

University of Groningen

Visco-elastic properties of biofilms

Peterson, Brandon Wade

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2013

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Peterson, B. W. (2013). *Visco-elastic properties of biofilms*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

SAMENVATTING

Bacteriën vallen in de groep van meest hardnekkige organismen op onze planeet, waarbij met name het vermogen van bacteriën om biofilms te vormen van belang is. Volgens huidige schattingen wordt 80% van alle bacteriële infecties, die door artsen behandeld worden, veroorzaakt door biofilms. Het is hoognodig een methode te vinden waarmee de groei en eigenschappen van biofilms voorkomen, c.q. beïnvloed, kunnen worden. Tot nu toe heeft onderzoek zich vooral gericht op het voorkomen van de hechting van bacteriën door het gebruik van oppervlakte coatings, die als antagonist werken op het bacteriële celoppervlak en het ontwikkelen van antimicrobiële oppervlakken die reeds gehechte bacteriën doden. **Hoofdstuk 1** beschrijft een aantal eigenschappen die kenmerkend zijn voor biofilms en biofilm organismen onderscheiden van planktonische bacteriën. Het doel van dit proefschrift is om een beter begrip te krijgen van de visco-elastische eigenschappen van volgroeide biofilms.

Om biofilms te kunnen voorkomen is het belangrijk de eigenschappen van de initieel hechtende bacteriën te begrijpen, aangezien deze bacteriën uitgroeien tot de latere biofilm. Vandaar dat de eerste experimentele studie gericht is op schade veroorzaakt door het centrifugeren van bacteriën, waarvan bekend is dat deze leidt tot veranderingen van het celoppervlak en interne structuren, waaronder DNA. In **Hoofdstuk 2** presenteren we een simpele, veelzijdige analyse methode om samendrukken van bacteriën tijdens centrifugeren te beschrijven, dit op basis van een, door ons opgestelde, centrifugatie coëfficiënt, C . Waarden van C werden gerelateerd aan verschillende celoppervlak eigenschappen. Verandering in de geometrie van de centrifuge container of

centrifuge snelheid hadden een significant effect op de waarde van C . Het aantal *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 bacteriën dat hechtte aan een glazen oppervlak daalde exponentieel van 4217 naar $1478 \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ met een toenemende waarde van C , terwijl het percentage stafylokokken met een zetapotential van rond de -15 mV , daalde van 97% naar 58%. Deze oppervlakte gevoelige parameters zijn vervolgens onafhankelijk van elkaar gebruikt om een kritische centrifugatie coëfficiënt (0.040) te bepalen. Een hogere centrifugatie coëfficiënt heeft een belangrijke invloed op de uitkomst van oppervlakte gevoelige experimenten, als gevolg van schade aan het celoppervlak. Het binnen nauwkeurige limieten houden van de centrifugatie coëfficiënt zorgde er bijvoorbeeld voor dat gedurende een reeks hechtingsproeven met stafylokokken, de standaard deviaties 43% lager waren dan bij dezelfde experimenten met vaste centrifuge snelheden.

De volgende stap was om te onderzoeken of de manier waarop de bacteriën geogst werden, samen met de verschillende groeiparameters, de eigenschappen van de uiteindelijke biofilm beïnvloeden (**Hoofdstuk 3**). Daarom werd onderzocht of centrifugeren van bacteriën en aanpassen van omgevingsfactoren tijdens groei, invloed hadden op de visco-elastische eigenschappen van orale biofilms. Biofilms werden gegroeid vanuit de initieel op het oppervlak gehechte streptokokken, actinomyces of een combinatie van beide. Verschillende uni-axiale deformaties werden op de biofilm uitgeoefend, waarna vervolgens de stress-relaxatie werd gemeten. Lineaire regressie analyse toonde aan, dat zowel de centrifugatie coëfficiënt van streptokokken als de veroorzaakte deformatie de mate van stress-relaxatie beïnvloedden. Samendrukken van

bacteriën als gevolg van centrifugeren had alleen een significante invloed na compressie van de buitenste 20% van de biofilm ($p < 0.05$), terwijl biofilm samenstelling belangrijk werd bij 50% compressie, als gevolg van de herverdeling van bacteriën in diepere lagen van de biofilm. Samenvattend, werken de effecten van het centrifugeren op de bacteriën die de basis van de biofilm vormen, door op de visco-elastische eigenschappen van de volledige biofilm. Dit geeft aan, dat de initieel hechtende bacteriën de structuur van de gehele biofilm beïnvloeden.

Biofilms zijn vaak minder gevoelig voor antimicrobiële stoffen door een combinatie van factoren die inherent zijn aan de manier waarop biofilms groeien en de slechte penetratie van antimicrobiële stoffen naar de diepere lagen van biofilms. Het huidige begrip van beperkte antimicrobiële stoffen penetratie in biofilms is voornamelijk gebaseerd op kwalitatieve beschrijvingen van biofilms. In **Hoofdstuk 4** poneren we de hypothese dat stress-relaxatie van biofilms samenhangt met de penetratie van antimicrobiële stoffen. Stress-relaxatie analyse van enkel-soortige, *in vitro* gegroeide orale biofilms toonde een snelle, middel-langzame en langzame reactie op de geïnduceerde vervorming, overeenkomend met respectievelijk, de uitstroom van water, extracellulaire polymere substanties (EPS) en herverdeling van bacteriën. De penetratie van chloorhexidine in deze biofilms nam toe met toenemende waarde van het langzame en afnemende waarde van het snelle element. De betrokkenheid van het langzame relaxatie element suggereerde dat biofilm structuren waarin na deformatie uitgebreide herverdeling van bacteriën kan plaatsvinden meer open zijn, waardoor de penetratie van antimicrobiële stoffen beter wordt. De betrokkenheid van het snelle

relaxatie element suggereerde vervolgens dat in de diepere lagen van de biofilm, waar de concentratie van antimicrobiële stoffen verlaagt tot ineffectieve waarden. *Ex situ* penetratie van chloorhexidine in twee weken oude, *in vivo* gegroeide biofilms toonde een zelfde afhankelijkheid van de snelle en langzame relaxatie elementen als *in vitro* gegroeide biofilms. Deze studie heeft aangetoond dat visco-elastische eigenschappen van biofilms een kwantitatieve verklaring kunnen geven voor de penetratie van antimicrobiële middelen.

Stress-relaxatie wordt veelvuldig wiskundig gemodelleerd in de literatuur, maar vervolgens nooit teruggekoppeld aan onderliggende fysische processen. In Hoofdstuk 4 suggereerden we dat de snelheid van stress-relaxatie van verschillende componenten in een biofilm verschilt. In **Hoofdstuk 5** hebben we bepaald dat EPS inderdaad snellere relaxatie vertoonde dan bacteriën zelf, na 20% deformatie van *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Met behulp van confocale laser scanning microscopie hebben we de beweging van EPS en bacteriën, die samen stress-relaxatie mogelijk maken, gevisualiseerd. De snelheid waarmee EPS bewoog kwam overeen met de relaxatietijd-constanten in de Maxwell modellen van stress-relaxatie, zoals die gebruikt zijn in Hoofdstuk 4.

Vervolgens hebben we gekeken naar de kenmerkende tijdsintervallen van verschillende Maxwell elementen die de stress-relaxatie in specifieke biofilms beschrijven. In **Hoofdstuk 6** hebben we de rol van verschillende matrix componenten op de visco-elastische reactie van biofilms vastgesteld. Biofilms van stafylokokken, streptokokken en pseudomonas werden gegroeid

onder verschillende omstandigheden, waardoor er biofilms ontstonden met verschillende matrix samenstellingen. Biofilms werden daarna blootgesteld aan mechanische deformatie en de stress-relaxatie werd in de tijd gevolgd. Een Maxwell model werd gebruikt als fit voor de data. Maxwell elementen werden gedefinieerd door een relaxatietijd-constante en hun relatieve zwaarte. Relaxatietijd-constanten toonden een hoge mate van variatie over de 104 geteste biofilms en werden opgedeeld in zeven tijdsintervallen. Een “*principal component*” analyse werd uitgevoerd om de tijdsintervallen te koppelen aan matrix samenstelling. De snelste relaxatie component (< 3 s) was een gevolg van de aanwezigheid van water, gecombineerd met de afwezigheid van bacteriën, c.q. de grootste massa's in een biofilm. Een tweede component (3–70 s) was gerelateerd aan EPS, met een onderscheidende rol voor eDNA, welke een unieke hoofdcomponent representeerde met een tijdsinterval (10–25 s) binnen die van de EPS. Dit impliceerde dat eDNA de interactie met andere matrix componenten reguleerde om zijn bijdrage aan visco-elastische relaxatie door mechanische stress te controleren.

In dit proefschrift hebben we een kwantitatieve relatie tussen stress-relaxatie tijdsintervallen en zowel biofilm structuur als penetratie van antimicrobiële middelen aangetoond. In **Hoofdstuk 7** werd een overzicht gegeven van de vorderingen die gemaakt zijn betreffende het kwalitatieve begrip van de ongevoeligheid van biofilms ten opzichte van de penetratie van antimicrobiële stoffen, dankzij de verbeteringen in microscopische technieken sinds de ontdekking van de microscoop in 17^e eeuw door Antonie van Leeuwenhoek. De beperkingen die microscopische technieken met

zich meebrengen creëren de behoefte aan een fysische eigenschap, die gerelateerd kan worden aan biofilm structuren. Wij hebben gesteld dat visco-elastische relaxatie onder externe stress gerelateerd is aan de penetratie van antimicrobiële stoffen, onafhankelijk van de groei condities, enkel- of meer-soortige biofilm, of de antimicrobieel stof. Dankzij het werk beschreven in dit proefschrift is visco-elastische relaxatie de eerste fysische eigenschap die de penetratie van antimicrobiële stoffen adequaat beschrijft. Daarnaast konden belangrijke componenten van de biofilm matrix bepaald worden met behulp van kwantitatieve beoordeling van visco-elastische relaxatie. Ten slotte werden de mogelijkheden voor het gebruik van bio-akoestiek bij de behandeling van klinische biofilms besproken, waarbij onze kwantitatieve resultaten werden gekoppeld aan de huidige opvatting dat geluidsgolven de efficiëntie van antimicrobiële stoffen kunnen vergroten.

Samenvattend, is in dit proefschrift aangetoond dat er een verband is tussen de eigenschappen van de initieel hechtende bacteriën in een biofilm en de uiteindelijke eigenschappen van de biofilm. Stress-relaxatie van biofilms kon beschreven worden met drie Maxwell elementen en relateerde met de structuur en penetratie van antimicrobiële stoffen. eDNA had een onderscheidende rol in biofilm stress-relaxatie, waardoor het een primair doel is voor toekomstig onderzoek naar bio-akoestische behandelingen. Voorts werden de tijdsintervallen gebruikt om een onderscheid te maken tussen Maxwell elementen en hun associatie met biofilm structuur en penetratie van antimicrobiële middelen. Deze tijdsintervallen zouden kunnen worden omgezet naar frequenties waardoor bio-akoetische behandeling een bruikbaar instrument wordt om de structuur van

biofilms te veranderen. Een potentieel succesvolle behandeling van biofilms zou het gebruik van antimicrobiële stoffen combineren met een frequentie die de biofilm laat resoneren en toegankelijker maakt voor antimicrobiële stoffen, terwijl het omliggende weefsel onaangetast blijft.