

University of Groningen

## Bacterial interactions with nanostructured surfaces

Hizal, Ferdi

**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:*

2017

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

*Citation for published version (APA):*

Hizal, F. (2017). *Bacterial interactions with nanostructured surfaces*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. Rijksuniversiteit Groningen.

### 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

De vorming van biofilm op materiaaloppervlakken door de aanhechting van bacteriën is zowel in medisch, industrieel en milieu en daarmee, in economisch opzicht een belangrijk probleem. In de zeevaart leidt begroeiing met bacteriën op scheepsrompen tot een aanzienlijke toename in weerstand en daaraan gerelateerd brandstofgebruik. Op vergelijkbare wijze wordt grote economische schade veroorzaakt door de hechting van organismen aan koelsystemen van energiecentrales, aquacultuursystemen, visnetten, pijpleidingen, onderwaterstructuren en oceanografische meetinstrumenten. In de voedselindustrie zijn staal, aluminium en titanium veelgebruikte metalen die kunnen worden beschadigd door hechting en kolonisatie van bacteriën. Metaaloppervlakken kunnen onderhevig zijn aan microbiële corrosie, veroorzaakt door de vorming van biofilm door sulfide producerende bacteriën. Microbiële aanhechting en groei in het menselijk lichaam leiden bovendien tot ernstige gezondheidsrisico's door het veroorzaken van moeilijk behandelbare infecties, voornamelijk op gecontamineerde oppervlakken van implantaten.

Het gebruik van mechanische of chemische oppervlakte modificaties op bestaande materialen om de materialen bacterieafstotend of dodend te maken staat nog in zijn kinderschoenen. Biomateriaal eigenschappen, zoals ruwheid of hydrofobiciteit, worden vaak gemodificeerd om materialen voor klinische toepassingen beter toepasbaar te maken maar vooralsnog zonder al teveel succes. Nanostructuren van materialen is een nieuwe categorie van oppervlakte modificaties maar mogelijkheden als infectiebestendige implantaatoppervlakken, of anti-adhesieve oppervlakken in het algemeen, zijn nog niet grondig verkend.

**Hoofdstuk 2** beschrijft de fabricatie van aluminium oppervlakken met een nanoporeuze structuur en nanopilaar-structuur, met verminderde bacteriële hechting als doel. Deze nanostructuren werden vervaardigd door anodisering en naderhand etsen, in hydrofiele (met eigen oxidelaag) en hydrofobe vorm (voorzien van teflon coating). De hechting van *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 (Gram-positief, bolvormig) en *Escherichia coli* K-12 (Gram-negatief, staafvormig) aan deze oppervlakken werd gemeten in af- en aanwezigheid van vloeistofstroming (*shear rate*:  $37 \text{ s}^{-1}$ ). Vergeleken met gladde elektrochemisch gepolijste oppervlakken, werd op de nanogestructureerde materialen een significant lager aantal kolonievormende eenheden (*colony forming units*, CFUs) waargenomen na uitplaten op agarplaten. Voor de hydrofiele oppervlakken werd deze afname toegeschreven aan een kleiner contactoppervlak, waardoor de hechtingskracht van bacteriën aan nanoporeuze en nanopilaar-gestructureerde oppervlakken werd verlaagd tot respectievelijk 4 nN en 2 nN, vergeleken met 8 nN op gladde oppervlakken. Afname in het aantal aanhechtende CFUs was groter op hydrofobe oppervlakken in een stromende vloeistof, tot meer dan 99.9% en 99.4% voor respectievelijk *S. aureus* en *E. coli* op nanopilaar-gestructureerde oppervlakken. Scanning elektronenmicroscopie wees uit dat bacteriële aanhechting op deze oppervlakken hoofdzakelijk plaatsvond op imperfecte of beschadigde gebieden, terwijl intacte gebieden met de originele nanopilaar-morfologie nagenoeg bacterievrij waren. De grotere afname van

bacteriële hechting aan hydrofobe nanopilaar-gestructureerde oppervlakken vergeleken met hydrofiële en nanoporeuze oppervlakken wordt toegeschreven aan de mate waarin lucht in de drie dimensionale pilaar structuur wordt ingesloten, hetgeen leidt tot superhydrofobe en zeer gladde oppervlakken, naast een minimaal contactoppervlak voor bacteriën om aan te hechten.

Overdracht van bacteriën van een donoroppervlak naar een ontvangend oppervlak is een onderschatte vorm van transport die aan de vorming van biofilm in veel industriële en biomedische toepassingen voorafgaat. Vaak wordt aangenomen dat bacteriën via lucht of waterige suspensies worden aangevoerd, terwijl in werkelijkheid bacteriële transmissie tussen oppervlakken plaatsvindt. Het mechanisme van transmissie bestaat uit het loslaten van gehechte bacteriën van het donoroppervlak en hechting aan het ontvangende oppervlak, en wordt bepaald door de verhouding van de hechtingskrachten uitgeoefend door beide oppervlakken. In **Hoofdstuk 3** worden voor stafylokokken de hechting aan, loslating van en transmissie tussen gladde en nanopilaar-gestructureerde Si oppervlakken gerelateerd aan de hechtingskrachten. Nanopilaar-gestructureerde Si oppervlakken werden vervaardigd met onderlinge pilaarafstanden van 200, 400 en 800 nm. Op gladde oppervlakken werden door middel van atomaire kracht microscopie (*atomic force microscopy*, AFM) met een bacteriële tip, hechtingskrachten voor stafylokokken gemeten van 4.4-6.8 nN en 1.8-2.1 nN (afhankelijk van de AFM-drukbelasting), respectievelijk voor slijm (*extracellular polymeric substances*, EPS) producerende (*S. aureus* ATCC 12600) en niet-EPS producerende (*S. epidermidis* ATCC 12228) stammen. Hechting van de EPS producerende stam vond derhalve in grotere aantallen plaats dan de niet-EPS producerende stam. Relatieve hechtingskrachten op de nanopilaar-Si oppervlaktestructuren ten opzichte van een glad oppervlak varieerden van 0.30-0.95, afhankelijk van de AFM-drukbelasting, bacteriestam en afstand tussen de nanopilaren. Voor elke stam was het aantal gehechte bacteriën echter vergelijkbaar voor alle nanopilaar-gestructureerde oppervlakken. Loslating van gehechte stafylokokken werd significant kleiner bij toenemende hechtingskrachten, terwijl transmissie van stafylokokken naar een ontvangend oppervlak ook verminderde bij grotere hechtingskrachten, uitgeoefend door het donoroppervlak. De EPS producerende stam werd bij transmissie naar nanopilaar-gestructureerde oppervlakken in grote mate gedood en gestimuleerd tot EPS productie, vermoedelijk door hoge lokale belasting van de celwand. Hiermee moet rekening worden gehouden bij toepassingen van nanogestructureerde oppervlakken: hoewel doding van bacteriën gunstig kan zijn, leidt EPS productie mogelijk tot verminderde werking van antimicrobiële agentia.

Bacteriële transmissie vanuit een biofilm naar een oppervlak is een wezenlijk ander proces dat het groeien van biofilm. Transmissie bestaat immers uit compressie van twee oppervlakken inclusief de biofilm, gevolgd door een trekkracht die ertoe leidt dat bacteriën loslaten van de biofilm of de donor en vervolgens hechten aan de ontvanger. Zodoende is transmissie afhankelijk van een gevoelige balans tussen de eigenschappen van de donor, biofilm en de ontvanger. In **Hoofdstuk 4** vergelijken we de bacteriële transmissie van biofilms

van een EPS producerende en niet-EPS producerende stam tussen een glad Si donoroppervlak en een nanopilaar-gestructureerd ontvangend oppervlak met onderlinge pilaarafstanden van 200, 400 en 800 nm. Na transmissie werd biofilm aangetroffen op de oppervlakken van zowel donor als ontvanger, wat suggereert dat transmissie voor beide stammen plaatsvond door het loslaten van de hele biofilm van het gladde Si oppervlak (*adhesive or interfacial failure*) en dat de biofilm doormidden breekt en zich verdeelt over donor en ontvanger (*cohesive failure*).

Bacteriën groeiend in een biofilm zijn relatief ongevoelig voor bestrijding met antibiotica, mede als gevolg van toenemende antibioticaresistentie bij veel bacteriestammen. Gentamicine is een veelgebruikt antibioticum voor lokale toepassing, vaak toegediend in poreuze botcementkralen of biologisch afbreekbare coatings. In het algemeen komt gentamicine uit dergelijke coatings direct in grote hoeveelheden vrij, wat leidt tot een initiële piekconcentratie gevolgd door geleidelijke afgifte van lagere hoeveelheden, die jaren kan voortduren. Het probleem is niet een tekort aan medicijnen, maar wel dat hun effectiviteit bij elk gebruik langzaam afneemt. Het is daarom belangrijk de doeltreffendheid van antibiotica te verbeteren. In **Hoofdstuk 5** tonen we aan dat nanogestructureerde titanium oppervlakken synergetisch werken met een daarop aangebrachte antibacteriële gelaagde film (*layer-by-layer*, LbL): de nanostructuren zorgen met lokale, bacterie-getriggerde afgifte van antibiotica voor een aanzienlijke verbetering van de antibacteriële werking van oppervlakken. Hoewel het vervaardigen van de nanostructuur op het titaniumoppervlak alleen de hechting en groei van *S. aureus* niet significant beïnvloedde, resulteerde de combinatie met een dunne looizuur/gentamicine LbL-film in een tienvoudige reductie van het aantal gehechte bacteriën aan het oppervlak. Dit effect wordt toegeschreven aan het vergrote oppervlak van de nanogestructureerde coating dat in staat is tot lokale, bacterie-getriggerde afgifte van antibiotica en de lagere bacteriële hechtingskrachten, waardoor verdedigingsmechanismen tegen antibiotica inactief blijven. Deze uitkomst laat zien dat een combinatie van 3D nanogestructureerde oppervlakken met coatings die door een bacteriële trigger antibiotica afgeven een unieke manier bieden om de antibacteriële eigenschappen van biomedische implantaten drastisch te verbeteren.

In de algemene discussie (**Hoofdstuk 6**) worden ten eerste de twee belangrijkste uitkomsten van dit proefschrift benadrukt:

- 1- Een methode voor grootschalige productie van micro-nanoschaal oppervlaktestructuren, met invloed op bacteriële hechting, loslating en transmissie.

- 2- Een nieuw fenomeen, genaamd "druk geactiveerde EPS-productie", en daarmee geassocieerde celdood, waarmee rekening gehouden dient te worden bij toekomstige studies naar ontwerpen voor nanogestructureerde oppervlakken voor de reductie van biofilmvorming.

Er wordt gesteld dat de term "nanogestructureerd oppervlak" een veelheid van verschillend gestructureerde oppervlakken omvat die vaak onvoldoende gedefinieerd zijn en dat het werkelijk "controleren" van bacteriële hechting op nanogestructureerde oppervlakken nog nooit zorgvuldig is onderzocht in relatie met de verschillende typen van

nanostucturering. Experimentele fouten in behandeling van de oppervlakken na aanhechting van bacteriën (bijvoorbeeld een lucht/water *interface* voorafgaand aan het kwantificeren) kunnen leiden tot grote krachten, die ervoor zorgen dat bacteriën loslaten, met “een verminderd aantal gehechte bacteriën” als onvermijdelijk resultaat, zowel op gladde als op nanogestructureerde oppervlakken. Vaak zijn zorgvuldiger ontworpen experimenten nodig om conclusies te onderbouwen. Ook wordt in de algemene discussie een toekomstbeeld geschetst voor de preventie van biomateriaal-gerelateerde biofilms door middel van nanogestructureerde oppervlakken, gebaseerd op de experimenten beschreven in dit proefschrift.