

Antimikrobielle Beschichtungen

DOI: 10.1002/ange.200602738

Kontaktaktive antimikrobielle Beschichtungen aus wässrigen Suspensionen**

Andreas D. Fuchs und Joerg C. Tiller*

Antimikrobielle Oberflächenmodifikationen werden derzeit intensiv erforscht. Steigende Ansprüche an Hygiene sowie die Vorbeugung von Infektionskrankheiten verlangen nach Materialien, deren Oberfläche Mikroben abtötet. Die meisten derartigen kommerziellen Materialien basieren auf einer

Imprägnierung mit Bioziden, wie Silberionen,^[1] quartären Ammoniumverbindungen,^[2] Triclosan,^[3] Chlorhexidin,^[4] Chlor,^[5] Tributylzinn^[6] und diversen Antibiotika.^[7] Obgleich effizient, führt die permanente Freisetzung von Bioziden zu erheblicher Umweltbelastung^[8,9] und fördert außerdem die Bildung resistenter Bakterienstämme, was ein großes Problem der modernen Medizin ist.^[10]

Da ein Biofilm die problematischste biologische Kontamination ist,^[11] erscheint es nicht notwendig, alle Mikroben in der Umgebung abzutöten, sondern nur Bakterien oder Pilze auf den jeweiligen Oberflächen am Wachstum zu hindern. Dies lässt sich durch mikrobeabweisende Oberflächen erreichen, die meistens durch Aufpfropfen von proteinabweisenden Polymeren, z. B. von Polyethylenglycol,^[12] hergestellt werden. Die Kombination eines bakterienabweisenden und eines Biozid freisetzenden Systems ist wirksamer als die jeweilige Einzellösung.^[13]

Oberflächenmodifikationen, die Mikroben bei Kontakt abtöten, ohne dabei ein Biozid freizusetzen, bieten einen modernen Weg zur Herstellung prinzipiell permanent steriler Materialien. Solche kontaktaktiven Modifikationen können durch chemisches Aufpfropfen von antimikrobiellen Polymeren, wie *N*-alkylierten Poly-4-vinylpyridinen,^[14] quaternisierten Polyethylenimininen^[15] und quartären Acrylsäurederivaten,^[16] auf zahlreiche verbreitete Materialien wie Glas,^[14] Cellulose^[16] und Kunststoffe^[17] erhalten werden. Die genannten Polymere werden nicht freigesetzt und wirken sogar gegen multiresistente Bakterien.^[18] Darüber hinaus entwickeln die verbreiteten Bakterienstämme *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* keine Resistenzen gegen diese Oberflächen.^[19] Allerdings sind die bisherigen Methoden zur Präparation von kontaktaktiven Oberflächen sehr aufwändig und erfordern sämtlich die Verwendung von organischen Lösungsmitteln.^[20] Wir haben daher die in Abbildung 1 dargestellte, universell nutzbare Beschichtungsmethode auf der Basis wasserunlöslicher antimikrobieller Emulgatoren zur Emulsionspolymerisation entwickelt.

Hierfür geeignete maßgeschneiderte makromolekulare Emulgatoren sind Diblockcopolymere aus einem hydropho-

[*] A. D. Fuchs, Priv.-Doz. Dr. J. C. Tiller
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Freiburger Materialforschungszentrum (FMF) und
Institut für Makromolekulare Chemie
Stefan-Meier-Straße 21, 79104 Freiburg (Deutschland)
Fax: (+49) 761-203-4709
E-Mail: joerg.tiller@fmf.uni-freiburg.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Emmy Noether-Programms und vom Fonds der Chemischen Industrie finanziell unterstützt. Der verwendete Azoinitiator wurde freundlicherweise von Wako Chemicals GmbH zur Verfügung gestellt. Die Autoren danken Matthias Thiel für experimentelle Unterstützung, Rainer Wissert für die ESEM-Aufnahmen, Dr. Ralf Thomann für die TEM-Messungen und Dr. Klaus Pelz für die *S. aureus*-Zellen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

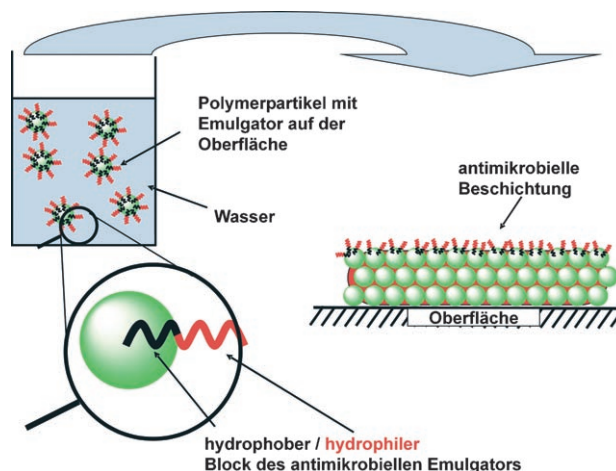


Abbildung 1. Kontaktaktive Beschichtungen aus wässrigen Polymersuspensionen.

ben Polystyrol(PS)-Block und einem hydrophilen Block des etablierten antimikrobiellen Polymers Poly-4-vinyl-*N*-methylpyridiniumiodid (P4VMP).^[21] Diese wurden mittels anionischer Polymerisation^[22] und anschließender Methylierung synthetisiert. Das Hydrophil/hydrophob-Verhältnis konnte dabei durch Veränderung des molaren Blockverhältnisses von PS/P4VMP im Bereich von 2:1 bis 1:4 eingestellt werden (siehe Tabelle 1). Alle erhaltenen Blockcopolymere PS-*b*-P4VMP sind in DMSO, nicht aber in Wasser löslich.

Tabelle 1: PS-*b*-P4VMP-Diblockcopolymere.

	1	2	3	Polymer 4
<i>n</i>	340	420	367	1330
<i>m</i>	710	450	183	325

Für erste Untersuchungen wurde PS₃₄₀-*b*-P4VMP₇₁₀ verwendet. Zu dem in Wasser angequollenen Diblockcopolymer wurden zunächst unter Rühren 10 Gew.-% Styrol zugegeben. Die folgende radikalische Polymerisation wurde thermisch mit dem ungeladenen wasserlöslichen Azoinitiator 2,2'-Azobis[2-methyl-*N*-(2-hydroxyethyl)propionamid] gestartet und resultierte in einer stabilen Polymerpartikelsuspension. Der mittlere Durchmesser der monomodalen Partikel wurde mit statischer Lichtstreuung zu 150 nm bestimmt. Um eine stabile Dispersion zu erhalten, mussten mindestens 2.5 Gew.-% (bezogen auf die Styrolmenge) des polymeren Emulgators eingesetzt werden. Die aus dieser Suspension gebildeten Filme waren sehr spröde; um elastischere Filme zu erhalten, wurde Styrol mit Butylacrylat (BA) copolymerisiert, was wegen der niedrigeren Glas-temperatur von PS-*co*-PBA zu einer besseren Filmbildung führen sollte.^[23] Mit steigendem BA-Gehalt wuchs die Partikelgröße von 150 nm für reines PS auf bis zu 450 nm für PS-*co*-PBA mit 50 Gew.-% PBA. Wie erwartet sind Beschichtungen aus den PS-*co*-PBA-Polymer-suspensionen mit einem PS/PBA-Verhältnis (w/w) von 70:30 und 60:40 transparent und elastisch. Filme aus einer 50:50-PS-*co*-PBA-Suspension sind dagegen zwar hochelastisch, aber lichtundurchlässig, da die Polymerpartikel offensichtlich in einem frühen Stadium der Filmbildung aggregieren.

Die ESEM-Aufnahmen in Abbildung 2 bestätigen sowohl die Partikelgrößen als auch die Größenverteilungen (ESEM = environmental scanning electron microscopy). Weiterhin wird die Filmbildung in den Abbildungen gut sichtbar. Während reine PS-Filme (Abbildung 2a) aus isolierten Kugeln bestehen, zeigt ein Film aus PS-*co*-PBA (70:30) bereits teilweise fusionierte Kugeln (Abbildung 2b), was die Voraussetzung für einen geschlossenen Polymerfilm ist. Die Verschmelzung nimmt mit steigendem BA-Gehalt zu, was im Fall von PS-*co*-PBA (60:40) bereits zu einem fast

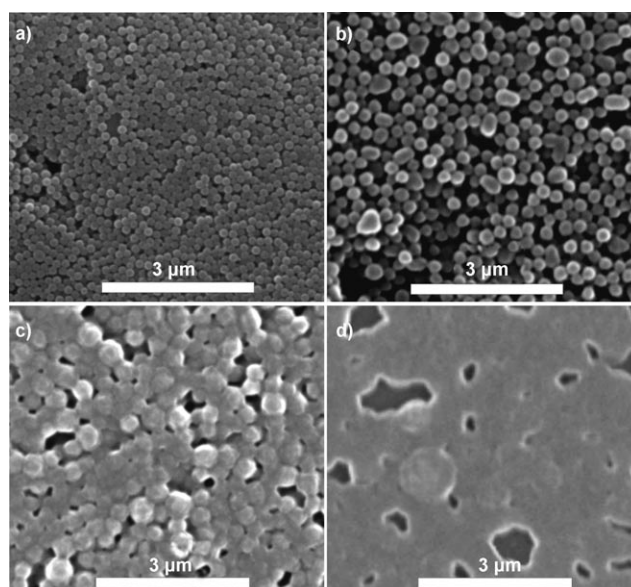


Abbildung 2. ESEM-Aufnahmen von Filmen aus verschiedenen PS-*co*-PBA-Copolymer-suspensionen. Die Filme bestehen aus a) PS, b) PS-*co*-PBA (70:30), c) PS-*co*-PBA (60:40) und d) PS-*co*-PBA (50:50). Alle Filme enthalten 2.5 Gew.-% PS₃₄₀-*b*-P4VMP₇₁₀.

vollständig dichten Film führt (Abbildung 2c). Eine weitere Erhöhung des BA-Gehaltes führt zu Filmen mit schwer auszumachenden Partikeln (Abbildung 2d).

Alle Polymerfilme waren in Lösungsmitteln unlöslich, die reines PS-*co*-PBA lösen, z. B. Chloroform und Aceton. Dies weist darauf hin, dass die Polymerpartikel komplett von dem unlöslichen Blockcopolymer-Emulgator umgeben sind. Um herauszufinden, ob sich die antimikrobiellen Poly-4-vinyl-*N*-methylpyridiniumiodid-Blöcke der Emulgatoren tatsächlich auf der Oberfläche der Polymerpartikel befinden, wurden ultradünne Schnitte der Polymerfilme angefertigt und mit OsO₄-Dampf behandelt, der selektiv P4VMP anfärbt. Die Transmissionselektronenmikroskopie(TEM)-Aufnahme des Schnittes einer PS-*co*-PBA-Beschichtung (60:40) mit 2.5 Gew.-% PS₃₄₀-*b*-P4VMP₇₁₀ ist in Abbildung 3 gezeigt.

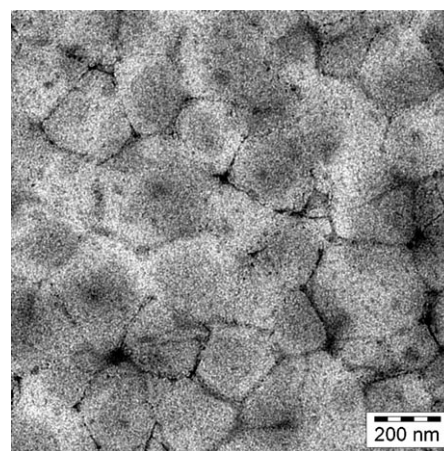


Abbildung 3. TEM-Aufnahme vom Schnitt eines Films aus PS-*co*-PBA (60:40) mit 2.5 Gew.-% PS₃₄₀-*b*-P4VMP₇₁₀, angefärbt mit OsO₄.

Darauf ist zu sehen, dass die Grenzfläche zwischen den fusionierten Kugeln stark kontrastiert, weil sich dort offensichtlich die P4VMP-Phase befindet. Die TEM-Aufnahme bestätigt außerdem die Größe der Polymerpartikel und ihre Verschmelzung im Filminneren. Zieht man in Betracht, dass Mikrobenzellen in der Regel größer als ein Mikrometer sind, sollte das überall präsente antimikrobielle Polymer in der Lage sein, Mikroben auch im Inneren des Films zu eliminieren.

Die mikrobielle Suszeptibilität der Polymerfilme wurde am Beispiel von Proben untersucht, die mit Suspensionen aus PS-co-PBA-Partikeln (60:40) mit 2.5 Gew.-% PS₃₄₀-b-P4VMP₇₁₀ oder Natriumdodecylsulfat (SDS) beschichtet waren. Die Beschichtung erfolgte dabei durch Aufstreichen der Suspension auf einen Glasobjektträger. Beim Trocknen an Luft bildeten sich auf einer Oberfläche von 2.5 × 2.5 cm² klare, ca. 30 µm dicke Filme. Nach gründlichem Waschen mit Wasser wurden die beschichteten Objektträger mit einer wässrigen Suspension von Zellen des verbreiteten und infektiösen Gram-positiven Bakteriums *Staphylococcus aureus* besprüht. Während einer Inkubationszeit von 24 h unter Wachstumsagar bildeten sich aus den einzelnen Zellen sichtbare Bakterienkolonien, die mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC), einem Farbstoff für lebende Zellen, rot angefärbt wurden.^[24] Die Zahl der auf den nicht beschichteten Teilen gewachsenen *S.-aureus*-Kolonien wurde als interne Kontrolle verwendet, da die Dichte der aufgesprühten Bakterienzellen bei den Experimenten in einem Bereich von 200 bis 550 Zellen pro cm² schwankt. Wie aus Abbildung 4 a er-

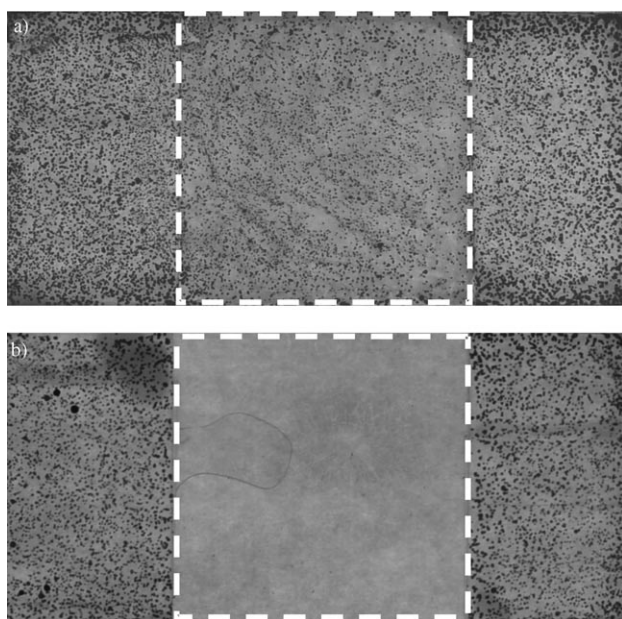


Abbildung 4. Photographien der *S.-aureus*-Kolonien, die auf Glasobjektträgern gewachsen sind. Die partiellen Beschichtungen wurden mit PS-co-PBA (60:40) hergestellt, mit a) 2.5 Gew.-% SDS und b) 2.5 Gew.-% PS₃₄₀-b-P4VMP₇₁₀ als Emulgator. Beide Objektträger wurden mit *S.-aureus*-Zellen besprüht, unter Wachstumsagar bei 37 °C für 24 h inkubiert und schließlich mit TTC angefärbt. Die Bakterienkolonien erscheinen dunkel. Die eingerahmten Flächen sind beschichtet. Die Gesamtansicht entspricht jeweils etwa 5 × 2.5 cm².

sichtlich ist, ermöglicht eine Beschichtung, die den verbreiteten Emulgator SDS enthält (2.5 Gew.-%), einen vollständigen Bewuchs mit *S.-aureus*-Zellen. Im Gegensatz dazu wachsen auf einer PS-co-PBA-Beschichtung (60:40) mit 2.5 Gew.-% PS₃₄₀-b-P4VMP₇₁₀ keine *S.-aureus*-Zellen (siehe Abbildung 4b). Bedenkt man, dass die Zahl der Bakterienkolonien auf der Kontrolle mindestens 1300 Zellen pro Fläche (2.5 × 2.5 cm²) beträgt, ergibt sich für die beschichteten Bereiche eine Reduktion der sich vermehrenden Bakterienzellen um mehr als 99.9%. Es ist erwähnenswert, dass die Bakterien auf den nicht beschichteten Randbereichen bis in die unmittelbare Nähe der Beschichtung wachsen (siehe Abbildung 4b). Würde ein Biozid freigesetzt, wäre das Bakterienwachstum noch einige Millimeter neben der Beschichtung gehemmt. Das Fehlen einer solchen Inhibitionszone deutet auf eine kontaktaktive antimikrobielle Wirkung hin.

Die Langzeitaktivität der Beschichtungen wurde durch permanentes Waschen mit Wasser bei täglichem Wechsel der Waschlösung getestet, wobei sich zeigte, dass die antimikrobielle Aktivität bereits nach einem Tag verloren war. Elementaranalyse und IR-Spektroskopie der Beschichtungen vor und nach dem Waschen ergaben allerdings keine signifikanten Unterschiede in der Zusammensetzung, weshalb wir davon ausgehen, dass möglicherweise die oberste Monoschicht teilweise abgelöst wurde. Um langzeitaktivere Polymerbeschichtungen zu erhalten, wurden PS-b-P4VMP-Emulgatoren mit einem höheren PS-Anteil, d. h. mit höherer Hydrophobie, in den Suspensionen verwendet. Wie erwartet hängt die antimikrobielle Wirksamkeit dieser Beschichtungen stark vom Emulgatorgehalt ab. Die für die biozide Wirkung erforderliche Emulgatormenge erhöhte sich mit größerem PS-Gehalt: Bei PS₄₂₀-b-P4VMP₄₅₀ benötigte man 2.5 Gew.-%, bei PS₃₆₇-b-P4VMP₁₈₃ 5 Gew.-% und bei PS₁₃₃₀-b-P4VMP₃₂₅ 10 Gew.-%. Überraschenderweise war der effektive Gehalt an reinem antimikrobiellem Polymer (P4VMP) in allen Fällen ähnlich und variierte zwischen 1.3 und 1.7 Gew.-% bezogen auf die Masse der Beschichtung.

Waschtests dieser Beschichtungen ergaben, dass nur der Film mit 10 Gew.-% des Emulgators PS₁₃₃₀-b-P4VMP₃₂₅ tatsächlich langzeitaktiv ist. Selbst nach sieben Tagen permanenten Waschens nahm die antimikrobielle Aktivität nicht ab. Voruntersuchungen ergaben, dass die Beschichtungen auch wirksam auf andere Oberflächen, z. B. auf Metalle und Kunststoffe, aufgebracht werden können.

Wie man in Abbildung 3, die repräsentativ für alle verwendeten Emulgatoren ist, erkennen kann, bildet das antimikrobielle Polymer ein kontinuierliches nanoskaliges Netzwerk im Inneren der Beschichtungen. Deshalb sollten die Beschichtungen nicht nur an der Oberfläche, sondern auch im Inneren antimikrobiell wirksam sein. Um dies zu untersuchen, wurden Scheiben mit einer Dicke von 5 mm aus einer PS-co-PBA-Dispersion (60:40) mit 10 Gew.-% PS₁₃₃₀-b-P4VMP₃₂₅ hergestellt und an der Oberfläche zerkratzt oder durchgebrochen. Nach einem Tag Waschen mit Wasser wurden *S.-aureus*-Zellen auf die Scheiben gesprüht und unter Wachstumsagar inkubiert. Nach der Inkubation wuchsen weder Bakterienkolonien auf der Oberfläche noch in den zerkratzten Bereichen noch auf der Bruchkante der Proben. Somit sind die Beschichtungen auch im Inneren antimikro-

biell – dies ist eine neue Qualität für kontaktaktive Beschichtungen, da diese meistens aus fragilen Monoschichten bestehen, die leicht mechanisch zerstört werden können.

Wir haben hier demonstriert, dass sich wasserunlösliche Diblockcopolymere PS-*b*-P4VMP mit einem hydrophoben (PS) sowie einem antimikrobiellen und hydrophilen Block (P4VMP) hervorragend als Emulgatoren für die wässrige Emulsionspolymerisation von Styrol und Butylacrylat eignen. Beschichtungen aus den resultierenden stabilen wässrigen Suspensionen wirken als kontaktaktive antimikrobielle Oberflächen und bieten damit eine Alternative zu entsprechenden aufwändigen chemischen Oberflächenmodifizierungen mit antimikrobiellen Polymeren. Laufende Arbeiten beschäftigen sich mit der Variation des hydrophoben Blocks der Emulgatoren, unter anderem zur Einführung polymerisierbarer Gruppen. Weiterhin sollen die Emulgatoren in kommerziellen Dispersionsfarben getestet werden, um damit vielleicht die bisher notwendige Zugabe von wasserlöslichen Bioziden zu solchen Farben vermeiden zu können.

Der experimentelle Teil (Polymersynthese, Polymeranalytik, antimikrobieller Test, Methodenbeschreibung) findet sich in den Hintergrundinformationen.

Eingegangen am 10. Juli 2006

Online veröffentlicht am 13. September 2006

Stichwörter: Antimikrobielle Emulgatoren · Blockcopolymere · Nanopartikel-Beschichtungen · Oberflächenchemie · Polymerisationen

-
- [1] J. Chainer, *AISE Steel Technol.* **2001**, 78, 59.
 - [2] J. C. Tiller, C. Sprich, L. Hartmann, *J. Controlled Release* **2005**, 103, 355.
 - [3] B. D. Kalyon, U. Olgun, *Am. J. Infect. Control* **2001**, 29, 124.
 - [4] A. A. Campbell, L. Song, X. S. Li, B. J. Nelson, C. Bottoni, D. E. Brooks, E. S. DeJong, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, 53, 400.

- [5] M. W. Eknoian, S. D. Worley, J. Bickert, J. F. Williams, *Polymer* **1998**, 40, 1367.
- [6] E. Dyckman, J. A. Montemarano, E. C. Fischer, *Nav. Eng. J.* **1974**, 86, 59.
- [7] I. Raad, R. Darouiche, R. Hachem, M. Sacilowski, G. P. Bodey, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, 39, 2397.
- [8] D. W. Kolpin, E. T. Furlong, M. T. Meyer, E. M. Thurman, S. D. Zaugg, L. B. Barber, H. T. Buxton, *Environ. Sci. Technol.* **2002**, 36, 1202.
- [9] D. S. Page, C. C. Ozbal, M. E. Lanphear, *Environ. Pollut.* **1996**, 91, 237.
- [10] J. J. Bullen, H. J. Rogers, P. B. Spalding, C. G. Ward, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2005**, 43, 325.
- [11] K. Lewis, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, 45, 999.
- [12] D. Cunliffe, C. A. Smart, C. Alexander, E. N. Vulfson, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, 65, 4995.
- [13] C. H. Ho, J. Tobis, C. Sprich, R. Thomann, J. C. Tiller, *Adv. Mater.* **2004**, 16, 957.
- [14] J. C. Tiller, C.-J. Liao, K. Lewis, A. M. Klibanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 5981.
- [15] J. Lin, S. Qiu, K. Lewis, A. M. Klibanov, *Biotechnol. Prog.* **2002**, 18, 1082.
- [16] S. B. Lee, R. R. Koepsel, S. W. Morley, K. Matyjaszewski, Y. Sun, A. J. Russell, *Biomacromolecules* **2004**, 5, 877.
- [17] J. C. Tiller, S. B. Lee, K. Lewis, A. M. Klibanov, *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, 79, 465.
- [18] J. Lin, J. C. Tiller, S. B. Lee, K. Lewis, A. M. Klibanov, *Biotechnol. Lett.* **2002**, 24, 801.
- [19] N. M. Milovic, J. Wang, K. Lewis, A. M. Klibanov, *Biotechnol. Bioeng.* **2005**, 90, 715.
- [20] D. Park, J. Wang, A. M. Klibanov, *Biotechnol. Prog.* **2006**, 22, 584.
- [21] N. Kawabata, M. Nishiguchi, *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, 54, 2532.
- [22] M. Antonietti, S. Heinz, M. Schmidt, C. Rosenauer, *Macromolecules* **1994**, 27, 3276.
- [23] S. Kirsch, J. Stubbs, J. Leuninger, A. Pfau, D. Sundberg, *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, 91, 2610.
- [24] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55.