



ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ

**ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЧНИ ТЕХНОЛОГИИ
КАТЕДРА „ПОЛИМЕРНО ИНЖЕНЕРСТВО“**

инж. Данаил Трендафилов Акузов

**НЯКОИ ВЪЗМОЖНОСТИ ЗА НАМАЛЯВАНЕ НА
МИКРООБРАСТВАНЕТО НА СВОБОДНИ ОТ БИОЦИДИ
СИЛОКСАНОВИ ПОКРИТИЯ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

за придобиване на образователната и научна степен „доктор“
по научна специалност 5.10. Химични технологии
(Химична технология на лакобояджийските материали и адхезивите)

Научни ръководители: проф. д-тн Тодорка Владкова
доц. д-р Цоло Цолов

Научен консултант: проф. Franz Brümmer

Научно жури:

1. проф. д-тн инж. Николай Дишовски - председател
2. доц. д-р Маргарита Симеонова - рецензент
3. доц. д-р Диляна Господинова - рецензент
4. доц. д-р Илия Илиев
5. проф. д-тн Тодорка Владкова

София, 2017

Дисертационният труд е написан на 118 страници, съдържа 49 фигури и 8 таблици. Цитирани са 102 източника.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита на заседание на разширен научен съвет на научното звено на катедра „Полимерно инженерство”, състояло се на 27.06.2017 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 30.10.2017 г. от 14:00 часа в зала 424, сграда „А” на ХТМУ.

Материалите са на разположение на интересующите се на интернет страницата на ХТМУ и в отдел „Научни дейности”, стая 406, етаж 4, сграда „А” на ХТМУ.

ВЪВЕДЕНИЕ

Биозамърсяване е всяко нежелано натрупване на жива материя върху различни материални повърхности. То е широко разпространен проблем при биоматериали, мембранни процеси, рибарски и аква-ферми, подводни конструкции и сензори, плавателни съдове, водосборни и охладителни системи, топлообменници, млеко-преработвателната индустрия и почти всички производства, протичащи във водна среда. Биозамърсяването в морска среда обикновено започва с образуване на биофилм (микрообрастване) и продължава със закрепване на разнообразни макроорганизми: миди, тръбни червеи, водорасли и др. (макрообрастване).

Съществуват три принципни подхода за борба с биозамърсяването:

- механично почистване на повърхностите, ако е възможно;
- убиване на биозамърсителите с помощта на химически или физически средства - антибиотици, почистващи химикали, биоциди и др.;
- модификация на повърхността, правеща материала ниско адхезивен (незакрепващ).

Класическият подход за борба с морското обрастване се основава на използването на биоцидни покрития – калай- или медсъдържащи бои. Те обаче отравят не само адхериралите към повърхността, но и всички живи организми в акваторията. Затова през 2008 г., най-токсичните от тях, а именно калайсъдържащите, са забранени в световен мащаб.

Съвременният нетоксичен подход за борба с биозамърсяването (в частност и морското обрастване) се основава на използването на нискоадхезивни покрития. Те от своя страна биват силнохидрофилни (полиетиленоксидни, цвитерионни) или силнохидрофобни (силоксанови, флуорполимерни). Счита се, че ниската биоадхезивност във водна среда на силнохидрофилните повърхности се дължи на образувалата се солватна обвивка, възпрепятстваща адсорбцията на адхезивните полимерни вещества, секретирани от организмите, докато ниската адхезивност при силнохидрофобните повърхности се дължи на ниската им повърхностна енергия и участието на слаби (вандерваалсови) междумолекулни сили в адхезионния процес. Силнохидрофилните покрития обаче са недостатъчно неустойчиви във водна среда, поради което изследователският интерес е насочен повече към силнохидрофобните и хибридни (амфибилни) покрития, съчетаващи в себе си хидрофилни и хидрофобни зони. В групата на силнохидрофобните противообрастващи покрития силоксановите (силиконовите) се отличават с добрите си отделителни свойства по отношение на

макроорганизми (макрозамърсители) и превъзхождат дори флуорполимерните, което се отдава на по-ниският им модул на еластичност и висока гладкост. В съчетание с по-ниската им цена, в сравнение с флуорполимерните, силоксановите противообрастващи покрития понастоящем се оказват единствената нетоксична търговска алтернатива на биоцидните бои. Те обаче също имат недостатъци като: а) не предотвратяват микрообрастването (биофилмообразуването) и б) за отделяне на макрозамърсителите е необходима голяма скорост на плаване, от порядъка на над 20 възела (~40 km/h).

Борбата с биофилмообразуването е изключително трудна и в световен мащаб са правени многобройни опити за дългосрочно предотвратяване на биофилмообразуването върху различни повърхности с различни средства, но до момента е постигнато само частично редуциране на микрообрастването, дори с участието на биоциди.

Цел на настоящата дисертация е намаляването на биофилмообразуването върху свободни от биоциди силоксанови противообрастващи покрития с помощта на подходящо подбрани модифициращи добавки. Въз основа на литературно проучване и досегашен опит се насочихме към изпитване ефекта на няколко типа модифициращи добавки:

- а) трисилоксаново нейногенно повърхностноактивно вещество, от което се очакваше допълнително да затрудни началната адхезия на микрозамърсителите;
- б) антиоксидантите α -токогерол и бутилхидроксианизол, които биха могли да инхибират окислителното омрежване на секретираните от биозамърсителите адхезивни екстрацелуларни полимери;
- в) TiO_2 –наночастици (анатаз) - фотокаталитичен пълнител с биоцидна активност;
- г) вещества, съдържащи етиленоксидни вериги, които да повишат противoadхезивните свойства на покритията.

За постигане на така поставената цел, трябваше да се решат следните задачи:

1. Избор на подходящ носител (масло), който да осигури продължителна доставка на модифициращата добавка на повърхността.
2. Приготвяне и охарактеризиране на силоксанови композиции и композиционни покрития, съдържащи индивидуални модифициращи добавки, както и комбинации от тях.
3. Оценка на биообрастването в лабораторни условия, а с някои покрития и в полеви условия.

ОПИТНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1 Ефект на силоксанови и флуорирани масла върху характеристиките и морското биофилмообразуване на свободни от биоциди силоксанови противобрастващи покрития

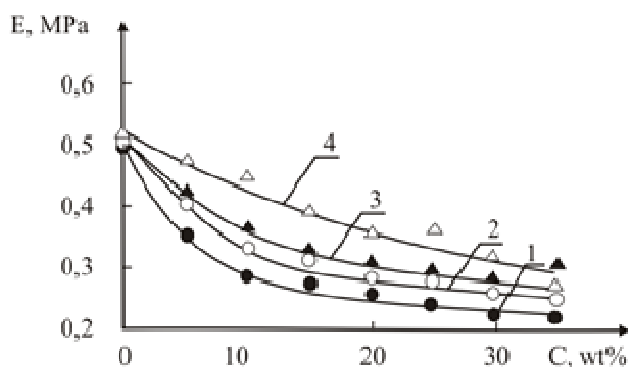
Понастоящем единствената търговска алтернатива на биоцид-съдържащите противобрастващи покрития са силоксановите покрития. Поради високата им гладкост, малката повърхностна енергия ($22-25 \text{ mJ/m}^2$) и не на последно място ниският им модул на еластичност, те създават нискоадхезивна повърхност, особено по отношение на макрообрастването. В динамични условия (скорости над 15-20 възела), успелите да се закрепят макроорганизми лесно се отделят от повърхността. По отношение на микрообрастването обаче силоксановите покрития имат недостатък. Биофилмите, образувани с участието на диатомити, имат добра адхезия към тях и в комбинация с малкото си напречно сечение (респ. динамично съпротивление) не успяват да се отделят от повърхността дори при скорости над 30 възела [1]. За повишаване на отделителната способност на силоксановите покрития в състава им обикновено се включват инертни силоксанови масла [2, 3]. Маслата, в зависимост от количеството им, могат значително да намалят модула на еластичност на покритията, с което да улеснят отделянето на макроорганизмите. Също така, мигрирайки на повърхността, те създават механично слаб и хлъзгав слой, който допълнително увеличава отделителната им способност по отношение на макроорганизми. Те биха могли да се използват и като носител на редуциращи биофилмообразуването модифициращи добавки, осигуряващ дълготрайното им доставяне на повърхността на покритията. Това мотивира изследването на ефекта на силоксанови и флуорирани масла върху характеристиките на свободни от биоциди, композиционни силоксанови покрития и морското биофилмообразуване.

В литературата има малко информация за модифициране на силоксановите каучуци с флуорирани масла, чрез които допълнително да се намали повърхностната енергия на покритията и дори да им се придаде известна олеофобност. Малко е и информацията относно влиянието на силоксанови и флуорирани масла върху морското биофилмообразуване. Знае се, че скоростта на миграция на маслата зависи от вискозитета, респективно молекулната им маса. Ето защо, целта на това изследване беше да се установи влиянието на няколко инертни силоксанови и флуорирани масла с различна молекулна маса върху физико-механичните характеристики и противобрастващите свойства на свободни от биоциди силоксанови покрития.

На базата на комбинация от силанол-завършени силоксанови каучуци, пълнители, омрежител, катализатор и масла (силоксанови и флуорсъдържащи) са приготвени тест образци, както е описано в [4]. Използвани са четири силоксанови (SO 100, SO 350, SO 1000 и SO 10000) и три флуорирани масла (FO 10, FO 30 и FO 60).

Модул на еластичност, ъгъл на омокряне, повърхностна енергия и грапавост

За да се установи връзката между биофилмообразуването и характеристиките на покриващата композиция са определени основните физико-механични параметри, имащи отношение към противообрастващата способност на образците. Получените опитни резултати са представени на Фиг. 1 и в Табл. 1.



Фиг.1 Модул на еластичност на силиконови противообрастващи покрития, съдържащи 0 до 30 мас.% силиконово масло с различен вискозитет: 100 cSt (крива 1); 350 cSt (крива 2); 1000 cSt (крива 3) и 10000 cSt (крива 4)

Както се вижда от Фиг. 21, модулет на еластичност E очаквано зависи от вискозитета и количеството на силиконовото масло. Най-ефективно понижение на модула на еластичност се постига с нисковискозните масла (криви 1 и 2), при това в количества 5 - 10 мас.% (в тази концентрационна област наклонът на криви 1 и 2 е най-голям). Концентрационната зависимост на модула на еластичност е значително по-слабо изразена при най-високовискозното масло (крива 4). Това обяснява предпочитанието в практиката да се използват сравнително нискомолекулни масла в относително малки количества – най-често около 10 %.

Сравняването на модула на еластичност на контролата и този на образци 5-7 в Таблица 1, показва слабото и независимо от молекулната маса влияние на флуорираното масло върху този показател.

Табл.1 Характеристики на силиксанови противообрастващи покрития: модул на еластичност E , [MPa]; ъгъл на омокряне с вода θ_{H_2O} ; повърхностно напрежение γ_c ; средноаритметична Ra и средноквадратична Rq грапавост. Control – силиксаново покритие несъдържащо масло; SO – покритие, съдържащи силиксаново масло; FO – покритие, съдържащо флуорирано масло.

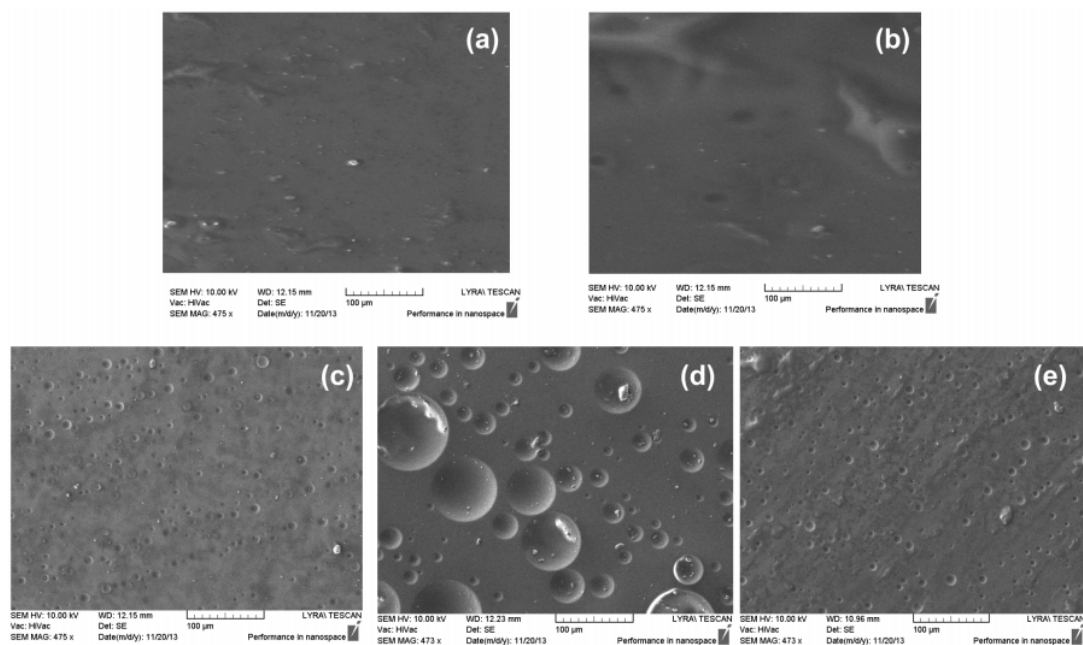
Образец No	Съдържание на масло, мас.%	E , MPa	θ_{H_2O} , °	γ_c , mN/m	Ra , nm	Rq , nm
Контрола	0	0.53	98.6	28.31	33.46	41.11
1.	SO 100	30	0.22	100.3	23.96	31.69
2.	SO 350	30	0.26	102.1	24.09	26.93
3.	SO 1000	30	0.30	102.9	24.12	24.99
4.	SO 10000	30	0.28	103.1	23.69	20.64
5.	FO 10	10	0.40	106.7	21.62	35.17
6.	FO 30	10	0.39	108.1	19.63	43.34
7.	FO 60	10	0.41	107.5	20.48	32.99
8.	SO 350	5	0.31	101.2	24.00	30.12
9.	FO 30	5	0.49	108.3	20.69	42.58
10.	1:1 мас.% SO 350/FO30	5	0.41	106.1	22.92	8.7
11.	SO 350	10	0.29	103.0	24.24	-
12.	FO 30	10	0.39	107.5	19.63	43.34
13.	1:1 мас.% SO 350/FO30	10	0.34	105.5	23.79	22.21

Вискозитетът на силиксановите масла оказва слабо влияние (Табл.1, образци 1-4) върху ъгъла на омокряне ($100,3 - 103,1^\circ$) и повърхностната енергия ($23,69 - 24,12 \text{ mJ/m}^2$), но наличието им като цяло леко засилва хидрофобността на покритията в сравнение с контролата, несъдържаща масло. Във всички случаи тестваните състави остават силнохидрофобни и попадат в т.нар. „Байеров прозорец“ от 20-30 mN/m, за който е прието, че покритията имат най-добри отделителни, респ. противообрастващи свойства, вследствие минимална биоадхезия По-силно е влиянието на силиксановите масла върху модула на еластичност, като в количество 30 мас.% понижението му е от порядъка на два пъти в сравнение с контролата.

Флуорираните масла (Таблица 1, образци 5 - 7) увеличават ъгъла на омокряне и понижават повърхностната енергия на покритията в сравнение с контролата, но както при силиксановите масла и тук молекулната им маса оказва слабо влияние върху тези параметри.

Морфология на повърхностите

За установяване на морфологичните различия на изследваните покрития е направено сканиращо електронно-микроскопско (SEM) наблюдение на повърхностите им (Фиг. 2).

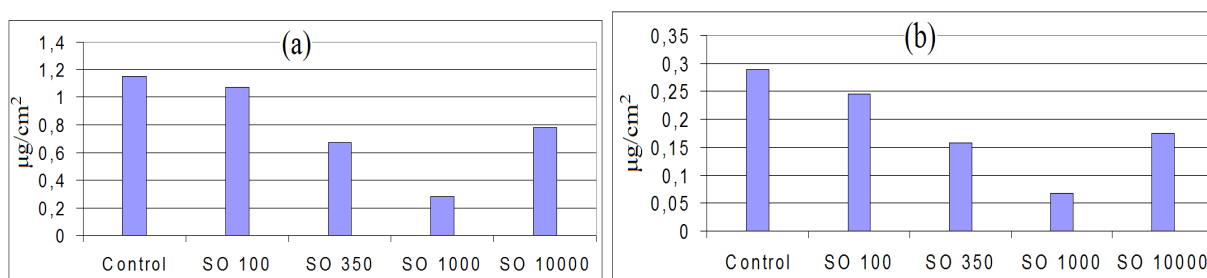


Фиг.2 SEM картини на повърхността на: (a) - Control (без масло); (b) - с 10% SO 350; (c) - с 10% FO 10; (d) - с 10% FO 30 и (e) - с 10% FO 60. (scale bar = 100µm)

Контролният образец (Фиг. 2a) и образецът, съдържащ силоксаново масло с вискозитет 350 cSt (Фиг. 2b) не показват съществена морфология на повърхността. Мигриралото масло успява да омокри повърхността и създава тънък непрекъснат слой. Подобна е картината и на образците със силоксанови масла с вискозитет 100, 1000 и 10000 cSt, поради което тук не са представени съответните снимки. По повърхността на образците, съдържащи флуорирани масла обаче (Фиг. 2 - c, d, e), се забелязват микроскопични капчици. Изглежда, че въпреки по-малкото си повърхностно напрежение (16-20 mN/m, [5]) в сравнение с полисилоксаните, мигриралите флуорирани масла не успяват да омекрат добре повърхността. Обяснение на това може да се търси в изключително слабото взаимодействие между флуорсъдържащите групи ($-\text{CF}_2-$, $-\text{CF}_3$) и CH_3 -групите от полидиметилсилоксановата повърхност [6-11].

Микрообрастване и охарактеризиране на биофилмите

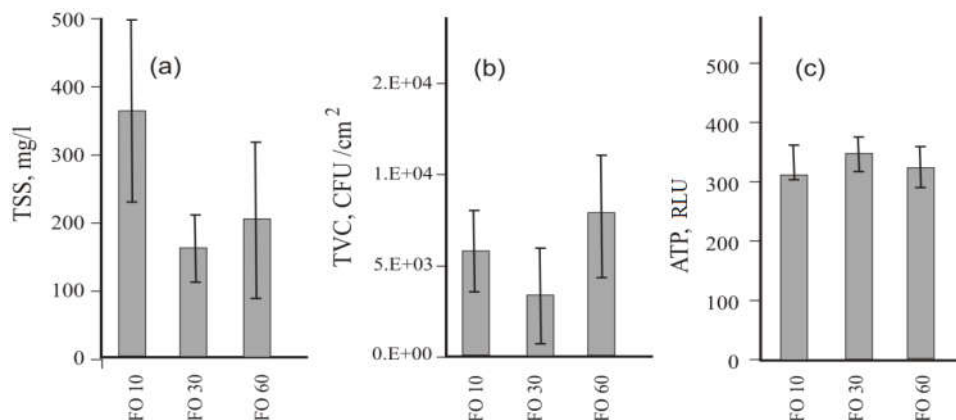
За установяване влиянието на вискозитета на силоксановите масла върху микрообрастването на свободни от биоциди силоксанови противообрастващи покрития, тестваните образци са потопени в средиземноморски аквариум в продължение на 5 седмици. Биофилмът е изграден основно от микроводорасли и количеството пигменти (хлорофили и каротеноиди) би следвало да е пропорционално на количеството биофилм, респ. на степента на микрообрастване. Поради това степента на биофилмообразуване е оценена посредством определяне на количеството хлорофил и каротеноидил. Получените резултати са представени на Фиг. 3.



Фиг.3 Параметри на биофилм, образуван след пет-седмичен престой в средиземноморски аквариум върху контролно покритие и покрития, съдържащи 30 мас. % силоксанови масла с вискозитет 100, 350, 1000 и 10000 cSt. (a) - общо количество хлорофил, $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; (b) - количество каротеноиди, $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Резултатите за количеството хлорофил и каротеноиди имат сходен вид, тъй като във фотосинтезата, както помощни пигменти, участват и каротеноидите. Според количеството хлорофил и каротеноиди, включването на силоксаново масло в съставите понижава биофилмообразуването, като най-силно е влиянието на маслата със средни стойности на вискозитета (SO 1000). Обяснението на това би могло да бъде, че масло с прекалено малък вискозитет мигрира бързо към повърхността и бързо се отмива от водния поток, при което повърхността остава с намалено количество масло. Обратно, масло с прекалено голям вискозитет се отмива прекалено бавно, с което не улеснява отстраняването на адхериралиите микроорганизми от повърхността.

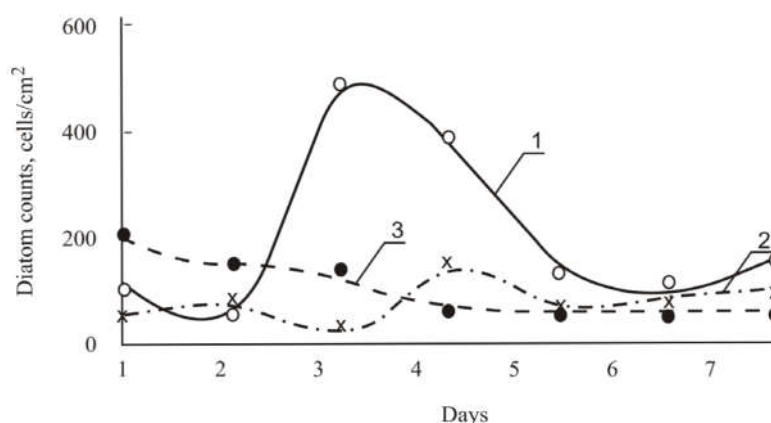
На Фиг.4 са показани параметрите на биофилми, образувани при едноседмичен престой във водите на рибарското пристанище на гр. Ченаи (Индия), върху образци, съдържащи 10 мас.% флуорирани масла.



Фиг. 4 Параметри на биофилм, образуван при едноседмичен престой в Индийския океан (рибарско пристанище Chennai, Индия) върху силиконов покрития, съдържащи 10 мас.% флуорирани масла с различна степен на полимеризация (респ. вискозитет): FO 10, FO 30 и FO 60. (a) - Total Suspended Solids (TSS, mg/L); (b) - Total Viable Bacterial Count (TVC, cfu/cm²) и (c) – съдържание на биомаса, определено с аденозин трифосфатен тест (ATP, RLU- Relative Light uUnits).

Вижда се, че по отношение на общото количество суспендирани частици (TSS) и общото бактериално число (TVC) за образците, съдържащи флуорирано масло със степен на полимеризация 30, показват най-ниски стойности на биофилмообразуване.

Основните едноклетъчни микроорганизми, участващи в морския биофилм върху силиконови повърхности, са диатомити (кремъчни водорасли). На Фиг. 5 е представен броя диатомитни клетки върху контролно силиконово покритие (несъдържащо масло) и силиконови покрития, съдържащи 10 мас.% силиконово масло (SO 350) и флуорирано масло (FO 30). Преброяването на диатомитите е извършвано всеки ден в продължение на една седмица.



Фиг. 5 Брой диатомити върху силиконови покрития при едноседмичен престой в Индийския океан (рибарско пристанище Chennai, Индия). Крива 1 – контролно покритие без масло; крива 2 – покритие с 10 мас. % силиконово масло, SO 350 и крива 3- покритие с 10 мас. % флуорирано масло, FO 30.

Вижда се, че кинетиката на образуване на диатомитен биофилм е различна при трите покрития. Прави впечатление постепенното намаляване на количеството диатомити върху покритието, съдържащо флуорирано масло FO 30. За обяснението й са нужни по-задълбочени изследвания, но изглежда, че контролното покритие е по-податливо на колонизация с диатомити.

Заклучение

Включването на инертни силоксанови и флуорирани масла в силоксанови противообрастващи покрития оказва влияние върху микрообрастването. Мигрирайки, силоксановите масла създават непрекъснат слой върху покритията, докато флуорираните масла формират микрокапчици. Това различно поведение на маслата трябва да се отчита, когато се ползват като носители на противообрастващи добавки.

Ефектът на силоксановите масла зависи от вискозитета им, респ. от молекулната маса, като оптималният им вискозитет, относно понижаване на биофилмообразуването, изглежда е в границите 350-1000 cSt ($M_w \sim 13000 - 28000$).

Кинетичните криви на натрупване на диатомити показва съществуването на различия в началната им адхезия към изучаваните повърхности.

2 Някои възможности за редуциране на биофилмообразуването върху свободни от биоциди, прозрачни силоксанови покрития, с помощта на модифициращи добавки с очаквана анти-биофилм активност

Въз основа на литературен преглед и предишен собствен опит, за това изследване бяха избрани следните ниско-токсични модифициращи добавки: 1) TiO_2 (анатаз форма, наночастици), добре известен с фотокаталитичната си активност под ултравиолетова светлина ($\lambda < 380$ nm), придаваща му окислителни и антисептични свойства; 2) нейногенно повърхностноактивно вещество с полиетиленгликолна хидрофилна част и трисилоксанова хидрофобна част (Y-17112, суперспредер), което би могло да затрудни началното закрепване на микроорганизмите и да улесни диспергирането на вече образуван биофилм; и 3) мастноразтворим антиоксидант (α -токоферол), който би могъл да инхибира омрежването на секретираните от биозамърсителите адхезивни полимери, ако то протича по окислителен механизъм.

Изваждането на пълнителите от основния състав на композиционото покритие бе мотивирано както поради възможността за разработване на прозрачни покрития (представляващи интерес за приложение при подводни сензори и много други), така и

поради опростяване на основната композиция и избягване влиянието на пълнителите. Като носител на модифициращите добавки е използвано силоксаново масло, тъй като мигрирайки, то образува равномерен тънък филм на повърхността и би обезпечило равномерното разпределяне на избраното съвместимо с него нейногенно повърхностноактивно вещество (ПАВ) и мастноразтворимия антиоксидант. За подобряване на съвместимостта на TiO_2 (анатаз) със силоксановата композиция са изработени и образци, в които TiO_2 -частиците са повърхностно силиконизирани.

Проведено е микрообрастване в средиземноморски аквариум с времетраене 5 седмици, като за осигуряване на UV-светлина с $\lambda < 380 \text{ nm}$ (необходима за проявяване на фотоактивността на TiO_2 -анатаз), са използвани луминесцентни лампи Powerchrome pureactinic заедно с лампи Philips MASTER TL-D.

Ъгъл на омокряне и повърхностно напрежение

Тъй като се очакваше, че използваните модифициращи добавки могат да повлияят хидрофилно-хидрофобния баланс на повърхността, който е значим фактор за биадхезията и биозамърсяването, бяха определени ъгъла на омокряне и повърхностното напрежение на изследваните тест-образци. Измереният ъгъл на омокряне и изчисленото повърхностно напрежение на покритията преди потапяне в аквариума са представени в Таблица 2.

Таблица 2. Ъгъл на омокряне с вода $\theta_{\text{H}_2\text{O}}$; с етиленгликол θ_{EG} ; с хексадекан θ_{HD} и повърхностно напрежение γ_c и неговата полярна γ_c^p и дисперсна част γ_c^d на силоксаново покритие несъдържащо добавки (control) и силоксанови покрития съдържащи: 0,1 и 1,0 мас.% нейногенни ПАВ; и 0,5 и 2,0 мас.% антиоксидант токоферол.

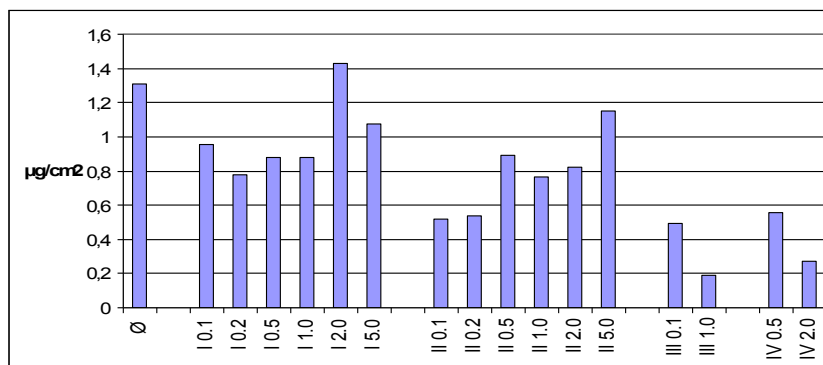
Образец	$\theta_{\text{H}_2\text{O}} (^{\circ})$	$\theta_{\text{EG}} (^{\circ})$	$\theta_{\text{HD}} (^{\circ})$	$\gamma_c (\text{mN m}^{-1})$	$\gamma_c^p (\text{mN m}^{-1})$	$\gamma_c^d (\text{mN m}^{-1})$
Покритие без добавки (контрола)	102.2	77.4	25.8	25.1	0.4	24.7
Покритие съдържащо (wt.%)						
Superspreader, 0.1	100.5	80.3	24.1	25.0	0.3	24.7
Superspreader, 1.0	73.8	49.9	26.2	33.7	11.8	21.9
α -Tocopherol, 0.5	101.2	81.8	25.5	24.7	0.3	24.4
α -Tocopherol, 2.0	93.8	75.1	25.2	25.8	1.4	24.4

Вижда се, че всички покрития, контролното (без добавки) и покритията, съдържащи трисилоксаново нейногенно ПАВ (с изключение на това с 1 мас.%) и антиоксидант са хидрофобни, показвайки ъгъл на омокряне с вода над 90° , който слабо варира в зависимост от вида и количеството на добавката. Повърхностното напрежение на всички покрития варира от 24,7 до 33,7 mN/m и попадат или са близо до така

наречения „Байеров прозорец“ (20 и 30 mN/m), приет като област с минимална биоадхезия и респ. добри отделителни свойства по отношение на биоамърсителите.

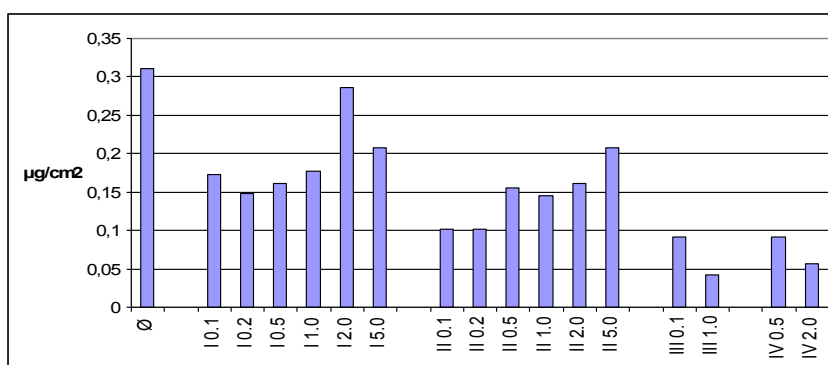
Съдържание на хлорофил и каротеноиди в биофилмите

Степента на биофилмообразуване е оценена посредством количеството хлорофил (фиг. 6) и каротеноиди (фиг.7) в биофилмите.



Фиг. 6 Общо количество хлорофил (А+В) в биофилмите върху ненапълнени силиконови покрития. Ø-без добавки; I_{0.1}, I_{0.2}, I_{0.5}, I_{1.0}, I_{2.0} и I_{5.0} – с 0,1 до 5.0 мас.% TiO₂ –наночастици; II_{0.1}, II_{0.2}, II_{0.5}, II_{1.0}, II_{2.0} и II_{5.0} – с 0,1 до 5.0 мас.% TiO₂ –силиконизирани наночастици; III_{0.1} и III_{1.0} - съответно с 0,1 и 1,0 мас.% нейногенно ПАВ; IV_{0.5} и IV_{2.0} - съответно с 0,5 и 2,0 мас.% антиоксидант.

Като цяло, количеството хлорофил в биофилмите е доста малко - под 1,5 µg/cm². За сравнение количеството хлорофил А в листата на сухоземните растения е от порядъка на 40-70 µg/cm² [12], а в морски биофилми, образувани върху полистиренова повърхност в лабораторна среда за 20 дни - средно между 4 и 10 µg/cm² [13].



Фиг.7 Общо количество каротеноиди (ксантофили и каротени) в биофилмите върху ненапълнени силиконови покрития. Ø-без добавки; I_{0.1}, I_{0.2}, I_{0.5}, I_{1.0}, I_{2.0} и I_{5.0} – с 0,1 до 5.0 мас.% TiO₂ –наночастици; II_{0.1}, II_{0.2}, II_{0.5}, II_{1.0}, II_{2.0} и II_{5.0} – с 0,1 до 5.0 мас.% TiO₂ –силиконизирани наночастици; III_{0.1} и III_{1.0} - съответно с 0,1 и 1,0 мас.% нейногенно ПАВ; IV_{0.5} и IV_{2.0} - съответно с 0,5 и 2,0 мас.% антиоксидант.

Изглежда, че TiO_2 (анатаз наночастици, силиконизирани и несиликонизирани) включен в покритията, не показва противообрастващи свойства. Възможно обяснение за това е: механичното блокиране на повърхността на частиците от силоксановата матрица, при което дифузията на водни и кислородни молекули от околната среда към частиците се затруднява; и/или недостатъчен интензитет на светлина с $\lambda < 380\text{nm}$. И двете (дифузията на водни и кислородни молекули и наличието на светлина с $\lambda < 380\text{nm}$) са необходими за проявяване на фотокаталитичните свойства на TiO_2 (анатаз), водещи до образуване на антисептично действащите пероксидни и хидроксилни радикали. Освен това с увеличаване на количеството TiO_2 -наночастици в силоксановите покрития (серии I и II) се увеличава и степента им на белота. Повишената степен на белота от своя страна води до по-голяма осветеност на биофилма от отразена светлина, а от там и до по-голяма скорост на развитието му, което обяснява наблюдаваната тенденция за леко повишаване на количеството биофилм с повишаване на количеството титанов диоксид.

При покритията, съдържащи ПАВ и антиоксидант (съответно $\text{III}_{0,1}$, $\text{III}_{1,0}$ и $\text{IV}_{0,5}$ и $\text{IV}_{2,0}$), количеството хлорофил и каротеноиди (респ. количеството биофилм) е значително намалено в сравнение с несъдържащата добавки контрола $\emptyset$.

Предполагаме, че противообрастващото действие на включения в силоксановото покритие трисилоксаново нейоногенно ПАВ, би могло да се свърже с: а) миграцията му към повърхността на покритието, при което във водна среда хидрофилната (полиетиленгликолна, ПЕГ) част на молекулата му се ориентира към полярната водна фаза и така създава в известна степен ПЕГ-повърхност; б) мигрирайки към повърхността, солубилизира (отмива) замърсителите; и в) ангажира адсорбционните центрове по повърхността на силоксановото покритие, т.е. адхезивните екстрацелуларни полимери се адсорбират не върху чиста силоксанова повърхност, а върху тънък нестабилен повърхностноактивен слой.

Идеята за повишаване противообрастващите свойства на силоксанови композиции, посредством модифицирането им с антиоксиданти, възникна от известния факт, че в процеса на адхезия на мидите и някои други биозамърсители текат окислителни полимеризационни реакции в секретираните от тях адхезивни протеини. Допуснахме, че ако в силоксаново покритие се включи мастноразтворим антиоксидант (токоферол), той би могъл да инхибира адхезията на мидите, както ще се види по-нататък. В литературата няма убедителни данни, че подобни окислителни полимеризационни реакции протичат и в биофилмообразуването (с участието на

бактерии или микроводорасли), но повишените противообрастващи свойства на тестваните покрития, посредством включването на антиоксидант в тях, сигнализират, че вероятно окислителните полимеризационни процеси са фундаментални за биоадхезията.

Заклучение

Образуваните в средиземноморски аквариум биофилми съдържат главно два типа микрозамърсители: диатомити и зелени микроводорасли, заедно с някои седиментни частици. Влиянието на фотоактивен пълнител (TiO_2 анатаз) в силикохановите противообрастващи покрития по отношение на биофилмообразуването е слабо. Оценено по показателите общ хлорофил и каротеноиди в биофилма трисилохановото нейногенно ПАВ (суперспредер Y-17112) намалява биофилмообразуването – 3 до 8 пъти в зависимост от количеството му и оценявания параметър. За първи път е доказан от нас противообрастващ ефект на антиоксидант. Използваният в това изследване α -токоферол редуцира биофилмообразуването 3-5 пъти в зависимост от количеството му и оценявания параметър. Този резултат беше публикуван през 2013.

Три години по-късно Wilker и сътр. [14] съобщават, че антиоксидантните покрития могат да помогнат за редуциране на морското обрастване и те се обсъждат като нова, екологично приемлива алтернатива на токсичните противообрастващи бои.

Представените до тук резултати дадоха основание да се премине към изследване ефекта на комбинации от нейногенно ПАВ и антиоксидат върху биофилмообразуването.

3 Ефект на нейногенно ПАВ, нетоксичен антиоксидант и комбинации от тях върху биоадхезията в лабораторни и полеви условия на свободни от биоциди силикоханови покрития

Целта на това изследване е да се покаже, в лабораторни и полеви експерименти, способността на подходящо подбрани нейногенно ПАВ, нетоксичен антиоксидант и техни комбинации, да предотвратяват макрообрастването и да редуцират силно развитието на морски биофилм върху свободни от биоциди противообрастващи силикоханови покрития.

Основната силикоханова композиция, съдържаща комбинация от силикоханови еластомери с различна молекулна маса, омрежител ES40 и силикоханово масло, е приготвена както е описано в [4]. Използвани са същите модифициращи добавки от

предходното изследвано - трисилоксаново нейногенно повърхностноактивно вещество (суперспредер Y-17112) и нетоксичен антиоксидант (α -токоферол), както и комбинации от тях в различни съотношения. Едногодишния полеви тест е проведен в Черно море, яхтеното пристанище на гр. Несебър, като образците бяха потопени на около 3 m дълбочина. Типичните за Черно море твърди макрозамърсители (hard-fouling organisms) са полипите (*Barnacles Balanus improvisus*) и мидите [15].

Модул на еластичност и характеристики на повърхността

Основните физико-химични и физико-механични характеристики на повърхността, оказващи влияние върху биоадхезията и биозамърсяването, определени преди потапянето в морска вода, са представени в Табл. 3.

Табл.3 Модул на еластичност E и характеристики на повърхността на покритията: ъгъл на омокряне с вода, θ_{H_2O} ; повърхностна енергия, γ_c ; микроиндентационен модул на еластичност, E_{it} ; индентационна микротвърдост, H_{it} ; Викерс микротвърдост, HMV ; модул на еластичност, E ; **1** – контрола без добавки; **2** – покритие, съдържащо 0.5 мас.% нейногенно ПАВ; **3** – покритие, съдържащо 1.5 мас.% антиоксидант и **4** – покритие, съдържащо 0.5 мас.% нейногенно ПАВ + 1.5 мас.% антиоксидант.

Покритие	1	2	3	4
θ_{H_2O} , °	102.2	89.9	99.2	98.6
γ_c , mN/m	25.82	25.87	26.43	26.71
E_{it} , N/mm ²	1.25	9.58	1.12	9.60
H_{it} , N/mm ²	0.247	0.156	0.214	0.182
HMV , N/mm ²	0.095	0.068	0.084	0.072
E , N/mm ²	0,318	0,316	0,298	0,280

Както се вижда от таблицата, и двете добавки намаляват ъгъла на омокряне с вода θ_{H_2O} в сравнение с контролата (покритие 1), като най-силно влияние има ПАВ (покритие 2). Всички покрития обаче остават хидрофобни (θ_{H_2O} около и над 90°). Повърхностното напрежение γ_c остава в рамките на „Байеровия прозорец” (20-30 mN/m), за който се счита, че биоадхезията е минимална. Присъствието на добавките в покритията намалява и микротвърдостите H_{it} и HMV , като отново по-силно е влиянието на ПАВ. Модула на еластичност E също се понижава в сравнение с контролата (покритие 1), което показва пластифициращия ефект на добавките. Освен това е възможно токоферолът частично да участва с хидроксилната си група във

вулканизационната мрежа, което би обяснило малко по-силното понижение на E с негово участие (покрития 3 и 4). Сигнал за подобно взаимодействие може да се види от данните на рентгеновата фотоелектронна спектроскопия по-долу.

Забелязва се, че и за четирите покрития стойностите на микроиндентационния модул на еластичност E_{it} са по-големи в сравнение с E . Подобен резултат получават и други автори [16, 17], като причина за различията в модула на еластичност в повърхностните слоеве и в обема на полидиметилсилоксана се отдават на различната степен на омрежване в повърхностните слоеве на каучука. От друга страна, завишени резултати при определянето на микроиндентационния модул на еластичност на силоксанови каучуци (и други меки материали) могат да се получат и поради адхезионни взаимодействия между тестваната повърхност и острието на измерващия прибор [16, 18, 19]. Особено големи стойности за E_{it} в сравнение с контролата показват образците, съдържащи ПАВ (покрития 2 и 4), но е трудно да се определи еднозначно кой от двата споменати фактора оказва най-силно влияние за това. От по-малките стойности за микротвърдостите H_{it} и HMV в сравнение с контролата обаче може да се предположи, че доминиращо влияние за големите стойности на E_{it} при ПАВ-съдържащите покрития оказват адхезионните процеси между повърхността и острието на измерващия апарат.

Нанотопография

Известно е, че грапавостта на дадена повърхност е важен фактор в процеса на адхезията, като с повишаване на грапавостта специфичната повърхност нараства, а от там и адхезията също нараства. В случай на биоадхезия обаче, от съществено значение е размера на грапавостта, отнесен към размера на участващите в биоадхезията микроорганизми. В табл.4 са представени нанотопографските данни на изследваните покрития.

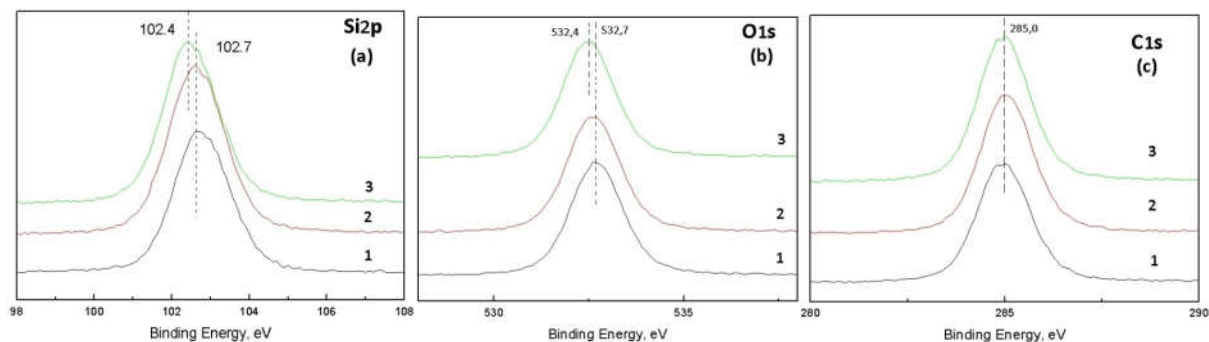
Табл.4 Нанотопографски данни на площи с размери 49x49 μm от повърхността на силиксанови образци, съдържащи трисилоксаново нейногенно ПАВ и α -токоферол: **1** –контрола, несъдържаща добавки; **2** – покритие с 0,5 мас.% ПАВ; **3** – покритие с 1,5 мас.% токоферол; и **4** – покритие с 0,5 мас.% ПАВ + 1,5 мас.% токоферол. Ra- средноаритметично отклонение от базовата линия; Rq- средноквадратично отклонение от базовата линия; Sp- най-висока точка; Sv- най-дълбока точка; Sy- разстоянието между на-високата и най-дълбоката точка.

Покритие	1	2	3	4
Ra, nm	20	15	37	16
Rq, nm	24	21	49	20
Sp, nm	49	55	174	60
Sv, nm	-74	-94	-146	-224
Sy, nm	123	149	320	284

При всички покрития данните показват, че грапавостта на покритията е в нанометровата област (от 15 до 37 nm за Ra и от 20 до 49 nm за Rq), което е далеч под размера на микроорганизмите (средно 2-5 μm за бактериите и 10-100 μm за диатомитите), участващи в биофилмообразуването и покритията биха могли да се приемат за гладки.

Рентгенова фотоелектронна спектроскопия (XPS)

Имайки предвид наблюдаваните изменения в модула на еластичност E на омрежените силиксанови композиционни покрития, както и химията на оценяваните модифициращи добавки и възможните им химични взаимодействия с други компоненти на композицията, бяха снети рентгенови фотоелектронни спектри. Антиоксидантът α -токоферол съдържа хидроксилна група и не е изключена реакция (макар и обратима) с образувалите се при хидролизата силанолни групи на омрежителя и/или силанолните крайни групи на каучуковите вериги. За установяване на наличието на такова взаимодействие са използвани подробните Si2p, O1s и C1s пикове на XPS спектрите на три образца: 1 – силиксаново покритие без добавки; 2 – силиксаново покритие с 1 мас.% трисилоксаново нейногенно ПАВ; и 3 – силиксаново покритие с 2 мас.% α -токоферол (фиг.8).



Фиг.8 XPS-спектър на: **1** – силоксаново покритие без добавки (контрола); **2** – силоксаново покритие съдържащо 1 мас.% нейногенно ПАВ и **3** – силоксаново покритие, съдържащо 2 мас.% антиоксидант.

Пикът на Si2p при 102.7 eV (контролно покритие -крива 1) отразява Si-O връзките в силоксани. Същият пик при покритието с 2 мас.% токоферол (крива 3), е леко изместен към по-ниска свързваща енергия (102,4 eV), което показва наличието на друг тип Si-O връзка. O1s-пикът (отразяващ O-Si връзка) на покритието с 2 мас.% токоферол (крива 3) също е изместен към по ниската свързваща енергия (от 532,7 на 532,4 eV), предполагайки наличието на друг тип свързване на кислорода със силиция. Единственото обяснение за това е реакция между хидроксилната група на токоферола и омрежителя и/или токоферола и силанолните краища на каучуковите молекули. Освен на пластифициращото действие на токоферола, по-силното понижение в модула на еластичност на композициите, съдържащи токоферол (вж. табл.5), е възможно да се дължи именно на това ангажиране на част от силанолните групи в силоксана от токоферола, което би довело до по-ниска степен на омрежване. Новополучилата се арилокси-група също е нестабилна и би следвало да търпи хидролиза до отделяне отново на токоферол и свободна силанолна група, но поради стерични фактори (обемността на токоферола) реакцията вероятно е доста бавна. От XPS-анализа не може да се определи каква част от токоферола се е ангажирала в реакцията, но може да се предположи, че свързвайки се с каучука, тази част токоферол бива защитена от окисление (тъй като ОН-групата му е блокирана). Едва след хидролиза би се получило отново активен токоферол. Възможно е това обратимо частично реагиране (блокиране) на токоферола със силоксана да предпазва токоферола от бързо окисление и така да се удължава противообрастващото му действие в покритията.

Не са наблюдавани отмествания на Si2p, O1s и C1s пиковите на покритието, съдържащо трисилоксаново нейногенно ПАВ, в сравнение с тези на контролното покритие без добавки. Това показва отсъствието на химични взаимодействия на използваното нейногенно ПАВ.

Адхезия на миди

Тестът е проведен в аквариум с балтийска морска среда с миди *Mytilus edulis*. Тестваните образци (100x100x2 mm) са: стъкло; силоксаново покритие без добавки (контрола); силоксаново покритие с добавка от 0,5 мас.% нейногенно ПАВ (суперспредер); силоксаново покритие с добавка от 1,5 мас.% антиоксидант (α -токоферол); силоксаново покритие с комбинация от 0,5 мас.% нейногенно ПАВ и 1,5 мас.% антиоксидант.

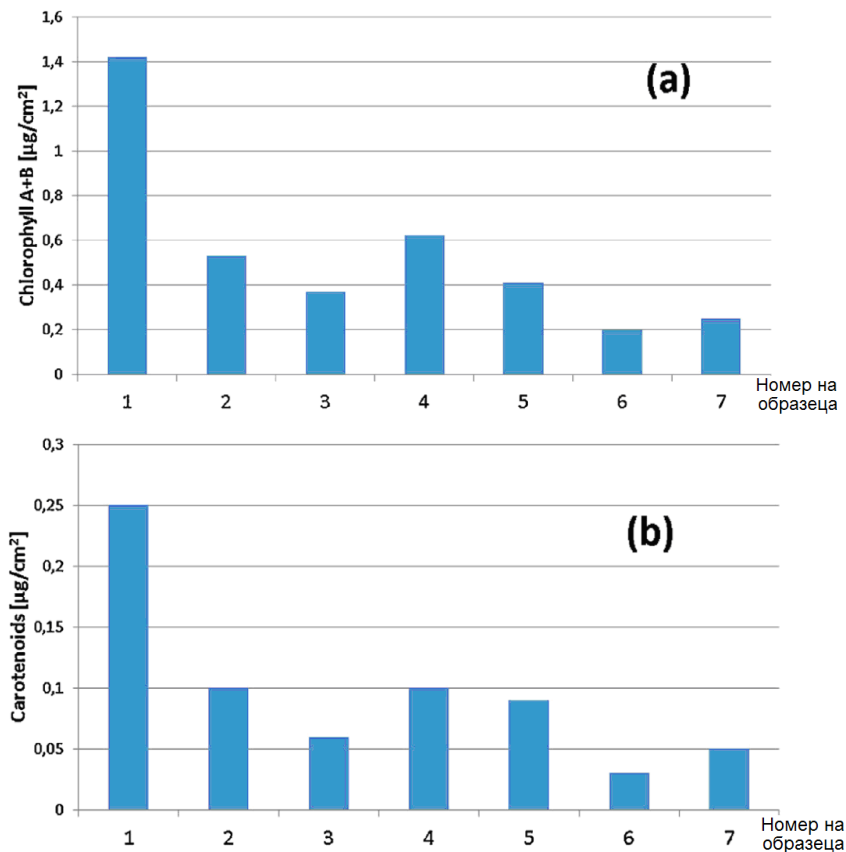
Преди потапянето им в аквариума всички образци са престояли една седмица в изкуствена морска вода, като водата е подменяна ежедневно. По два образца от всеки тестван състав са положени в аквариума и върху тях са поставени по 4 миди (*Mytilus edulis*) със сходен размер в положение лице-гръб. Мидите са оставени свободно да се движат по повърхността, като могат да се фиксират върху нея или да я напуснат. След определен период от време образците са извадени, преброени са закрепилите се миди и byssus-плаки и е оценено колко бързо мидите се отделят (и дали въобще се отделят) от повърхностите под действие на собствената си тежест.

Забелязва се, че ако се случи закрепване на мидите върху тестваните покрития, то е значително по-слабо в сравнение със закрепването им върху стъклото, като се отделят бързо (в рамките на секунди) под действието на собствената си тежест. От тестваните състави мидите успяват да се закрепят единствено за контролното покритие (несъдържащо модифициращи добавки) и покритието, съдържащо ПАВ, но адхезията е много ниска и те падат за около 5 s под действие на собствената си тежест.

Върху покритията, съдържащи антиоксидант или смес от антиоксидант + ПАВ не се наблюдава никакво закрепване на миди, което показва, че антиоксидантът действа инхибиращо на адхезията на мидите и оправдава очакванията ни.

Морско обрастване и биофилмообразуване

Както се очакваше, не беше наблюдавано никакво макрообрастване (с участието на зооорганизми или макроводорасли), а само образуване на оскъден и силно разпокъсан биофилм върху всички тествани силоксанови покрития след 1-годишен (04.2014 – 04.2015) престой под вода в Черно море, яхтеното пристанище на гр. Несебър. За оценка на образувания водораслов биофилм са използвани 2 показателя: общ хлорофил и съдържание на каротеноиди. Получените резултати са представени на Фиг.9.



Фиг.9 Количество хлорофил (a) и каротеноиди (b) в биофилмите: **1** - контролно покритие, несъдържащо добавки; **2** и **3** – съответно 0,5 и 1,0 мас.% ПАВ; **4** и **5** – съответно 0,5 и 2,0 мас.% антиоксидант; **6** – 0,5 мас.% ПАВ + 1,5 мас.% антиоксидант; **7**- 1,0 мас.% ПАВ + 1,0 мас.% антиоксидант.

Съдържанието на хлорофил и каротеноиди, характерни за изградените от микроводорасли биофилми, е много малко, както се вижда от Фиг.9a и 9b. За сравнение, съдържанието на хлорофил в листата на повечето растения е около 40-70 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [12], докато в изследваните биофилми е под 1.42 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Ефекта на модифициращите добавки: трисилоксаново нейногенно ПАВ, антиоксидант и техни комбинации върху общия хлорофил и съдържанието на каротеноиди е подобно, което е разбираемо имайки предвид, че във фотосинтезата като помощни пигменти участват и каротеноидите. От фигурите се вижда, че върху всички покрития съдържащи модифициращи добавки (образци 2-7), има намалено биофилмообразуване в сравнение с контролното без добавки (образец 1). Особено ниски стойности има при комбинациите от ПАВ и антиоксидант в съотношение 1:3 (образец 6), намалявайки 7-8 пъти степента на микрообрастване, според данните за количеството хлорофил и каротеноиди.

Заклучение

Ефектът на нейногенното ПАВ, антиоксиданта и комбинациите от тях в свободни от биоциди силоксанови противообрастващи покрития е слабо изразен при монокултурно бактериално биофилмообразуване с участието на *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*.

Обратно, опитните данни показват ефикасността на подбраните ПАВ, антиоксидант и техни комбинации в свободни от биоциди силоксанови противообрастващи покрития да намаляват черноморското обрастване – предотвратяване на макрообрастването и намаляване на микрообрастването до 7-8 пъти (Фиг.6 и Фиг.9). Присъствието на антиоксидант в покритията предотвратява и адхезията на миди (*Mytilus edulis*) в лабораторни условия.

Подобрените им антиобрастващи свойства биха могли да се припишат на: затруднена начална (обратима) адхезия на биозамърсителите (благодарение присъствието на ПАВ); и инхибиране на омрежването на адхезивните екстрацелуларни полимери, секретирани от биозамърсителите (благодарение присъствието на антиоксидант).

4 Ефект на ЕО-съдържащи вещества в свободни от биоциди силоксанови противообрастващи композиционни покрития

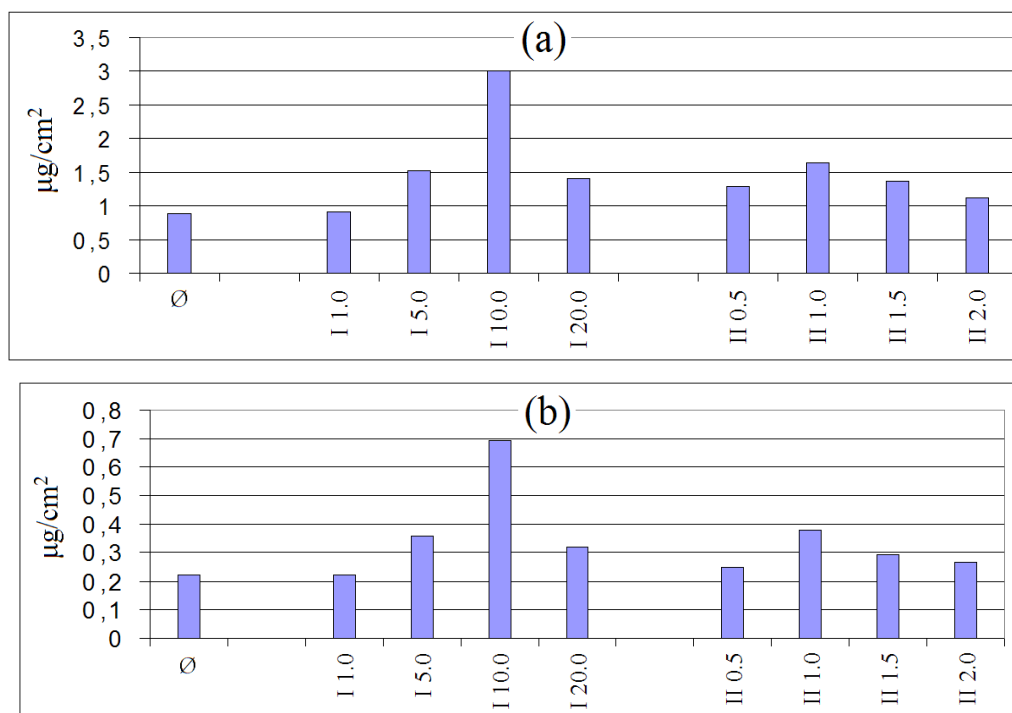
Добре известно е, че силно хидрофилните повърхности, най-често покрити или присадени с етиленоксидни (ЕО) олигомери или цвитерийонни вещества, са резистентни спрямо неспецифичната протеинова адсорбция и бактериална адхезия, поради което намират приложение за създаване на биоинертни биоматериали с различни медицински приложения. Тъй като в обрастването до голяма степен участват екстрацелуларни адхезивни протеини би следвало да се очаква, че една протеин-резистентна повърхност ще има и повишени анти-биоадхезивни свойства [90]. Но незадоволителната им устойчивост във водна среда ограничава значително приложимостта им.

Целта на това изследване да се провери възможността за съчетаване на противoadсорбционните и противoadхезионни свойства на ЕО-съдържащите вещества с добрите отделителни свойства на силоксаните. Изследвани са два типа ЕО-съдържащите вещества: химически инертен, неучастващ във силоксановата вулканизационна мрежа високомолекулен полиетиленоксид; и участващ химически във вулканизационния процес триметоксисилан с полиетиленгликолов (ПЕГ) радикал.

4.1 Ефект на химично инертно ЕО-съдържащо вещество

Като химически несвързващо се със силоксановия каучук вещество е използван високомолекулен полиетилен оксид (ПЕО), като е включен в композициите под формата на прах или воден разтвор, фино емулгиран в силоксаново масло. Проведен е тест за микрообрастване в средиземноморски аквариум за 5 седмици, а степента на биофилмообразуване е оценена посредством съдържанието на хлорофил и каротеноиди.

Както се вижда от Фиг.10 ПЕО, добавен във вид на прах или емулсия в/м, не оправда очакванията ни.



Фиг.10 Съдържание на общ хлорофил (а) и каротеноиди (b) в биофилмите от силоксанови образци. Ø - контрола без добавки; I 1.0, I 5.0, I 10.0 и I 20.0 – съдържащи 1,0 до 20,0 мас. % прахообразен ПЕО; II 0.5, II 1.0, II 1.5 и II 2.0 – съдържащи 0,5 до 2,0 мас.% ПЕО -емулсия.

Резултатите от определянето на общ хлорофил и каротеноиди показаха, че включването на ПЕО в силоксановите образци под която и да е от двете форми, вместо до очакваното намалено, води до повишено микрообрастване. Възможни обяснения на това са: 1) при контакта с вода, не свързаният химически ПЕО лесно се отмива от повърхностния слой на покритието, без да успее да прояви очаквания противообрастващ ефект; 2) отмивайки се, ПЕО би следвало да оставя след себе си микро- и макропразнини в силоксановата повърхност, които увеличават грапавостта и

подпомагат обрастването. По тази причина опитите за модификация на силоксани с химично инертни спрямо силоксановата матрица ПЕО/ПЕГ бяха преустановени.

Заклучение

Модифицирането на свободни от биоциди силоксанови противообрастващи композиции с химически неучастващ във вулканизационната мрежа полиетиленоксид води до повишено микрообрастване. Такива състави биха били от интерес повече за биотехнологията, като податливи на заселване с желани микроорганизми повърхности.

4.2 Ефект на химично свързващо се ЕО-съдържащо вещество

Като химично свързваща се модифицираща добавка, съдържаща полиетиленгликолова верига, беше избран триметокси-ПЕГ-силан, Methoxy(polyethyleneoxy)₆₋₉-propyltrimethoxysilane, който би могъл да участва в силанолна кондензация със силоксановия еластомер и с омрежителя и така да се включи във вулканизационната мрежа. За микробиологични и медицински цели ПЕГ-силани се използват за създаване на протеин-резистентни повърхности и покрития, чрез включването му в силоксанови еластомери [20, 21, 22].

Трите метокси-групи в ПЕГ-силана могат да участват в процеса на омрежване на хидроксилзавършения силоксанов каучук. На практика обаче избраният ПЕГ-силан не може да бъде пълноценен омрежител поради: а) ниска функционалност (само три метокси-групи; и б) недобра съвместимост (слаба разтворимост) в силоксановата композиция, т.е. при смесване на ПЕГ-силана със силоксановата композиция се получава мътна смес, показваща двуфазност на системата (дисперсия).

Можем да предположим, че покритие, получено от такава хетерогенна смес, на микро ниво ще притежава хидрофилни (обусловени от ПЕГ-силана) и хидрофобни (обусловени от силоксановия каучук) зони. Известно е, че биозамърсителите, участващи в процеса на обрастване, имат определено „предпочитание” от гледна точка на хидрофилно-хидрофобния характер на повърхността, която ще заселват [23, 24]. Те, до известна степен, могат да моделират секретирания адхезивни полимери в зависимост от характера на повърхността. От тук може да изкажем хипотезата, че имайки повърхност, съдържаща едновременно силнохидрофилни и силнохидрофобни микрообласти, ще бъде по-трудно за организмите да вземат адекватно ”решение” относно какъв тип е повърхността и какъв тип най-подходящи адхезивни протеини да секретират. В случай, че адхезивните протеини са по-подходящи за хидрофобните зони, тогава в хидрофилните зони адхезията ще е по-слаба и обратно. Това би следвало да доведе до общо понижение в адхезията на биофилма.

От няколко години японската фирма Chugoku Marine Paints предлага противообрастващата, свободна от биоциди, силиконова боя Bioclean ECO [25], която създава двуфазна, микрохетерогенна повърхност с хидрофобни и хидрофилни зони. Съставът на продукта не е споменат, но допускаме, че се базира на същия принцип – модифициране на силоксанови еластомери с ПЕГ-силан.

Тъй като използваният от нас ПЕГ-силан е трифункционален и може да участва в омрежването на силоксановия каучук, е направен опит за частична (2 мас.%) и пълна (6 мас.%) замяна на стандартния омрежител (ES40 - етилсиликат 40) с този силан. На базата на силанол-завършени силоксанови каучуци, катализатор (0,5 мас.% дибутилкалаендилаурат) и омрежители (6 мас.% ES40, 6 мас.% ПЕГ-силан или смес 2 мас.% ПЕГ-силан + 4 мас.% ES40) са изготвени кръгли листови образци с диаметър 40 mm и дебелина 3 mm. При цялостна замяна на стандартния омрежител с ПЕГ-силан омрежването на силоксановия каучук е непълно и получените образци са с много нисък модул на еластичност. Както беше споменато по-горе, освен слабата му разтворимост в силоксановия каучук, друга възможна причина за недобрите омрежващи свойства на ПЕГ-силана е ниската му функционалност (само три броя метокси-групи) в сравнение с традиционния полифункционален омрежител ES40.

Изготвените образци са подложени на микрообрастване в черноморски аквариум с времетраене 5 месеца.

На фиг.11 е показана фотография на обраслите образци след 5 месеца престой в аквариума.



Фиг. 11 Обрастване след пет месеца престой в черноморски аквариум. Ø-контрола (с 6 мас.% стандартен омрежител ES40); 1- образец с 6 мас.% ПЕГ-силан; 2- образец с 2 мас.% ПЕГ-силан + 4 мас.% ES40.

Вижда се, че разликите в обрастването са значителни. След 5 месеца единственият почти необрасъл образец е съдържащият 2 % ПЕГ-силан + 4% омрежител ES40 (образец 2), а останалите са напълно покрити с водорасли. При такова състояние бе безпредметно количественото определяне степента на обрастване. Известно е, че във водна среда ПЕГ-илираните повърхности се солватират толкова силно от водните молекули, че неспецифичната адсорбция на протеини (респ. на екстрацелуларни адхезивни полимери) се затруднява. Вероятно поради същите причини, наличието на ПЕГ-групи, ковалентно свързани със силоксановия каучук (какъвто е нашият случай), създава мощен противообрастващ ефект. Образците несъдържащи класически омрежител (образци 1) обаче, съдържат 3 пъти по-голямо количество ПЕГ-силан, но не показват така добри противообрастващи свойства както образец 2. Вероятна причина е ниската им степен на омрежване, при което: а) в каучука би следвало да остават голямо количество свободни силанолни групи ($\equiv\text{Si-OH}$), които са предпоставка за силни междумолекулни взаимодействия с екстрацелуларните полимери на микроорганизмите и б) вследствие ниската степен на омрежване повърхността притежава известна лепливост и биозамърсителят по-лесно адхерира към нея. Това, че слабоомрежен силоксан притежава известни адхезионни свойства се използва в практиката за получаване на силиконови контактни медицински лепила (silicone soft skin adhesives) [26].

Заклучение

Сравнявайки резултатите с тези, получени при използването на химично несвързващ се полиетиленоксид като модифицираща добавка (т.4.1) може да се направи извода, че за наличие на противообрастващ ефект е необходимо полиетиленгликолният компонент да е химично свързан в силоксановото покритие. В този случай, въпреки силната си хидрофилност, ПЕГ-компонентът не се отмива от водата и ефектът му е дълготраен.

5 Ефект на ПЕГ-силан в свободни от биоциди силоксанови покрития, съдържащи нейногенно ПАВ и/или антиоксидант

Силоксановите композиции, съдържащи модифициращите добавки нейногенно ПАВ (суперспредер) и антиоксидант (токоферол) са същите, използвани в предишните изследвания и са приготвени както е описано в [4]. ПЕГ-силанът участва като съомрежител заедно с традиционно използвания етилсиликат (ES40). Определени са характеристиките на повърхността (физико-химични и физико-механични) и адхезията

на бактерията *Cobetia marina* с флуоресцентна микроскопия, като количеството на бактериалния биофилм е оценено с аденозинтрифосфатен тест.

Модул на еластичност и характеристики на повърхността на омреженото покритие

Повърхностните физико-химични и механични характеристики на изследваните покрития са дадени в табл.5.

Табл. 5 Модул на еластичност, Е и характеристики на повърхността на покритията: ъгъл на омокряне, θ_{H_2O} ; повърхностна енергия, γ_c и нейните дисперсна, γ^d и полярна част, γ^p ; Викерсова микротвърдост, НМV; индентационна микротвърдост, Нit и индентационен модул на еластичност, Eit

Образец	1	2	3	4	5	6
$\theta_{H_2O}, ^\circ$	104,1	103,0	104,1	51,5	90,6	60,0
$\gamma_c, \text{mN/m}$	22,4	22,8	22,1	30,5	24,4	32,1
$\gamma^d, \text{mN/m}$	22,0	22,6	22,0	20,1	22,0	21,0
$\gamma^p, \text{mN/m}$	0,4	0,7	0,1	10,4	2,3	11,1
НМV, N/mm ²	0,13	0,46	0,45	0,34	0,34	0,27
Нit, N/mm ²	0,34	0,82	0,82	0,77	0,63	0,51
Eit, N/mm ²	1,76	8,13	7,88	4,99	5,87	4,41
E, N/mm ²	0,48	0,31	0,35	-	-	-

- 1 – покритие с 6 мас.% ES 40 (традиционен омрежител), контрола;
2 – покритие с 4 мас.% ES 40 + 2 мас.% ПЕГ-силан;
3 – покритие с 6 мас.% ES 40 + 2 мас.% ПЕГ-силан;
4 – покритие с 4 мас.% ES 40 + 2 мас.% ПЕГ-силан + 0,5 мас.% нейногенно ПАВ;
5 – покритие с 4 мас.% ES 40 + 2 мас.% ПЕГ-силан + 1,5 мас.% антиоксидант;
6 – покритие с 4 мас.% ES 40 + 2 мас.% ПЕГ-силан + 0,5 мас.% нейногенно ПАВ + 1,5 мас.% антиоксидант.

От Табл. 5 се вижда, че добавянето на 2 мас.% ПЕГ-силан като съомрежител (покрития 2 и 3) в основната силоксанова композиция (контрола, покритие 1) не променя хидрофобността на повърхността: ъгълът на омокряне с вода θ_{H_2O} и повърхностното напрежение γ_c на трите покрития 1, 2 и 3 са почти еднакви. Наличието на ПЕГ-групи в покритие 3 би следвало да намали ъгъла на омокряне с вода в

сравнение с контролата (покрытие 1), но всъщност това не се наблюдава. Възможно обяснение за това е коментираната вече ниска съвместимост на ПЕГ-силана със силиконовия каучук, при което голяма част от силанът се намира в дисперсна форма - микроскопични перлички, обвити в силиконовата матрица. По този начин за краткото време, през което се извършват повърхностните измервания (2 min за измерване на θ_{H_2O} и γ_c), ПЕГ-групите не успяват да се ориентират в посока към граничната повърхност. В подкрепа на подобно тълкувание са изследванията на някои автори, описани в [27-34]. Физико-механичните показатели на повърхността на покритията, съдържащи ПЕГ-силан (покрития 2-6) обаче нарастват в сравнение с контролата (покрытие 1): микротвърдостта H_{it} и Викерсовата микротвърдост H_{MV} се увеличават около 2,5-3,5 пъти; модулът на еластичност при микропроникване E_{it} нараства около 4,5 пъти. За разлика от механичните показатели на повърхността, модулът на еластичност E показва обратна зависимост - присъствието на ПЕГ-силан го намалява (сравни покрития 2 и 3 с покрытие 1). Възможни обяснения на наблюдаваните различия са: а) като хидрофилна съставка ПЕГ-силанът, в близост до граничната повърхност абсорбира влага, което води до набъбване и втвърдяване на повърхностните слоеве на покритието; и б) формирането на различна вулканизационна мрежа в обема на покритието и на повърхността му.

Включването на нейногенно ПАВ, превръща повърхността на покрытие 3 от хидрофобна ($\theta_{H_2O}=104.1^\circ$) в хидрофилна – θ_{H_2O} на покрития 4 и 6 намалява съответно до стойности 51° и 60° . Сравнявайки покритията от предходни експерименти, които съдържат същия ПАВ в количества 0,5 и 1 мас.%, но не съдържат ПЕГ-силан (покрытие 2, табл.5, т.Ш.3, $\theta_{H_2O}=89,9^\circ$ и покрытие Ш_{1,0}, табл.4, т.Ш.2, $\theta_{H_2O}=73,8^\circ$) се вижда, че при тях увеличаването на хидрофилността не е така силно изразено. В случая значително по-малкият контактен ъгъл (покрития 4 и 6) би следвало да е сумарен ефект от действието на нейногенното ПАВ (като типично повърхностноактивно вещество, съдържащо силно полярна част) и подобрена съвместимост на ПЕГ-силана с каучука или улеснена ориентация на ПЕГ-веригите му към повърхността.

Присъствието на антиоксидант в покрытие 5 намалява слабо ъгъла на омокряне, но повърхността остава хидрофобна (от $\theta_{H_2O} = 103^\circ$ за покрытие 2 до $\theta_{H_2O} = 90,6^\circ$ за покрытие 5). Сравнявайки го с покрытие 3 от Табл.5, Ш.3, с $\theta_{H_2O}=99,2^\circ$ и покрытие IV_{2,0} от Табл.4, Ш.2 с $\theta_{H_2O} = 93,8^\circ$, които съдържат същия антиоксидант в количества съответно 1,5 и 2 мас.%, но не съдържат ПЕГ-силан се вижда, че последните две са по-хидрофобни. Това, може да се дължи отново на подобрена съвместимост на ПЕГ-силана със силиконовия каучук. Предпоставки за подобен ефект на антиоксиданта

токоферол е неговата молекулна структура – наличие на по-полярна част (поради присъствие на ОН-група) и хидрофобна част, което предполага наличие на известни емулгиращи свойства по отношение на ПЕГ-силана.

И тук комбинацията ПАВ/антиоксидант показва суперпозиция в ъгъла на омокряне (покрытие 6). От цялата серия покрития 4 и 6 се отличават с най-голяма и относително близка хидрофилност (съответно $\theta_{\text{H}_2\text{O}} = 51,5^\circ$ и $\theta_{\text{H}_2\text{O}} = 60^\circ$) и би следвало да се предположи, че тези две покрития ще притежават най-висока резистентност към биоадхезия. Резултатите обаче от бактериалната адхезия при двете покрития, както ще видим по-долу, са доста различни. Това показва, че или хидрофилно-хидрофобните отнасяния на дадена повърхност сами по себе си не могат да бъдат еднозначен критерий за степента на биоадхезия, или че в случая токоферолът притежава някакво специфично антибиоадхезивно свойство.

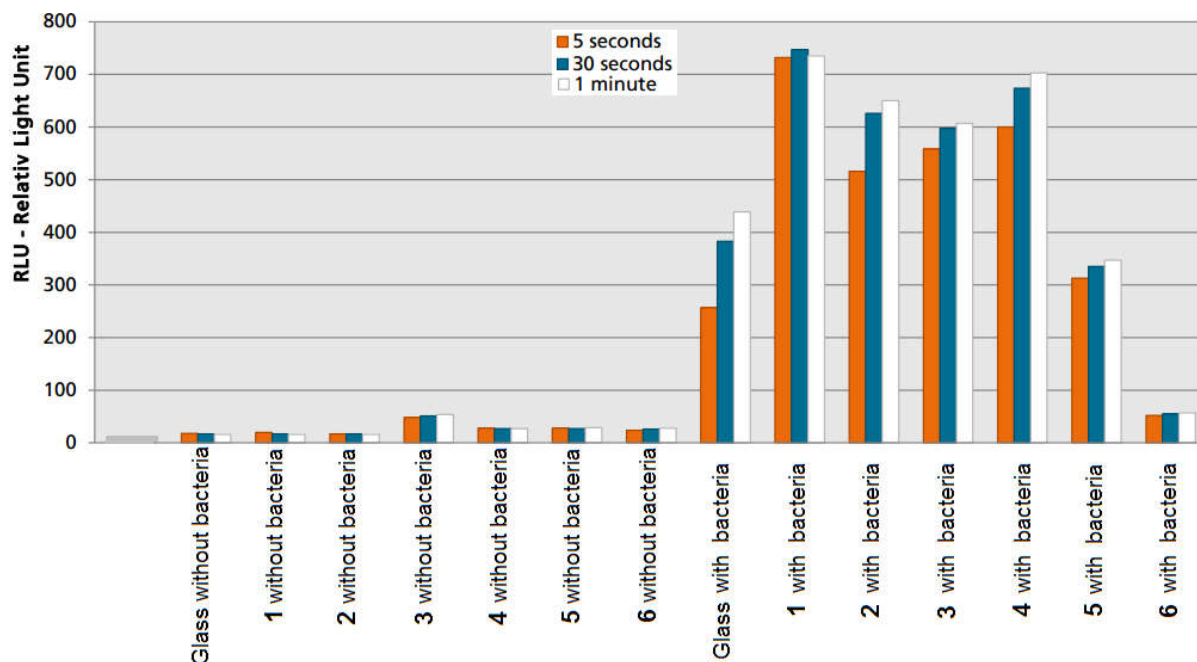
Флуоресцентна микроскопия със SYTO 9

След еночасовата инкубация в култура на бактерия *Cobetia marina* и оцветяване с флуоресциращото в зелено багрило SYTO 9 единствено покритие 6 (2% ПЕГ-силан + 0,5% нейоногенен ПАВ + 1,5% антиоксидант) не показва видимо заселване с *Cobetia marina*.

Отново правят впечатление покритията, съдържащи токоферол (покрития 5 и 6) с наличието по повърхността им на образувания, приличащи на маслени петна. Възможно е да са следствие от мигрирал към повърхността токоферол, който поради относително ниската повърхностна енергия на силоксановата композиция, не успява да омокри напълно повърхността.

Аденозинтрифосфатна биолуминесценция

Бактериалния биофилм върху тестваните покрития, образуван при еночасов престой в култура на $4 \cdot 10^7$ cfu/ml *Cobetia marina*, е определен количествено чрез аденозинтрифосфатна биолуминесценция. Интензитетът на емитираната светлина е пропорционален на количеството аденозинтрифосфат, респ. на количеството бактериални клетки. На фиг.12 е показано относителното количество флуоресцентна светлина, продуцирана от бактериалните филми 5, 30 и 60 s след прибавянето на реагентите.



Фиг.12 Аденозинтрифосфатна луминесценция от тестваните покрития без и с бактериален биофилм, образуван при едночасов престой на образците в $4 \cdot 10^7$ cfu/ml *Cobetia marina*. **Glass** – стъклена повърхност; **1** – покритие с 6 мас.% ES40, без добавки (контрола); **2**– покритие с 4 мас.% ES40 + 2 мас.% ПЕГ-силан; **3** – покритие с 6 мас.% ES40 + 2% ПЕГ-силан; **4** – покритие с 4 мас.% ES40 + 2 мас.% ПЕГ-силан + 0,5 мас.% ПАВ; **5** – покритие с 4 мас.% ES40 + 2 мас.% ПЕГ-силан + 1,5 мас.% антиоксидант; **6** – покритие с 4 мас.% ES40 + 2 мас.% ПЕГ-силан + 0,5 мас.% ПАВ + 1,5 мас.% антиоксидант.

Вижда се, че стъклената повърхност, по отношение на *Cobetia marina*, има средна податливост към колонизация, докато чистото силоксаново покритие **1** – максимална. Това е в съгласие с изследвания в областта, според които хидрофобните повърхности са по-благоприятни за бактериална адхезия [35, 36].

Покрития **2** и **3** (с 2% ПЕГ-силан, но различно количество класически втвърдител) имат сходно количество бактериален биофилм, но намалено, в сравнение с контролата **1**. Това показва, че за времето на инкубация в бактериалната суспензия (1 h) част от ПЕГ-веригите успяват да се ориентират към водната фаза и да повлияят на биоадхезията, докато за краткото време на измерване (2min) на θ_{H_2O} и γ_c (Табл.7, покрития **1,2** и **3**) индикация за подобна ориентация на ПЕГ-веригите не се наблюдава.

Прибавянето на 0,5% нейногенно ПАВ (покритие **4**) превръща повърхността от хидрофобна в хидрофилна ($\theta_{H_2O}=51,5^\circ$, Табл.7), но това не довежда до намаляване на количеството биофилм, дори напротив, количеството бактериален биофилм е леко увеличено в сравнение с покритие **2** и противоречи на приетото мнение, че по-хидрофобните повърхности са по-благоприятни за бактериална адхезия.

Присъствието на антиоксидант (α -токоферол) в покритие 5 понижава значително количеството адхерирани бактерии в сравнение с покритие 2 и дори достига ниските нивата на бактериалния филм върху стъклото, въпреки че покритието показва хидрофобност (Табл.7, $\theta_{\text{H}_2\text{O}}=90,6^\circ$). В литературата има малко изследвания относно влиянието на токоферола върху бактериите, но получения резултат корелира с някои ортопедични наблюдения, че импланти от ултрависокомолекулен полиетилен, съдържащ токоферол като антиоксидант (с цел предпазване на полимера от окислителна деструкция при преработката и експлоатацията му), дават по-малко случаи на постоперативни инфекции и намалено биофилмообразуване върху повърхността им [37-39]. Авторите показват, че включването на α -токоферол в полиетилен понижава в немалка степен адхезивната способност на *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, като ефектът му почти не се влияе от концентрацията му. Подобно антибиофилмообразуване на токоферола по отношение на *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus aureus* се наблюдава и при включването му в полимлечна киселина [40]. За сега няма убедително обяснение на антибиоадхезивните свойства на токоферола. Би могло да допуснем, че в бактериалната адхезия участват окислителни процеси, при които токоферолът се намесва. Друго възможно обяснение е наличие на известна антибактериална активност на токоферола. Въпреки възприетото схващане, че токоферолът е пасивен спрямо бактериалната активност, т.е. няма антибактериални свойства, в някои изследвания се показва известна антибактериална активност по отношение на някои Грам-положителни бактерии като *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* [41]. Все още няма достатъчни изследвания, изясняващи механизма на наблюдаваното му бактериостатично действие.

Комбинацията от ПАВ и антиоксидант (покритие 6) в силоксановите покрития, съдържащи 2 мас.% ПЕГ-силан като съомрежител, показва синергизъм по отношение намаляване заселването на повърхността с *Cobetia marina*. Разгадаването на истинската причина за това се нуждае от задълбочени микробиологични и биохимични изследвания, което е обект на бъдещи изследвания.

Заклучение

Самостоятелното присъствие на ПЕГ-силан, като съомрежител в свободни от биоциди силоксанови противообрастващи покрития, оказва слаб ефект върху редуцирането на количеството бактериален биофилм, получен от монокултура на *Cobetia marina*. Съчетаването обаче на ПЕГ-силан с антиоксидант (токоферол) и

особено с комбинация от антиоксидант и нейногенно ПАВ, силно намалява количеството бактериален биофилм. Не се открива строга закономерност между бактериалната адхезия (количеството биофилм) и хидрофилно-хидрофобния характер на изследваните покрития.

ИЗВОДИ

Въз основа на резултатите от проведените експерименти могат да се направят следните обобщения:

1. Инертните силоксанови и флуорирани масла, оказващи сами по себе си влияние върху микрообрастването, могат да се използват и като носител на модифициращи добавки, които е желателно да мигрират на повърхността. За предпочитане в този случай са силоксановите масла, които създават равномерен тънък слой върху покритата повърхност, докато флуорираните масла образуват микрокапчици. Скоростта на миграция на маслото може лесно да се управлява чрез неговия вискозитет. Най-подходящи, по отношение на редуцирано биофилмообразуване, са силоксановите масла с вискозитет в границите на 350-1000 cSt.
2. Оценено по няколко показателя: общ хлорофил, съдържание на каротеноиди, общ протеин и суха маса на биофилма, трисилоксановото нейногенно ПАВ (суперспредер Y17112) намалява силно биофилмообразуването – 3 до 8 пъти в зависимост от количеството му (0.1 – 1.0 мас.%) и оценявания параметър.
3. За първи път в света, от нас е доказан противообрастващ ефект на антиоксидант, което може да се приеме като косвено потвърждение на предполагаемия окислителен механизъм на омрежване на секретиранияте от биозамърсителите екзополимерни вещества. Включването на 0.5 – 2.0 мас.% α -токоферол в свободните от биоциди силоксанови противообрастващи покрития намалява микрообрастването 3 до 5 пъти в зависимост от количеството му и оценявания параметър. Антиоксидантните покрития вече се обсъждат от научната общност като нова екологично приемлива алтернатива на токсичните противообрастващи бои [83].
4. Подходящо подобреният нейногенно ПАВ и нетоксичен антиоксидант показват силно изразена противообрастваща активност в свободните от биоциди силоксанови композиционни покрития не само в лабораторни, но и в полеви условия, като ефектът е най-силно изразен при покритията, съдържащи едновременно нейногенно ПАВ и антиоксидант. Тези покрития показват отлични противообрастващи свойства: морско макрообрастване (миди, барнакли и макроводорасли) са редуцирани до нула; силно редуциран (6 – 10 пъти) биофилм от различни микрозамърсители, както и пълно и лесно

отстраняване на образувания оскъден биофилм чрез избърсване или измиване с течаща вода.

5. Използването на ПЕГ-силан като съомрежител в немодифицираните силоксанови противообрастващи покрития, намалява значително микрообрастването.
6. Използването на ПЕГ-силан като съомрежител в немодифицираните силоксанови противообрастващи покрития оказва слабо влияние върху образуването на бактериален филм от монокултура на *Cobetia marina*.
7. Използването на ПЕГ-силан като съомрежител в модифицирани с антиоксидант и нейногенно ПАВ силоксанови противообрастващи покрития, силно намалява количеството на образувания се бактериален филм от монокултура на *Cobetia marina*.
8. Модифицирането на свободни от биоциди силоксанови противообрастващи покрития с химически несвързан във вулканизационната мрежа полиетиленоксид води до повишено микрообрастване.
9. Включването на фотоактивен пълнител (TiO_2 анатаз) в силоксановите противообрастващи покрития има слаб ефект върху биофилмообразуването.

ПРИНОСИ

Формулирани са пре-реквизитите на незамърсяващата се, „чиста“ повърхност, които могат да се използват като основа за разработване на противозамърсяващи покрития и повърхности с различно предназначение, като например: антимикробните биоматериали; рибарски и аква-ферми; подводни конструкции и сензори; плавателни съдове; водосборни и охладителни системи; топлообменници; съоръжения в млекопреработващата индустрия и почти всички производства, протичащи във водна среда.

Въз основа на тях са разработени три типа свободни от биоциди силоксанови противообрастващи покрития, редуциращи силно морско биофилмообразуване в лабораторни и полеви условия: 1) прозрачни покрития, съдържащи повърхностноактивно вещество или антиоксидант; 2) композиционни покрития, съдържащи ПАВ и антиоксидант едновременно и 3) съдържащи ПАВ, антиоксидант или двете едновременно, в комбинация с ПЕГ-силан като съомрежител. За отбелязване е, че поради твърде ниската адхезия на покритите повърхности, биофилмът върху тях се отстранява напълно и лесно чрез измиване с течаща вода или леко избърсване.

За първи път в света, от нас е доказан противообрастващ ефект на антиоксидант, което може да се приеме като косвено потвърждение на предполагаемия окислителен механизъм на омрежване на секретираните от биозамърсителите екзополимерни вещества. Антиоксидантните покрития вече се обсъждат от научната общност като нова, екологично приемлива алтернатива на токсичните противообрастващи бои.

Списък на научни публикации по дисертацията

1. D. Akuzov, F. Brümmer, T. Vladkova, Some Possibilities To Reduce the Biofilm Formation on Transparent Siloxane Coatings, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 104, 303-310 (2013) IF₂₀₁₃ 4.287
2. D. Akuzov, T. Vladkova, A. Klöppel, F. Brümmer, S. Murthy, Composition Antifouling Coatings: Effect of Siloxane and Fluorinated Oil Incorporation on Marine Biofilm Formation, JCTM, 49 (3), 229-237 (2014)
3. T. Vladkova, D. Akuzov, A. Klöppel, F. Brümmer, Current Approaches to Reduction Marine Biofilm Formation, JCTM, 49 (4), (2014)
4. D. Akuzov, T. Vladkova, G. Zamfirova, V. Gaydarov, M. Nascimento, N. Szeglar, I. Gruenwald, Polydimethyl siloxane coatings with superior antifouling efficiency in laboratory and marine conditions, Progr in Org. Coat, 103, 126-134 (2016) IF 2.632
5. T. Vladkova, D. Akuzov, "Current Approaches to Reduction Marine Biofilm Formation", in BIOFILMS: Emerging Concept and Trends, R. Sekar, V. Nanchariah, S. Murthy, V. Thiyagarajan (Eds), Narosa Publishing House, India (под печат)

Заявки за патенти

1. Т. Владкова, Д. Акузов, Свободно от биоциди противообрастващо покритие, заявка за БГ пат. № 11866/15.01.2015 г.

Участия в научни форуми

1. D. Akuzov, A. Klöppel, F. Brümmer, T. Vladkova, Preparation and Biofilm Formation on Biocide-Free Siloxane Antifouling Coatings, Third Int. Conf. On Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials, Sorento, Italy, March, 3-7, 2013. (oral presentation OB9)
2. D. Akuzov, A. Klöppel, F. Brümmer, T. Vladkova, Preparation and Biofilm Formation on Biocide-Free Siloxane Antifouling Coatings, Frontiers in Polymer Science, Sitges, Spain, May 21-23, 2013.
3. D. Akuzov, T. Vladkova, A. Kloeppel, F. Bruemmer, Modification of Polysiloxane Coatings to Reduce Biofilm Formation in Sea Environment, Nat. Conf. on Chemistry, Sofia, June 26-28, 2014.
4. T. Vladkova, D. Akuzov, Current Approaches to Reduction Marine Biofilm Formation, IIIrd International Conference on Antimicrobial Research, ICAR 2014, Madrid, Spain October 1-3, 2014 (oral presentation)
5. D. Akuzov, T. Vladkova, A. Kloeppel, F. Bruemmer, Low Adhesive Surfaces Significantly Reducing Biofilm Formation, ICAR 2014, Madrid, Spain October 1-3, 2014.
6. D. Akuzov, T. Vladkova, D. Gospodinova, G. Zamfirova, V. Gaydarov, M.-V. Nascimento, N. Szeglat, I. Grunwald, Siloxane Composition Coatings with Eexcellent Antibiofilm Efficiency, ICAR-2016, Torremolinos - Malaga, Spain, 29 June – 1 July 2016.
7. T. Vladkova, D. Akuzov, I. Grünvald, D. Gospodinova, F. Brümmer, Effect of PEG-Silane Cross-Linker in Siloxane Nanocomposite Antifouling Coatings, BIT,s 6th Annual World Congress of Nano Science & Technology – 2016, Singapore, 26 – 28.2016.

ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА

1. R. Holland, T. Dugdale, R. Wetherbee, et al. Adhesion and motility of fouling diatoms on a silicone elastomer. (2004) *Biofouling*, 20, 323-329.
2. J. Stein, K. Truby, C. Wood et al. Silicone Foul Release Coatings: Effect of the Interaction of Oil and Coating Functionalities on the Magnitude of Macrofouling Attachment Strengths. (2003) *Biofouling*, 19, 71-82.
3. K. Truby, C. Wood, J. Stein et al. Evaluation of the Performance Enhancement of Silicone Biofouling-Release Coatings by Oil Incorporation. (2000) *Biofouling*, 15, 141-150.
4. T. Vladkova, I. Zlatanov, P. Dinev, I. Katiroli, S. Venkatesan, S. Murthy. Composition Coating for Biofouling Protection. BG Pat. 109779/2006, WO 2008/074102 A1.
5. Krytox, Performance Lubricants - Product Overview - DuPont. (2010) http://www2.dupont.com/Lubricants/en_US/assets/downloads/Krytox_Overview_H-58505-3_19april2010.pdf
6. F. Fowkes. Dispersion Force Contributions to Surface and Interfacial Tensions, Contact Angles, and Heats of Immersion. (1964) *Advances in Chemistry*, 43, 99-111.
7. F. Fowkes. Additivity of Intermolecular Forces at Interfaces. I. Determination of the Contribution to Surface and Interfacial Tensions of Dispersion Force in Various Liquids. (1963) *J. Phys. Chem.*, 67, 2538-2541.
8. M. Chaudhury. Surface Free Energies of Alkylsiloxane monolayers supported on elastomeric polydimethylsiloxanes. (1993) *J. Adhesion Sci. Technol.*, 7, 669-675.
9. M. Chaudhury, G. Whitesides. Correlation Between Surface Free Energy and Surface Constitution. (1992) *Science*, 255, 1230-1232.
10. M. Chaudhury. Interfacial Interaction Between Low-energy Surfaces. (1996) *Materials Science and Engineering*, R16, 97-159.
11. N. Kovalchuk, A. Trybala, V. Starov et al. Fluoro- vs Hydrocarbon Surfactants: Why do They Differ in Wetting Performance? (2014) *Adv Colloid Interface Sci.*, 210, 65-71.
12. H. Lichtenthaler, C. Buschmann. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. (2001) *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F4.3.1-F4.3.8.
13. J. Chiu, V. Thiyagarajan, M. Tsoi, P. Qian. Qualitative and Quantitative Changes in Marine Biofilms as a Function of Temperature and Salinity in Summer and Winter. (2005) *Biofilms*, 2, 183-195.
14. J. Wilker, C. Grosso, T. McCarthy et al. Managing Redox Chemistry To Deter Marine Biological Adhesion. (2016) *Chemistry of Materials*, 28, 6791-6796.
15. E. Shalaeva, E. Lisitskaya. Seasonal dynamics of the numbers of larvae of common fouling organisms in Balaklava Bay (Black Sea). (2004) *Russian Journal of Marine Biology*, 30, 371-378.
16. C. Charitidis. Nanoscale Deformation and Nanomechanical Properties of Polydimethylsiloxane (PDMS). (2011) *Ind. Eng. Chem. Res.*, 50, 565-570.
17. C. Charitidis. Nanoscale Deformation and Nanomechanical Properties of Soft Matter Study Cases: Polydimethylsiloxane, Cells and Tissues. (2011) *ISRN Nanotechnology*, 2011, 1-13.
18. S. Gupta, F. Carrillo, C. Li et al. Adhesive Forces Significantly Affect Elastic Modulus Determination of Soft Polymeric Materials in Nanoindentation. (2007) *Materials Letters*, 61, 448 - 451.
19. F. Carrillo, M. Balooch, S. Marshall. Nanoindentation of Polydimethylsiloxane Elastomers: Effect of Crosslinking, Work of Adhesion, and Fluid Environment on Elastic Modulus. (2005) *J. Mater. Res.*, 20, 2820-2830.
20. H. Chen, M. Brook, H. Sheardown. Silicone Elastomers for Reduced Protein Adsorption. (2004) *Biomaterials*, 25, 2273-2282.

21. H. Chen, M. Brook, Y. Chen, H. Sheardown. Surface Properties of PEO-silicone Composites: Reducing Protein Adsorption. (2005) *J Biomater Sci Polym Ed.*, 16, 531-548.
22. T. Aimiya, H. Hoshino. Fluorescent Substance-Containing Silica Nanoparticles with Coating Having High Bulk Refractive Index. US 8513031 B2/ 25.12.2009.
23. J. Waite. Adhesion à la Moule. (2002) *Integr. Comp. Biol.*, 42, 1172-1180.
24. S. Thompson. Cell Biology of Settlement and Adhesion Processes of Biofouling Algae. (2007) PhD Thesis, The University of Birmingham.
25. Bioclean ECO, Environmentally - Friendly Biocide - Free Silicone Foul Release Coating System. Chugoku Marine Paints.
http://www.cmp.co.jp/library/global/pdf/brochure/bioclean_eco_en.pdf
26. X. Thomas. Silicone Adhesives in Healthcare Applications. (2003) Dow Corning Corporation.
27. R. Murthy, C. Cox, M. Hahn, M. Grunlan. Protein-Resistant Silicones: Incorporation of Poly(ethylene oxide) via Siloxane Tethers. (2007) *Biomacromolecules*, 8, 3244–3252.
28. R. Murthy, C. Shell, M. Grunlan. The Influence of Poly(ethylene oxide) Grafting via Siloxane Tethers on Protein Adsorption. (2009) *Biomaterials*, 30, 2433-2439.
29. R. Murthy, B. Bailey, C. Valentin-Rodriguez, A. Ivanisevic, M. Grunlan. Amphiphilic Silicones Prepared with Branched PEO-silanes with Siloxane Tethers. (2010) *Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 48, 4108-4119.
30. M. Hawkins, M. Grunlan. Protein Resistance of Silicones Prepared with a PEO-silane Amphiphile. (2012) *J. Mater. Chem.*, 22, 19540-19546.
31. M. Hawkins, M. Rufin, J. Raymond, M. Grunlan. Direct Observation of the Nanocomplex Reorganization of Antifouling Silicones Containing a Highly Mobile PEO-silane Amphiphile. (2014) *J. Mater. Chem. Part B*, 2, 5689-5697.
32. M. Hawkins, F. Faÿ, K. Réhel, I. Linossier, M. Grunlan. Bacteria and Diatom Resistance of Silicones Modified with PEO-silane Amphiphiles. (2014) *Biofouling*, 30, 247-258.
33. M. Rufin, J. Gruetzner, M. Hurley et al. Enhancing the Protein Resistance of Silicone via Surface-Restructuring PEO-silane Amphiphiles with Variable PEO Length. (2015) *J. Mater. Chem. B.*, 3, 2816-2825.
34. M. Rufin, M. Barry, P. Adair, M. Hawkins et al. Protein Resistance Efficacy of PEO-silane Amphiphiles: Dependence on PEO-segment Length and Concentration in Silicone. (2016) *Acta Biomaterialia*, 41, 247-252.
35. N. Boks, W. Norde, H. van der Mei, H. Busscher. Forces Involved in Bacterial Adhesion to Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces. (2008) *Microbiology*, 154, 3122-3133.
36. D. Cunliffe, C. Smart, C. Alexander, E. Vulfson. Bacterial Adhesion at Synthetic Surfaces. (1999) *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4995-5002.
37. D. Molina-Manso, E. Gómez-Barrena, J. Esteban et al. Bacterial Adherence on UHMWPE Doped with Vitamin E: an in vitro study. (2010) *J. of Physics: Conference Series*, 252, 012-014.
38. G. Banche, V. Allizond, P. Bracco et al. Interplay Between Surface Properties of Standard, Vitamin E Blended and Oxidised Ultrahigh Molecular Weight Polyethylene Used in Total Joint Replacement and Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. (2014) *Bone Joint J.*, 96, 497-501.
39. J. Banche, P. Bracco, A. Bistolfi et al. Vitamin E Blended UHMWPE May Have the Potential to Reduce Bacterial Adhesive Ability. (2011) *J Orthop Res.*, 29, 1662-1672.
40. D. Campoccia, L. Visai, F. Renò et al. Bacterial Adhesion to Poly-(D,L)lactic Acid Blended with Vitamin E: Toward Gentle Anti-Infective Biomaterials. (2015) *J Biomed Mater Res A.*, 103, 1447-1458.
41. D. Al-Salih, M. Jehad, F. Aziz, B. Mshimesh. Antibacterial Effects of Vitamin E: in Vitro Study. (2013) *J of Biotech. Reserch Center*, 7, 17-23.