

## University of Groningen

### EPS and water in biofilms

Hou, Jiapeng

**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:*

2018

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

*Citation for published version (APA):*

Hou, J. (2018). *EPS and water in biofilms*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of 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**

Voor de meeste bacteriën is planktonisch leven gevaarlijk en daarom wordt bacteriële hechting aan een oppervlak beschouwd als een overlevingsmechanisme. Eenmaal gehecht, komt er een opeenvolging van gebeurtenissen op gang, zoals de productie van extracellulaire polymere substanties (EPS). Dit leidt tot de formatie van wat een "biofilm" genoemd wordt. Biofilms kunnen op bijna alle oppervlakken groeien waardoor ze verscheidene klinische-, industriële- en milieuproblemen kunnen veroorzaken. Het volledig doden en verwijderen van biofilms is vaak moeilijk doordat de bacteriën zich bevinden in hun EPS matrix. Tegen deze beschermende groeiwijze bestaan geen effectieve behandelingen. Daarom is dit proefschrift gericht op het bestuderen van de fundamentele mechanismen van biofilmresistentie tegen fysieke stress en de rol van EPS en water daarin. Hiertoe werden zowel microscopische als spectroscopische methoden toegepast op biofilms van verschillende bacteriestammen om de verdeling, structuur en functie van EPS en water in biofilms onder verschillende omgevingsstressomstandigheden te bestuderen.

In **HOOFDSTUK ÉÉN** vragen we ons af hoe bacteriën zich bewust worden van hun aanhechtingstoestand. Wij veronderstellen dat bacteriën vervormen onder invloed van de adhesiekrachten die op ze uitgeoefend worden tijdens het aanhechten op een substraat. Het bestaan van tijdens adhesie optredende kleine deformaties van de celwand is overtuigend gedemonstreerd met oppervlakte versterkende fluorescentie. Deze kleine deformaties zouden voor een aanhechtende bacterie als trigger voor de productie van EPS kunnen optreden. Voor stafylokokken blijkt dat de productie van EPS gerelateerd is met de sterkte van de door de bacterie gevoelde adhesiekrachten. Het belang van de EPS is alom aanwezig tijdens het gehele proces van biofilmontwikkeling, van het vergemakkelijken van initiële adhesie tot het behoud van structurele integriteit tijdens groei. De biofilm wordt gedurende de gehele levenscyclus door het EPS beschermd tegen antimicrobiële behandeling en mechanische stress. De visco-elastische respons van biofilms op externe mechanische stress kan worden gemodelleerd met behulp van drie Maxwell-elementen die de stroming van water, meer viskeus EPS en bacteriële herpositionering in een vervormde biofilm representeren. Bacteriële herpositionering heeft invloed op de penetratie van antibiotica en onthechting, en gebeurt veelvuldiger in biofilms met een open structuur dan in 'dichtere' biofilms. De belangrijkste voordelen van stress-relaxatie als een methode om de biofilmstructuur en -samenstelling te bepalen ten opzichte van microscopische technieken, zijn dat het kwantitatieve gegevens oplevert over een gebied van meerdere vierkante millimeters. Samenvattend geeft dit hoofdstuk het belang aan om de rol van water en EPS in biofilms beter te bestuderen, hetgeen daarmee tevens het doel is van dit proefschrift.

Om de rol van water in biofilms beter te kunnen begrijpen, moest eerst water op een oppervlak onder fysieke stress bestudeerd worden. Hiervoor gebruikten we de tribochemist, een apparaat bestaande uit een tribometer en een FTIR-spectrometer om de relatie tussen stress (in dit geval mechanisch wrijving) en karakteristieke absorptie van IR van water op een oppervlak te meten (**HOOFDSTUK TWEE**). Water absorptiespectra werden onder mechanische schuifspanning bestudeerd op germanium (Ge) en silicium (Si) kristallen. Oppervlak-thermodynamische analyses suggereerden dat watermoleculen met hun waterstofgroepen aan beide oppervlakken hechten. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) liet zien dat Ge-oppervlakken, die minimale wrijving geven, een mengsel van -O en =O functionaliteiten bezitten, terwijl Si-kristal- en kwartsoppervlakken alleen -O functionaliteiten bezitten. Vergelijking van infrarood-absorptiebanden van de kristallen in

water wees op minder gebonden waterlagen op hydrofiele Ge- dan op hydrofobe Si-kristaloppervlakken, terwijl absorptiebanden voor vrij water op het Ge-kristaloppervlak een veel meer uitgesproken aanwezigheid van gestructureerde, vrije waterclusters aantoonde dan op de Si-kristaloppervlakken. Daarom concludeerden we dat de aanwezigheid van gestructureerde, vrije waterclusters essentieel is voor lubricatie op basis van water. De prevalentie van gestructureerde waterclusters kan worden gereguleerd door de verhouding tussen elektrondonerende en elektronaccepterende groepen en tussen -O en =O functionaliteiten op het oppervlak aan te passen.

In **HOOFDSTUK DRIE** vergeleken we vervolgens de respons van biofilms van een EPS-producerende (ATCC 12600) en niet-EPS producerende (5298) *Staphylococcus aureus* stam onder mechanische stress (in dit geval vloeistofstroming en mechanische schuifspanning). Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) bevestigde de afwezigheid van EPS in biofilms van *S. aureus* 5298. ATR-FTIR-spectroscopie in combinatie met tribometrie toonde aan dat de polysaccharideproductie per bacterie, in de initiële fase, hoger was tijdens groei bij hoge dan bij lage vloeistofstroming en dat deze verhoogde EPS-productie zichtbaar was in de hele biofilm. De wrijvingscoëfficiënten van biofilms die gegroeid waren onder hoge vloeistofstroom, waren hoger dan wanneer ze gegroeid waren onder lage vloeistofstroom, waarschijnlijk als gevolg van het wegwassen van polysacchariden. Het meten van de wrijvingscoëfficiënt van een biofilm impliceert dat het toepassen van een mechanische druk een onmiddellijke toename in de polysaccharideband van *S. aureus* ATCC 12600 biofilms in het FTIR spectrum opleverde, ten gevolge van samendrukking. Deze toename verdween geleidelijk, nadat de mechanische druk was weggenomen. Voor biofilms gegroeid onder hoge vloeistofstroom viel dit samen met een hogere %witheid in Optical Coherence Tomography (OCT)-afbeeldingen, indicatief voor het uitstromen van water dat tijdens stress-relaxatie terugvloeit in de biofilm. Biofilms gegroeid onder lage vloeistofstroom werden tijdens tribometrie echter gestimuleerd om EPS te produceren, ook na het wegnemen van mechanische druk.

De witheidsanalyse van OCT-afbeeldingen toegepast in **HOOFDSTUK DRIE** kan niet kwantitatief worden gerelateerd aan de gemeten componenten in een biofilm, zoals water en EPS vanwege de automatische schaal aanpassing toegepast in OCT-apparatuur om een optimale kwaliteit van afzonderlijke afbeeldingen te garanderen. In **HOOFDSTUK VIER** hebben we een methode ontwikkeld om de invloed van automatische schaal aanpassing te elimineren om kwantitatieve vergelijking van biofilms in verschillende afbeeldingen mogelijk te maken. Automatisch geschaalde en herschaalde witheidsintensiteiten konden kwalitatief worden geïnterpreteerd in lijn met de verwachte biofilmeigenschappen uit de literatuur voor de verschillende biofilms, hetgeen een validatie van auto- en herschalinganalyses is. Echter, specifieke kenmerken van *Pseudomonas* en orale dual-species biofilms werden prominenter uitgedrukt na herschaling. Kwantitatieve validatie werd verkregen door het relateren van gemiddelde auto- en herschaalde witheidsintensiteiten van de biofilms met volumetrische bacterie dichtheden in deze biofilms. De bacteriedichtheden per volume eenheid waren onafhankelijk verkregen door het tellen van het aantal bacteriën per biofilm volume eenheid. In tegenstelling tot auto-geschaalde gemiddelde witheidsintensiteiten, namen de herschaalde intensiteiten van verschillende biofilms lineair toe met bacteriële dichtheden per volume eenheid. Zo werd de ontwikkelde schaal verder kwantitatief

gevalideerd. Hiermee wordt de voorgestelde witheidsverdelingen in OCT-afbeeldingen aanzienlijk verbeterd, wat de mogelijkheden van OCT biofilm-beeldvorming ten goede komt.

Water is essentieel voor biofilms, maar de rol ervan is onderschat. Daarom is de rol van water in **HOOFDSTUK VIJF** samengevat gebaseerd op de literatuur aangevuld met de bijdrage van dit proefschrift aan bestaande literatuur. Tussen 77-97 gewichtsprocent van een biofilm bestaat uit water in kanalen, poriën en bacteriële clusters. Desalniettemin is water in biofilms een weinig bestudeerd onderwerp en daarom richt deze review zich op hoe water in biofilms kan worden gedetecteerd, op de structurele kenmerken van biofilms waarin water wordt vastgehouden en op de functie van water in een biofilm. Drooggewichtsvergelijking met het gewicht van gehydrateerde biofilms, FTIR en Raman micro-spectroscopie zijn de enige technieken om water in biofilm structuren te identificeren en kwantificeren, terwijl NMR-, microscopische en andere beeldvormingstechnieken, òf geen directe kwantitatieve resultaten opleveren of gebaseerd zijn op de aanname dat kanalen en poriën inderdaad met water gevuld zijn. De definitie van "kanalen" en "poriën" in de literatuur is nogal zwak. De juiste definitie is deels afhankelijk van de grootte van het molecuul of deeltje dat getransporteerd moet worden en bepaalt of een kanaal zijn transportfunctie al dan niet kan uitvoeren. Deze review stelt een minimale kanaalbreedte van driemaal de Debye-Hückel-lengte voor om te voorkomen dat elektrostatistische interacties plaatsvinden tussen deeltjes of moleculen die getransporteerd worden met de kanaalwanden, en een kanaalbreedte-lengteverhouding die kleiner is dan 0,3 om de transportfunctie te rechtvaardigen. Anders dan kanalen, schrijft deze review een opslag- en bufferfunctie toe aan poriën waardoor antimicrobiële concentraties na penetratie in een biofilm verdund worden hetgeen bijdraagt aan een mogelijke bacteriële overleving.

## TOEKOMSTPERSPECTIEF

Biofilms zijn heterogeen en dat geldt ook voor de verdeling van water en EPS in een biofilm. Deze heterogene verdeling, en het in kaart brengen ervan, lijkt een waardevolle voortzetting van deze studie. Dit kan worden gedaan met Raman micro-spectroscopie, mogelijk in combinatie met een tribometer. Bovendien zal het een uitdaging zijn om een witheid-analysemethode te ontwikkelen op basis van 3D OCT-beelden om de verdeling van waterkanalen en poriën in een biofilm matrix te bestuderen, evenals hun structurele veranderingen onder fysieke stress. Aangezien waterkanalen ook het transport van antimicrobiële stoffen verzorgd, zal het ook interessant zijn om de relatie tussen lokale concentratie van deze antimicrobiële stoffen binnen biofilm matrices en de structurele reactie van de biofilm op die chemische stress te bestuderen.



