigen die gramnegativen *P. fluorescens* Stäbchenbakterien auf der Kupfer- bzw. SiO₂-Oberfläche, die rechts dargestellten Querschnitte wurden quer zur Bakterienlänge präpariert. Es ist erkennbar, dass die innere Bakterienstruktur auf den SiO₂-Oberflächen nahezu intakt blieb, wohingegen auf Kupfer eine starke Zellschädigung stattfand. Die Bakterienzelle erscheint hier nahezu ausgehöhlt. Die Tendenz der stärkeren Zellschädigung auf Kupfer war deutlich ausgeprägt, obwohl auch bei manchen Bakterienschnitten auf SiO₂ schwache Zellschäden erkennbar waren. Diese sind darauf zurückzuführen, dass das strukturfixierende Glutaraldehyd ebenfalls als toxische Substanz einzustufen ist, deren Wirkung jedoch stark durch die des Kupfers überlagert wird.^[286] Im Vergleich der beiden

Materialien ist auf der metallischen Kupferoberfläche eine starke Oxidation zu erkennen, die durch das *wet plating* und die Präparation hervorgerufen wurde. Auffällig im Querschnitt auf Kupfer ist die scheinbar verstärkte Korrosion des Materials direkt unterhalb des Bakteriums. Diese könnte dadurch erklärt werden, dass sich unterhalb des Bakteriums während der Trocknung aufgrund von Kapillarkräften ein korrosives Flüssigkeitsreservoir länger erhält. Ebenfalls wäre denkbar, dass Stoffwechselprodukte des Bakteriums zu einer lokal erhöhten, mikrobiell induzierten Korrosion führen.^[291]

Die durch die FIB-Untersuchung gewonnenen Erkenntnisse stützen die These, dass die Abtötung auf Kupferwerkstoffen mit Membranschäden^[55,56] und drastischer Zellschädigung, wie dem Auslaufen der Zelle^[29,143], einhergeht. Diese Phänomene wurden nach bestem Wissen des Autors erstmalig mit Hilfe der FIB-Technik durch REM hochaufgelöst dargestellt. Feng *et al.* konnten in einer ähnlichen, mechanistischen Studie die Auswirkungen von Silbersalz auf *E. coli* Bakterien nachweisen.^[187] Hierzu wurde jedoch die wesentlich aufwändigere Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) an ausgedünnten, speziell präparierten Lamellen ohne Bezug zur Materialoberfläche eingesetzt. Um die Genauigkeit der FIB-Methode etwa zur genaueren Unterscheidung verschiedener, intrazellulärer Schäden zu erhöhen, ist es jedoch notwendig, den Einfluss der Präparationsmethode zu minimieren. Sowohl die zur Zellfixierung eingesetzten Chemikalien, als auch die nach dem Abtötungsversuch verlängerte Lagerzeit in Lösung beeinflussen die Zellmorphologie zusätzlich. Aus diesem Grund sind bisher nur vergleichende Studien realistisch. Eine Möglichkeit, diesen Einfluss zukünftig auszuschließen und den Schädigungszustand eines genauen Zeitpunkts während des Abtötungsprozesses abzubilden, wäre die Kryo-REM. Diese ermöglicht es, Momentanzustände einzufrieren und biologische Proben in gefrorenem Zustand mittels FIB zu bearbeiten.^[288]

2.3 Laser-Strukturierung von Kupferwerkstoffen

Neben der Beeinflussung der Adhäsionseigenschaften konnte gezeigt werden, dass sich die LIS auch zur Beeinflussung des Benetzungsverhaltens von Kupferlegierungen eignet (siehe Veröffentlichung ^[292]). Eine verbesserte Benetzung von antibakteriellen Kontaktflächen wäre für den Desinfektionsmitteleinsatz und eine effektive Reinigung vorteilhaft.^[87] Diese wiederum begünstigt den direkten Kontakt zwischen Bakterien und metallischer Oberfläche und damit effektives *contact killing*.

Die bisher vorgestellten Ergebnisse motivieren daher neben der Mikrostrukturgestaltung und Optimierung der Ionenabgabe eine zusätzliche Funktionalisierung der Oberfläche von antibakteriellen Kupferwerkstoffen zum Einstellen vorteilhafter Oberflächeneigenschaften, wie beispielsweise Adhäsions- und Benetzungsverhalten. Im Folgenden wird diskutiert, welche Werkstoffmodifikationen bei der direkten LIS von Kupferwerkstoffen auftreten und wie sich diese auf die Anwendung antibakterieller Kontaktflächen auswirken.

Um chemische Oberflächenmodifikationen durch die Nanosekunden-Laserbehandlung zu untersuchen, wurde reines, poliertes Kupfer zum einen mittels Zweistrahl-Interferenzlinienstrukturiert (siehe Abbildung 40 a)) und zum anderen ohne Interferenzaufbau flächendeckend laserbehandelt. Hierbei wurden die Laserintensitäten so gewählt, dass die globale Fluenz $F_G = 3,34 \text{ J cm}^{-2}$ bei der homogenen Bestrahlung der lokal in den Intensitätsmaxima der Laserinterferenz auftretenden Fluenz (siehe Gleichungen 4 & 5 S. 24). entsprach.^[292] Anschließend wurden die Probenoberflächen im Vergleich zu einer reinen und oxidierten Kupferreferenz mittels XPS analysiert (siehe Abbildung 40 b)).

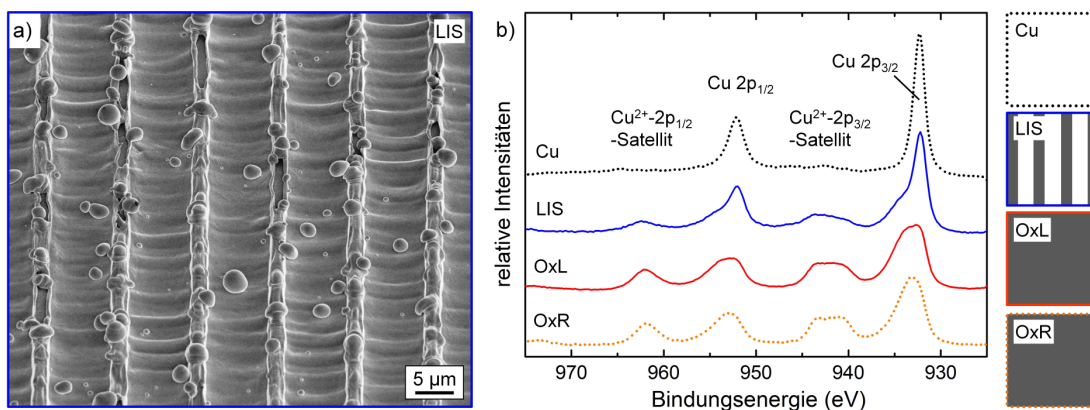


Abbildung 40: a) REM-Aufnahme einer linienstrukturierten Kupferoberfläche (LIS) mit $P = 10 \text{ µm}$, b) XPS-Spektren der linienstrukturierten (LIS) und einer homogen bestrahlten Kupferprobe (OxL) sowie einer thermisch oxidierten (OxR) und oxidfreien Referenzprobe (Cu). Die lokale Laserfluenz in den Intensitätsmaxima der linienstrukturierten Probe entsprach der globalen Fluenz F_G der homogen strukturierten Probe von $3,34 \text{ J cm}^{-2}$. Rechts dargestellt ist die vermutete, schematische Oxidverteilung (grau) auf den entsprechenden Oberflächen.

In Abbildung 40 a) sind neben einer deutlichen, topographischen Linienausprägung Schmelztröpfchen und Querstege als klare Indizien für Schmelzprozesse zu erkennen. Diese belegen die bei der Nanosekunden-Laserbearbeitung von Metallen auftretenden, starken thermischen Effekte im hier eingesetzten Fluenzbereich. Aus früheren Studien zur Laserbehandlung von Metallen unter atmosphärischen Bedingungen war bekannt, dass unter diesen Voraussetzungen auch Oxidationsprozesse stattfinden können^[293]. Deshalb wurde die XPS-Analyse im Vergleich zu einer thermisch oxidierten Kupferreferenzprobe durchgeführt. Anhand der XPS-Spektren war erkennbar, dass außer Cu und O keine weiteren Elemente in Oberflächenverbindungen vorlagen.^[292] Eine qualitative Auswertung des Spektrums ergab Cu^0 und Cu^{2+} als die auftretenden Oxidationsstufen des Kupfers, die sich in Form des $2p_{3/2}$ - und $2p_{1/2}$ -Doublets bei reinem Kupfer und zusätzlichen Satellitenstrukturen bei den oxidierten Proben abzeichnen (siehe Abbildung 40 b)).^[292] Dies ließ auf die präferierte Bildung von CuO durch die LIS von Kupfer schließen. In einem quantitativen Vergleich der Peakflächen zu denen der Referenzspektren Cu und OxR (0 % und 100 % Oxidation) wurde der Oxidationsgrad der

laserbehandelten Oberflächen zu 97 % für OxL und zu 46 % für die linienstrukturierte Oberfläche bestimmt.^[292]

Somit wurde gezeigt, dass bei der topographischen LIS von Kupferwerkstoffen mit der dazu notwendigen Fluenz im Bereich einiger J cm^{-2} auch eine thermisch-chemische Modifikation der Oberfläche stattfindet. Unter atmosphärischen Bedingungen wird durch die Laserbestrahlung vorwiegend CuO gebildet, welches sich unter Einsatz der LIS-Methode lokal in den Bereichen maximaler Laserintensität ausbildet. Schlussfolgernd bedeutet dies, dass sich die LIS zur Optimierung des Adhäsionsvermögens oder der Benetzungseigenschaft von antibakteriellen Kupferwerkstoffen bedingt eignet, da sich während der Laserbehandlung vornehmlich das schwächer abtötende CuO bildet. Um dies zu vermeiden wäre beispielsweise denkbar, die LIS unter Schutzgasatmosphäre durchzuführen oder das erzeugte CuO durch chemische Nachbehandlung vor dem Einsatz der topographisch funktionalisierten Oberflächen zu entfernen.

2.4 Versuchsparameter

Glatte Polyimidoberflächen (Rauheit: $2 \pm 1\text{ nm}$) wurden durch spin coating bei 2.000 rpm für 1 min von in N-Ethyl-2-Pyrrolidon gelöstem, 10%-igem Polyimid (P84, Evonik Industries) auf SiO_2 -Wavern erzeugt. Die Laserstrukturierung erfolgte mit dem zuvor beschriebenen Lasersystem bei einer globalen Fluenz F_G von 890 mJ cm^{-2} (Abbildung 36) und 490 mJ cm^{-2} (Abbildung 37). Die Goldbeschichtung wurde an einer Metallbedampfungsanlage UNIVEX 300 (Leybold Heraeus) durchgeführt. Für die Adhäsionsversuche wurde *S. carnosus* TM300 bei 37 °C anaerob in 20 mL N-Medium gezüchtet. Die Zellen wurden 3x zentrifugiert und gewaschen und in PBS-medium überführt. Zur Bestimmung der Bakterienanlagerung wurde die Bakterienlösung auf eine Bakterienkonzentration von ca. $2 \cdot 10^5\text{ mL}^{-1}$ verdünnt. Der genaue Flusskammeraufbau wird in ^[278] beschrieben. Zur Kontrastierung der adhärierenden Bakterien wurde der Differentialinterferenzkontrast verwendet.

Für die FIB-Querschnitte und REM-Abbildungen wurde eine Dual Beam Anlage Strata DB 235 (FEI) eingesetzt. Zur Erzeugung des FIB-Querschnitts wurde nach mehreren Stufen höherer Ionenstrahlintensitäten ein finaler Strahlstrom von 10 pA eingesetzt. Für die Abtötungsversuche und strukturellen FIB-Untersuchungen wurde *P. fluorescens* DSM 50090 bei 30 °C aerob in 40 mL LB-Medium (Rezept siehe Anhang) gezüchtet. Die Zellen wurden 3x zentrifugiert und gewaschen und in PBS-Medium überführt. Mittlere Zelldichten lagen bei $2 - 3 \cdot 10^{10}\text{ cfu mL}^{-1}$. Die Abtötungsversuche wurden entsprechend der im Stand der Forschung beschriebenen *wet plating* Methoden durchgeführt.^[51,160] Für das *wet plating* wurden 20 μL Puffermedium auf die Proben appliziert und später 10 μL zur Verdünnung und Ausplattierung auf LB-Nährböden entnommen. Die 120 min Si bzw. Cu Proben für die REM wurden direkt nach dem Versuch ohne Entnahme von 10 μL in Glutaraldehydlösung überführt. Die Präparation

der biologischen Proben für die Strukturanalyse erfolgte nach dem im Anhang beschriebenen Rezept. Alle biologischen Proben wurden mit Au/Pd mit einer Stärke von 3 - 5 nm besputtert.

Die Laserstrukturierung der Kupferproben erfolgte mit dem zuvor beschriebenen Lasersystem unter Einfachpulsung mit einer globalen Fluenz F_G von $3,34 \text{ J cm}^{-2}$ (OxL) bzw. $1,67 \text{ J cm}^{-2}$ (LIS). Die XPS-Analyse wurde mit einem ESCA Mk II Spektrometer (Vacuum Generators) mit Al-K α Strahlung ($h\omega = 1486,6 \text{ eV}$) in Normal-Emissionsmodus wie in ^[294] beschrieben am Lehrstuhl für Physik kondensierter Materie an der Universität des Saarlandes durchgeführt.

In den zeitlichen Verläufen der Adhäsion und Abtötung (Abbildung 36) und Ionenabgabe (Abbildung 38) sind jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung dargestellt.

Elementübergreifende Betrachtung

In diesem Kapitel werden generelle Ursachen und entscheidende physikalisch-chemische Eigenschaften für ein antibakterielles Verhalten bei metallischen Elementen diskutiert. Aus dieser Betrachtung leitet sich die besondere Rolle von Kupfer- und Silberwerkstoffen ab, deren antibakterielle Werkstoffeigenschaften unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zusammenfassend interpretiert werden. Weiterhin wird der Einfluss der Legierungszusammensetzung auf die antibakterielle Wirkung von Kupferlegierungen betrachtet.

1. Eigenschaftskorrelation bei Metallen

Dieses Kapitel verfolgt den Ansatz, durch einen übergreifenden Vergleich von biologischen, chemischen und physikalischen Eigenschaften mehrerer metallischer Elemente die für ein effektives antibakterielles Materialverhalten entscheidenden Größen und Eigenschaftskombinationen zu ermitteln. Ziel dieser Aufstellung ist es einerseits, die Wirkmechanismen bei bekannten antibakteriellen Metallen genauer zu verstehen sowie andererseits eine Vorhersage bezüglich des antibakteriellen Verhaltens von bisher nicht untersuchten Werkstoffen abzuleiten.

Als Basis des in Tabelle 6 dargestellten Vergleichs wurde die Studie von Kawakami *et al.* herangezogen, in der das Abtötungsverhalten mehrerer metallischer Elemente unter einheitlichen, feuchten Bedingungen durch das JIS-Testverfahren ermittelt wurde.^[2] Kawakami *et al.* berechnen für jedes Metall eine Abtötungsrate k gegenüber Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien (siehe Gleichung 19 S. 48), welche die Reihenfolge der in Tabelle 6 gelisteten Elemente vorgibt. Da die antimikrobielle Wirkung von Metallen maßgeblich auf deren Ionenwirkung beruht^[144], wurden chemische Eigenschaften der jeweiligen metallischen Ionen und Materialkennwerte zum Korrosionsverhalten und zur Freisetzung von Ionen in Korrelation zur Abtötungsrate gesetzt. Als weiterer Eigenschaftsblock werden elementare, physikalische Konstanten sowie die Elektronenkonfiguration der Elemente aufgeführt. Der relative Verlauf der jeweiligen Größe über das Elementspektrum wird durch eine Farbskala hervorgehoben, die von Weiß, Gelb, Orange nach Rot zu extremeren Werten hin verläuft. Die Namen der Metalle werden im folgenden Abschnitt durch deren Elementsymbol abgekürzt. Für das Abtötungsverhalten wurde die photokatalytische antibakterielle Wirkung von TiO_2 nicht berücksichtigt.

Tabelle 6: Nach antibakterieller Wirkung geordnete Auflistung von relevanten biologischen, chemischen und physikalischen Eigenschaften und Kenngrößen ausgewählter Metalle und deren Ionen (Oxidationsstufe hochgestellt in Klammern). Aufgelistet sind: im JIS-Verfahren bestimmte Abtötungsrate k an *E. coli* und *S. aureus*^[2]; die Einordnung der metallischen Ionen nach dem HSAB-Konzept^[295] (soft, medium, hard); der pK_L -Wert zum Löslichkeitsprodukt des Metallsulfids ($pK_{L(MeS)}$) als Maßstab für die Thiophilizität; der pK_L -Wert zum Löslichkeitsprodukt der relevanten Metalloxid- bzw. Metallhydroxidverbindung ($pK_{L(MeO/Me(OH))}$); der „praktische“ Edelcharakter des Metalls (EC, geringerer Wert entspr. edlerem Verhalten)^[1]; das elektrochemische Standardpotential E_0 ; die Elektronegativität (χ); die erste Ionisierungsenergie (IE) sowie die reale Elektronenkonfiguration des entsprechenden Metalls. *: Hg wird als toxisch gegenüber Bakterien eingestuft^[296]; **: die Thiophilizität von Au wird als hoch eingestuft^[297]. Verlauf der relativen Farbskala: Weiß-Gelb-Orange-Rot. El. = Element, Qu. = Quellen.

El.	Abtötungswirk.		Ioneneigenschaften		Korrosionsverhalten			atomare Eigenschaften			
	$k_{E. coli}$	$k_{S. aureus}$	hard/soft	$pK_{L(MeS)}$	$pK_{L(MeO/Me(OH))}$	EC	E_0 (V)	χ	IE (eV)	Elektronenkonf.	El.
Hg	* -	* -	s (+)	-52,70	-25,4 ⁽²⁺⁾ [298]	11	-	2,00	10,44	4f ¹⁴ 5d ¹⁰ 6s ²	Hg
Cu	13,57	12,51	s/m ^(+/2+)	-36,22	-23,5/-9,0 ^(2+/+) [241,245]	16	0,34/0,52 ^(2+/+)	1,90	7,73	3d ¹⁰ 4s ¹	Cu
Ag	11,91	11,66	s (+)	-50,22	-7,7/-7,7 ^(+/2+) [298,299]	14	0,79 ⁽⁺⁾	1,93	7,58	4d ¹⁰ 5s ¹	Ag
Co	2,81	2,49	h/m ^(3+/2+)	-20,41	-14,2 (Co(OH) ₂) ^[298]	30	-0,28 ⁽²⁺⁾	1,88	7,88	3d ⁷ 4s ²	Co
Ni	2,77	0,54	m ⁽²⁺⁾	-18,52	-14,7 (Ni(OH) ₂) ^[298]	29	-0,26 ⁽²⁺⁾	1,91	7,63	3d ⁸ 4s ²	Ni
Al	1,23	1,19	h ⁽³⁺⁾	-	-32,9 (Al(OH) ₃) ^[300]	19	-1,66 ⁽³⁺⁾	1,61	5,98	3s ² 3p ¹	Al
Pd	1,18	0,34	s ⁽²⁺⁾	-	-	8	0,95 ⁽²⁺⁾	2,20	8,34	4d ¹⁰	Pd
Zn	0,53	0,53	m ⁽²⁺⁾	-25,70	-16,4 ⁽²⁺⁾ [298]	37	-0,76 ⁽²⁺⁾	1,65	9,39	3d ¹⁰ 4s ²	Zn
Pb	0,38	0,15	m ⁽²⁺⁾	-27,52	-15,2 ⁽²⁺⁾ [298]	34	-0,13 ⁽²⁺⁾	2,33	7,42	4f ¹⁴ 5d ¹⁰ 6s ² 6p ²	Pb
Pt	0,17	0,11	s ⁽²⁺⁾	-	-	6	1,18 ⁽²⁺⁾	2,28	9,02	4f ¹⁴ 5d ⁹ 6s ¹	Pt
Ti	0,08	0,13	h ⁽⁴⁺⁾	-	-	7	-1,63/-1,37 ^(2+/3+)	1,65	6,82	3d ² 4s ²	Ti
Mn	0,04	0,14	-	-13,52	-	-	-1,18 ⁽²⁺⁾	1,55	7,43	3d ⁵ 4s ²	Mn
Cr	-0,04	0,08	h ⁽³⁺⁾	-	-	21	-0,91/-0,74 ^(2+/3+)	1,66	6,76	3d ⁵ 4s ¹	Cr
Sn	-0,04	0,13	h ⁽²⁺⁾	-26,00	-26,2/-64,5 ^(2+/4+) [298]	15	-0,14 ⁽²⁺⁾	1,96	7,34	4d ¹⁰ 5s ² 5p ²	Sn
Au	-0,07	0,09	s (+)	** -	-	4	1,69/1,49 ^(+/3+)	2,54	9,22	4f ¹⁴ 5d ¹⁰ 6s ¹	Au
Nb	-0,08	-0,09	-	-	-	-	-1,10 ⁽³⁺⁾	1,60	6,88	4d ⁴ 5s ¹	Nb
Qu.	[2,301]	[2,301]	[295]	[302,303]	siehe Einträge		[1]	[93]	[93]	[93]	Qu.

Abtötungswirkung

Zur Korrelation der in Tabelle 6 gelisteten Eigenschaften muss berücksichtigt werden, dass die hier verwendeten Abtötungsraten k entsprechend der JIS-Versuchsmethode ermittelt wurden. Diese schreibt ein konstant flüssiges Milieu über eine Wirkzeit von 24 h vor, wodurch eine starke Ausprägung korrosiver Effekte und damit der Ionenwirkung zu erwarten ist. Aus der Studie von Kawakami *et al.* geht hervor, dass Cu und Ag ein starkes ($k > 11$), Co und Ni ein mittelstarkes ($3 > k > 2$) und einige andere Metalle ein schwach abtötendes bis inertes Verhalten gegenüber Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien zeigen.^[2] Obwohl Hg als stark zytotoxisches Metall nicht in der Studie von Kawakami *et al.* berücksichtigt wurde, ist dessen Betrachtung sinnvoll, um die aufgestellten Eigenschaftskorrelationen zu stützen.

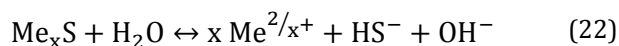
Ioneneigenschaften

Die antibakterielle Wirkung von Kupfer und Silber definiert sich primär über die Wirkung der gelösten Ionen. Es ist somit anzunehmen, dass sich die antibakterielle Wirkung von Metallen allgemein von den spezifischen Bindungsmöglichkeiten derer Ionen zu organischen Verbindungen ableitet, die den mikrobiologischen Toxizitätsmechanismen zu Grunde liegen.

Eine Möglichkeit, die Reaktivität von Ionen zu untergliedern, stellt das *hard and soft acid and base*-Konzept (HSAB- bzw. Pearson-Konzept) dar. Dieses ordnet Ionen, Molekülen und Atomen einen harten, weichen oder mittleren Charakter als Säure bzw. -Base zu.^[295] Weiche Teilchen im Sinne des HSAB-Konzepts weisen hierbei ein niedriges Ladungs-zu-Radius-Verhältnis und damit eine niedrige Ladungsdichte auf und sind generell leicht polarisierbar. Harte Teilchen weisen eine hohe Ladungsdichte auf und sind schwer polarisierbar, wirken selbst aber stark polarisierend.^[104] In Tabelle 6 ist erkennbar, dass der Ionenform der als antibakteriell eingestuften Metalle Hg, Cu, Ag, Co und Ni ein weicher bis mittlerer Charakter zugeordnet wird. Somit ließe sich ableiten, dass ein weicher, leicht polarisierbarer Charakter eines Metallions antibakterielles Verhalten begünstigt. Ausnahmen zu dieser These stellen Pd, Pt und Au dar, die keine wahrnehmbare Abtötungswirkung zeigten, deren Ionen aber als weich eingestuft werden.

Laut Ahrland *et al.* tendieren weiche Metallionen verstärkt dazu, Schwefelverbindungen einzugehen.^[295] Andere Studien legen nahe, dass die Thiophilizität, die spezifische Bindungsaffinität zu Schwefel, eine Gemeinsamkeit bei antibakteriell wirkenden Metallionen darstellt^[58,59,304]. Nies *et al.* diskutierten einen Zusammenhang zwischen der wachstumshemmenden Wirkung der Metallionen und der Löslichkeit der Sulfidverbindung eines Metalls.^[302] Diese wurde als indirektes Maß für die Thiophilizität der metallischen Ionen herangezogen und in Form des pK_L -Werts des Löslichkeitsprodukts der Sulfidverbindung $K_{L(\text{MeS})}$ in Tabelle 6 gelistet.

Die zu Grunde liegenden Gleichgewichtsreaktionen für die Sulfidlöslichkeit in Wasser lauten:



wobei x Werte von 1 oder 2 annimmt und Me das entsprechende Metall darstellt. Ein niedrigerer, negativerer pK_L -Wert bezeichnet eine geringere Sulfidlöslichkeit, was mit einer höheren Thiophilizität des Metallions assoziiert wird. Vergleicht man die Löslichkeit der Sulfidverbindungen der jeweiligen Metalle mit deren Abtötungsverhalten, so fällt auf, dass die Ionen der stark antibakteriellen Elemente Cu, Ag und Hg eine hohe Thiophilizität ($\text{pK}_{L(\text{MeS})} < -35$) aufweisen und sich damit deutlich von den übrigen Elementen abheben. Mit Ausnahme von Au, dessen Thiophilizität ebenfalls als hoch eingestuft wird^[58,297], ist somit generell die Tendenz erkennbar, dass Metalle, deren Ionen eine ausgeprägte Thiophilizität zeigen, auch eine starke Abtötungswirkung ausüben.

Korrosionsverhalten

Entsprechend der zu den Ioneneigenschaften aufgestellten Thesen wäre zu folgern, dass auch metallisches Au, Pt und Pd aufgrund des weichen Ionencharakters und der bei Au ausgeprägten Thiophilizität ein messbares Abtötungsverhalten zeigen. Dies war im von Kawakami *et al.* durchgeführten Experiment jedoch nicht der Fall. Da die in dieser Arbeit gezeigten Versuche nahelegen, dass die Konzentration der abgegebenen Kupferionen für die Abtötungswirkung entscheidend sein kann, wurden weitere Materialkenngrößen herangezogen, um die korrosive Freisetzung von Ionen aus dem Metall abzubilden.

Es ist anzunehmen, dass sich während des von Kawakami *et al.* eingesetzten JIS-Verfahrens über die Zeitspanne von 24 h die jeweils stabilsten Oxid- bzw. Hydroxidverbindungen des jeweiligen Metalls in wässriger Lösung ausbilden und diese den Ionenabgabeprozess steuern. Speziell für Co, Ni und Al sind nicht die metallischen Oxide, sondern die Hydroxide in neutralen wässrigen Lösungen stabil.^[1,300,305] Für Kupfer wurde gezeigt, dass die zwischen CuO und Cu₂O abweichende antibakterielle Wirkung über eine unterschiedliche Oxidlöslichkeit interpretiert werden kann. In Tabelle 6 wurde daher die Oxid- bzw. Hydroxidlöslichkeit durch den entsprechenden pK_L -Wert des metallischen Oxids bzw. Hydroxids in Wasser abgebildet. Die entsprechenden Gleichgewichtsreaktionen unterscheiden sich je nach Oxidationsstufe und Verbindungstyp und sind in den angegebenen Quellen zu finden. Hierbei ist zu beachten, dass Löslichkeitsprodukte generell experimentell schwer präzise zu bestimmen sind und Angaben aus verschiedenen Quellen schwanken.^[298,306] In Tabelle 6 wurden jeweils die aktuellsten bzw. aus mehreren Quellen abgesicherte Angaben verwendet.

Um das Korrosionsverhalten unter realen Bedingungen zu berücksichtigen, wurde weiterhin der nach Pourbaix definierte „praktische“ Edelcharakter (EC) herangezogen.^[1]

Dieser beschreibt die allgemeine, pH- und spannungsübergreifende Korrosionsresistenz eines Metalls entsprechend den im Pourbaix-Diagramm vorliegenden Stabilitäts-, Passivierungs- und Korrosionsbereichen. Hiernach werden alle metallischen Elemente vom „praktisch“ edelsten bis zum unedelsten ansteigend durchnummeriert. Diese Einteilung kann von der thermodynamischen Einteilung nach dem elektrochemischen Standardpotential E_0 abweichen (siehe z.B. Ti), die ebenfalls in Tabelle 6 angeführt ist.

Im allgemeinen Vergleich fällt auf, dass die Löslichkeit von Cu_2O und die der Silberoxide relativ hoch liegt ($\text{pK}_L > -10$). Die Löslichkeit der Hydroxide von Co und Ni ist um mehrere Stufen niedriger, was, neben dem weniger weichen Ionencharakter, ebenfalls die bei diesen Metallen verringerte Abtötungswirkung erklären könnte. Dementsprechend ließe sich die für Kupferoxide formulierte These des löslichkeitsgesteuerten Abtötungsverhaltens in einem gewissen Rahmen auch mit elementübergreifender Gültigkeit formulieren. Für die edlen Metalle Pd, Pt und Au mit weichem ionischen Charakter gilt, dass diese in neutralen, wässrigen Lösungen unter Normalbedingungen vollkommen stabil sind und kein maßgebliches Oxid ausbilden bzw. keine Ionen in Lösung treten.^[1] Dieses Verhalten spiegelt sich deutlich in EC und E_0 wieder. Somit würde sich die ausbleibende antibakterielle Wirkung von Pd, Pt und Au trotz weichem ionischen Charakter dadurch erklären, dass diese Metalle während eines standardisierten Abtötungsversuchs keine nennenswerten Mengen an Ionen abgeben. Diese These wird durch die Beobachtung gestützt, dass bei Goldionen in gelöster, komplexierter Form sehr wohl ein antibakterielles Verhalten nachgewiesen wurde.^[297]

Atomare Eigenschaften

Einige der bisher betrachteten Größen beziehen sich auf Affinitäten zu bestimmten Stoffen (S, O), die wiederum von den möglichen Bindungsverhältnissen der beteiligten Elemente auf atomarem Level abhängen. Somit wäre es denkbar, dass die antibakterielle Wirkung eines metallischen Werkstoffs bereits durch den spezifischen atomaren Aufbau des Metalls bestimmt wird. Um dies zu überprüfen, wurden die Elektronegativität (χ) entsprechend der Pauling-Skala, die erste Ionisierungsenergie (IE) sowie die Elektronenkonfiguration der metallischen Elemente in Tabelle 6 mit einbezogen.

Sowohl die Elektronegativität als auch die Ionisierungsenergie und der ionische Charakter entsprechend des HSAB-Konzepts hängen mit der Kernladungszahl und dem Atomradius zusammen.^[104] Somit erklärt sich, dass ein weicherer Ionencharakter generell bei einer höheren Elektronegativität und bei höherer Ionisierungsenergie auftritt. Betrachtet man die Metalle Cu, Ag, Co und Ni, die laut Kawakami *et al.* eine maßgebliche antibakterielle Wirkung zeigen^[2], so ist auffällig, dass sowohl die Elektronegativitäten als auch die Ionisierungsenergien dieser Elemente in einem vergleichsweise engen Intervall liegen (χ : 1,88 – 1,93; IE: 7,58 – 7,88 eV). Dies unterstreicht eine gewisse Ähnlichkeit dieser Elemente auf atomarer

Ebene. Die theoretische Elektronenkonfiguration von Cu, Ag, Co und Ni zeichnet sich durch ein vollbesetztes s-Orbital und ein nahezu vollbesetztes d-Orbital aus, wodurch diese sich von den übrigen betrachteten Elementen – mit Ausnahme von Au – hervorheben. Da auch für komplexierte Goldionen ein antibakterieller Charakter nachgewiesen wurde^[297], wäre sogar denkbar, dass gerade die besondere Elektronenkonfiguration der Elemente der Kupfergruppe (theoretisch: $xd^9 ys^2$, praktisch: $xd^{10} ys^1$), die auch für deren hohe thermische und elektrische Leitfähigkeit verantwortlich ist, eine Ursache für das antibakterielle Verhalten deren Ionen darstellt. Generell ist zu beachten, dass diese auf physikalischer Ebene hergestellten Zusammenhänge lediglich eine erste, sehr grobe Korrelation darstellen und daher unter entsprechendem Vorbehalt betrachtet werden müssen.

Elementübergreifende Interpretation

In Abbildung 41 sind der relative Einfluss und der abgeschätzte Stellenwert verschiedener Einflussgrößen für das antibakterielle Verhalten eines metallischen Werkstoffs zusammengefasst. Hierbei wurden der aktuelle Stand der Forschung, die mit Hilfe von Tabelle 6 hergeleiteten Thesen und die in dieser Arbeit experimentell gewonnenen Ergebnisse berücksichtigt.

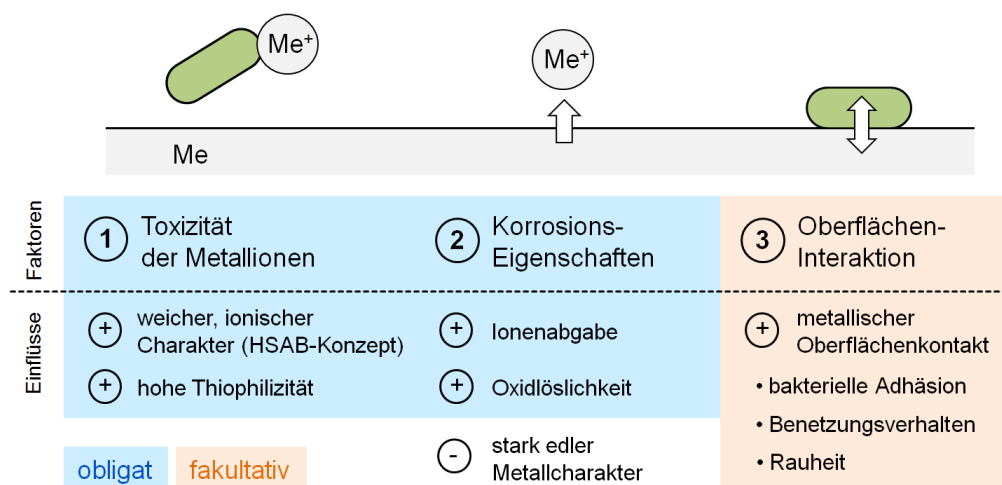


Abbildung 41: Zusammenfassung des abgeschätzten Einflusses und Stellenwerts wichtiger Faktoren für das antibakterielle Verhalten metallischer Werkstoffe.

Als **primär notwendige Eigenschaften** für ein antibakterielles Materialverhalten bei Metallen werden eine weicher Charakter und eine hohe Thiophilizität der metallischen Ionen gewertet. Weiterhin wird eine ausreichend hohe Ionenabgabe vorausgesetzt, die, wie im Falle von Kupfer in dieser Arbeit nachgewiesen, über die Löslichkeit oberflächennaher Oxidverbindungen gesteuert wird. Ein stark edler Metallcharakter verringert hingegen die Wahrscheinlichkeit eines antibakteriellen Verhaltens. Metalle, die diese Voraussetzungen nicht vollständig erfüllen (z.B. Gold: passender ionischer Charakter aber keine maßgebliche Ionenabgabe)

zeigen ein vernachlässigbares bis kein antibakterielles Verhalten. Aus diesem Grund werden die bisher aufgezählten Faktoren als obligate Primäreigenschaften gewertet.

Die in dieser Arbeit an Kupfer gewonnenen Erkenntnisse lassen vermuten, dass noch weitere, als fakultativ angenommene, **sekundäre Einflussgrößen** die Stärke des antibakteriellen Verhaltens von metallischen Werkstoffen mitbestimmen. Nachweislich positiv wirkte sich hierbei der direkte Kontakt zwischen Bakterium und Oberfläche aus. Demnach ist anzunehmen, dass auch die Adhäsionseigenschaften metallischer Oberflächen gegenüber Bakterien einen Einfluss auf das Abtötungsverhalten ausüben. Weiterhin wurde exemplarisch nachgewiesen, dass auch die Benetzungseigenschaften und die relative Oberflächenrauheit einen Einfluss auf die antibakterielle Wirkung bei Kupferwerkstoffen ausüben.^[87,237] Im Vergleich zu den primären Einflussfaktoren werden die vermuteten Sekundärfaktoren allgemein als schwächer eingestuft und bedürfen teilweise noch umfassenderer, wissenschaftlicher Nachweise. Den Sekundärfaktoren ist gemein, dass diese größtenteils durch spezifische Interaktionen zwischen Materialoberfläche und Bakterium bestimmt werden, weshalb diese unter dem Begriff der Oberflächeninteraktion zusammengefasst wurden. Es ist vorstellbar, dass sowohl materialabhängige (Adhäsions-, Benetzungseigenschaften) als auch materialunabhängige (Rauheit, Topographiegrößenordnung) Sekundärfaktoren existieren. Dieser Schluss legt nahe, dass die antibakterielle Effizienz eines metallischen Werkstoffs durch eine zusätzliche materialunabhängige Oberflächenfunktionalisierung optimiert werden kann.

Die in Abbildung 41 modellhaft dargestellte Interpretation stellt eine erste Annäherung zur Vorhersage und Aufklärung des antibakteriellen Verhaltens von Metallen dar. Es ist festzuhalten, dass die angestellten Überlegungen auf Ergebnissen basieren, die in flüssigem Milieu (^[2], JIZ) erzielt wurden und daher nur bedingt Rückschlüsse für den trockenen Anwendungsbereich, wie beispielsweise Türgriffe im Innenraum, zulassen. Da jedoch jegliche Interaktion mit Haut bzw. Bakterien mit einem gewissen Maß an Flüssigkeit (Hautschweiß, Bakterien bestehen zu ca. 80 Gew.-% aus Wasser) einhergeht, können die in flüssigem Milieu bestimmten Mechanismen auch in diesem Fall als näherungsweise gültig betrachtet werden. Kawakami *et al.* führten die Abtötungsversuche entsprechend des JIS-Testprotokolls bei leicht erhöhter Temperatur von 35 °C durch. Generell wurde festgestellt, dass die Bakterienabtötung bei höheren Temperaturen schneller abläuft.^[68,78] Für die Studie von Kawakami *et al.* ist daher davon auszugehen, dass die Abtötungsraten im Vergleich zu Raumtemperaturexperimenten leicht, jedoch für alle Elemente einheitlich erhöht liegen.

2. Kupfer- und Silberwerkstoffe im Vergleich

Kupfer und Silber heben sich durch einen starken antibakteriellen Effekt deutlich von anderen Metallen hervor. Beide Elemente stellen somit die wichtigsten Materialien zur Gestaltung antibakterieller metallischer Werkstoffe dar. In diesem Abschnitt werden Gemeinsamkeiten und Unterscheidungsmerkmale beider Materialsysteme und deren Eignung für spezielle Anwendungsgebiete abschließend diskutiert.

Im vorherigen Abschnitt wurde hergeleitet, dass die starke antibakterielle Wirkung von Kupfer und Silber das Resultat einer gemeinsamen, spezifischen Kombination von physikalisch-chemischen Eigenschaften darstellt. In ionischer Form zeigen beide Elemente einen weichen, thiophilen Charakter, was die Wechselwirkung mit wichtigen organischen Gruppen und damit die Toxizität gegenüber Bakterien begünstigt. Beide Metalle bilden eine passivierende Oxidschicht und bei beiden Elementen zeigt mindestens ein Oxid (Cu_2O , Ag_2O) eine im Vergleich zu anderen Metalloxiden hohe Ionenlöslichkeit in wässrigen Lösungen, durch die ausreichende Mengen an Ionen für eine effektive Abtötung freigesetzt werden können. Für Kupferoxid entspricht der pK_L -Wert des Löslichkeitsprodukts ca. -23,5 (CuO) bzw. -9 (Cu_2O). Für Silber(I)-oxid (Ag_2O), welches unter Normalbedingungen und in wässrigen Lösungen die stabilste Oxidationsform von Silber darstellt^[1], wurden pK_L -Werte von -7,72 (1960; ^[307]), -7,71 (1963; ^[298]) und -7,75 (2013; ^[299]) bestimmt. Eine zu hohe Konzentration an Silber- bzw. Kupferionen kann auch auf eukaryontische Zellen und höher entwickelte Lebewesen toxisch wirken.^[104,186] Daher ist anzunehmen, dass gerade der halbedle bzw. leicht edle Charakter von metallischem Kupfer und Silber und die dadurch regulierte, nicht übermäßige Ionenabgabe entscheidend für den Einsatz dieser Metalle als bakterienabtötende, jedoch für den Menschen ungefährliche Materialien verantwortlich ist.

Auf mikrobiologisch-mechanistischer Ebene stellen die möglichen ionischen Oxidationszustände bei Kupfer und Silberionen ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal dar. Kupferionen können als Cu^{2+} und Cu^+ stabil in wässriger Lösung auftreten^[104], weshalb redoxinduzierte Toxizitätsmechanismen bei Kupferionen möglich sind. Im Gegensatz hierzu liegt ionisches Silber nahezu ausschließlich als Ag^+ vor, da Ag^{2+} und Ag^{3+} als starke Bildner unlöslicher Komplexe in wässriger Lösung nicht stabil sind.^[104] Es ist daher anzunehmen, dass spezielle Abtötungsmechanismen, wie die katalytische Erzeugung von radikalen Verbindungen entsprechend der Fenton-Reaktion (siehe S. 38), nicht durch Silberwerkstoffe ausgelöst werden können. Da beide Metalle nachgewiesenermaßen über mehrere, teilweise gleichzeitig ablaufende Toxizitätsmechanismen verfügen, wird jedoch vermutet, dass das Fehlen dieses Mechanismus die generelle antibakterielle Wirkung von Silberwerkstoffen nur schwach beeinflusst. Wie bereits in Einzelfällen nachgewiesen wurde, können spezielle Toxizitätsmechanismen eine Hauptrolle während des Abtötungsprozesses einnehmen.^[55] Es wäre

daher vorstellbar, dass Erreger, die erhöhte Resistenzen gegenüber Silber im Vergleich zu Kupferwerkstoffen zeigen, vorrangig durch radikale Hydroxylgruppen und weniger durch metallische Ionen angegriffen werden.

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal von Kupfer und Silber stellt die Biokompatibilität beider Metalle dar. Im Gegensatz zu Silber ist Kupfer ein essentielles Spurenelement für viele Organismen^[30]. Der empfohlene Tagesbedarf an Kupfer für einen Erwachsenen Menschen beträgt 0,9 mg.^[198] Da auch einige Bakterien eine geringe Menge an Kupfer als Nährstoff benötigen und sogar spezielle Membranproteine als Pumpen für die Regulation des Kupferhaushalts nutzen^[38,308], wäre denkbar, dass diese gegenüber Kupfer- weniger sensibel reagieren als gegenüber Silberionen. Sowohl der bei Silber fehlende Redoxcharakter, als auch die abweichende Biokompatibilität von Kupfer und Silber wären somit mögliche Ursachen für die beobachteten bakterienstammspezifischen Sensitivitäten gegenüber diesen beiden Ionentypen.^[44]

Anwendungsrelevanz

Die in diesem Kapitel aufgestellte Interpretation antibakteriellen Materialverhaltens ermöglicht erstmals eine genauere Erklärung des zwischen Kupfer- und Silberwerkstoffen beobachteten feuchtigkeitsabhängigen Wirksamkeitsunterschieds.

Entsprechend dem aktuellen Forschungsstand wird Silberwerkstoffen eine im Vergleich zu Kupfer stärkere antibakterielle Wirkung in flüssigem Umfeld zugeordnet. Silber bildet in wässrigen Lösungen Ag_2O als stabiles Oxid aus, welches mit einem pK_L -Wert von -7,7 eine relativ hohe Oxidlöslichkeit aufweist. Die Kupferoxide Cu_2O und CuO (pK_L -Wert von ca. -9 bzw. -23,5) weisen eine im Vergleich geringere Ionenlöslichkeit auf. Hinzu kommt, dass sich in Puffermedien während Abtötungsversuchen vorwiegend CuO auszubilden scheint, welches eine geringere Ionenabgabe und Abtötung im Vergleich zu Cu_2O zeigt. Es lässt sich somit folgern, dass Kupferwerkstoffe im Vergleich zu Silberwerkstoffen deshalb eine verringerte antibakterielle Wirkung bei feuchten Abtötungsverfahren zeigen, weil sich im Vergleich zum besser löslichen Ag_2O auf Kupfer schwerer lösliches CuO ausbildet.

Für den Einsatz antibakterieller metallischer Werkstoffe bedeutet dies, dass sich Silber generell für den feuchten Anwendungsbereich und Kupfer eher für den trockenen Anwendungsbereich eignet. Berücksichtigt man die bei Kupfer- im Vergleich zu Silberionen höhere Biokompatibilität, wäre es sinnvoll, für antibakterielle Werkstoffanwendungen, bei denen eine direkt Aufnahme metallischer Ionen in den Körper möglich ist (z.B. Lebensmittelbereich, chirurgischer Bereich), Kupfer- gegenüber Silberwerkstoffen vorzuziehen.

3. Legierungseinfluss bei Kupferwerkstoffen

Für reale antimikrobielle Anwendung wird Kupfer meist aufgrund seiner geringen Härte nicht in Reinform eingesetzt. In vielen der zu antimikrobiellen Kupferoberflächen in Krankenhäusern durchgeführten Feldstudien^[24,26,27,155] und wissenschaftlichen Arbeiten^[68,148] wurden daher Kupferlegierungen untersucht. Diese können in Kupfer-Zinn-(Bronze), Kupfer-Zink-(Messing), Kupfer-Nickel-Legierungen und komplexere Mehrstofflegierungen eingeteilt werden. Für das Verständnis und die Optimierung der antimikrobiellen Wirkung von Kupferlegierungen ist es daher entscheidend, den Einfluss der Legierungszusammensetzung zu erforschen. Da viele der an Kupferlegierungen durchgeführten Studien einen rein mikrobiologisch-nachweisenden Charakter haben und wenig materialwissenschaftliche Aufklärung betrieben wurde, ist dieser bisher weitgehend ungeklärt. Dieses Kapitel verfolgt daher den Ansatz, die Ergebnisse der bisher durchgeführten Studien an Kupferlegierungen unter Beachtung der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zusammenfassend zu interpretieren.

Zu diesem Zweck wurden in Tabelle 7 alle seit 2004 durchgeführten (Stand: 18.02.15) Studien an Kupferlegierungen zusammengestellt, die das Abtötungsverhalten quantitativ beschreiben. Die Studienergebnisse wurden entsprechend der Legierungszusammensetzung geordnet und durchnummeriert. Um einen studienübergreifenden Wirksamkeitsvergleich zu ermöglichen, wurde die antimikrobielle Effizienz für alle Arbeiten in eine einheitliche Abtötungsrate Z umgerechnet. Diese wurde definiert als die logarithmische Reduzierung der Erreger pro Zeit in Minuten. Der Eintrag „[7/30] 0,233“ in Zeile 8 beispielsweise bedeutet eine Reduzierung der Ausgangskonzentration an Bakterien um den Faktor 10^7 innerhalb von 30 min, was einer Rate Z von 0,233 entspricht. Hierbei stellt $Z > 0,5$ ein relativ starkes und $Z < 0,05$ ein relativ schwaches Abtötungsverhalten dar. Falls aus der entsprechenden Studie ersichtlich, wurde hierfür die benötigte Zeit bis zur vollständigen Abtötung verwendet, ansonsten die Zeit bis zur maximal erfassten Reduktion.

Um anhand von Tabelle 7 auch die Einflüsse der in der jeweiligen Studie verwendeten Testmethode und Probenpräparation nachvollziehen zu können, werden außerdem wichtige Methodenparameter und präparative Schritte gelistet. Der jeweils getestete Erreger wird ebenfalls angegeben, um die Breitbandwirkung gegenüber Bakterien, Viren und Pilzen und den Einfluss des Bakterientyps abzubilden.

Tabelle 7: Nach Materialien geordnete Zusammenstellung von Forschungsarbeiten, die die antimikrobielle Wirkung von Kupferwerkstoffen durch Abtötungstests quantitativ erfassen. Von links nach rechts aufgeführt sind: die Zeilennummer (Nr.) die Zusammensetzung des Werkstoffs sowie der relative Kupferanteil in Gew.-% auf 1 % gerundet (Rot: 100 – 90, Orange: 89 – 80, Gelb: 79 – 70, Weiß: < 70 %); die Abtötungsrate Z, die als die logarithmische Reduzierung der Ausgangskonzentration an Erregern pro Zeiteinheit in log-Stufen pro Minuten (eckige Klammern) definiert wurde; die jeweils verwendete Testmethode und wichtige Umgebungsbedingungen (Meth.); präparative Maßnahmen sowie die im letzten Säuberungs- bzw. Desinfektionsschritt der Proben verwendete Lösung (Präparation); der/die getestete Erreger bzw. Bakterienspezies; die entsprechende Literaturquelle (Q.). Die gelisteten Studien wurden mit Ausnahme von ^[74] (Zeile 4, 35 °C) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Farbskalierung der Abtötungsrate Z von Weiß, Gelb, Orange nach Rot entspricht einer ansteigenden Abtötungsrate.

Legende: T = Bakterienlösung wurde als Tropfen aufgebracht; S = Bakterienlösung wurde spreitend aufgebracht; A = atmosphäre Bedingungen; DP = *dry plating* (Bakterienlösung wurde mit Wattebausch aufgetragen, danach atmosphärische Bedingungen); WP = *wet plating* (aufgebrachte Bakterienlösung wurde in abgeschlossener oder feuchter Atmosphäre gelagert); JIS = Japanische Industriestandardmethode JIS Z 2801 (eine ausführliche Beschreibung der verschiedenen Testmethoden findet sich ab S. 13); H₂SO₄ = verdünnte Schwefelsäure wurde zum Lösen von Oberflächenoxid eingesetzt; F = die Proben wurden in der Flamme sterilisiert.

Nr.	Material	% Cu	Abtötungsrate [log ₁₀ /min] Z	Meth.	Präparation	Erreger bzw. Bakterium	Q.
Kupfer							
1	Cu	100	[7/80] 0,087	T, A	F	<i>S. aureus</i> (MRSA)	[76]
2	Cu	100	[6/5] 1,200	T, A	Ethanol	<i>C. albicans</i> (Pilz)	[54]
3	Cu	100	[6/7] 0,857	DP	H ₂ SO ₄ , Ethanol	<i>S. haemolyticus</i>	[55]
4	Cu	100	[7/85] 0,082	JIS	Aceton, F	<i>S. aureus</i> (MRSA)	[74]
5	Cu	100	[7,5/10] 0,750	T, A	H ₂ SO ₄ , Ethanol	<i>S. enteritidis</i>	[77]
6	Cu	100	[7/120] 0,058	WP	H ₂ SO ₄ , Wasser	<i>E. coli</i>	[66]
7	Cu	100	[7/5] 1,400	DP	Wasser	<i>E. coli</i>	[66]
8	Cu	100	[7/30] 0,233	WP	Wasser	<i>E. coli</i>	[66]
9	Cu	100	[8/1] 8,000	DP	H ₂ SO ₄ , Ethanol	<i>E. coli</i>	[51]
10	Cu	100	[9/1] 9,000	DP	H ₂ SO ₄ , Ethanol	<i>E. coli</i>	[75]
11	Cu	100	[7/240] 0,029	T, A	H ₂ SO ₄ , Ethanol	<i>P. aeruginosa</i>	[78]
12	Cu	100	[2,8/360] 0,008	T, A	F	<i>C. difficile</i> (Sporen)	[79]
13	Cu	99	[4,1/360] 0,011	T, A	F	<i>E. coli</i> -	[80]
14	Cu	99	[3,7/360] 0,010	T, A	F	<i>K. pneumoniae</i>	[80]
15	Cu	99	[7/90] 0,078	WP	Ethanol	<i>S. aureus</i> (MRSA)	[309]
16	Cu	-	[4/360] 0,011	T, A	-	Influenza A (Virus)	[81]
17	Cu	-	[4/240] 0,017	WP	-	<i>S. enterica</i>	[67]
18	Cu	-	[7/50] 0,140	T, A	Aceton, F	<i>S. aureus</i> (MRSA)	[82]
19	Cu	-	[5,5/1440] 0,004	T, A	Aceton, F	<i>C. difficile</i>	[83]
20	Cu (elektropl.)	-	[7/60] 0,117	WP	Wasser	<i>E. coli</i>	[66]
21	Cu ₂ O (therm.)	-	[2,5/60] 0,042	WP	Wasser	<i>E. coli</i>	[66]
Bronzelegierungen							
22	CuSn5P	95	[7/15] 0,467	T, A	H ₂ SO ₄ , Ethanol	<i>S. enteritidis</i>	[77]
23	CuSn5P	95	[7,5/105] 0,071	WP	Ethanol	<i>E. coli</i>	[68]
24	CuSn5P	95	[7/240] 0,029	WP	H ₂ SO ₄ , Wasser	<i>E. coli</i>	[66]
25	CuSn5P	95	[2/480] 0,004	T, A	H ₂ SO ₄ , Ethanol	<i>P. aeruginosa</i>	[78]
26	CuNi15Sn8	77	[7,5/360] 0,021	WP	Ethanol	<i>E. coli</i>	[68]

Nr.	Material	% Cu	Abtötungsrate [log ₁₀ /min] Z	Meth.	Präparation	Erreger bzw. Bakterium	Q.
Messinglegierungen							
27	CuZn10	90	[5/60] 0,083	WP	Ethanol	<i>L. monocytogenes</i>	[69]
28	CuZn20	80	[7/270] 0,026	T, A	Aceton, F	<i>S. aureus</i> (MRSA)	[82]
29	CuZn20	80	[7/270] 0,026	WP	Ethanol	<i>S. aureus</i> (MRSA)	[309]
30	CuZn30	70	[7/15] 0,467	T, A	H ₂ SO ₄ , Ethanol	<i>S. enteritidis</i>	[77]
31	CuZn30	70	[7/360] 0,019	WP	H ₂ SO ₄ , Wasser	<i>E. coli</i>	[66]
32	CuZn37	63	[2,9/360] 0,008	T, A	F	<i>E. coli</i>	[80]
33	CuZn37	63	[2,3/360] 0,006	T, A	F	<i>K. pneumoniae</i>	[80]
34	CuZn40	60	[3/15] 0,200	T, A	H ₂ SO ₄ , Ethanol	<i>S. enteritidis</i>	[77]
35	CuZn40	60	[9/15] 0,600	DP	H ₂ SO ₄ , Ethanol	<i>E. coli</i>	[75]
36	CuZn10Ni18	72	[7,5/90] 0,083	WP	Ethanol	<i>E. coli</i>	[68]
37	CuZn17Ni18	65	[7/15] 0,467	T, A	H ₂ SO ₄ , Ethanol	<i>S. enteritidis</i>	[77]
38	CuZn17Ni18	65	[7,5/105] 0,071	WP	Ethanol	<i>E. coli</i>	[68]
39	CuZn17Ni18	65	[7/90] 0,078	WP	Ethanol	<i>L. monocytogenes</i>	[69]
40	CuZn21Ni18	61	[6/30] 0,200	T, A	Ethanol	<i>C. albicans</i> (Pilz)	[54]
41	CuZn21Ni18	61	[3/360] 0,008	WP	Ethanol	<i>S. aureus</i> (MRSA)	[309]
42	CuZn21Ni18	61	[9/5] 1,800	DP	H ₂ SO ₄ , Ethanol	<i>E. coli</i>	[75]
43	CuZn27Ni18	55	[2,5/360] 0,007	WP	Ethanol	<i>E. coli</i>	[68]
44	CuZn37Sn1Pb1	61	[4/360] 0,011	S, A	Aceton, F	<i>E. coli</i>	[148]
45	CuZn5Sn5Pb5	85	[7,5/180] 0,042	S, A	Aceton, F	<i>E. coli</i>	[148]
46	CuZn12Mn7Ni	78	[7,5/120] 0,063	WP	Ethanol	<i>E. coli</i>	[68]
47	CuZn4Sn1,5Pb	93	[7,5/270] 0,028	S, A	Aceton, F	<i>E. coli</i>	[148]
48	CuZn23Al3	74	[7,5/270] 0,028	WP	Ethanol	<i>E. coli</i>	[68]
49	CuZn5Al5Sn	89	[6/60] 0,100	T, A	Ethanol	<i>C. albicans</i> (Pilz)	[54]
Kupfer-Nickel-Legierungen							
50	CuNi21	79	[7,5/120] 0,063	WP	Ethanol	<i>E. coli</i>	[68]
51	CuNi25	75	[7,5/120] 0,063	WP	Ethanol	<i>E. coli</i>	[68]
52	CuNi30	70	[3,5/360] 0,010	WP	Ethanol	<i>E. coli</i>	[68]
53	CuNi10Fe1	89	[7/15] 0,467	T, A	H ₂ SO ₄ , Ethanol	<i>S. enteritidis</i>	[77]
54	CuNi10Fe1	89	[5/2880] 0,002	T, A	Aceton, F	<i>C. difficile</i>	[83]
55	CuNi10Fe1	89	[7,5/105] 0,071	WP	Ethanol	<i>E. coli</i>	[68]
56	CuNi10Fe1	89	[2/60] 0,033	WP	Ethanol	<i>L. monocytogenes</i>	[69]
57	CuNi10Fe1	89	[7/480] 0,015	T, A	H ₂ SO ₄ , Ethanol	<i>P. aeruginosa</i>	[78]
58	CuNi10Fe1	89	[7/360] 0,019	WP	H ₂ SO ₄ , Wasser	<i>E. coli</i>	[66]
59	CuNi3SiMg	96	[7,5/105] 0,071	WP	Ethanol	<i>E. coli</i>	[68]
60	CuNi20Zn6Sn4	70	[4,5/360] 0,013	S, A	Aceton, F	<i>E. coli</i>	[148]
sonstige Kupferlegierungen							
61	CuFeP	99	[7,5/75] 0,100	WP	Ethanol	<i>E. coli</i>	[68]
62	CuAl8Ni2	90	[7,5/180] 0,042	WP	Ethanol	<i>E. coli</i>	[68]
63	CuAl3Si2	95	[7,5/90] 0,083	WP	Ethanol	<i>E. coli</i>	[68]
64	CuAl3Si2	95	[5/60] 0,083	WP	Ethanol	<i>L. monocytogenes</i>	[69]
65	CuSi1Mn1	98	[7,5/65] 0,115	WP	Ethanol	<i>E. coli</i>	[68]
66	CuSi2Mn1	97	[5/60] 0,083	WP	Ethanol	<i>L. monocytogenes</i>	[69]
67	CuSi4Mn1	95	[7,5/75] 0,100	S, A	Aceton, F	<i>E. coli</i>	[148]
68	CuCrFeSi	99	[7,5/75] 0,100	WP	Ethanol	<i>E. coli</i>	[68]
69	CuAl9Ni5Fe4Mn	80	[3,5/350] 0,010	S, A	Aceton, F	<i>E. coli</i>	[148]
70	CuAl11Ni4Fe4Mn3	78	[1/360] 0,003	S, A	Aceton, F	<i>E. coli</i>	[148]

Anhand von Tabelle 7 sind zunächst zwei wichtige Tatsachen erkennbar:

Zum einen scheint die Abtötungswirkung von reinem Kupfer im Vergleich zu seinen Legierungen studienübergreifend höher zu liegen (vgl. Zeilen 5 & 21, 8 & 31, 15 & 41). Dies würde bedeuten, dass durch Zulegieren weiterer Metalle die antibakterielle Wirkung von Kupfer generell herabgesetzt wird.

Zum anderen existieren teilweise sehr starke Schwankungen der Abtötungsrate zwischen verschiedenen Versuchen, die den gleichen Erreger und ein gleiches bzw. ähnliches Material einsetzen (vgl. Zeilen 6-10, 32 & 48, 55 & 58). Diese Diskrepanz lässt vermuten, dass bei einem studienübergreifenden Vergleich neben der Materialzusammensetzung weitere Einflüsse berücksichtigt werden müssen.

Die folgende Diskussion der in Tabelle 7 dargestellten Ergebnisse findet daher in zwei Schritten statt. Zunächst werden die Einflüsse verschiedener Methoden von Abtötungstests und der Probenpräparation bewertet. Darauf aufbauend werden die Rolle des Kupfergehalts der Legierung und der generelle Einfluss von Legierungselementen betrachtet.

3.1 Methoden- und Präparationseinfluss

Bei einem Vergleich der in Tabelle 7 berechneten Abtötungsraten Z für Versuche mit *E. coli* auf reinem Kupfer (z.B. Zeilen 6-10) ist exemplarisch erkennbar, dass bei gleichem Ausgangsmaterial je nach Experiment starke Schwankungen von bis zu mehreren $\log \text{ min}^{-1}$ auftreten. Da diese unabhängig von der Materialzusammensetzung und den Bakterieneigenschaften sind, wird ein starker Einfluss der Testmethode bzw. der Probenpräparation vermutet.

Eine detaillierte Beschreibung der verschiedenen **Methodenvarianten** von Abtötungstests findet sich ab S. 13. Generell ist anhand Tabelle 7 erkennbar, dass sowohl für Kupferlegierungen als auch bei reinem Kupfer das *dry plating* im Vergleich zum *wet plating* zu wesentlich schnelleren Abtötungsraten führt (vgl. Zeilen 7 & 8, 34 & 35, 41 & 42). Diese Beobachtung wurde bei Kupfer bisher dadurch erklärt, dass sich eine erhöhte Kupferionenkonzentration in dem beim *dry plating* wesentlich geringeren Flüssigkeitsvolumen ausbildet.^[51,74] In dieser Arbeit durchgeführte Studien legen nahe, dass auch der beim *dry plating* erzwungene Kontakt zwischen Bakterium und metallischer Oberfläche hierfür verantwortlich sein könnte.

Auch im Vergleich zwischen Studien, die einheitlich das *wet plating* einsetzen, können bei gleichem Erreger und Material unterschiedliche Abtötungsraten beobachtet werden (vgl. Zeilen 6, 8 & 13). In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass beispielweise das TRIS-Puffermedium stärker korrosiv wirkt als das PBS-Medium. Deshalb ist davon auszugehen, dass ein unterschiedlich korrosiver Charakter bei variierenden Rezepten für Puffermedien auch bei den in Tabelle 7 aufgeführten Studien eine wesentliche Einflussgröße ausmacht.^[160]

Vor Abtötungsversuchen stellt die Sterilisation der Proben, d.h. das Entfernen/Abtöten aller vorhandenen Mikroorganismen einen elementaren Schritt bei der **Probenpräparation** dar. Hierzu werden thermische und chemische Verfahren eingesetzt, die auch die Probenoberfläche beeinflussen.

Bei einigen in Tabelle 7 gelisteten Studien wurde die Sterilisation der Proben in der Flamme durchgeführt (z.B. Zeile 1, 12, 14, 28, 32). Hierbei ist zu vermuten, dass durch die thermische Behandlung die Oberflächenoxidation verstärkt wird. In anderen Studien wurde bereits die atmosphärische Oxidation von Kupferwerkstoffen berücksichtigt und deshalb eine vorbereitende Spülung der Proben mit verdünnter Schwefelsäure durchgeführt, um Kupferoxide vor dem Versuch gezielt zu entfernen (z.B. Zeile 3, 5, 6, 11, 25). Beide Herangehensweisen beeinflussen unmittelbar den Oxidationszustand der Probenoberfläche. Wie in dieser Arbeit gezeigt, variiert das Abtötungsverhalten von Kupfer je nach Art der Oxidausbildung extrem stark.

Bei einem Vergleich der chemischen Mittel zur Probensterilisation wird Ethanol als unbedenkliches, neutrales Mittel eingeschätzt. Im Gegensatz dazu ist jedoch die ebenfalls etablierte Behandlung mit Aceton (z.B. Zeile 18, 28, 45, 60) fragwürdig, da dieses sich mit Kupfer nicht chemisch neutral verhält. Unter Tageslichteinfluss kann eine photochemische Reaktion mit Aceton zur Oxidation von Kupfer und zur Bildung von Kupferacetat führen.^[310] Auswirkungen dieses Prozesses auf das Abtötungsverhalten von Kupferoberflächen sind nicht auszuschließen.

Neben der chemischen Probenpräparation wurde nachgewiesen, dass auch die Oberflächenrauheit als präparativer Aspekt einen Einfluss auf das Abtötungsverhalten von Bakterien ausübt.^[237] Dies findet bisher jedoch wenig Berücksichtigung und entsprechende Angaben zu Oberflächenkennwerten werden in mikrobiologischen Studien oft nicht geliefert.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass ein studienübergreifender Vergleich des Abtötungsverhaltens von Kupferwerkstoffen nur bedingt belastbare Rückschlüsse erlaubt. Methoden- und präparationsspezifische Einflussfaktoren, die entweder nicht aufgeführt, nicht hinreichend aufgeklärt oder nur schwer abzuschätzen sind, können starke, zusammensetzungsunabhängige Schwankungen des Abtötungsverhaltens verursachen.

3.2 Einfluss der Legierungszusammensetzung

Dieser Abschnitt hat zum Ziel, eine Abschätzung für die antibakterielle Wirkung von Kupferlegierungen bei Kenntnis deren Zusammensetzung zu treffen. Hierzu werden die Ergebnisse bisheriger Studien verglichen und entsprechend den in dieser Arbeit hergeleiteten Thesen weiterführend interpretiert.

Auswertung bisheriger Arbeiten

Ein für alle Legierungstypen einheitlich definierbare Materialgröße ist der relative Kupferanteil in Gew.-%. In Abbildung 42 wurde auf Basis von Tabelle 7 die berechnete Abtötungsrate Z in Abhängigkeit des relativen Kupferanteils der entsprechenden Legierung aufgetragen. Die verschiedenen Legierungstypen wurden hierbei farblich voneinander abgehoben. Abbildung 42 a) fasst die gesamten Ergebnisse studienübergreifend zusammen, wohingegen in Abbildungsteil b) nur die Werte aus den Studien ^[66,68] aufgetragen wurden, da diese bei einer relativ großen Materialauswahl einheitliche Versuchsbedingungen und Erreger (*E. coli*) einsetzen.

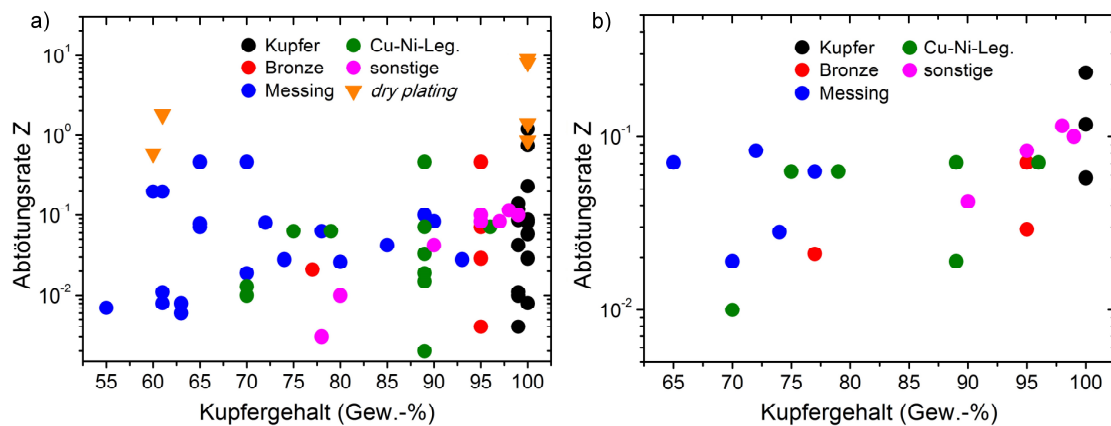


Abbildung 42: Auftragung der Abtötungsrate Z in Abhängigkeit des relativen Kupfergehalts der entsprechenden Legierungen. Quellen: a) gesamte Tabelle, b) Studien mit einheitlichen Versuchsbedingungen^[66,68].

In Abbildungsteil a) ist kein klarer studien- und legierungstypübergreifender Zusammenhang zwischen der Abtötungsrate Z und dem Kupfergehalt der Legierung zu erkennen. Studien, die das *dry plating* einsetzen, heben sich bei hohen und niedrigen Kupfergehalten durch eine wesentlich stärkere Abtötungsrate hervor. Dies lässt darauf schließen, dass der Methodeneinfluss den Einfluss der Legierungszusammensetzung in Abbildungsteil a) deutlich überlagert. Betrachtet man die verschiedenen Legierungsgruppen für sich, so ist lediglich bei den nicht genauer zugeordneten Legierungen (sonstige) ableitbar, dass ein höherer Kupfergehalt eine stärkere Abtötungswirkung hervorruft.

Um den Methoden- und Präparationseinfluss zu minimieren, wurden in Abbildungsteil b) lediglich Werte aus zwei Studien mit größerem Probenumfang aufgetragen, in denen einheitlich die *wet plating* Methode, eine neutrale Probenpräparation und *E. coli* als Erreger eingesetzt wurden. Im Gegensatz zu Abbildung 42 a) ist hier generell die Tendenz erkennbar, dass ein höherer Kupfergehalt eine stärkere Abtötung hervorruft. Dies lässt sich in gewissem Maße auch jeweils innerhalb eines bestimmten Legierungstyps beobachten.

Ein mit sinkendem Kupferanteil nachlassendes Abtötungsverhalten wurde auch in einigen Studien als maßgeblicher Legierungseinfluss vorgeschlagen.^[68,148,309] Michels *et al.* konnten dies, wie in Abbildung 43 dargestellt, in Abtötungsversuchen mit Messinglegierungen an MRSA exemplarisch beobachten.^[309]

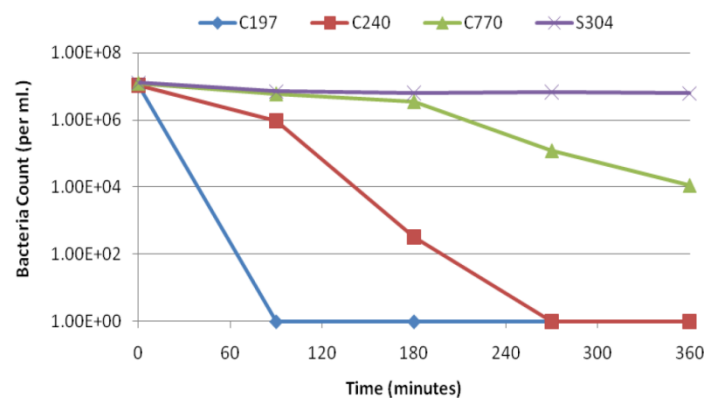


Abbildung 43: Abtötungsverhalten von Kupferlegierungen und Edelstahl (S304) gegenüber MRSA ermittelt mittels *wet plating*.^[309] Die verwendeten Legierungen sind: CuFe0,7P (C197), CuZn20 (C240) und CuZn27Ni18 (C770).

Die in obiger Abbildung dargestellten Daten sind jedoch nicht ausreichend, um einen allgemein Trend nachzuweisen. Ein wesentlicher Kritikpunkt wäre, dass Michels *et al.* zum Nachweis lediglich drei Legierungen anführen, die zudem verschiedene Legierungselemente beinhalten.

Zusammenfassend lässt eine vergleichende Auswertung der bisher durchgeführten Studien an Kupferlegierungen keine eindeutige Interpretation des Legierungseinflusses zu. Der Einfluss materialunabhängiger Parameter (Versuchsmethode, Probenpräparation, Erregerwahl) wird hierbei als starker Störfaktor angesehen. Vereinzelt lassen sich Hinweise finden, die auf ein stärkeres Abtötungsverhalten bei einem höheren relativen Kupfergehalt der Legierung hindeuten. Ein statistisch belastbarer Nachweis dieser Tendenz ist bisher nicht erfolgt.

Weiterführende Interpretation

Für reines Kupfer konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die antibakterielle Effizienz stark mit der Freisetzung von Ionen und der Oxidbildung verknüpft ist.

Entsprechend der zu Kupfer-Silber-Legierungen gewonnenen Erkenntnisse wäre bei Legierungen mit geringen Legierungsanteilen an edleren Elementen zu vermuten, dass die antibakterielle Wirkung im Vergleich zu reinem Kupfer eher ansteigt als abfällt.

Der Großteil an relevanten Kupferlegierungen (Messing, Bronze) beinhaltet allerdings unedlere Legierungselemente, die oft zur Erhöhung der Korrosionsresistenz der Legierung zulegiert werden. Die beobachtete Abnahme der Abtötungswirkung ließe sich in diesem Fall durch zwei Effekte erklären. Zum einen ist anzunehmen, dass unedlere Metalle in feuchtem Umfeld die Abgabe von Kupferionen einschränken, in dem sie als Opferanode agieren und Kupferionen zu Kupfer reduzieren. Zum anderen geht bei vielen Kupferlegierungen eine Erhöhung der Korrosionsresistenz mit der Ausbildung passivierender Oxidschichten einher. In diesem Fall wäre es möglich, dass die Kupferionenabgabe und damit die antibakterielle Effizienz der Legierung primär dadurch gesteuert wird, welche und in welchem Anteil sich Kupferoxide ausbilden können. Der Kupferoxidanteil wiederum könnte hierbei in erster Näherung mit dem relativen Kupfergehalt der Legierung verknüpft sein, was den in manchen Studien abgeleiteten Zusammenhang zwischen Kupferanteil und Abtötungswirkung erklären würde. Eine genauere Vorhersage der Abtötungswirkung bei einem oxidgesteuerten Prozess erscheint jedoch relativ schwierig, da sich die Oxidausbildung auf Kupferlegierungen als sehr komplex gestaltet und nicht hinreichend erforscht ist.^[129] Für eine ausgeprägte antibakterielle Wirkung von Kupferlegierungen wäre nach dieser Theorie eine flächenmäßig starke Ausbildung von Kupferoxid im Vergleich zu den Oxiden der Legierungselemente (z.B. ZnO, SnO und SnO₂) günstig. Ebenfalls wäre möglich, dass die Art des gebildeten Kupferoxids und damit dessen antibakterielle Effizienz durch Legierungselemente beeinflusst werden. Die Art und der flächenmäßige Anteil der gebildeten Oxide hängen daher von wesentlich mehr Faktoren als dem reinen Kupferanteil der Legierung ab.

Zusammenfassend lässt sich schließen, dass sowohl der relative Edelcharakter der Legierungselemente als auch die vorherrschenden Oxidwachstumsprozesse für die antibakterielle Wirkung einer Kupferlegierung entscheidend sein könnten. Es ist anzunehmen, dass der relative Kupfergehalt generell nur bei Legierungen mit unedleren Legierungspartnern und nur als sehr ungenaue Näherung herangezogen werden kann.

Unter Berücksichtigung der bisher auftretenden Interpretationsschwierigkeiten und der in dieser Arbeit vorgeschlagenen Wirkmechanismen wäre es sinnvoll, für zukünftige Studien zum Materialeinfluss antibakterieller Kupferlegierungen wichtige Randpunkte festzulegen. Diese sollten derart definiert sein, dass nicht nur mikrobiologische Aspekte, sondern auch das, wie gezeigt entscheidende, korrosive Materialverhalten berücksichtigt wird.

Ein wichtiges Kriterium stellt hierbei eine **einheitliche Testmethode und Probenpräparation** dar. Im Vergleich zu dem schwer zu reproduzierenden *dry plating* und dem als zu lange gewerteten JIS-Verfahren bietet sich das bei Raumtemperatur durchgeführte *wet plating* Verfahren an. Um Rauheitseinflüsse zu vermeiden wäre es sinnvoll, kompakte Proben auf eine einheitliche, geringe Rauheit zu präparieren. Oxidbildende und -lösende Präparationsverfahren sollten vermieden und durch Sterilisation mit neutral wirkendem Ethanol ersetzt werden.

Aus mikrobiologischer Sicht macht es Sinn, ungefährliche Erreger mit Verwandtschaft zu nosokomialen Erregern zu testen. Auffallend in Tabelle 7 ist, dass *E. coli* Bakterien bereits relativ oft als Testorganismen eingesetzt wurden. *E. coli* K12 stellt einen sehr gut erforschten Modellorganismus dar^[30] und ist mit dem gefährlichen, pathogenen Stamm *E. coli* O157:H7 verwandt^[68], weshalb er sich als **Standardkeim** eignen würde.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse und aufgestellten Thesen motivieren weiterhin die Ionenabgabe und den Oxidationszustand der Materialien als wesentliche Faktoren. Zur Aufklärung mechanistischer Prozesse wäre daher zielführend, zusätzlich jeweils die **Kupferionenabgabe** in dem entsprechendem Medium und den **Oxidationszustand** des metallischen Werkstoffs vor und nach dem Abtötungstest zu charakterisieren.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Material- und Oberflächenparametern auf die antibakterielle Wirkung von Kupferwerkstoffen untersucht. Basierend darauf wurden weiterhin allgemeine Thesen zum antibakteriellen Verhalten von Metallen aufgestellt.

Kupfer und Kupferwerkstoffe

Für Kupferoxide wurden erstmalig ein spezifischer Einfluss des gebildeten Oxidtyps nachgewiesen und die maßgeblichen Oxidbildungsprozesse während Standardabtötungsversuchen aufgeklärt. Cu_2O zeigte hierbei im Vergleich zu CuO ein wesentlich stärkeres Abtötungsverhalten, welches dem von metallischem Kupfer nahekam. Die unterschiedliche antibakterielle Wirksamkeit der Kupferoxide wurde über die Ionenabgabe hergeleitet und schließlich mit dem Löslichkeitsprodukt des entsprechenden Oxids korreliert. Die These eines löslichkeitsgesteuerten Abtötungsverhaltens konnte mit Hilfe eines umfassenden Literaturabgleichs auf weitere metallische Elemente übertragen werden.

Anhand einer modellhaften Kupfer-Silber-Legierung wurde nachgewiesen, dass durch die direkte Kombination der beiden Metalle eine wesentliche Verstärkung des antibakteriellen Effekts im Vergleich zu den reinen Elementen möglich ist. Diese tritt vorwiegend in flüssigem Medium auf und beruht auf einer elektrochemisch erhöhten Kupferionenabgabe und nicht, wie bisher vermutet, auf dem synergetischen Zusammenspiel der metallischen Ionen.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurde eine Neuinterpretation des Legierungseinflusses bei Kupferwerkstoffen durchgeführt. Es wurde abgeleitet, dass durch das kontrollierte Hinzufügen edlerer Legierungselemente eine Wirkungssteigerung gegenüber reinem Kupfer zu erwarten ist. Im Gegensatz hierzu wurde für Legierungen mit unedleren Legierungspartnern ein oxidgesteuertes Abtötungsverhalten vorgeschlagen. Die bisherige, generelle Annahme einer direkt zum Kupfergehalt der Legierung korrelierenden antibakteriellen Effizienz wurde daher in Frage gestellt. Bei einem umfassenden Studienvergleich wurden methoden- und präparationsbedingte Einflüsse als wesentliche Störgrößen identifiziert, weshalb sinnvolle Richtlinien für zukünftige Versuche definiert wurden.

Neben der Zusammensetzung des Werkstoffs scheint der direkte Kontakt zwischen metallischer Oberfläche und Bakterien einen starken Einfluss auf das Abtötungsverhalten bei Kupferwerkstoffen auszuüben. Dies wurde durch Versuche auf nanoskaligen, inerten Abstandsstrukturen, die durch Laser-Interferenzlithographie erzeugt wurden, eindeutig nachgewiesen. Es wird vermutet, dass der beobachteten Synergie aus Kupferionen und metallischer Oberfläche eine direkte Schwächung der Zellwand durch das Metall zu Grunde liegt, die bisher nicht näher aufgeklärt ist. Basierend auf dieser Erkenntnis könnten bei Kupferwerkstoffen auftretende Phänomene, wie etwa die schnellere Abtötung während des *dry plating*

Verfahrens und die eingeschränkte Wirksamkeit im Zusammenhang mit Biofilmen neu interpretiert werden.

Allgemeine Erkenntnisse

Aus dem zuvor beschriebenen Einfluss des Oberflächenkontakts wurde abgeleitet, dass die Adhäsionseigenschaften von Oberflächen gegenüber Bakterien eine wichtige Rolle während des Abtötungsprozesses spielen. Exemplarisch wurde nachgewiesen, dass das Adhäsionsverhalten von Oberflächen durch topographische Gestaltung mittels LIS stark beeinflusst werden kann. Hieraus wurde gefolgert, dass eine materialunabhängige Optimierung antibakterieller Eigenschaften durch eine geeignete Oberflächenfunktionalisierung möglich ist.

Es wurde gezeigt, dass die in der Materialwissenschaft etablierten REM/FIB-Verfahren auch zur Aufklärung mikrobiologischer Fragestellungen eingesetzt werden können. Insbesondere mit Bezug zur Kontaktflächenanalyse und zur strukturellen Integrität von Bakterien wurden erste, vielversprechende Resultate erzielt und wichtige Prozessparameter bestimmt.

Abschließend wurde anhand der erarbeiteten Ergebnisse und einer elementübergreifenden Wirksamkeitsstudie ein theoretisches Modell entwickelt, welches versucht, die Ursachen der starken antibakteriellen Wirkung von Kupfer und Silber gegenüber anderen metallischen Elementen zu beschreiben. Nach diesem Modell hängt die antibakterielle Wirksamkeit eines Metalls in erster Linie von Primärfaktoren ab, die sich aus dem ionischen Charakter und den Korrosionseigenschaften des Metalls ergeben. Über Sekundärfaktoren, die die Interaktion der Materialoberfläche mit Bakterien beschreiben, wird der Einfluss einer zusätzlichen Oberflächenfunktionalisierung erfasst.

Literaturverzeichnis

- [1] Pourbaix, M. *Atlas of Electrochemical Equilibria in Aqueous Solutions*. (NACE and Cebelcor, 1974).
- [2] Kawakami, H., Yoshida, K., Nishida, Y., Kikuchi, Y. & Sato, Y. Antibacterial properties of Metallic Elements for Alloying Evaluated with Application of JIS Z 2801:2000. *ISIJ Int.* 48, 1299–1304 (2008).
- [3] Walger, P., Popp, W. & Exner, M. *Stellungnahme der DGKH zu Prävalenz, Letalität und Präventionspotenzial nosokomialer Infektionen in Deutschland 2013*. *krankenhaushygiene.de* (2014).
- [4] Statistisches Bundesamt. *Statistik für Verkehrsunfälle 2013*. (2013)
- [5] European Centre for Disease Prevention and Control. *Special Issue: healthcare-associated infections*. (2009).
- [6] World Health Organisation. *Report on the burden of endemic health-care associated infection worldwide*. (2011).
- [7] World Health Organisation. *WHO - Healthcare-associated infections fact sheet*. (2010).
- [8] Scott, R. *The direct medical costs of healthcare-associated infections in US hospitals and the benefits of prevention*. (2009).
- [9] World Health Organisation. *Antimicrobial Resistance - Global Report on Surveillance*. (2014).
- [10] Kayser, F. H. *et al. Medizinische Mikrobiologie*. (Georg Thieme Verlag, 2005).
- [11] European Centre for Disease Prevention and Control. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011*. (2011).
- [12] European Centre for Disease Prevention and Control. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012*. (2012).
- [13] World Health Organisation. *World Health Day 2011- News release*. (2011).
- [14] Kramer, A., Schwebke, I. & Kampf, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect. Dis.* 6, 130 (2006).
- [15] Weber, D. J., Anderson, D. & Rutala, W. A. The role of the surface environment in healthcare-associated infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 26, 338–44 (2013).
- [16] Otter, J. A., Yezli, S. & French, G. L. The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 32, 687–99 (2011).
- [17] Huslage, K., Rutala, W. A., Sickbert-Bennett, E. & Weber, D. J. A quantitative approach to defining “high-touch” surfaces in hospitals. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 31, 850–3 (2010).
- [18] Sexton, T., Clarke, P., O’Neill, E., Dillane, T. & Humphreys, H. Environmental reservoirs of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in isolation rooms: correlation with patient isolates and implications for hospital hygiene. *J. Hosp. Infect.* 62, 187–94 (2006).
- [19] Lemmen, S. W., Häfner, H., Zolldann, D., Stanzel, S. & Lütticken, R. Distribution of multi-resistant Gram-negative versus Gram-positive bacteria in the hospital inanimate environment. *J. Hosp. Infect.* 56, 191–7 (2004).

- [20] Wojgani, H. *et al.* Hospital door handle design and their contamination with bacteria: a real life observational study. Are we pulling against closed doors? *PLoS One* 7, e40171 (2012).
- [21] Page, K., Wilson, M. & Parkin, I. P. Antimicrobial surfaces and their potential in reducing the role of the inanimate environment in the incidence of hospital-acquired infections. *J. Mater. Chem.* 19, 3819 (2009).
- [22] O’Gorman, J. & Humphreys, H. Application of copper to prevent and control infection. Where are we now? *J. Hosp. Infect.* 81, 217–23 (2012).
- [23] Silvestry-Rodriguez, N., Sicairos-Ruelas, E. E., Gerba, C. P. & Bright, K. R. Silver as a disinfectant. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 191, 23–45 (2007).
- [24] Mikolay, A. *et al.* Survival of bacteria on metallic copper surfaces in a hospital trial. *Appl. Microb. Cell Physiol.* 87, 1875–9 (2010).
- [25] Salgado, C. D. *et al.* Copper surfaces reduce the rate of healthcare-acquired infections in the intensive care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 34, 479–86 (2013).
- [26] Casey, A. L. *et al.* Role of copper in reducing hospital environment contamination. *J. Hosp. Infect.* 74, 72–7 (2010).
- [27] Karpanen, T. J. *et al.* The antimicrobial efficacy of copper alloy furnishing in the clinical environment: a crossover study. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 33, 3–9 (2012).
- [28] Borkow, G. Using copper to fight microorganisms. *Curr. Chem. Biol.* 6, 93–103 (2012).
- [29] Borkow, G. & Gabbay, J. Copper as a biocidal tool. *Curr. Med. Chem.* 12, 2163–2175 (2005).
- [30] Fuchs, G. & Schlegel, H. G. *Allgemeine Mikrobiologie.* (Georg Thieme Verlag, 2007).
- [31] Setlow, P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J. Appl. Microbiol.* 101, 514–25 (2006).
- [32] McKenney, P. T., Driks, A. & Eichenberger, P. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 33–44 (2013).
- [33] Cross, J. B. *et al.* Killing of *Bacillus* Spores by aqueous Dissolved Oxygen, Ascorbic Acid and Copper Ions. *Appl. Env.* 69, 2245–2252 (2003).
- [34] Sloan, M. & Farnsworth, S. Testing and evaluation of nanoparticle efficacy on *E. coli* and *Bacillus anthracis* spores. in *NSTI Nanotechnology Conference* 25 (2006).
- [35] *International Code of Nomenclature of Bacteria.* (ASM Press, 1990).
- [36] Ausschuss für Biologische Arbeitsstoffe. *Technische Regeln für biologische Arbeitsstoffe.* (2012).
- [37] Solioz, M., Abicht, H. K., Mermod, M. & Mancini, S. Response of Gram-positive bacteria to copper stress. *J. Biol. Inorg. Chem.* 15, 3–14 (2010).
- [38] Su, C.-C. *et al.* Crystal structure of the CusBA heavy-metal efflux complex of *Escherichia coli*. *Nature* 470, 558–62 (2011).
- [39] Dupont, C. L., Grass, G. & Rensing, C. Copper toxicity and the origin of bacterial resistance - new insights and applications. *Metallomics* 3, 1109–18 (2011).
- [40] Freund, H. J. & Wedler, G. *Lehrbuch der Physikalischen Chemie.* (Wiley-VCH, 2012).
- [41] McFarland, J. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *J. Am. Med. Assoc.* 15, 1176–1178 (1907).

- [42] Allion, A., Van Hecke, B., Boubetra, A. & Lenestour, F. Methodological approach of antibacterial surfaces characterization. *La Metall. Ital.* 1, 29–34 (2012).
- [43] Fuller, T. A. *et al.* Developing an engineered antimicrobial/prophylactic system using electrically activated bactericidal metals. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21, 2103–2114 (2010).
- [44] Ruparelia, J. P., Chatterjee, A. K., Duttagupta, S. P. & Mukherji, S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomater.* 4, 707–16 (2008).
- [45] Djokic, S. Antimicrobial activity of electrochemically oxidized silver and copper. *ECS Trans.* 25, 7–15 (2010).
- [46] Niakan, S. *et al.* Comparison of the antibacterial effects of nanosilver with 18 antibiotics on multidrug resistance clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Jundishapur J. Microbiol.* 6, 1–5 (2013).
- [47] Díaz, M. *et al.* Synthesis and antimicrobial activity of a silver-hydroxyapatite nanocomposite. *J. Nanomater.* 2009, 1–6 (2009).
- [48] Anita, S., Ramachandran, T., Rajendran, R., Koushik, C. & Mahalakshmi, M. A study of the antimicrobial property of encapsulated copper oxide nanoparticles on cotton fabric. *Text. Res. J.* 81, 1081–1088 (2011).
- [49] Miola, M. *et al.* Surface silver-doping of biocompatible glasses to induce antibacterial properties. Part II: Plasma sprayed glass-coatings. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 20, 741–9 (2009).
- [50] Sheng, X., Ting, Y. P. & Pehkonen, S. O. Force measurements of bacterial adhesion on metals using a cell probe atomic force microscope. *J. Colloid Interface Sci.* 310, 661–9 (2007).
- [51] Espírito Santo, C. *et al.* Bacterial killing by dry metallic copper surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 794–802 (2011).
- [52] Warnes, S. L. & Keevil, C. W. Mechanism of copper surface toxicity in vancomycin-resistant enterococci following wet or dry surface contact. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6049–59 (2011).
- [53] Warnes, S. L., Caves, V. & Keevil, C. W. Mechanism of copper surface toxicity in *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* involves immediate membrane depolarization followed by slower rate of DNA destruction which differs from that observed for Gram-positive bacteria. *Environ. Microbiol.* 14, 1730–43 (2012).
- [54] Quaranta, D. *et al.* Mechanisms of contact-mediated killing of yeast cells on dry metallic copper surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 416–26 (2011).
- [55] Santo, C. E., Quaranta, D. & Grass, G. Antimicrobial metallic copper surfaces kill *Staphylococcus haemolyticus* via membrane damage. *Microbiologyopen* 1, 46–52 (2012).
- [56] Hong, R., Kang, T. Y., Michels, C. A. & Gadura, N. Membrane lipid peroxidation in copper alloy-mediated contact killing of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1776–84 (2012).
- [57] Warnes, S., Highmore, C. & Keevil, C. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes on abiotic touch surfaces: implications for public health. *MBio* 3, e00489–12 (2012).
- [58] Xu, F. F. & Imlay, J. A. Silver(I), mercury(II), cadmium(II), and zinc(II) target exposed enzymic iron-sulfur clusters when they toxify *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 3614–21 (2012).

- [59] Macomber, L. & Imlay, J. A. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 8344–9 (2009).
- [60] Hassan, M. S., Amna, T., Kim, H. Y. & Khil, M.-S. Enhanced bactericidal effect of novel CuO/TiO₂ composite nanorods and a mechanism thereof. *Compos. Part B Eng.* 45, 904–910 (2013).
- [61] Cui, L. *et al.* In situ study of the antibacterial activity and mechanism of action of silver nanoparticles by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Anal. Chem.* 85, 5436–43 (2013).
- [62] Lin, Y. S. E., Vidic, R. D., Stout, J. E. & Yu, V. L. Individual and combined effects of copper and silver ions on inactivation of *Legionella pneumophila*. *Water Res.* 30, 1905–1913 (1996).
- [63] Oliver, J. The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* 43, 93–100 (2005).
- [64] Aurass, P., Prager, R. & Flieger, A. EHEC/EAEC O104:H4 strain linked with the 2011 German outbreak of haemolytic uremic syndrome enters into the viable but non-culturable state in response to various stresses and resuscitates upon stress relief. *Environ. Microbiol.* 13, 3139–48 (2011).
- [65] Dwidjosiswojo, Z. *et al.* Influence of copper ions on the viability and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* under conditions relevant to drinking water environments. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214, 485–92 (2011).
- [66] Elguindi, J. *et al.* Metallic copper corrosion rates, moisture content, and growth medium influence survival of copper ion-resistant bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 1963–1970 (2011).
- [67] Faúndez, G. & Troncoso, M. Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiol.* 4, 19 (2004).
- [68] Wilks, S. A., Michels, H. & Keevil, C. W. The survival of *Escherichia coli* O157 on a range of metal surfaces. *Int. J. Food Microbiol.* 105, 445–454 (2005).
- [69] Wilks, S. A., Michels, H. T. & Keevil, C. W. Survival of *Listeria monocytogenes* on metal surfaces: implications for cross-contamination. *Int. J. Food Microbiol.* 111, 93–8 (2006).
- [70] Ishino, C., Okumura, K. & Quéré, D. Wetting transitions on rough surfaces. *Europhys. Lett.* 68, 419–425 (2004).
- [71] Quéré, D. Rough ideas on wetting. *Physica A* 313, 32–46 (2002).
- [72] Dürr, H. Influence of surface roughness and wettability of stainless steel on soil adhesion, cleanability and microbial inactivation. *Food Bioprod. Process.* 85, 49–56 (2007).
- [73] Monk, A. B., Kanmukhla, V., Trinder, K. & Borkow, G. Potent bactericidal efficacy of copper oxide impregnated non-porous solid surfaces. *BMC Microbiol.* 14, 57 (2014).
- [74] Michels, H. T., Noyce, J. O. & Keevil, C. W. Effects of temperature and humidity on the efficacy of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* challenged antimicrobial materials containing silver and copper. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 191–5 (2009).
- [75] Espírito Santo, C., Taudte, N., Nies, D. H. & Grass, G. Contribution of copper ion resistance to survival of *Escherichia coli* on metallic copper surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 977–86 (2008).
- [76] Gould, S. *et al.* The antimicrobial properties of copper surfaces against a range of important nosocomial pathogens. *Ann. Microbiol.* 59, 151–156 (2009).

- [77] Zhu, L., Elguindi, J., Rensing, C. & Ravishankar, S. Antimicrobial activity of different copper alloy surfaces against copper resistant and sensitive *Salmonella enterica*. *Food Microbiol.* 30, 303–10 (2012).
- [78] Elguindi, J., Wagner, J. & Rensing, C. Genes involved in copper resistance influence survival of *Pseudomonas aeruginosa* on copper surfaces. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1448–55 (2009).
- [79] Wheeldon, L. J. *et al.* Antimicrobial efficacy of copper surfaces against spores and vegetative cells of *Clostridium difficile*: the germination theory. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 522–5 (2008).
- [80] Souli, M. *et al.* Antimicrobial activity of copper surfaces against carbapenemase-producing contemporary Gram-negative clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 852–7 (2013).
- [81] Noyce, J. O., Michels, H. & Keevil, C. W. Inactivation of influenza A virus on copper versus stainless steel surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2748–50 (2007).
- [82] Noyce, J. O., Michels, H. & Keevil, C. W. Potential use of copper surfaces to reduce survival of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the healthcare environment. *J. Hosp. Infect.* 63, 289–97 (2006).
- [83] Weaver, L., Michels, H. T. & Keevil, C. W. Survival of *Clostridium difficile* on copper and steel: futuristic options for hospital hygiene. *J. Hosp. Infect.* 68, 145–51 (2008).
- [84] U.S. Environmental Protection Agency. *EPA registers copper-containing alloy products*. (The National Academic Press, 2008).
- [85] Reddy, G. S. Nanostructured surfaces that show antimicrobial, anticorrosive, and antibiofilm properties. *Key Eng. Mater.* 521, 1–33 (2012).
- [86] Cady, N., Behnke, J. & Strickland, A. Copper-based nanostructured coatings on natural cellulose: nanocomposites exhibiting rapid and efficient inhibition of a multi-drug resistant wound pathogen. *Adv. Funct. Mater.* 21, 2506–2514 (2011).
- [87] Airey, P. & Verran, J. Potential use of copper as a hygienic surface; problems associated with cumulative soiling and cleaning. *J. Hosp. Infect.* 67, 271–7 (2007).
- [88] ATS Labs. Test method for the continuous reduction of bacterial contamination on copper alloy surfaces. (2005).
- [89] Bäuerle, D. *Laser Processing and Chemistry*. (Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1996).
- [90] Metev, S. M. & Veiko, V. P. *Laser-assisted Microtechnology*. (Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1998).
- [91] Drude, P. Zur Elektronentheorie der Metalle. *Ann. Phys.* 566–613 (1900).
- [92] Hecht, E. *Optik*. (Oldenburg, 2001).
- [93] Haynes, W. M. *Handbook of Chemistry and Physics. The American Journal of the Medical Sciences* (CRC Press, 2011).
- [94] MicroChemicals. Physik und Chemie von AZ® / TI Fotolacken. 49, (2007).
- [95] Yao, Y. L., Chen, H. & Zhang, W. Time scale effects in laser material removal: a review. *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* 26, 598–608 (2004).
- [96] Vilar, R. Laser alloying and laser cladding. *Mater. Sci. Forum* 301, 229–252 (1999).

- [97] Cabalin, L. M. & Laserna, J. J. Experimental determination of laser induced breakdown thresholds of metals under nanosecond Q-switched laser operation. *Spectrochim. Acta Part B* 53, 723–730 (1998).
- [98] Mücklich, F., Lasagni, A. & Daniel, C. Laser interference metallurgy: using interference as a tool for micro/nano structuring. *Int. J. Mater. Res.* 97, 1–8 (2006).
- [99] Lasagni, F. A. Advanced design of periodical structures by laser interference metallurgy in the micro/nano scale on macroscopic areas. (PhD-Thesis, Saarland University, 2006).
- [100] Pei, Y. T. & De Hosson, J. T. M. Functionally graded materials produced by laser cladding. *Acta Mater.* 48, 2617–2624 (2000).
- [101] Thomas, R. A beginner's guide to ICP-MS. *Spectroscopy* 16-18, (2002).
- [102] Stummeyer, J. & Wunsch, G. Bestimmung von Elementspuren in Niob durch ICP-AES und ICP-MS mit und ohne Spuren-Matrix-Trennung. *Fresenius. J. Anal. Chem.* 269–277 (1991).
- [103] Tompkins, H. G. & Irene, E. A. *Handbook of Ellipsometry*. (William Andrew publishing & Springer, 2005).
- [104] Housecroft, C. E. & Constable, E. C. *Chemistry*. (Pearson Education Limited, 2006).
- [105] Wilhelm, S. M., Tanizawa, Y., Liu, C. Y. & Hackerman, N. A photo-electrochemical investigation of semiconducting oxide films on copper. *Corros. Sci.* 22, 791–805 (1982).
- [106] Jayatissa, A. H., Guo, K. & Jayasuriya, A. C. Fabrication of cuprous and cupric oxide thin films by heat treatment. *Appl. Surf. Sci.* 255, 9474–9479 (2009).
- [107] Lasagni, A., D'Alessandria, M., Giovanelli, R. & Mücklich, F. Advanced design of periodical architectures in bulk metals by means of Laser Interference Metallurgy. *Appl. Surf. Sci.* 254, 930–936 (2007).
- [108] Wagner, C. No Title. *Z. Phys. Chem.* B21, (1933).
- [109] Cabrera, N. F. & Mott, N. Theory of the oxidation of metals. *Rep. Prog. Phys.* 12, 163 (1949).
- [110] Leibslle, F. M. STM studies of oxygen-induced structures and nitrogen coadsorption on the Cu(100) surface: evidence for a one-dimensional oxygen reconstruction and reconstructive interactions. *Surf. Sci.* 337, 51–66 (1995).
- [111] Tanaka, K., Matsumoto, Y., Fujita, T. & Okawa, Y. Nano-scale patterning of metal surfaces by adsorption and reaction. *Appl. Surf. Sci.* 130-132, 475–483 (1998).
- [112] Chawla, S., Rickett, B., Sankarrama, N. & Payer, J. An X-ray photo-electron spectroscopic investigation of the air-formed film on copper. *Corros. Sci.* 33, 1617–1631 (1992).
- [113] Iijima, J. *et al.* Native oxidation of ultra high purity Cu bulk and thin films. *Appl. Surf. Sci.* 253, 2825–2829 (2006).
- [114] O'Reilly, M. *et al.* Investigation of the oxidation behaviour of thin film and bulk copper. *Appl. Surf. Sci.* 91, 152 (1995).
- [115] Barr, T. L. ESCA studies of naturally passivated metal foils. *J. Vac. Sci. Technol.* 14, 660 (1977).
- [116] Barr, T. L. An ESCA study of the termination of the passivation of elemental metals. *J. Phys. Chem.* 82, 1801 (1978).
- [117] Platzman, I., Brener, R., Haick, H. & Tannenbaum, R. Oxidation of polycrystalline copper thin films at ambient conditions. *J. Phys. Chem. C* 1101–1108 (2008).

- [118] Cocke, D. L., Chuah, G. K., Kruse, N. & Block, J. H. Copper oxidation and surface copper oxide stability investigated by pulsed field desorption mass spectrometry. *Appl. Surf. Sci.* 84, 153–161 (1995).
- [119] Yang, J. C., Kolasa, B., Gibson, J. M. & Yeadon, M. Self-limiting oxidation of copper. *Appl. Phys. Lett.* 73, 2841 (1998).
- [120] Rönnow, D., Lindström, T., Isidorsson, J. & Ribbing, C. Surface roughness of oxidised copper films studied by atomic force microscopy and spectroscopic light scattering. *Thin Solid Films* 325, 92–98 (1998).
- [121] Rönquist, A. & Fischmeister, H. The oxidation of copper - A review of published data. *J. Inst. Met.* 89, 65 (1960).
- [122] FitzGerald, K. P., Nairn, J., Skennerton, G. & Atrens, A. Atmospheric corrosion of copper and the colour, structure and composition of natural patinas on copper. *Corros. Sci.* 48, 2480–2509 (2006).
- [123] Graedel, T., Nassau, K. & Franey, J. Copper patinas formed in the atmosphere - I. Introduction. *Corros. Sci.* 27, 1987 (1987).
- [124] Goidanich, S., Brunk, J., Herting, G., Arenas, M. A. & Wallinder, I. O. Atmospheric corrosion of brass in outdoor applications: patina evolution, metal release and aesthetic appearance at urban exposure conditions. *Sci. Total Environ.* 412-413, 46–57 (2011).
- [125] Feser, R. *Encyclopedia of Electrochemistry, V.4, Corrosion and Oxide Films.* (Viley-VCH, 2003).
- [126] He, J.-B., Lu, D.-Y. & Jin, G.-P. Potential dependence of cuprous/cupric duplex film growth on copper electrode in alkaline media. *Appl. Surf. Sci.* 253, 689–697 (2006).
- [127] Kunze, E. *Korrosion und Korrosionsschutz.* (Wiley-VCH, 2001).
- [128] Chan, H. Y. H., Takoudis, C. G. & Weaver, M. J. Oxide film formation and oxygen adsorption on copper in aqueous media as probed by surface-enhanced raman spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* 103, 357–365 (1999).
- [129] Honkanen, M., Vippola, M. & Lepistö, T. Oxidation of copper alloys studied by analytical transmission electron microscopy cross-sectional specimens. *J. Mater. Res.* 23, 1350–1357 (2011).
- [130] Deutsches Kupferinstitut. Kupfer-Zink-Legierungen (Messing und Sondermessing). (2007).
- [131] Souissi, N., Sidot, E., Bousselmi, L., Triki, E. & Robbiola, L. Corrosion behaviour of Cu–10Sn bronze in aerated NaCl aqueous media – Electrochemical investigation. *Corros. Sci.* 49, 3333–3347 (2007).
- [132] Deutsches Kupferinstitut. BRONZE - unverzichtbarer Werkstoff der Moderne. (2003).
- [133] Burstein, G. & Gao, G. The first stages of dezincification of freshly generated brass surfaces in sulfuric acid solution. *J. Electrochem. Soc.* 141, 912–921 (1994).
- [134] Sykes, S. & Bond, J. W. A comparison of fingerprint sweat corrosion of different alloys of brass. *J. Forensic Sci.* 58, 138–41 (2013).
- [135] Qiu, P. & Leygraf, C. Initial oxidation of brass induced by humidified air. *Appl. Surf. Sci.* 258, 1235–1241 (2011).
- [136] Procaccini, R., Schreiner, W. H., Vázquez, M. & Ceré, S. Surface study of films formed on copper and brass at open circuit potential. *Appl. Surf. Sci.* 268, 171–178 (2013).

- [137] Kabasakaloğlu, M., Kiyak, T., Şendil, O. & Asan, A. Electrochemical behavior of brass in 0.1 M NaCl. *Appl. Surf. Sci.* 193, 167–174 (2002).
- [138] Fredj, N., Kolar, J. S., Prichard, D. M. & Burleigh, T. D. Study of relative color stability and corrosion resistance of commercial copper alloys exposed to hand contact and synthetic hand sweat. *Corros. Sci.* 76, 415–423 (2013).
- [139] Suter, T., Moser, E. & Böhni, H. The characterization of the tarnishing of Cu-15Ni-8Sn and Cu-5Al-5Sn alloys. *Corros. Sci.* 34, 1111–1122 (1993).
- [140] Robbiola, L., Tran, T. T. M., Dubot, P., Majerus, O. & Rahmouni, K. Characterisation of anodic layers on Cu-10Sn bronze (RDE) in aerated NaCl solution. *Corros. Sci.* 50, 2205–2215 (2008).
- [141] Dollwet, H. & Sorenson, J. Historic uses of copper compounds in medicine. *Trace Elem. Med.* 2, 80–87 (1985).
- [142] Borkow, G. & Gabbay, J. Copper, an ancient remedy returning to fight microbial, fungal and viral infections. *Curr. Chem. Biol.* 3, 272–278 (2009).
- [143] Grass, G., Rensing, C. & Solioz, M. Metallic copper as an antimicrobial surface. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1541–7 (2011).
- [144] Von Nägeli, K. in *Neue Denkschr. Allg. Schweiz. ges. Natruwiss.* 174–182 (1893).
- [145] Kuhn, P. Doorknobs: a source of nosocomial infection. *Diagnostic Med.* (1983).
- [146] Paulsen, F. Die Entdeckung der Krankheitserreger. *Ciba Zeitschrift* 1–20 (1934).
- [147] Siebeneicher, H. Oligodynamische Wirkung der Metalle und Metallsalze. *Kolloid-Zeitschrift* 2, 243–253 (1932).
- [148] Noyce, J. O., Michels, H. & Keevil, C. W. Use of copper cast alloys to control Escherichia coli O157 cross-contamination during food processing. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4239–44 (2006).
- [149] Gabbay, J. *et al.* Copper oxide impregnated textiles with potent biocidal activities. *J. Ind. Text.* 35, 323–335 (2006).
- [150] Cassells, J. M., Yahya, M. T., Gerba, C. P. & Rose, J. B. Efficacy of a combined system of copper and silver and free chlorine for inactivation of Naegleria fowleri amoebas in water. *Water Sci. Technol.* 31, 119–122 (1995).
- [151] Miuetzner, S. *et al.* Efficacy of thermal treatment and copper-silver ionization for controlling legionella pneumophila in high-volume hot water plumbing systems in hospitals. *AJIC* 25, 452–457 (1997).
- [152] Anyaogu, K. C., Fedorov, A. V & Neckers, D. C. Synthesis, characterization, and antifouling potential of functionalized copper nanoparticles. *Langmuir* 24, 4340–6 (2008).
- [153] Chapman, J. *et al.* Antifouling performances of macro- to micro- to nano-copper materials for the inhibition of biofouling in its early stages. *J. Mater. Chem. B* 1, 6194 (2013).
- [154] Marais, F., Mehtar, S. & Chalkley, L. Antimicrobial efficacy of copper touch surfaces in reducing environmental bioburden in a South African community healthcare facility. *J. Hosp. Infect.* 74, 80–2 (2010).
- [155] Laitinen, K., Yliopiston, H., Instituutti, H. & Voutilainen, P. Clinical trial on using copper and brass surfaces in a hospital in West-Finland using microbiological assessment. *Intern. Rep.* (2010).

- [156] Schmidt, M. G. *et al.* Sustained reduction of microbial burden on common hospital surfaces through introduction of copper. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2217–23 (2012).
- [157] Schmidt, M. G. *et al.* Copper continuously limits the concentration of bacteria resident on bed rails within the intensive care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 34, 530–3 (2013).
- [158] Huang, H.-I. *et al.* In vitro efficacy of copper and silver ions in eradicating *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter baumannii*: implications for on-site disinfection for hospital infection control. *Water Res.* 42, 73–80 (2008).
- [159] Sagripanti, J. L., Routson, L. B. & Lytle, C. D. Virus inactivation by copper or iron ions alone and in the presence of peroxide. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4374–6 (1993).
- [160] Molteni, C., Abicht, H. K. & Solioz, M. Killing of bacteria by copper surfaces involves dissolved copper. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4099–101 (2010).
- [161] Zietz, C. *et al.* Analysis of the release characteristics of Cu-treated antimicrobial implant surfaces using atomic absorption spectrometry. *Bioinorg. Chem. Appl.* 2012, 850390 (2011).
- [162] Hahn, A., Günther, S., Wagener, P. & Barcikowski, S. Electrochemistry-controlled metal ion release from silicone elastomer nanocomposites through combination of different metal nanoparticles. *J. Mater. Chem.* 21, 10287 (2011).
- [163] Rifkind, J. M., Shin, Y. a, Heim, J. M. & Eichhorn, G. L. Cooperative disordering of single-stranded polynucleotides through copper crosslinking. *Biopolymers* 15, 1879–1902 (1976).
- [164] Dowjat, W. K., Kharatishvili, M. & Costa, M. DNA and RNA strand scission by copper, zinc and manganese superoxide dismutases. *Biometals* 9, 327–35 (1996).
- [165] Weaver, L., Noyce, J., Michels, H. & Keevil, C. Potential action of copper surfaces on meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiology* 109, 2200–5 (2010).
- [166] Macomber, L., Rensing, C. & Imlay, J. A. Intracellular copper does not catalyze the formation of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 189, 1616–26 (2007).
- [167] Kim, J. H., Cho, H., Ryu, S. E. & Choi, M. U. Effects of metal ions on the activity of protein tyrosine phosphatase VHR: highly potent and reversible oxidative inactivation by Cu^{2+} ion. *Arch. Biochem. Biophys.* 382, 72–80 (2000).
- [168] Österberg, R. *Study of the biochemistry of copper - final report. INCRA Report* 1–27 (1977).
- [169] Fenton, H. J. H. LXXIII.-Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc., Trans.* 899–910 (1894).
- [170] Park, H., Nguyen, T., Yoon, J. & Lee, C. Role of reactive oxygen species in *Escherichia coli* inactivation by cupric ion. *Environ. Sci. Technol.* 46, 11299–304 (2012).
- [171] Santo, C. E., Morais, P. V. & Grass, G. Isolation and characterization of bacteria resistant to metallic copper surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1341–8 (2010).
- [172] Michels, H. T., Wilks, S. A., Noyce, J. O. & Keevil, C. W. Copper alloys for human infectious disease control. *Stainl. Steel* (2005).
- [173] Vargas-Reus, M. A., Memarzadeh, K., Huang, J., Ren, G. G. & Allaker, R. P. Antimicrobial activity of nanoparticulate metal oxides against peri-implantitis pathogens. *Int. J. Antimicrob. Agents* 40, 135–9 (2012).

- [174] Champagne, V. K. & Helfritsch, D. J. A demonstration of the antimicrobial effectiveness of various copper surfaces. *J. Biol. Eng.* 7, 8 (2013).
- [175] Bright, K. R., Sicairos-Ruelas, E. E., Gundy, P. M. & Gerba, C. P. Assessment of the antiviral properties of zeolites containing metal ions. *Food Environ. Virol.* 1, 37–41 (2008).
- [176] Zhang, W. *et al.* Antimicrobial properties of copper plasma-modified polyethylene. *Polymer (Guildf)*. 47, 7441–7445 (2006).
- [177] Díaz-Visurraga, J., Gutiérrez, C., von Plessing, C. & García, A. in *Science against Microbial Pathogens* 210–218 (2011).
- [178] Christy, A. J., Nehru, L. C. & Umadevi, M. A novel combustion method to prepare CuO nanorods and its antimicrobial and photocatalytic activities. *Powder Technol.* 235, 783–786 (2013).
- [179] Bondarenko, O., Ivask, A., Käkinen, A. & Kahru, A. Sub-toxic effects of CuO nanoparticles on bacteria: kinetics, role of Cu ions and possible mechanisms of action. *Environ. Pollut.* 169, 81–9 (2012).
- [180] Ren, G. *et al.* Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *Int. J. Antimicrob. Agents* 33, 587–90 (2009).
- [181] Mimura, K., Lim, J., Isshiki, M., Zhu, Y. & Jiang, Q. Brief review of oxidation kinetics of copper at 350 °C to 1050 °C. *Metall. Mater. Trans. A* 37, (2006).
- [182] Lee, Y.-J., Kim, S., Park, S.-H., Park, H. & Huh, Y.-D. Morphology-dependent antibacterial activities of Cu₂O. *Mater. Lett.* 65, 818–820 (2011).
- [183] Rai, M., Yadav, A. & Gade, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol. Adv.* 27, 76–83 (2008).
- [184] Davies, R. L. & Etris, S. F. The development and functions of silver in water purification and disease control. *Catal. Today* 36, 107–114 (1997).
- [185] Gibbard, J. Public health aspects of the treatment of water and beverages with silver. *Am. J. Public Health Nations. Health* 27, 112–9 (1937).
- [186] Landau, U. *Die keimreduzierende Wirkung des Silbers in Hygiene, Medizin und Wasseraufbereitung.* (Isensee Verlag, 2006).
- [187] Feng, Q. L. *et al.* A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Biomed. Mater. Res.* 52, 662–668 (2000).
- [188] Castellano, J. J. *et al.* Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs. *Int. Wound J.* 4, 114–22 (2007).
- [189] Kawahara, K., Tsuruda, K., Morishita, M. & Uchida, M. Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. *Dent. Mater.* 16, 452–5 (2000).
- [190] Jeon, H.-J., Yi, S.-C. & Oh, S.-G. Preparation and antibacterial effects of Ag-SiO₂ thin films by sol-gel method. *Biomaterials* 24, 4921–4928 (2003).
- [191] Chen, X. & Schluesener, H. J. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol. Lett.* 176, 1–12 (2008).
- [192] Monteiro, D. R. *et al.* The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *Int. J. Antimicrob. Agents* 34, 103–10 (2009).
- [193] Roe, D., Karandikar, B., Bonn-Savage, N., Gibbins, B. & Rouillet, J.-B. Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles. *J. Antimicrob. Chemother.* 61, 869–76 (2008).

- [194] Shirwaiker, R. A., Wysk, R. A., Kariyawasam, S., Carrion, H. & Voigt, R. C. Micro-scale fabrication and characterization of a silver-polymer-based electrically activated antibacterial surface. *Biofabrication* 3, - (2011).
- [195] Kumar, R. & Münstedt, H. Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites. *Biomaterials* 26, 2081–8 (2005).
- [196] Pérez-Tanoira, R. *et al.* Bacterial adhesion on biomedical surfaces covered by micrometric silver Islands. *J. Biomed. Mater. Res. A* 100, 1521–8 (2012).
- [197] Damm, C. Silver ion release from polymethyl methacrylate silver nanocomposites. 13, 649–656 (2005).
- [198] Yoon, K.-Y., Hoon Byeon, J., Park, J.-H. & Hwang, J. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Sci. Total Environ.* 373, 572–5 (2007).
- [199] Fisher, K., Pope, M. & Phillips, C. Combined effect of copper and silver against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Hosp. Infect.* 73, 180–2 (2009).
- [200] Jing, H., Yu, Z. & Li, L. Antibacterial properties and corrosion resistance of Cu and Ag/Cu porous materials. *J. Biomed. Mater. Res. A* 87, 33–7 (2008).
- [201] Torres-Urquidy, O. & Bright, K. Efficacy of multiple metals against copper-resistant bacterial strains. *J. Appl. Microbiol.* 112, 695–704 (2012).
- [202] Foster, H. A., Ditta, I. B., Varghese, S. & Steele, A. Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 1847–68 (2011).
- [203] Renz, C. Lichtreaktionen der Oxyde des Titans, Cers und der Erdsäuren. *Helv. Chim. Acta* 106, 104–106 (1921).
- [204] Berger, O. & Fischer, W. Photo-induced switchable TiO₂-thin films for biological applications. *Bioinspired, Biomim. Nanobiomaterisl* 2, 100–116 (2013).
- [205] Hashimoto, K., Irie, H. & Fujishima, A. TiO₂ photocatalysis: A historical overview and future prospects. *Jpn. J. Appl. Phys.* 44, 8269–8285 (2005).
- [206] Wang, R., Sakai, N., Fujishima, A., Watanabe, T. & Hashimoto, K. Studies of surface wettability conversion on TiO₂ single-crystal surfaces. *J. Phys. Chem. B* 103, 2188–2194 (1999).
- [207] Miyauchi, M., Kieda, N. & Hishita, S. Reversible wettability control of TiO₂ surface by light irradiation. *Surf. Sci.* 511, 401–407 (2002).
- [208] Noort, R. Van. Titanium: the implant material of today. *J. Mater. Sci.* 22, (1987).
- [209] Lu, G., Bernasek, S. & Schwartz, J. Oxidation of a polycrystalline titanium surface by oxygen and water. *Surf. Sci.* 458, 80–90 (2000).
- [210] Miyagi, T., Kamei, M., Mitsunashi, T., Ishigaki, T. & Yamazaki, A. Charge separation at the rutile/anatase interface: a dominant factor of photocatalytic activity. *Chem. Phys. Lett.* 390, 399–402 (2004).
- [211] Qiu, X. *et al.* Hybrid Cu_xO/TiO₂ nanocomposites as risk-reduction materials in indoor environments. *ACS Nano* 6, 1609–1618 (2012).
- [212] Ewald, A., Glückermann, S. K., Thull, R. & Gbureck, U. Antimicrobial titanium/silver PVD coatings on titanium. *Biomed. Eng. Online* 5, 22 (2006).
- [213] Stranak, V. *et al.* Ionized vapor deposition of antimicrobial Ti–Cu films with controlled copper release. *Thin Solid Films* 550, 389–394 (2014).

- [214] Ditta, I. B. *et al.* Photocatalytic antimicrobial activity of thin surface films of TiO₂, CuO and TiO₂/CuO dual layers on Escherichia coli and bacteriophage T4. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 127–33 (2008).
- [215] Liu, Y., Wang, X., Yang, F. & Yang, X. Excellent antimicrobial properties of mesoporous anatase TiO₂ and Ag/TiO₂ composite films. *Microporous Mesoporous Mater.* 114, 431–439 (2008).
- [216] Wan, Y. Z. *et al.* Modification of medical metals by ion implantation of copper. *Appl. Surf. Sci.* 253, 9426–9429 (2007).
- [217] Kubacka, A., Muñoz-Batista, M. J., Ferrer, M. & Fernández-García, M. UV and visible light optimization of anatase TiO₂ antimicrobial properties: Surface deposition of metal and oxide (Cu, Zn, Ag) species. *Appl. Catal. B Environ.* 140–141, 680–690 (2013).
- [218] Chang, E. L., Simmers, C. & Knight, D. A. Cobalt complexes as antiviral and antibacterial agents. *Pharmaceuticals* 3, 1711–1728 (2010).
- [219] Popova, T. P., Alexandrova, R. I., Tudose, R., Mosoarca, E. & Costisor, O. Antimicrobial activity in vitro of four Nickel complexes. *Bulg. J. Agric. Sci.* 18, 446–450 (2012).
- [220] Mukherjee, A., I, M. S., Prathna, T. C. & Chandrasekaran, N. Antimicrobial activity of aluminium oxide nanoparticles for potential clinical applications. in *Science against Microbial Pathogens* 245–251 (2011).
- [221] Jiang, W., Mashayekhi, H. & Xing, B. Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles. *Environ. Pollut.* 157, 1619–25 (2009).
- [222] Wehling, J., Dringen, R., Zare, R. N., Maas, M. & Rezwani, K. Bactericidal activity of partially oxidized nanodiamonds. *ACS Nano* 8, 6475–83 (2014).
- [223] Hu, W. *et al.* Graphene-based antibacterial paper. *ACS Nano* 4, 4317–4323 (2010).
- [224] Haldar, J., An, D., Álvarez de Cienfuegos, L., Chen, J. & Klibanov, A. Polymeric coatings that inactivate both influenza virus and pathogenic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 17667–17671 (2006).
- [225] Rose, S. F., Okere, S., Hanlon, G. W., Lloyd, A. W. & Lewis, A. L. Bacterial adhesion to phosphorylcholine-based polymers with varying cationic charge and the effect of heparin pre-adsorption. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 16, 1003–15 (2005).
- [226] Sengstock, C. *et al.* Structure-related antibacterial activity of a titanium nanostructured surface fabricated by glancing angle sputter deposition. *Nanotechnology* 25, 195101 (2014).
- [227] Ivanova, E. P. *et al.* Bactericidal activity of black silicon. *Nat. Commun.* 4, 1–7 (2013).
- [228] Epstein, A., Hochbaum, A., Kim, P. & Aizenberg, J. Control of bacterial biofilm growth on surfaces by nanostructural mechanics and geometry. *Nanotechnology* 22, 494007 (2011).
- [229] Hochbaum, A. I. & Aizenberg, J. Bacteria pattern spontaneously on periodic nanostructure arrays. *Nano Lett.* 10, 3717–21 (2010).
- [230] Bazaka, K., Crawford, R. J. & Ivanova, E. P. Do bacteria differentiate between degrees of nanoscale surface roughness? *Biotechnol. J.* 6, 1103–14 (2011).
- [231] Anselme, K. *et al.* The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale (Review). *Acta Biomater.* 6, 3824–3846 (2010).
- [232] Ploux, L., Ponche, A. & Anselme, K. Bacteria/material interfaces: Role of the material and cell wall properties. *J. Adhes. Sci. Technol.* 24, 2165–2201 (2010).

- [233] Hegetschweiler, A. Quantifizierung der Ionenfreisetzung und Design von antimikrobiellen Materialien. (Bachelor-Thesis, Saarland University, 2011).
- [234] Hans, M. *et al.* Role of copper oxides in contact killing of bacteria. *Langmuir* 29, 16160–6 (2013).
- [235] Ribbing, C. G. & Roos, A. in *Handbook of Optical Constants of Solids* (ed. Palik, E. D.) II, 875–882 (Academic Press/Elsevier, 1997).
- [236] Hunter, D. W. L. and W. R. in *Handbook of Optical Constants of Solids* (ed. Palik, E. D.) I, 275–367 (Academic Press/Elsevier, 1997).
- [237] Zeiger, M., Solioz, M., Edongué, H., Arzt, E. & Schneider, A. S. Surface structure influences contact killing of bacteria by copper. *Microbiol. Open* 3, 327–32 (2014).
- [238] Ziemniak, S. E., Jones, M. E. & Combs, K. E. S. Copper(II) oxide solubility behavior in aqueous sodium phosphate solutions at elevated temperatures. *J. Solution Chem.* 21, 179–200 (1992).
- [239] P. Schindler, H. Althaus, F. Hofer, W. M. Löslichkeitsprodukte von Metalloxiden und -hydroxiden. *Helv. Chim. Acta* 48, 1204–1215 (1965).
- [240] Feitknecht, W. Über die Löslichkeitsprodukte der Oxyde und des Hydroxyds von Kupfer und über die Löslichkeit von Kupferhydroxyd in Natronlauge. *Helv. Chim. Acta* 27, 771 (1944).
- [241] Baes, C. F. & Mesmer, R. E. *The hydrolysis of cations*. (Wiley-VCH, 1976).
- [242] Wagman, D. D. *et al.* The NBS tables of chemical thermodynamic properties. *Phys. Chem. Ref. Data* 11, (1982).
- [243] Var'yash, L. N. No Title. *Geokhimiya* 1003–1013 (1995).
- [244] Palmer, D. A. Solubility measurements of crystalline Cu₂O in aqueous solution as a function of temperature and pH. *J. Solution Chem.* 40, 1067–1093 (2011).
- [245] Palmer, D. A. & Bénézeth, P. Solubility of copper oxides in water and steam. *14th Int. Conf. Prop. water steam Kyoto* -, - (2008).
- [246] Abicht, H., Gonskikh, Y., Gerber, S. D. & Solioz, M. Non-enzymatic copper reduction by menaquinone enhances copper toxicity in *Lactococcus lactis* IL1403. *Microbiology* 159, 1190–1197 (2013).
- [247] Klemm, S. O., Topalov, A. A., Laska, C. A. & Mayrhofer, K. J. J. Coupling of a high throughput microelectrochemical cell with online multielemental trace analysis by ICP-MS. *Electrochem. commun.* 13, 1533–1535 (2011).
- [248] Glindemann, D., Dietrich, A., Staerk, H. J. & Kusch, P. The two odors of iron when touched or pickled: (skin) carbonyl compounds and organophosphines. *Angew. Chem. int Ed.* 45, 7006–7009 (2006).
- [249] Chen, Y. *et al.* Electronic structure and morphology of dark oxides on zinc generated by electrochemical treatment. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15, 9812–22 (2013).
- [250] Hans, M. *et al.* Laser cladding of stainless steel with a copper-silver alloy to generate surfaces of high antimicrobial activity. *Appl. Surf. Sci.* 320, 195–199 (2014).
- [251] Támara Florez, J. C. Study of the laser cladding process and the antimicrobial activity of pure copper, pure silver and a combination of both. (Master-Thesis, Saarland University, 2011).
- [252] Exner, D. & Gebel, J. Einfluss von metallischen Oberflächenmaterialien auf die mikrobielle Besiedlung sowie der Einfluss von Reinigung und Desinfektion. (2009).

- [253] Assal, J., Hallstedt, B. & Gauckler, L. Thermodynamic assessment of the Ag-Cu-O system. *J. Phase Equilibria* 19, 351–360 (1998).
- [254] Chvoj, Z., Srikanth, S. & Ramachandrarao, P. Thermodynamic limits and kinetic probabilities during homogeneous nucleation in liquid Ag-Cu alloys. *J. Non-Equilib. Thermodyn.* 24, 360–371 (1999).
- [255] Fredriksson, H., Arai, Y., Emi, T., Haddad-Sabsevar, M. & Shibata, H. Melting temperature, transformation and metastable phase diagram of rapidly solidified Ag-Cu alloys. *Mater. Trans.* 39, 587–595 (1998).
- [256] Chen, Y. S. *et al.* Efficacy of point-of-entry copper-silver ionisation system in eradicating *Legionella pneumophila* in a tropical tertiary care hospital: implications for hospitals contaminated with *Legionella* in both hot and cold water. *J. Hosp. Infect.* 68, 152–8 (2008).
- [257] Nan, L. *et al.* Antibacterial mechanism of copper-bearing antibacterial stainless steel against *E. coli*. *J. Mater. Sci. Technol.* 24, 197–201 (2008).
- [258] Zhang, X. *et al.* Surface microstructures and antimicrobial properties of copper plasma alloyed stainless steel. *Appl. Surf. Sci.* 258, 1399–1404 (2011).
- [259] Zhang, X. *et al.* Bactericidal behavior of Cu-containing stainless steel surfaces. *Appl. Surf. Sci.* 258, 10058–10063 (2012).
- [260] Nan, L., Liu, Y., Lü, M. & Yang, K. Study on antibacterial mechanism of copper-bearing austenitic antibacterial stainless steel by atomic force microscopy. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19, 3057–62 (2008).
- [261] Mathews, S., Hans, M., Mücklich, F. & Solioz, M. Contact killing of bacteria on copper is suppressed if bacterial-metal contact is prevented and is induced on iron by copper ions. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 2605–11 (2013).
- [262] Thome, A. Quantitatives Adhäsionsverhalten von Bakterien während Abtötungsversuchen auf antimikrobiellen Oberflächen. (Bachelor-Thesis, Saarland University, 2014).
- [263] Loskill, P. *et al.* Reduced adhesion of oral bacteria on hydroxyapatite by fluoride treatment. *Langmuir* 29, 5528–33 (2013).
- [264] Wang, D. Metallic surface patterning on copper by laser interference lithography and the antimicrobial impact. (Master-Thesis, Saarland University, 2013).
- [265] Wolferen, H. Van & Abelmann, L. in *Lithography: Principles, Processes and Materials* (ed. Hennessy, T. C.) 133–148 (Nova Science Publishers, Inc., 2011).
- [266] Baureder, M., Reimann, R. & Hederstedt, L. Contribution of catalase to hydrogen peroxide resistance in *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 331, 160–4 (2012).
- [267] Van de Guchte, M. *et al.* Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek, Kluwer Acad. Publ.* 82, 187–216 (2002).
- [268] Gutierrez, H., Portman, T., Pershin, V. & Ringuelette, M. Evaluation of biocidal efficacy of copper alloy coatings in comparison with solid metal surfaces: generation of organic copper phosphate nanoflowers. *J. Appl. Microbiol.* 114, 680–7 (2013).
- [269] Tian, W.-X. *et al.* Copper as an antimicrobial agent against opportunistic pathogenic and multidrug resistant *Enterobacter* bacteria. *J. Microbiol.* 50, 586–93 (2012).
- [270] Jacobs, A., Lafolie, F., Herry, J. M. & Debroux, M. Kinetic adhesion of bacterial cells to sand: Cell surface properties and adhesion rate. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 59, 35–45 (2007).

- [271] Hori, K. & Matsumoto, S. Bacterial adhesion: From mechanism to control (Review). *Biochem. Eng. J.* 48, 424–434 (2010).
- [272] Bremer, P. J., Geese, G. G. & Drake, B. Atomic force microscopy examination of the topography of hydrated bacterial biofilm on a copper surface. *Curr. Microbiology* 24, 223–230 (1992).
- [273] Critchley, M., Cromar, N., McClure, N. & Fallowfield, H. J. Biofilms and microbially influenced cuprosolvency in domestic copper plumbing systems. *J. Appl. Microbiol.* 91, 646–651 (2001).
- [274] Jungfer, C. *et al.* Drinking water biofilms on copper and stainless steel exhibit specific molecular responses towards different disinfection regimes at waterworks. *J. Bioadh. Biofilm Res.* 29, (2013).
- [275] Agarwala, M., Choudhury, B. & Yadav, R. N. S. Comparative study of antibiofilm activity of copper oxide and iron oxide nanoparticles against multidrug resistant biofilm forming uropathogens. *Indian J. Microbiol.* 54, 365–368 (2014).
- [276] Díaz, C., Schilardi, P. & de Mele, M. F. L. Influence of surface sub-micropattern on the adhesion of pioneer bacteria on metals. *Artif. Organs* 32, 292–8 (2008).
- [277] Bonk, S. Quantitative Untersuchung der Bakterienadhäsion auf Laser-Interferenzstrukturen in der Größenordnung der Bakterien. (Study-Thesis, Saarland University, 2013).
- [278] Kreis, C. T. Bakterienadhäsion. (Bachelor-Thesis, Saarland University, 2011).
- [279] Epstein, A. K., Hong, D., Kim, P. & Aizenberg, J. Biofilm attachment reduction on bioinspired, dynamic, micro-wrinkling surfaces. *New J. Phys.* 15, 095018 (2013).
- [280] Katsikogianni, M. & Missirlis, Y. F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur. Cell. Mater.* 8, 37–57 (2004).
- [281] Díaz, C., Schilardi, P. L., Salvarezza, R. C. & Fernández Lorenzo de Mele, M. Have flagella a preferred orientation during early stages of biofilm formation?: AFM study using patterned substrates. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 82, 536–42 (2011).
- [282] Díaz, C., Schilardi, P. L., Salvarezza, R. C. & de Mele, M. F. L. Nano/microscale order affects the early stages of biofilm formation on metal surfaces. *Langmuir* 23, 11206–10 (2007).
- [283] Whitehead, K. A. & Verran, J. The effect of surface topography on the retention of microorganisms. *Food Bioprod. Process.* 84, 253–259 (2006).
- [284] Lüdecke, C. Investigation of bacterial adhesion mechanisms on nanorough biomaterials surfaces using a novel in vitro testing device. (PhD-Thesis, Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2014).
- [285] Lasagni, F. *et al.* Three-dimensional characterization of “as-cast” and solution-treated AlSi12(Sr) alloys by high-resolution FIB tomography. *Acta Mater.* 55, 3875–3882 (2007).
- [286] Bushby, A. J. *et al.* Imaging three-dimensional tissue architectures by focused ion beam scanning electron microscopy. *Nat. Protoc.* 6, 845–58 (2011).
- [287] Alhede, M. *et al.* Combination of microscopic techniques reveals a comprehensive visual impression of biofilm structure and composition. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 65, 335–42 (2012).

- [288] Marko, M., Hsieh, C., Schalek, R., Frank, J. & Mannella, C. Focused-ion-beam thinning of frozen-hydrated biological specimens for cryo-electron microscopy. *Nat. Methods* 4, 215–217 (2007).
- [289] Burkhardt, C. & Nisch, W. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an mit FIB-Präparation hergestellten Grenzflächen von biologischen Materialien und Werkstoffen: erste Ergebnisse. *Pract. Metallogr.* 42, 161–171 (2005).
- [290] Rojan, A. Der einfluss von antimikrobiellen Kupferwerkstoffen auf Bakterien - Eine elektronenmikroskopische Strukturanalyse. (Bachelor-Thesis, Saarland University, 2013).
- [291] Iverson, W. P. Microbial corrosion of metals. *Adv. Appl. Microbiol.* 32, 1–63 (1987).
- [292] Hans, M., Müller, F., Grandthyll, S., Hüfner, S. & Mücklich, F. Anisotropic wetting of copper alloys induced by one-step laser micro-patterning. *Appl. Surf. Sci.* 263, 416–422 (2012).
- [293] D'Alessandria, M. & Mücklich, F. Tailoring the chemical behavior of aluminum for selective etching by laser interference metallurgy. *Appl. Phys. A* 98, 311–320 (2010).
- [294] Müller, F. *et al.* How does graphene grow? Easy access to well-ordered graphene films. *Small* 5, 2291–2296 (2009).
- [295] Ahrland, S., Chatt, J. & Davies, N. R. The relative affinities of ligand atoms for acceptor molecules and ions. *Quart. Rev. Chem. Soc.* 12, 265–276 (1958).
- [296] Steiger, M. & Döll, A. Untersuchungen über die Desinfektionswirkung des Sublimats. *Zeitschrift für Hyg. und Infekt.* 73, 324–344 (1912).
- [297] Glišić, B. Đ. & Djuran, M. I. Gold complexes as antimicrobial agents: an overview of different biological activities in relation to the oxidation state of the gold ion and the ligand structure. *Dalt. Trans* 43, 5950–69 (2014).
- [298] Feitknecht, W. & Schindler, P. Solubility constants of metal oxides, metal hydroxides and metal hydroxide salts in aqueous solution. *Pure Appl. Chem.* (1963).
- [299] Sauls, F. C. A simple determination of the Ag₂O solubility product by potentiometric determinations of both Ag⁺¹ and OH⁻¹. *J. Chem. Educ.* 90, 1212–1214 (2013).
- [300] Palmer, D. A., Benezeth, P., Wesolowski, D. J. & Anovitz, L. M. Solubility of, and hydrogen ion adsorption on, some metal oxides in aqueous solutions to high temperatures. in *5. Int. Conf. Cycle. Chem. Foss. Plants* (1997).
- [301] Ahonkhai, I., Pugh, W. & Russell, A. Sensitivity to antimicrobial agents of some mercury-sensitive and mercury-resistant strains of Gram-negative bacteria. *Curr. Microbiol.* 11, 183–185 (1984).
- [302] Nies, D. H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 313–339 (2003).
- [303] Saier, M., Tam, R., Reizer, A. & Reizer, J. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol. Microbiol.* 11, 841–848 (1994).
- [304] Šandor, M., Geistmann, F. & Schuster, M. An anthracene-substituted benzoylthiourea for the selective determination of Hg(II) in micellar media. *Anal. Chim. Acta* 388, 19–26 (1999).
- [305] Ziemniak, S. E., Jones, M. E. & Combs, K. E. S. Solubility and phase behavior of nickel oxide in aqueous sodium phosphate solutions at elevated temperatures. *J. Solution Chem.* 18, 1133–1152 (1989).

-
- [306] Tagirov, B. R., Baranova, N. N., Zotov, A. V., Schott, J. & Bannykh, L. N. Experimental determination of the stabilities of Au₂S(cr) at 25°C and Au(HS)₂⁻ at 25–250°C. *Geochim. Cosmochim. Acta* 70, 3689–3701 (2006).
- [307] Biedermann, G. & Sillen, L. G. Studies on the hydrolysis of metal ions. *Acta Chem. Scand.* 14, 717–725 (1960).
- [308] Long, F. *et al.* Crystal structures of the CusA efflux pump suggest methionine-mediated metal transport. *Nature* 467, 484–8 (2010).
- [309] Michels, H., Moran, W. & Michel, J. Antimicrobial properties of copper alloy surfaces, with a focus on hospital-acquired infections. *Adv. Mater. Process.* (2008).
- [310] Kagwade, S. V., Clayton, C. R., Chidambaram, D. & Halada, G. P. Photochemical breakdown of acetone on copper. *Electrochim. Acta* 46, 2337–2342 (2001).

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Steigende Antibiotikaresistenz am Beispiel von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , einem oft als nosokomialer Erreger auftretenden Bakterium. Im Ländervergleich dargestellt sind die Prozentsätze an <i>P. aeruginosa</i> , die gegen Piperacillin, ein gängiges Antibiotikum, resistent sind. Im direkten Vergleich zwischen 2011 und 2012 ist ein deutlicher, für andere Bakterienarten repräsentativer, Resistenzanstieg zu beobachten. ^[11,12]	2
Abbildung 2: a) Rot markiert in einem repräsentativen Krankenzimmer sind Kontaktoberflächen, auf denen in Studien eine starke Keimbelastung nachgewiesen wurde. ^[17-20] b) Möglicher Lösungsansatz: Durchbrechen der nosokomialen Infektionsschleife durch den Einsatz antimikrobieller Materialien. ^[21]	3
Abbildung 3: Gegenüberstellung elementarer Strukturen der Materialwissenschaft und Biologie mit entsprechendem Skalenverhältnis. Die relevanten Schnittstellen der Arbeit liegen auf Ebene der Mikrostruktur, der Laser-Interferenzstrukturierung von Oberflächen und der durchschnittlichen Bakteriengröße. Quellen: eigene Aufnahmen und nicht geschützte Internetquellen.....	4
Abbildung 4: Schematischer Aufbau von Bakterien am Beispiel des stäbchenförmigen Modellorganismus <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>). Die für antimikrobiellen Effekte relevanten Bausteine der Zellwand und des Zellinneren sind eingerahmt. Modifiziert aus ^[30]	7
Abbildung 5: Schema des Zellwandaufbaus von a) Gram-positiven und b) Gram-negativen Bakterien.	8
Abbildung 6: a) Namensgebung und ableitbare Eigenschaften am Beispiel von <i>S. aureus</i> , der in b) rasterelektronenmikroskopisch dargestellt ist. ^[30] Die für den Keim typische Gelbfärbung wurde hier durch Bildnachbearbeitung erzeugt.....	9
Abbildung 7: Idealierte Wachstumskurve einer Bakterienkultur in flüssigem Nährmedium.....	12
Abbildung 8: Ausbildung eines Hemmhofs um vier silberbeschichtete Glasbruchstücke (Ag-GCI) auf einem mit <i>S. aureus</i> besiedelten Nährboden. Modifiziert aus ^[49]	14
Abbildung 9: Lebend/Tot-Färbung von <i>E. coli</i> auf Kupfer und Edelstahl im Vergleich. ^[51] Die Aufnahme erfolgte mittels Fluoreszenzspektroskopie. Bakterien mit intakter Membran werden grün, welche mit beschädigter Membran rot dargestellt.....	15
Abbildung 10: Exemplarische Darstellung der Ergebnisse eines Wachstumstests mit <i>E. coli</i> bei verschiedenen Konzentrationen von antibakteriell wirkenden Silber-Nanopartikeln. Zeitabhängig aufgetragen ist die relative optische Dichte der Lösung bei $\lambda = 600 \text{ nm}$. ^[61]	15
Abbildung 11: Schematische Darstellung des generellen Ablaufs und etablierter Versuchsvarianten bei einem bakteriellen Abtötungstest auf Festkörperoberflächen.....	16
Abbildung 12: Absorptionsverhalten von verschiedenen Metallen und Silizium in Abhängigkeit der Wellenlänge. Rohdaten aus ^[93]	20
Abbildung 13: Absorptionsspektren einiger positiv-Fotolacke (MicroChemicals GmbH). ^[94]	21
Abbildung 14: a) Schema der Laser-Interferenzstrukturierung von Oberflächen und laterale Größenordnungen am Beispiel der Zweistrahlinterferenz. Rechts dargestellt sind die geometrischen Laserstrahlkonfigurationen (oben) sowie die resultierenden Intensitätsverteilungen (unten) im Falle von b) 2-Strahl- bzw. c) 3-Strahlinterferenz. Berechnete Intensitätsverteilungen modifiziert aus ^[99]	23
Abbildung 15: Schema und wichtige Größenordnungen des LC Prozesses.....	25
Abbildung 16: Potential-pH-Diagramm (Pourbaix-Diagramm) für das System Cu-H ₂ O bei 25°C. ^[1] Cu(OH) ₂ ist im Diagramm nicht berücksichtigt. Die Geraden A, B und C ergeben sich aus den im Folgenden beschriebenen Gleichungen.....	30

Abbildung 17: Dargestellt ist die Keimbelastung durch Kontakt auf bluthaltigen Nährböden (rechts) eines schwach belasteten Messingtürgriffs (oben, CuZn33) im Vergleich zu einem stark belasteten Edelstahltürgriffs (unten). Quelle: Kuhn, 1982 ^[145] .	34
Abbildung 18: Schematische Darstellung möglicher mikrobiologischer Toxizitätsmechanismen von Kupferionen an einer Bakterienzelle. A: Zellwandschädigung; B: Fragmentierung der DNS; C: Deaktivierung von Proteinen; D: Redoxreaktionen.	36
Abbildung 19: Absterberaten k von a) <i>E. coli</i> (Gram-negativ) und b) <i>S. aureus</i> (Gram-positiv) auf verschiedenen Metallen ermittelt nach JIS. Modifiziert aus ^[2] .	48
Abbildung 20: Ellipsometrische Differenzspektren $\delta\psi$ für Kuperoxide. Die Referenzspektren a) und b) wurden für verschiedene Oxidschichtdicken von Cu ₂ O und CuO auf Basis von Literaturdaten berechnet. In c) und d) dargestellt sind die gemessenen Differenzspektren in TRIS- bzw. PBS-Pufferlösung im zeitlichen Verlauf.	55
Abbildung 21: Ellipsometrisch bestimmter Wachstumsverlauf für CuO auf Kupfer in PBS- und TRIS-Puffermedium. Dargestellt sind jeweils zwei Einzelmessungen, die mittlere Schichtwachstumsrate beträgt etwa 0,01 nm min ⁻¹ .	56
Abbildung 22: REM-Aufnahmen und schematischer Schichtaufbau der thermisch auf Kupfer generierten Cu ₂ O- und Cu ₂ O/CuO-Doppelschichten.	57
Abbildung 23: XRD-Diffraktogramme der auf Kupfer thermisch generierten Cu ₂ O-Schichten (oben) und Cu ₂ O/CuO-Doppelschichten (unten).	58
Abbildung 24: Zeit-Abtötungsdiagramme für Abtötungsversuche auf Glas, Kupfer und thermisch generierten Kupferoxidoberflächen in a) PBS- und b) TRIS-Medium nach dem <i>wet plating</i> Verfahren.	59
Abbildung 25: Cu-Ionenkonzentration in PBS- und TRIS-Medium auf Kupfer und thermisch generierten Kupferoxidoberflächen im zeitlichen Verlauf sowie linear gefittete, oberflächennormierte Abgaberraten. Für Kupfer entspricht 1 mmol L ⁻¹ genau 63,54 mg L ⁻¹ .	60
Abbildung 26: a) flächenmäßig auftragsgeschweißte und polierte Cu-Ag-Legierung auf Edelstahlsubstrat; b) REM-Aufnahme eines FIB-Querschnitts durch Cu-Ag-Legierung und Substrat; c) Eine in diesem Querschnitt durchgeführte EDX-Linienmessung senkrecht zur Substratoberfläche belegt eine minimale Durchmischung zwischen Beschichtung und Substrat.	66
Abbildung 27: a) XRD-Diffraktogramm mit berechneter Zusammensetzung und b) Mikrostruktur- ausbildung (REM-Aufnahme) der auftragsgeschweißten Cu-Ag-Legierung. Gekennzeichnet sind die kupferreiche α -, die silberreiche β -Phase sowie Cu ₂ O-Einschlüsse.	68
Abbildung 28: a) Zeit-Abtötungsdiagramme für Abtötungsversuche auf Edelstahl, Silber, Kupfer und der auftragsgeschweißten Cu-Ag-Legierung in PBS-Medium nach dem <i>wet plating</i> Verfahren. b) Cu- und Ag-Ionenkonzentrationen in PBS-Medium auf reinen Metallen und der auftragsgeschweißten Cu-Ag-Legierung (tiefgestellt: Cu, Ag bzw. CuAg) im zeitlichen Verlauf. Für Kupfer entspricht 1 μ mol L ⁻¹ genau 63,54 μ g L ⁻¹ , für Silber 107,87 μ g L ⁻¹ .	69
Abbildung 29: Zeit-Abtötungsdiagramme für Abtötungsversuche auf Edelstahl, Silber, Kupfer und der auftragsgeschweißten Cu-Ag-Legierung mit PBS-Medium nach dem <i>dry plating</i> Verfahren.	70
Abbildung 30: a) Zeitlicher Verlauf der Anzahl sich anlagernder Bakterien unter statischen Bedingungen in H ₂ O auf poliertem Messing (leere Symbole) und Edelstahl (volle Symbole). Dargestellt sind jeweils drei unabhängige Versuche. Ab ca. 75 min (vertikalen Markierung) wurde ein Übergang zu nicht-linearem Verhalten beobachtet. b) Zeit-Abtötungsdiagramme zu den gleichen Oberflächen ermittelt durch <i>wet plating</i> in PBS-Medium.	75
Abbildung 31: REM-Aufnahmen der flächenmäßig auf poliertem Kupfer generierten, inerten Abstandsstrukturen aus positiv-Fotolack in a) Übersichts- und b) Nahansicht. Der Einschub in a) zeigt die zur Belichtung eingesetzte laterale Intensitätsverteilung der interferierenden Laserstrahlen.	76

Abbildung 32: Exemplarische REM-Aufnahmen und schematische Querschnitte von getrockneten <i>Enterococcus hirae</i> Bakterien nach 100 min <i>wet plating</i> in TRIS-Medium auf a) poliertem Kupfer und b) Abstandsstrukturen.....	77
Abbildung 33: Zeit-Abtötungsdiagramme für Abtötungsversuche auf reinem Kupfer, Abstandsstrukturen auf Kupfer, einer Glasreferenz und deckend mit Fotolack beschichtetem Kupfer in TRIS-Medium nach dem <i>wet plating</i> Verfahren.....	78
Abbildung 34: Cu-Ionenkonzentration in TRIS-Medium auf reinem Kupfer und Abstandsstrukturen auf Kupfer im zeitlichen Verlauf. Für Kupfer entspricht 1 mmol L^{-1} genau $63,54 \text{ mg L}^{-1}$	78
Abbildung 35: Zeit-Abtötungsdiagramme für Abtötungsversuche auf Glas und Eisen nach dem <i>wet plating</i> Verfahren in reinem TRIS-Medium (leere Symbole) und TRIS-Medium mit Cu_2SO_4 einer Gesamtkonzentration von 4 mmol L^{-1} (volle Symbole).....	79
Abbildung 36: a) REM-Aufnahme einer linienstrukturierten und goldbeschichteten Polyimidoberfläche und kontrastoptimierte, lichtmikroskopische Aufnahme von auf dieser Oberfläche adhätierenden <i>S. carnosus</i> Bakterien (Einschub). b) Bakterienadhäsion während eines Fließversuchs auf den in a) dargestellten Oberflächen (LIS) im Vergleich zu einer unstrukturierten, goldbeschichteten Polyimidoberfläche (Referenz) im zeitlichen Verlauf.....	87
Abbildung 37: a) REM-Aufnahme eines adhätierenden, getrockneten <i>S. carnosus</i> Bakteriums auf linienstrukturiertem und goldbeschichtetem Polyimid. b) FIB-Querschnitt im aufsitzenden Bakterium (d) mit c: Pt-Schutzschicht, e: Au-Beschichtung, f: Polyimidsubstrat und g: Poren. Markiert sind die Kontaktpunkte des Bakteriums zur Oberfläche.....	89
Abbildung 38: Zeit-Abtötungsdiagramme für Abtötungsversuche auf SiO_2 und Kupfer in PBS-Medium nach dem <i>wet plating</i> Verfahren. Nach 120 min wurde jeweils eine Probenserie im Testzustand ohne Bakterienabnahme für REM-Untersuchungen präpariert (120 min Si bzw. Cu).....	90
Abbildung 39: Chemisch präparierte, stäbchenförmige <i>P. fluorescens</i> Bakterien auf SiO_2 - (a , b)) und Cu-Oberflächen (c) , d)) nach 120 min <i>wet plating</i> mit PBS-Medium. Dargestellt sind Oberflächenaufnahmen im Sekundärelektronenkontrast (a, c)) und jeweils ein repräsentativer FIB-Querschnitt eines einzelnen, aufliegenden Bakteriums in UHR (b, d)).....	91
Abbildung 40: a) REM-Aufnahme einer linienstrukturierten Kupferoberfläche (LIS) mit $P = 10 \text{ } \mu\text{m}$, b) XPS-Spektren der linienstrukturierten (LIS) und einer homogen bestrahlten Kupferprobe (OxL) sowie einer thermisch oxidierten (OxR) und oxidfreien Referenzprobe (Cu). Die lokale Laserfluenz in den Intensitätsmaxima der linienstrukturierten Probe entsprach der globalen Fluenz F_G der homogen strukturierten Probe von $3,34 \text{ J cm}^{-2}$. Rechts dargestellt ist die vermutete, schematische Oxidverteilung (grau) auf den entsprechenden Oberflächen.....	93
Abbildung 41: Zusammenfassung des abgeschätzten Einflusses und Stellenwerts wichtiger Faktoren für das antibakterielle Verhalten metallischer Werkstoffe.....	101
Abbildung 42: Auftragung der Abtötungsrate Z in Abhängigkeit des relativen Kupfergehalts der entsprechenden Legierungen. Quellen: a) gesamte Tabelle, b) Studien mit einheitlichen Versuchsbedingungen ^[66,68]	110
Abbildung 43: Abtötungsverhalten von Kupferlegierungen und Edelstahl (S304) gegenüber MRSA ermittelt mittels <i>wet plating</i> . ^[309] Die verwendeten Legierungen sind: CuFe0,7P (C197), CuZn20 (C240) und CuZn27Ni18 (C770).....	111
Abbildung 44: Definition der Raumwinkel α und β für j Einzelstrahlen mit Bezug zum verwendeten Koordinatensystem.....	137

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einstufung der Biostoffe in Risikogruppen mit beispielhaften Bakterienvertretern. ^[36] In dieser Arbeit verwendete Bakterienarten sind mit * gekennzeichnet.....	10
Tabelle 2: Zusammenfassung der wichtigsten, etablierten Methoden zur Evaluierung antibakterieller Eigenschaften von Materialien und deren Merkmale.....	13
Tabelle 3: Physikalisch-chemische Größen und Eigenschaften von Kupfer, Silber und Kupferoxiden. ^[93] Temperaturabhängige Größen sind bei 25 °C angegeben. Das elektrochemische Standardpotential bezieht sich auf Cu ²⁺ und Ag ⁺ . *: Bezug zur LIS, ^v : Bezug zum LC der Kupfer-Silber-Legierung.....	27
Tabelle 4: Meilensteine und historische Anwendungen von antimikrobiellem Kupfer.....	33
Tabelle 5: Quadratisch gemittelte Oberflächenrauheit (rms) von poliertem, reinem Kupfer (Cu), thermisch generierten Cu ₂ O- und CuO-Oberflächen und von polierten Kupferproben, die 300 min in Kontakt mit PBS- (Cu-PBS) bzw. TRIS-Lösung (Cu-TRIS) standen.....	58
Tabelle 6: Nach antibakterieller Wirkung geordnete Auflistung von relevanten biologischen, chemischen und physikalischen Eigenschaften und Kenngrößen ausgewählter Metalle und deren Ionen (Oxidationsstufe hochgestellt in Klammern). Aufgelistet sind: im JIS-Verfahren bestimmte Abtötungsrate <i>k</i> an <i>E. coli</i> und <i>S. aureus</i> ^[2] ; die Einordnung der metallischen Ionen nach dem HSAB-Konzept ^[295] (soft, medium, hard); der pK _L -Wert zum Löslichkeitsprodukt des Metallsulfids (pK _{L(MeS)}) als Maßstab für die Thiophilizität; der pK _L -Wert zum Löslichkeitsprodukt der relevanten Metalloxid- bzw. Metallhydroxidverbindung (pK _{L(MeO/Me(OH))}); der „praktische“ Edelcharakter des Metalls (EC, geringerer Wert entspr. edlerem Verhalten) ^[1] ; das elektrochemische Standardpotential E ₀ ; die Elektronegativität (χ); die erste Ionisierungsenergie (IE) sowie die reale Elektronenkonfiguration des entsprechenden Metalls. *: Hg wird als toxisch gegenüber Bakterien eingestuft ^[296] ; **: die Thiophilizität von Au wird als hoch eingestuft ^[297] . Verlauf der relativen Farbskala: Weiß-Gelb-Orange-Rot. El. = Element, Qu. = Quellen.....	97
Tabelle 7: Nach Materialien geordnete Zusammenstellung von Forschungsarbeiten, die die antimikrobielle Wirkung von Kupferwerkstoffen durch Abtötungstests quantitativ erfassen. Von links nach rechts aufgeführt sind: die Zeilennummer (Nr.) die Zusammensetzung des Werkstoffs sowie der relative Kupferanteil in Gew.-% auf 1 % gerundet (Rot: 100 – 90, Orange: 89 – 80, Gelb: 79 – 70, Weiß: < 70 %); die Abtötungsrate <i>Z</i> , die als die logarithmische Reduzierung der Ausgangskonzentration an Erregern pro Zeiteinheit in log-Stufen pro Minuten (eckige Klammern) definiert wurde; die jeweils verwendete Testmethode und wichtige Umgebungsbedingungen (Meth.); präparative Maßnahmen sowie die im letzten Säuberungs- bzw. Desinfektionsschritt der Proben verwendete Lösung (Präparation); der/die getestete Erreger bzw. Bakterienspezies; die entsprechende Literaturquelle (Q.). Die gelisteten Studien wurden mit Ausnahme von ^[74] (Zeile 4, 35 °C) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Farbskalierung der Abtötungsrate <i>Z</i> von Weiß, Gelb, Orange nach Rot entspricht einer ansteigenden Abtötungsrate. Legende: T = Bakterienlösung wurde als Tropfen aufgebracht; S = Bakterienlösung wurde spreitend aufgebracht; A = atmosphäre Bedingungen; DP = <i>dry plating</i> (Bakterienlösung wurde mit Wattebausch aufgetragen, danach atmosphärische Bedingungen); WP = <i>wet plating</i> (aufgebrachte Bakterienlösung wurde in abgeschlossener oder feuchter Atmosphäre gelagert); JIS = Japanische Industriestandardmethode JIS Z 2801 (eine ausführliche Beschreibung der verschiedenen Testmethoden findet sich ab S. 13); H ₂ SO ₄ = verdünnte Schwefelsäure wurde zum Lösen von Oberflächenoxid eingesetzt; F = die Proben wurden in der Flamme sterilisiert.....	106

Anhang

A: Herleitung der Intensitätsverteilung für 3-Strahl-Laserinterferenz

Die Intensitätsverteilung für 3-Strahlinterferenz wurde von A. Lasagni im Rahmen seiner Doktorarbeit berechnet und wird hier zusammengefasst.^[99] Die folgende Abbildung zeigt die den Berechnungen zu Grunde liegende Winkelsituation in Bezug zu dem in Abbildung 14 definierten Koordinatensystem:

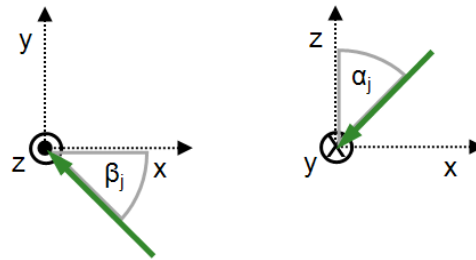


Abbildung 44: Definition der Raumwinkel α und β für j Einzelstrahlen mit Bezug zum verwendeten Koordinatensystem.

Durch eine Vereinfachung des Problems auf eindimensionale, harmonische, monochromatische und linear polarisierte Wellen lässt sich der reale Fall eines Laserstrahls hinreichend annähern. Allgemein berechnet sich die Interferenz von j Einzelstrahlen über das Superpositionsprinzip durch die Summe der elektrischen Felder E damit zu:

$$E = \sum_{j=1}^n E_j = \sum_{j=1}^n E_{0j} e^{i(k\vec{r} - \omega t)} \quad (23)$$

wobei E_{0j} die Amplitude des elektrischen Felds, k die Wellenzahl und \vec{r} den Ausbreitungsvektor der Welle darstellen. Das Produkt $k\vec{r}$ kann allgemein beschrieben werden als:

$$k \cdot \vec{r} = \begin{pmatrix} k \cdot \sin\alpha_j \cdot \cos\beta_j \\ k \cdot \sin\alpha_j \cdot \sin\beta_j \\ k \cdot \cos\alpha_j \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} \quad (24)$$

Nach der in Abbildung 44 durchgeführten Winkeldefinition vereinfacht sich Gleichung (23) zu:

$$E = \sum_{j=1}^n E_j = \sum_{j=1}^n E_{0j} e^{-ik \sin\alpha_j (x \cos\beta_j - y \sin\beta_j)} \quad (25)$$

Die Berechnung erfolgt für den in dieser Arbeit umgesetzten, symmetrischen Fall der 3-Strahlinterferenz, wie in Abbildung 14 dargestellt. Entsprechend dem in Abbildung 44 definierten Winkelsystem bedeutet dies für die Raumwinkel α_i und β_i der j Einzelstrahlen:

$$\alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = \alpha; \beta_1 = 0, \beta_2 = 2/3\pi, \beta_3 = -2/3\pi \quad (26)$$

Weiterhin wird eine einheitliche Ausgangsintensität I_0 für alle Strahlen vorausgesetzt.

Die allgemeine Intensitätsverteilung von sich überlagernden Strahlen ergibt sich zu:

$$I = \frac{c\epsilon_0}{2} |E|^2 \quad (27)$$

wobei c die Lichtgeschwindigkeit und ϵ_0 die Permittivitätskonstante des Vakuums darstellen. Die resultierende Intensitätsverteilung in der x - y -Ebene kann so letztendlich ausgedrückt werden als:

$$I = \frac{9}{2} c\epsilon_0 E_0^2 \left[\begin{aligned} & \left(-\cos(kx \sin\alpha) - \cos\left(k \sin\alpha \left(-\frac{x}{2} - y \frac{\sqrt{3}}{2}\right)\right) - \cos\left(k \sin\alpha \left(-\frac{x}{2} + y \frac{\sqrt{3}}{2}\right)\right) \right)^2 \\ & + \left(-\sin(kx \sin\alpha) + \sin\left(k \sin\alpha \left(-\frac{x}{2} - y \frac{\sqrt{3}}{2}\right)\right) - \sin\left(k \sin\alpha \left(-\frac{x}{2} + y \frac{\sqrt{3}}{2}\right)\right) \right)^2 \end{aligned} \right] \\ = 9I_0 \cdot [A] \quad (28)$$

wobei $[A]$ dem in Gleichung (5) verwendeten Platzhalter entspricht. In Abbildung 14 ist diese Intensitätsverteilung graphisch dargestellt.

B: Rezepte der verwendeten Puffer- und NährlösungenPBS-Medium (4 L)

5,52 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (EMSURE, A0516946)

32,76 g NaCl (2,8 mol L^{-1})

Zugabe von 150 mL destilliertem Wasser

Zugabe von NaOH-Lösung (10 mol L^{-1}), bis pH 7

Auffüllen auf 200 mL ergibt 20-fach konz. PBS-Lösung, bei Bedarf 1:19 auf 4 L verdünnen

TRIS-Medium (TRIS-Cl, 200 ml)

2,42 g $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ (Tris(hydroxymethyl)aminomethan, AppliChem A1086)

Zugabe von 150 mL destilliertem Wasser

Zugabe von HCl-Lösung (1 mol L^{-1}), bis pH 7

Auffüllen auf 200 mL

N-Medium (400 mL)

10 g Trypticase Peptone BBL (BD BioSciences)

5 g Hefeextrakt

11 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (AnalaR Normagem, VWR)

20 ml Glukose (Merck 1.08337)

15 g Agar (nur für Agarplatten, AppliChem A0949)

Auffüllen auf 1 L, Autoklavieren bei 125 °C, Agarplatten heiß ausgießen

LB-Medium (Luria Broth, 1 L)

10g Trypticase Peptone (BD BioSciences)

5g Hefeextrakt

10 g NaCl

15 g Agar (nur für Agarplatten, AppliChem A0949)

Auffüllen auf 1 L, Autoklavieren bei 125 °C, Agarplatten heiß ausgießen

C: REM-Präparation biologischer Proben für die FIB-Strukturanalyse

1. Fixieren: Probe für mind. 2 h bei 4 °C (Kühlschrank) in Glutaraldehydlösung (2,5 % in PBS-Medium) lagern
2. Spülen: Probe für 15 min in PBS-Lösung lagern, 3x mit frischer Lösung durchführen
3. Dehydrieren: Probe in Ethanollösungen mit steigender Konzentration lagern:
 - 1 min in 30 %
 - 3 min in 50 %
 - 5 min in 70 %
 - 5 min in 90 %
 - 5 min in 95 %
 - 10 min in reinem Ethanol (2x)
 - 20 min in reinem Ethanol
4. Trocknung: mindestens 15 min Lufttrocknung, Schutz vor Staub
5. Besputtern: 2 min mit 20 mA Au/Pd besputtern (ca. 3 - 5 nm)