

Monitorering av biofilmbildning med kvartskristallmikrobalans (QCM) och ytplasmonresonans (SPR)

Ellinoora Holmström



Diplomarbete i kemi- och processteknik utförd under

handledning av Professor Jouko Peltonen och Emil Rosqvist

Inriktning fysikalisk kemi

Laboratoriet för molekylärvetenskap och -teknik

Fakulteten för naturvetenskaper och teknik

Åbo Akademi

Januari 2023

Abstrakt

Biofilmer som bildas av bakterier består av bakterier och en extracellulär matris som skyddar bakterier från yttre hot. Biofilmer är en hälsorisk eftersom de är mer resistenta mot antibiotika än planktoniska bakterier. Biofilmer orsakar också ofta kroniska inflammationer på grund av deras antibiotikaresistens. Sådana inflammationer kan observeras till exempel hos patienter med konstgjorda leder. Hos dessa patienter kan behandlingen av kronisk inflammation kräva flera veckors antibiotikainfusion innan en ny led installeras.

Nya karakteriseringsmetoder som kvartskristallmikrobalans (QCM) och ytplasmonresonans (SPR), som upptäcker massförändringen på en sensoryta, har börjat användas för att studera biofilmer och kan användas för att monitorera biofilmbildningen i realtid. I detta diplomarbete kommer biofilmbildningen av *Staphylococcus aureus* monitoreras med ovan nämnda metoder för att få en bättre förståelse för de olika stegen i biofilmbildningen och hur antibiotikan påverkar biofilmbildningen. Under forskningen upptäcktes att *S. aureus* kan bilda en biofilm på den guldbelagda sensorn. Vankomycin, som användes som antibiotika, kunde inte förhindra tillväxten av biofilmmassan, men genom SEM-avbildning kunde det upptäckas att vankomycin deformerade bakterierna i biofilmen.

Sökord: antibiotikaresistens, biofilm, kvartskristallmikrobalans, svepelektronmikroskop, *Staphylococcus aureus*, ytplasmonresonans, vankomycin

Förord

Syftet med detta diplomarbete är att samla in information om biofilmbildning, biofilmsammansättning och antibiotikaresistens. Därutöver är målet att monitorera biofilmbildningen med hjälp av QCM- och SPR-metoder och avbilda mogna biofilmer med SEM. Forskningen utförs vid laboratoriet för molekylär vetenskap och teknik och är en del av ABC-Health-projektet finansierat av Jane och Aatos Erkkos stiftelse. Jag vill tacka mina handledare, professor Jouko Peltonen och Emil Rosqvist, som föreslog detta ämne för min avhandling och som hjälpte mig under hela processen. Jag vill också tacka professor Tapani Viitala för att han undervisade mig i hur man använder QCM- och SPR-utrustningen och gav mig möjligheten att använda utrustningen på Biocity under bakteriemätningarna. Slutligen vill jag tacka doktorand Meixin Ran för all praktisk hjälp.

Åbo, januari 2023

Ellinoora Holmström

Förkortningar

AIP	autoinducerade peptider
agr	regulatorisk gen
AMP	antimikrobiella peptider
Bap	biofilm-associerat protein
COS	kitosanologosackarid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNase	deoxiribonukleas
eDNA	miljö-DNA
HA	humant albumin
ica-operon	intercellulär adsorption operon
LB	lysogenbuljong
MBC	bakteriedödande koncentration
MIC	minsta hämmande koncentration
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	fosfatbuffrad koksaltlösning
PIA	polysackarid intercellulär adhesin
PNAG	poly-N-acetylglukosamin
QS	quorum sensing
QCM	kvartskristallmikrobalans
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCV	små kolonivarianter
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SEM	svepelektronmikroskop
SPR	ytplasmonresonans
TSB	Tryptic Soy Broth
TTO	teträdolja
VISA	vankomycin-intermediär <i>Staphylococcus aureus</i>
VRSA	vancomycin-resistent <i>Staphylococcus aureus</i>

Innehållsförteckning	
1 Inledning	1
2 Allmänt om biofilmer	3
2.1 Introduktion till biofilmer	3
2.2 Quorum sensing-systemet	5
2.3 Biofilmer i implantat	6
3 Biofilmbildning	8
3.1 Adsorption av proteiner, bakterier och celler	8
3.2 Adsorption av biofilmen	9
3.3 Mognandet och lossningen	10
4 Antibiotika	12
4.1 Mekanismer för antibiotikaresistens	12
4.2 Mekanismer för att behandla eller förhindra biofilmrelaterade infektioner	14
5 Metoder och utrustning	19
5.1 Utrustning	19
5.1.1 Kvartskristallmikrobalans, QCM (quartz crystal microbalance)	19
5.1.2 Ytplasmonresonans, SPR (surface plasmon resonance)	22
5.1.3 Svepelektronmikroskopi, SEM (scanning electron microscopy)	23
5.2 Provberedning och analys	24
5.2.1 QCM-mätningarna med DMEM	25
5.2.2 SPR-mätningar med DMEM	26
5.2.3 QCM-mätningarna med <i>S. aureus</i>	26
5.2.4 SPR-mätningarna med <i>S. aureus</i>	29
5.2.5 SEM-avbildning efter mätningarna	30
6 Resultat och diskussion	31
6.1 Proteinadsorption	31
6.2 Biofilmbildning	36
6.2.1 QCM-mätningarna med <i>S. aureus</i>	36
6.2.2 SPR-mätningarna med <i>S. aureus</i>	40
6.2.3 SEM-avbildning efter mätningarna	44
6.3 Biofilmens viskoelastiska egenskaper	48
7 Sammanfattning	55
8 Källförteckning	56

1 Inledning

Biofilmer är filmer som består av bakterier och interbakteriella ämnen som kallas extracellulär matris, och som innehåller polysackarider, proteiner och eDNA (López et al. 2010). Syftet med detta arbete är att studera biofilmer som bildas av *Staphylococcus aureus* och antibiotikans inverkan på dessa biofilmer. Som ett antibiotikum användes vankomycin. Syftet är att med hjälp av QCM (kvartskristallmikrobalans), SPR (ytplasmonresonans) och SEM (svepelektronmikroskop) upptäcka hur biofilmen bildas på olika ytor (guldbelagd sensorn i QCM och SPR) och hur antibiotika påverkar biofilmbildningen och livskraften.

Allt fler bakterier har utvecklat resistens mot antibiotika och varje år dör cirka 33 000 människor i Europa och cirka 90 patienter i Finland till följd av antibiotikaresistenta infektioner (THL 2021). Antibiotikaresistenta bakteriestammar är inte bara ett mänskligt fenomen, utan resistenta bakterier förekommer även naturligt (Durso et al. 2012). I biofilmer finns en extracellulär matris som bland annat skyddar bakterier från antibiotika (Lewis 2008). När resistenta bakteriestammar blir alltmer vanliga kan människor avlida av vanliga sjukdomar, som exempelvis lunginflammation. Risken är ännu större vid olika typer av operationer, till exempel organtransplantationer, eftersom det alltid finns en risk för infektioner under operationen. (THL 2021)

S. aureus är en bakterie som kan finnas bland annat i människans näsa, hud, hår och slemhinnor (Gracel och Fetsch 2018). Bakterier kan bilda biofilmer på olika ytor, men de är särskilt skadliga på ytorna av medicinska utrustningar som implantat och katetrar, eftersom biofilmer orsakar kronisk inflammation som är resistent mot antibiotika (Hall-Stoodley et al. 2004; Donlan 2008; Hatt och Rather 2008). Biofilmernas struktur och funktionen hos deras komponenter är ännu inte helt kända och därför är det viktigt att studera dem för att förhindra att biofilmer som är skadliga för människor bildas (Vázquez-Sánchez och Rodríguez-López 2018). Biofilmbildningen involverar flera steg. Bakterierna adsorberas först på ytan med hjälp av olika ytproteiner. Bakterierna börjar sedan bilda en extracellulär matris. När den extracellulära matrisen har mognat, börjar bakterierna att lossna. (López et al. 2010; Moormeier och Bayles 2017; Vázquez-Sánchez och Rodríguez-López 2018)

Denna avhandling består av en teoretisk och empirisk del. Teoridelen beskriver biofilmernas funktion, formation och antibiotikaresistens samt adsorptionsteori och olika utrustningar som finns tillgängliga för biofilmanalys. Den empiriska delen beskriver hur QCM- och SPR-mätningarna genomfördes samt analyserar det samlade data och slutsatserna därtill.

2 Allmänt om biofilmer

2.1 Introduktion till biofilmer

Bakterier har förmågan att forma biofilmer genom att bilda en extracellulär matris mellan bakterierna. Den extracellulära matrisen består till största delen av polysackaridbiopolymerer, men innehåller också proteiner och DNA. Biofilmbildningen beror bland annat på typen av bakterier och bakteriernas miljöförhållande. Bakterier kan forma biofilmer på olika typer av ytor, och vanligtvis bildas biofilmer vid fast-vätskegränssnitt. (López et al. 2010) Bakterier bildar ofta biofilmer på ytorna av medicinsk utrustning, till exempel katetrar och implantat, vilket kan orsaka kroniska inflammationer som är svåra att bota (Hall-Stoodley et al. 2004; Donlan 2008; Hatt och Rather 2008). Biofilmbildningen gör bakterier resistenta mot antibiotika, och i biofilmer finns det mera persisterceller än normalt. Percisterceller är celler som är i viloläge och främjar biofilmens uthållighet. En extracellulär matris skyddar också bakterier genom att förhindra att små molekyler diffunderar genom den. (Lewis 2008)

Beroende på vilka typer av bakterier som finns i biofilmen fungerar biofilmen på olika sätt. Detta arbete kommer att fokusera på *Staphylococcus aureus*. Därför kommer detta arbete att behandla mer specifikt hur biofilmer som bildas av *S. aureus* fungerar. *S. aureus* är en grampositiv bakterie, och de flesta av dess bakteriestammar finns i människans näsa, men de kan även kolonisera hud, hår och slemhinnor (Gracel och Fetsch 2018). Tidigare forskning har visat att *S. aureus* kan bilda biofilmer på olika abiotiska och biotiska ytor som mänskliga vävnader, olika medicinska utrustningar och livsmedelsprodukter (Trampuz och Widmer 2006; Simon och Sanjeev 2007). Biofilmer är en risk för människans hälsa på grund av deras ökade resistens mot antibiotika, och därför är det viktigt att förstå de processer som är involverade i biofilmbildning så att man kan hitta en effektiv kontrollstrategi mot dem (Vázquez-Sánchez och Rodríguez-López 2018).

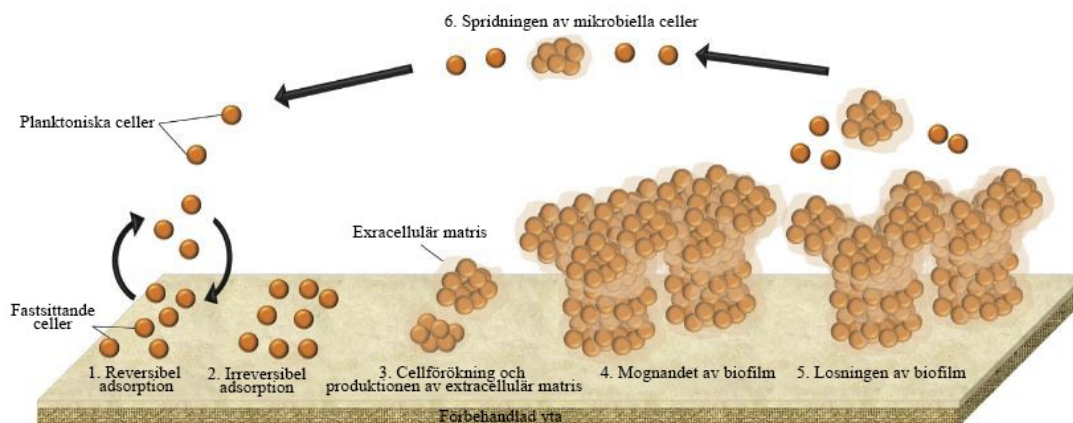
I majoriteten av *S. aureus*-stammarna bildas biofilmen av poly-N-acetylglukosamin (PNAG), även känt som PIA (polysackarid intercellulär adhesin). Så kallade ica-operoner (intercellular adsorption operons) styr bildningen av PNAG. (O'Gara 2007) Olika proteiner finns på bakterieytorna, till exempel Bap (biofilm-associerat protein), som är en viktig komponent i *S. aureus*-biofilmbildningen och tros påverka

intercellulära interaktioner. Bap-proteiner kan främja både primär adsorption till abiotiska ytor och intercellulär adsorption, vilket är viktigt vid biofilmbildning. (Cucarella et al. 2001) Biofilmer innehåller också eDNA, vars funktion bland annat är att hålla biofilmen stabil, och bildas troligen på grund av bakteriell nedbrytning, vilket leder till att DNA frigörs (Rice et al. 2007).

Det är inte helt förutsägbart vilken typ av biofilm olika bakteriearter bildar, eftersom biofilmbildningen också beror på bakteriestammen (López et al. 2010). En biofilm kan bestå av endast en bakterieart. I så fall skulle den innehålla endast en klonad population, men oftast bildas biofilmen av fenotypiskt skilda subpopulationer. Detta innebär att biofilmen ofta innehåller specialiserade celltyper på grund av skillnader i genuttryck men inte i gensammansättning. (Fux et al. 2005; Spormann 2008; Stewart och Franklin 2008) Celldifferentiering i bakteriesamhället påverkas av extracellulära förhållanden. Bakterier börjar ändra sitt genuttryck på grund av mikromiljöer som har bildats när gradienter av näringsämnen, syre eller elektronacceptorer har bildats i biofilmen. (Spormann 2008; Stewart och Franklin 2008). Rani et al. (2007) undersökte till exempel metaboliskt aktiva regioner i biofilmer som bildats av *S. aureus*-bakterier och studien visade att ungefär två tredjedelar av bakterierna i biofilmen var metaboliskt inaktiva.

Biofilmbildningen består av olika steg: initiell adsorption, cell-till-cell-adsorption, mognandet och cellavlossning (Otto 2004). **Figur 1** visar de olika stegen av biofilmbildningen (Vázquez-Sánchez och Rodríguez-López 2018). Första steget av biofilmbildningen är adsorption av planktoniska celler till en yta. Detta händer för *S. aureus* endast när agr (regulatorisk gen) quorum sensing-systemet (beskrivs senare) är inhiberat. (López et al. 2010). Bakterier kan växelverka med ytan på många olika sätt. Ett exempel på olika interaktioner är van der Waals-krafter, som leder till reversibel adsorption. Lewis syra-basinteraktion, hydrofobiska och elektrostatiske interaktioner och ligand-receptorinteraktioner leder däremot till irreversibel adsorption. (Bos et al. 1999; Donlan 2002). Adsorption av bakterier påverkas av både bakteriernas och ytans fysikalisk-kemiska egenskaper såsom ytenergi, vätning, grovhet och ytladdning eller med andra ord ytkemi. Därtill påverkar också biokemiska egenskaper som cellväggens adhesiva egenskaper och förekomsten av ytproteiner adsorptionen av bakterier. (Tegouilia et al. 2002; Müller et al. 2007; Webb et al. 2013) Efter adsorptionen börjar bakterier ackumulera sig och bilda N-acetyl-glukosamin som är en del av den

extracellulära matrisen (López et al. 2010). Efter att biofilmen har mognat börjar små kluster av bakterier lossna småningom, vilket är ett viktigt steg för spridningen av bakterier. (Yarwood et al. 2004; Yao och Strauch 2005)



Figur 1. Biofilmbildningen (modifierat ur Vázquez-Sánchez och Rodríguez-López 2018). Copyright © 2018 Elsevier Inc.

2.2 Quorum sensing-systemet

Biofilmbildningen är ett sätt för bakterier att skydda sig mot yttre hot. Vissa extracellulära signaler aktiverar biofilmbildningen. Bakterier kan producera dessa signaler, och de signalmolekyler som skapas av bakterierna kallas autoinducerare. Dessa molekyler ackumuleras extracellulärt, och deras koncentration korrelerar med bakteriernas täthet. Vid höga koncentrationer aktiverar autoinducerarna signaler som leder till multicellulära reaktioner i bakteriepopulationen. (López et al. 2010) Denna kommunikationsmekanism mellan bakterier (cell till cell) spelar en viktig roll för biofilmbildningen och kallas också quorum sensing (QS) (Camilli och Bassier 2006). QS-systemet kan också ha en roll i att avlägsna bakterier från den mogna biofilmen så att infektionen kan spridas (Boles och Horswill 2008). Grampositiva bakterier finns autoinducerare som ofta är peptider. Dessa peptider identifieras i allmänhet av membranassocierade sensorkinaser (enzymer) som aktiverar reglerande proteiner genom fosforylering. Detta aktiverar i sin tur uttrycket av målgenerna. (Novick och Geisinger 2008)

Det finns även andra signaler som främjar biofilmbildningen utöver QS-molekyler. Dessa är så kallade sekundära metaboliter såsom antibiotika, pigment och sideroforer. (López et al. 2010) När antibiotika används vid låga, så kallade subinhibitoriska koncentrationer, dödar de inte celler men de kan möjligtvis fungera som signaler som utlöser förändringar i genuttrycket (Yim et al. 2007). Aktivering av QS-systemet inhiberar biofilmbildning av *S. aureus*-bakterier, men det har observerats att furanoner som är naturliga produkter härstammande från marina alger kan inhibera QS-systemet och samtidigt gynna biofilmbildningen i subinhiberande koncentrationer (López et al. 2010). Kuehl et al. (2009) har visat att furanoner har bakteriedödande effekt bland annat på *S. aureus* vid höga koncentrationer men vid subinhiberande koncentrationer av furanoner befrämjas furanoner biofilmbildningen genom att inhibera QS-systemet.

2.3 Biofilmer i implantat

Alla implanterade medicinska utrustningar är mottagliga för biofilmer som *S. aureus* kan bilda. Inflammationer som orsakas av biofilmer har observerats till exempel i implanterade katetrar, hjärtklaffproteser, pacemaker och konstgjorda leder. (Craft. et al. 2019) De första upptäckterna av biofilmer på ytan av medicinsk utrustning gjordes i början av 1980-talet, då man med elektronmikroskopi kunde upptäcka bakteriell kolonisation (Marrie et al. 1982; Hall-Stoodley et al. 2004). Inflammation som förekommer i ett implantat orsakas ofta av *S. aureus*, *S. epidermidis* och *P. aeruginosa* (Hall-Stoodley et al. 2004). En infektion i en konstgjord led är ett exempel på en implantatrelaterad infektion; en sådan infektion är svår att diagnostisera och behandla (Parvizi et al. 2013). Dessa är ofta resistenta mot både antibiotika och personens immunförsvar. På grund av den begränsade tillgången till bakterieceller som orsakas av den extracellulära matrisen kan polymorfonukleära leukocyter inte effektivt fagocytera bakterier när biofilmen har bildats på implantatets yta. (Leid et al. 2002)

I Finland utförs omkring hundra operationer varje år enbart på grund av infektioner i konstgjorda knän, vilket innebär att detta är ett kliniskt signifikant problem (Tapiainen et al. 2010). Antalet operationer av konstgjorda leder förväntas öka på grund av den åldrande befolkningen. Infektioner i konstgjorda leder har vanligtvis två huvudsakliga orsaker: den första är infektion i ett operationssår, där infektionen orsakas av patientens endogena bakterier eller av bakterier från sjukhuspersonal eller operationssalen (McConoughey et al. 2014). Den andra orsaken är hematogen

spridning (genom blodet), som tros inträffa efter en operation (Greene 2012). Sura eller anaeroba områden som har formats på grund av metabolisk aktivitet i den yttre biofilmen kan också orsaka antibiotikanedbrytning (Huang et al. 1995). Dessutom kan utsöndrade polymerer i den extracellulära matrisen binda till och inaktivera antibiotika (Høiby 2011).

Enligt Jämsen et al. (2005) är den allmänna behandlingen av avancerad protesinfektion problematisk för patienten, eftersom den befintliga protesen måste avlägsnas och patienten måste behandlas med antibiotika i sex veckor innan en ny protes kan sättas in (Tapiainen et al. 2010). När protesen avlägsnas kan tester göras med känslig och noggrann histopatologisk och mikroskopisk undersökning för att fastställa förekomsten och strukturen av adhesiva bakterier (Trampuz et al. 2003). Det är dock möjligt att biofilmen sönderfaller när implantaten tas bort (McConoughey et al. 2014).

3 Biofilmbildning

3.1 Adsorption av proteiner, bakterier och celler

Ett av målen med detta arbete är att förstå hur proteiner eller bakterier (med hjälp av proteiner) adsorberas till ytan av en guldbelagd sensoryta. För tolkningen av mätresultaten är det viktigt att förstå effekterna av de fysikalisk-kemiska krafter som är involverade i adsorptionen av proteiner/bakterier. Adsorption sker när kraftfältet på en fast yta reducerar molekylens potentiella energi till mindre än den potentiella energin i den omgivande vätskan. Beroende på rådande krafter kan adsorption delas in i fysikalisk adsorption och kemisk adsorption. Fysikalisk adsorption orsakas av dispersionskrafter, det vill säga van der Waals-krafter. Den fysikaliska adsorptionen påverkas av olika elektrostatiska krafter såsom polarisation, fält-dipol och fältgradientkvadrupol interaktioner, som är särskilt viktiga för polära adsorbenter. Kemisk adsorption i sin tur innebär starkare krafter än fysikalisk adsorption på grund av överföring och delning av elektroner vid bildandet av kemiska bindningar. De krafter som råder i fysiorption är svaga, därmed är det typiskt en reversibel process, medan kemisorption är irreversibel. Vid kemisorption är molekylerna adsorberade i ett monolager, medan det vid fysiorption är möjligt att det bildas ett multilager. (Karge och Weitkamp 2008) Adsorption är effektivast på ytor som är grova och hydrofoba (Craft et al. 2019).

Forskare har undersökt olika fenomen som påverkar proteinadsorptionen. Norde (1995) har undersökt vad som påverkar proteinadsorption vid gränssytan mellan fast och vätska: proteinadsorptionen påverkas särskilt av bildandet av en grupp av föreningar i granulerna, bildandet och hydratiseringen av sorbent- och proteinytorna samt strukturella omarrangemang i proteinmolekylen. Enligt Norde behöver man vara medveten om de mekanismer som är involverade i adsorptionsprocessen för att kunna styra den. Adsorptionsprocessen består av olika steg: transport till ytan, adsorption till ytan, orientering och strukturellt omarrangemang av molekylerna. (Norde 1995)

Proteinernas transporthastighet stiger med ökande proteinkoncentration. Själva adsorptionen beror inte på koncentrationen. Därför kan det förväntas att vid låga koncentrationer och låg yttäckning av proteinerna är det transportprocessen som styr adsorptionshastigheten, och vid hög koncentrationer och hög yttäckning är det

reaktioner på ytan som kontrollerar adsorptionshastigheten. (Norde 1995) Enligt Barbucci et al. (1992) börjar proteinerna omarrangera sin struktur efter absorption till ytan.

I allmänhet uttrycks den adsorberade mängden i form av en adsorptionsisoterm, varvid mängden adsorberat ämne Γ avsätts som en funktion av koncentrationen c . För att adsorption ska ske spontant måste ändringen i Gibbs energi vara negativ:

$$\Delta_{ads}G = \Delta_{ads}H - T\Delta_{ads}S < 0 \quad (1)$$

var G är Gibbs energi, H är entalpi, S är entropi och T är temperatur. (Norde 1995)

3.2 Adsorption av biofilmen

S. aureus adsorption till en yta beror på om ytan är abiotisk eller biotisk. Adsorption till abiotiska ytor påverkas främst av de fysikalisk-kemiska egenskaperna hos både bakterien och kontaktytan, vilket innebär att adsorptionen beror på hydrofoba och elektrostatiska interaktioner. (Vázquez-Sánchez och Rodríguez-López 2018) Det har också visat sig att bakteriella ytmolekyler såsom autolysiner eller tekoinsyror som kan finns på ytorna av *S. aureus* kan påverka adsorptionen av bakterier (Heilmann et al. 1997; Gross et al. 2001). Gross et al. (2001) har föreslagit att repulsiva elektrostatiska krafter kan leda till en minskning av biofilmbildningen av *S. aureus*, vilket innebär att biofilmbildningen kunde förhindras genom att modifiera implantatyten. Vázquez-Sánchez et al. (2012) fann att fler *S. aureus* bakterier adhererade till polystyren i ett medium med hög jonstyrka och att adsorptionen var beroende av ytans och bakteriernas laddning.

Efter bakteriell adsorption följer cell-cell adsorption, vilket innebär att bakterierna börjar ackumulera och dela sig. De nya dottercellerna är särskilt benägna att lossna på grund av den strömmande vätskans skjuvkraft (vid fast-vätskegränssnitt) innan extracellulära matrisen har bildats. *S. aureus* bakterier försöker stabilisera cell-cell-interaktioner på många sätt, bland annat genom att producera många extracellulära proteiner som främjar ackumulering efter adsorption. Vissa av dessa proteiner spelar en betydande roll i både adsorption och ackumulering. (Moormeier och Bayles 2017) Bap-proteiner har till exempel visat sig främja ackumulering genom intercellulär

adsorption (Cucarella et al. 2001). Foulston et al. (2014) föreslår att cytoplasmatiska proteiner fäster vid bakteriernas yta för att bilda en extracellulär matris, och att den bildade matrisen gör att bakterierna fäster vid varandra. Bildandet av denna matris börjar när pH-värdet i mediet sjunker. Det är inte exakt känt hur cytoplasmatiska proteiner frisätts, men Foulston et al. föreslår att de skulle kunna frigöras som ett resultat av reglerad autolys som är liknande med eDNA-frisättning (Mann et al. 2009). Förutom proteiner är även eDNA viktigt för bildning av extracellulär matris. Dengler et al. (2015) föreslår i sin forskning att eDNA fungerar som ett elektrostatiskt nät, som sammanbinder celler omgivna av positivt laddade matrisproteiner vid lågt pH.

3.3 Mognandet och lossningen

Med hjälp av time-lapse-mikroskop har man observerat att en del av bakterierna frisätts ungefär 6 h efter bakteriedelningen. Denna händelse är en tidig spridning av bakterier, som börjar med bildandet av en mikrokoloni och leder till att biofilmen återbildas. (Moormeier och Bayles 2017) Mann et al. (2009) antyder att stafylokoktermonukleas bryter ned eDNA, vilket potentiellt främjar biofilmsspridning och kan vara en viktig faktor för biofilmsunderhåll. På senare tid har det kunnat fastställas med hjälp av time-lapse-mikroskopi att nedbrytning av eDNA sker under de första stadierna av biofilmbildningen. Forskare anser att detta är ett nytt steg i biofilmbildningen, men den roll som detta steg spelar i biofilmbildningen har ännu inte undersökts tillräckligt. (Moormeier et al. 2014)

En betydande del av biofilmens mogning är bildandet av mikrobiella strukturer, vilket utökar ytan för näringsupptag och avfallsborttagning, samtidigt som det bidrar till en bredare spridning av bakterier (Hall-Stoodley et al. 2004). Olika studier har rapporterat bildandet av mikrokolonier, men mekanismen med vilken de bildas är oklar (Yarwood et al. 2004; Mann et al. 2009). Med hjälp av time-lapse-mikroskop har man observerat att mikrokolonierna är uppbyggda av diskreta cellkolonier som finns kvar i basalskiktet efter en del av bakterierna har frisatts. Samma resultat observerades också när biofilmens uppbyggnad studerades med lägre förstoring. (Moormeier och Bayles 2017).

Bakteriernas lossning är det sista steget i biofilmbildningen efter att de har mognat. Yarwood et al. (2004) har föreslagit att cellernas lossning från biofilmen grundar sig på agr quorum sensing-systemet. Boles och Horswill (2008) har också märkt att

induktion av agr-systemet främjar cellavlossning och att mekanismen för cellproliferation kräver extracellulär proteasaktivitet. Boles och Horswill visade i sin studie att låg agr-aktivitet är viktigt för biofilmbildningen och att aktivering av agr-systemet utökar lossningen av cellerna. Miljöförhållandena påverkar också lossningen, till exempel kan brist av glukos eller tilläggning av AIP:er (autoinducerade peptider) leda till lossning av bakterierna. Deras test visade också att bakterierna som lossnar från biofilmen är känsliga för antibiotika. Av denna anledning skulle det vara viktigt att förstå mekanismen för cellossning för att kunna bryta ned biofilmen och döda bakterierna med antibiotika. (Boles och Horswill 2008)

4 Antibiotika

I den experimentella delen av den här studien användes antibiotika som kallas vankomycin. Antibiotikans historia börjar för mer än 100 år sedan, då den första syntetiska antibiotikan användes kliniskt på 1910-talet. Införandet av antibiotika kan beskrivas som 1900-talets viktigaste medicinska genombrott. Antibiotika gjorde det inte bara möjligt att behandla infektioner utan även många moderna medicinska behandlingar som cancerbehandling och organtransplantationer. (Hutchings et al. 2019) Antibiotika är i allmänhet endast effektiva mot bakterieinfektioner, men vissa antibiotika kan också vara effektiva mot protozoainfektioner. Antibiotika som dödar bakterier kallas baktericider och antibiotika som hämmar multiplikationen kallas bakteriostatika. (Vuento 2020)

Baktericider, till exempel penicillin, kan verka genom att till exempel bryta ned bakteriens cellvägg. Bakteriostatiska antibiotika kan påverka bakteriens ämnesomsättning eller gener. Antibiotikans effektivitet beror på strukturen hos både antibiotikan och bakterien. Antibiotikan måste hitta en fästplats (receptor) i bakteriecellen för att fungera. När antibiotika verkar på många olika patogener har den ett brett spektrum. (Vuento 2020) När orsaken till infektionen inte är med säkerhet känd ges patienterna antibiotika med brett spektrum oralt. Den utbredda användningen av sådana antibiotika leder till att resistenta bakterier uppstår. Därför kan antibiotika i framtiden behöva vara inriktade mot en specifik patogen. (Prescott 2014)

4.1 Mekanismer för antibiotikaresistens

Biofilmrelaterade infektioner är svåra att behandla, eftersom bakterierna i biofilmen är mer resistenta mot antimikrobiella medel och patientens eget immunförsvar. Den ökade resistensen beror både på det skydd som biofilmmatrisen ger och på de enskilda bakteriernas egenskaper. (Craft et al. 2019) Antibiotikaresistens kan definieras till exempel genom att mäta hur mycket mer antibiotika än tidigare som behövs för att stoppa tillväxten av bakterier, bland annat på grund av bakteriemutationer. Antibiotikatolerans kan definieras genom att mäta hur länge bakterier kan leva när de har exponerats för antibiotika. Dessa definitioner fungerar bra när det är frågan om planktoniska, det vill säga enstaka bakterier, men definitionen är inte lika enkel när det gäller biofilmer. (Mah 2012)

S. aureus kan liksom andra bakterier utveckla resistens mot flera antibiotika. De första antibiotikaresistenta *S. aureus*-stammarna upptäcktes på 1940-talet, när man på ett sjukhus upptäckte en ökning av bakterier som var resistenta mot penicillin. Penicillinresistenta *S. aureus*-bakterier är kända under förkortningen PRSA. (Chambers och DeLeo 2009) Idag är mer än 90 % av *S. aureus*-bakterierna resistenta mot penicillin (Lowy 2003). Senare (1959) ersattes penicillin med meticillin, men det var först två år senare som de första meticillinresistenta bakterierna upptäcktes (Chambers och DeLeo). I dag är infektioner orsakade av framför allt MRSA utbredda, både i samhället och på sjukhusen. Världshälsoorganisationen (WHO) räknar MRSA som en av de tolv viktigaste patogenerna som utgör en risk för människors hälsa. (Craft et al. 2019) Vancomycin ansågs länge vara ett antibiotikum som skulle vara immunt mot bakteriell resistens, eftersom dess verkan bygger på att det fäster vid cellhöljet, snarare än vid målproteiner som många andra antibiotika (Stogios och Savchenko 2020).

Biofilmer har en ökad resistens jämfört med planktoniska bakterier mot yttre agenter som antibiotika och interna agenter i det medfödda immunsystemet, såsom antimikrobiella peptider (AMP) (Craft et al. 2019). Det finns många faktorer som har visat sig vara relaterade till biofilmernas resistens mot antibiotika, men två av de mest välkända faktorerna är biofilmmatrisen och persisterceller (Lewis 2008). Det kan vara svårt att studera biofilmernas resistens och tolerans, eftersom biofilmer har så varierande mekanismer (Mah 2012). Enligt Lewis (2008) hindrar resistensmekanismer antibiotikan från att nå sitt mål, medan toleransmekanismer inaktiverar antibiotikans funktion. Förmodligen är biofilmens resistens och tolerans summan av många olika faktorer som tillsammans gör biofilmen ännu mer resistent och tolerant (Mah 2012). I de tidiga stadierna av biofilmbildningen är biofilmen mer känslig för antibiotika, men när den mognar ökar dess resistens (Høiby et al. 2011).

Biofilmernas extracellulära matris består av polysackaridbiopolymerer, proteiner och DNA (eDNA) och deras uppgift är att forma biofilmernas struktur och skydda bakterier (Whitchurch et al. 2002; Mann 2011). Matrisen kan förhindra antibiotika från att nå bakterier. Matrisens effektivitet beror dock på dess sammansättning och ålder samt att den inte nödvändigtvis hindrar alla antibiotika från att penetrera igenom den. Det finns också studier som visar att polysackarider och eDNA spelar en roll för att skydda biofilmen mot antibiotika. (Mah 2012)

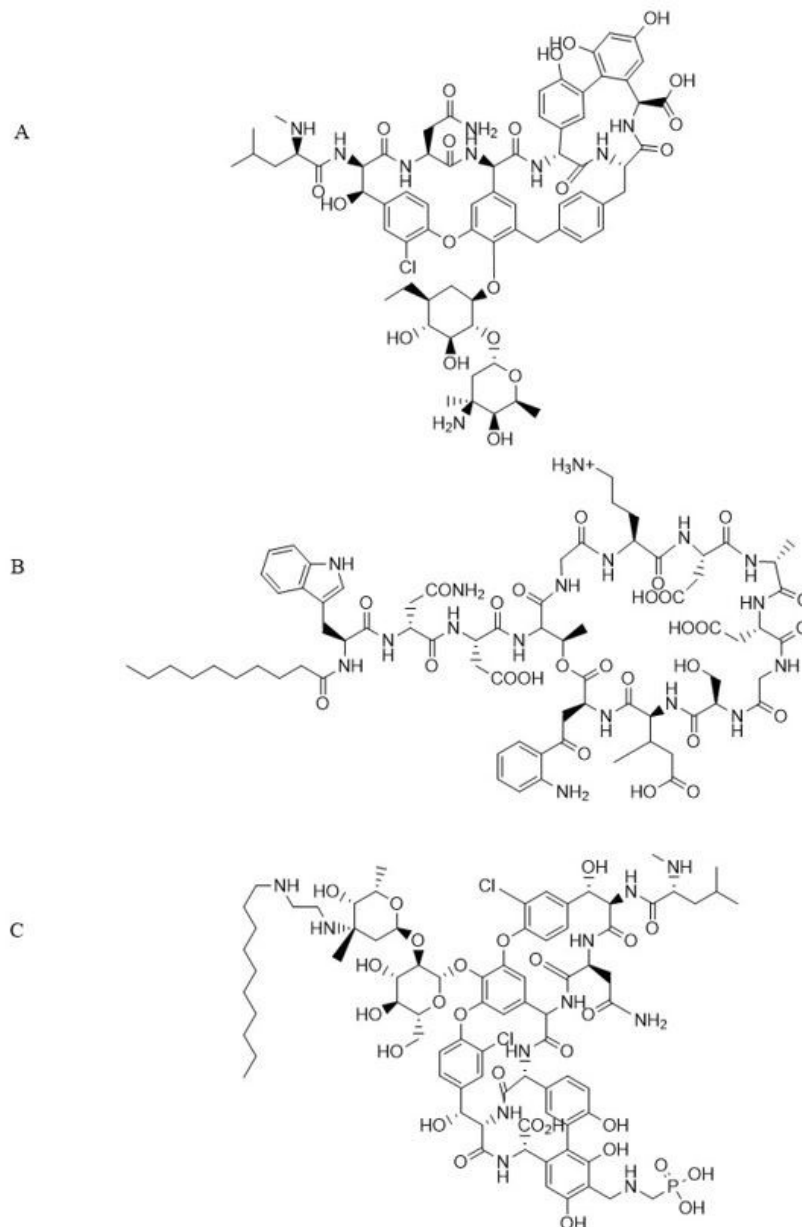
Biofilmerna är heterogena och innehåller ofta olika varianter av bakterier, till exempel små kolonivarianter (SCV) som är resistenta mot antibiotika. Deras mekanismer är inte helt kända, men man tror att biofilmens heterogenitet leder till diversifiering av biofilmen, vilket leder till att biofilmen börjar gynna resistenta varianter. (Mah 2012) Biofilmer innehåller också så kallade persisterceller som är toleranta mot antibiotika, eftersom bakteriernas metabolism är långsammare eller avstängd och antibiotika inte kan fungera eftersom målbakterien inte är aktiv (Lewis 2008). Det finns också specifika gener som gör biofilmen mer resistent mot antibiotika. Det finns åtminstone sex gener som oftare finns i biofilmer än i planktoniska bakterier såsom *ndvB*, *PA1875-1877* och *tssC1*. (Mah 2012)

4.2 Mekanismer för att behandla eller förhindra biofilmrelaterade infektioner

Eftersom biofilminfektioner är svåra att behandla är det bästa sättet att förebygga biofilmsrelaterade infektioner att agera innan biofilmbildningen. Detta kan vara svårt eftersom *S. aureus* är resistent mot antibiotika redan som planktoniska celler. (Craft et al. 2019) Eftersom biofilmer är ännu mer resistenta mot antibiotika än planktoniska celler, ökar också den lägsta hämmande koncentration (MIC) för behandling av biofilmsinducerade inflammationer (Melander och Melander 2017). MIC och MBC (bakteriedödande koncentration) av bakterier i biofilm kan till och med vara 100–1000 gånger högre än för planktoniska celler (Høiby et al. 2011). Detta innebär att antibiotikadosen bör ökas. Det har också visat sig att subletal exponering leder till ökad utveckling av antibiotikatolerans genom att öka biofilmbildningen (Jefferson et al. 2005). Vankomycin (**Figur 2A**) är det vanligaste antibiotika mot infektioner orsakade av *S. aureus* (Craft et al. 2019). Vankomycin har dock begränsningar, eftersom det har utvecklats för delvis (d.v.s. VISA) eller helt (d.v.s. VRSA) resistenta *S. aureus*-stammar. Därför har det sökts alternativ till vankomycin. (Sievert et al. 2008)

Även om bakterierna är resistenta mot flera antibiotika finns det fortfarande antibiotika som är effektiva mot infektioner relaterade till biofilmer, till exempel daptomycin (**Figur 2B**). Daptomycin är en cyklisk lipopeptidmolekyl som växelverkar med den cytoplasmatiske cellväggen som leder till snabb depolarisering vilket stör syntesen av DNA, RNA och proteiner. (Craft et al. 2019) Daptomycin är ett av de mest effektiva antibiotika för att döda *S. aureus*-bakterier i en biofilm och är överlägsen till vankomycin (Smith et al. 2008). Daptomycin är också effektivt mot persisterceller

eftersom cellerna inte behöver vara metaboliskt aktiva för att daptomycin ska fungera (Craft et al. 2019). Telavancin (**Figur 2C**) har också visat sig vara effektivare än vancomycin när det gäller att döda bakterier (Smith et al. 2013).



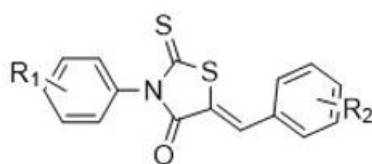
Figur 2. Strukturer av (A) vankomycin, (B) daptomycin och (C) telavancin

När biofilmen har bildats kan den avlägsnas genom en kirurgisk operation. På detta sätt kan till exempel sår och implantat rengöras från biofilmen. Spolning och pulssköljning används vanligtvis för att rengöra sår och implantat. (Bhattacharya et al.

2015) Tyvärr ger metoder där endast verktyg används sällan tillräckligt goda resultat, och till exempel pulssköljning avlägsnar inte effektivt *S. aureus*-bakterier från implantat (Urish et al. 2014).

Ett tredje sätt att förhindra biofilmbildning är att förhindra bakterier ifrån att fastna på ytor. Bakteriernas adsorption påverkas av många faktorer. Adsorption är effektivast på ytor som är grova och hydrofoba. Det finns många sådana ytor, till exempel på sjukhus, och de infektioner som uppstår där kommer ofta från medicinsk utrustning. (Craft et al. 2019) Eftersom olika medicinska utrustningar utgör en infektionsrisk utvecklas metoder för att förhindra bakteriekolonisering på dem (Buhmann et al. 2016; Morgenstern et al. 2016; Choi et al. 2018). Som tidigare nämnts spelar exempelvis ytproteiner en betydande roll för bakterieadsorption (Cucarella et al. 2001). För att förhindra bakterieadsorption på ytan måste mekanismerna bakom fenomenet förstås (Craft et al. 2019).

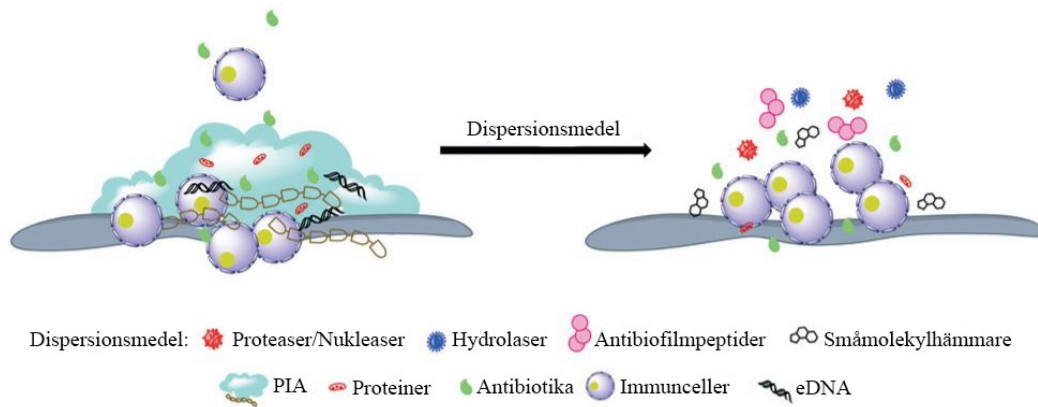
Det finns olika ytbehandlingar som kan förhindra biofilmbildning. Ett exempel är arylrhodaniner (**Figur 3**), som är femledade heterocykliska molekyler, kända för att hämma biofilmbildningen hos stafylokocker. Molekylerna fäster sig vid adhesiner på den mikrobiella cellens yta, vilket hindrar bakterierna från att fästa sig vid ytan. Användningen av arylrhodaniner förhindrar bildandet av resistenta bakteriestammar eftersom det inte har antimikrobiell aktivitet. Molekylerna är inte heller cytotoxiska för mänskliga celler. (Opperman et al. 2009) Olika beläggningar kan också användas för att förhindra biofilmbildningen på abiotiska ytor, till exempel katetrar som är belagda med tetracykliner och anamyciner har visat sig att minska blodströmsinfektion (Harron et al. 2016, Turnbull 2018). Dessa studier visade att genom att modifiera ytgenskaperna hos en medicinteknisk utrustning med bakteristatiska medel kan biofilmbildningen förhindras.



Figur 3. Struktur av arylrhodanin

Olika metaller har också använts som beläggingsmaterial på abiotiska ytor, såsom katetrar, för att förhindra biofilmbildning (Kowalczyk et al. 2012). Särskilt silver har använts i flera studier och har visat sig vara effektivt när det gäller att hämma biofilmbildningen (Pompilio et al. 2018, Wilkinson et al. 2018). Det är dock inte helt känt varför silver är så effektivt när det gäller att förhindra biofilmbildningen. Det har dock visats att silvernanopartiklar fäster vid cellmembranet och tränger in i cellen där partiklarna binder till sulfidinhaltiga proteiner och DNA. Detta leder till att DNA-replikering och -transkription förhindras. Nackdelarna med silver är att det är giftigt för celler och det finns en ökad risk för trombos på grund av att det används som beläggingsmaterial i medicinska utrustningar. (Craft et al. 2019) Av denna anledning har även rostfritt stål använts för att belägga implantatmaterialet (Akens et al. 2018).

Små molekyler kan också användas för att förhindra biofilmbildning och/eller för att sprida den utvecklade biofilmen (**Figur 4**). De har till exempel visat sig att cis-2-decensyra både sprider den utvecklade biofilmen och förhindrar biofilmbildning av *S. aureus*. (Jennings et al. 2012, Amari et al. 2013) D-aminosyror har också visat sig sprida biofilmer som *S. aureus* och förhindra biofilmbildningen (Harmata et al. 2015, Abenojar et al. 2018). D-aminosyror orsakar frisättning av amyloidfibrer, som är ansvariga för att binda ihop biofilmbakterier (Kolodkin-Gal et al. 2010). Ett sätt att avlägsna en biofilm är att använda enzymer som bryter ned biofilmens matris. Sådana enzymer är till exempel dispersin B eller DNase. Dispersin B sönderdelar särskilt polysackariderna i biofilmen. Vissa bakteriestammar skapar dock inte matriser med högt innehåll av polysackarider, vilket gör enzymet mindre effektivt. (Craft et al. 2019) Naturligt förekommande växtbaserade produkter innehåller också ämnen som chelerytin, dihydroxibensofuran, sanguinarin och proantocyanid, vilka har visat sig att förhindra biofilmbildning (Artini et al. 2012). Dessutom hämmar polofenolföreningar, såsom garvsyra, som fås från växter, biofilmbildningen (Dong et al. 2018). Teträdsolja (TTO) har visat sig döda bakterier i biofilmen och skada cellens extracellulära matris, vilket bryter ned biofilmen (Kwieciński et al. 2008). Derivat av ellaginsyra hämmar biofilmbildning och även gör biofilmen känsligare för antibiotika såsom daptomycin, klindamycin och oxacillin (Quave et al. 2012).



**Figur 4. Dispersion av extracellulär matris (modifierat ur Craft et al. 2019).
Copyright © 2019 The Royal Society of Chemistry**

5 Metoder och utrustning

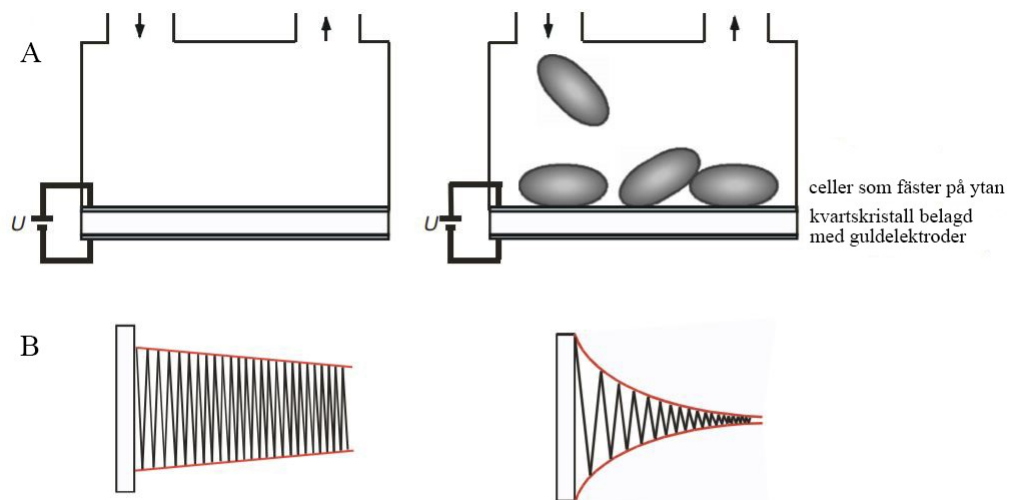
5.1 Utrustning

QCM och SPR är mätmetoder som mäter förändringar i massan eller optiska egenskaper på sensorytan. Dessa metoder gör det möjligt att monitorera massförändringar i realtid, och därför har dessa metoder tidigare också använts för att monitorera biofilmbildning. Biofilmbildningen kan studeras till exempel med QCM och SPR metoder (Otto 2008). SEM möjliggör en ännu närmare undersökning av strukturer av den bildade biofilmen.

5.1.1 Kvartskristallmikrobalans, QCM (quartz crystal microbalance)

I det här arbetet användes QCM (**Figur 5**) som en metod för att studera adsorption av biofilmer på en substratyta. Det QCM-instrument som användes i detta arbete var en KSV QCM-Z500. QCM är en akustisk biosensor och kan användas för att monitorera massförändringar med nanograms noggrannhet per kvadratcentimeter (Otto 2008; Shafiqul Islam et al. 2021). QCM-tekniken bygger på piezoelektricitet och mätningstekniken baserar sig på att applicera ett alternerande elektriskt fält över en kvartskristall. Det leder till att kristallen börjar oscillera vid sin resonansfrekvens, som är beroende av den totala oscillerande massan. Den totala oscillerande massan ökar på grund av molekylernas adsorption på kristallens yta, vilket leder till en minskning av kristallens resonansfrekvens. (Otto 2008)

Kvartskristall är ett piezoelektriskt material, vilket innebär att materialets elektriska och mekaniska tillstånd är beroende av varandra. Som ett resultat av detta kan materialet deformeras, till exempel när det utsätts för en spänning, eller så kan deformationen skapa en spänning i materialet. Det piezoelektriska fenomenet upptäcktes ursprungligen av Jacques och Pierre Currie, och det är vanligt förekommande bland annat i anisotropiska kristaller såsom kvarts. (Pohanka 2021)



Figur 5. (A) Kvartskristallen ansluten till växelströmmen är belagd med tunna guldelektroder. (B) Kristallen oscillerar vid en resonansfrekvens på 5 MHz och celladsorption påverkar avklingningen av oscillationsamplituden, som kan mätas som dissipation. (modifierat ur Otto 2008) Copyright © 2008 Elsevier Masson SAS.

När biofilmer studeras är det viktigt att ha ett system som möjliggör att samtidigt mäta, kontrollera och monitorera bakterietillväxt. Med QCM kan man mäta resonansfrekvensen av den oscillerande kristallen, kontrollera mätningsförhållanden (temperatur, flödes hastighet) och monitorera biofilmbildningen (ökande/sjunkande frekvens). QCM är en metod som stör systemet mycket mindre jämfört med gamla metoder som mikrotiterplatta, Calgary-enhet och Robbins-enhet vilka är destruktiva och diskontinuerliga och kan leda till nedbrytning av biofilmen. Detta har också begränsat undersökningen av faktorer som påverkar bildandet och styrningen av biofilmer. Fördelen med QCM-metoden är att den möjliggör att observera biofilmens stegvisa bildning i realtid. (Amer et al. 2020)

Sauerbrey upptäckte år 1959 ett samband mellan förändringen i massa och frekvens för en oscillerande kvartskristall. Den ekvation han definierade visar hur en ökning av massan på ytan av en oscillerande kvartskristall resulterar i en minskning av resonansfrekvensen:

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2}{A\sqrt{\rho\mu}}\Delta m \quad (2)$$

där f_0 är den ursprungliga resonansfrekvensen för kvartskristallen, Δf är förändringen av resonansfrekvensen på grund av förändringen av kvartskristallens massa Δm . A är kristallens aktiva yta, ρ är kvartsens densitet och μ är kvartsens skjuvmodul. (Latif et al. 2013) Sauerbrey-ekvationen kan användas för dataanalys om det adsorberade lagret anses vara tunt och stelt. Om frekvensförskjutningen är mer än 2 % av den ursprungliga resonansfrekvensen anses filmen vara tjock. Följande steg är att evaluera om proteinlagret är också stelt. Kriteriet för stelt lager är följande:

$$\frac{\Delta D}{\Delta f} \ll \frac{1}{f_0} \quad (3)$$

där ΔD är förändringen i dissipation, Δf förändringen i resonansfrekvens och f_0 den ursprungliga resonansfrekvensen. (BioLogic Science Instruments 2021)

QCM kan användas för att studera biofilmbildning på kvarts kristallens yta. Olsson et al. (2019) har föreslagit att adsorption av en bakterie utan cellbihang (polymera protein strukturer i bakterieyta till exempel flagelle) till sensorytan observeras som en minskning av resonansfrekvensen. Studien visade också att adsorption av bakterier med cellbihang resulterar i en liten minskning av resonansfrekvensen eller en ökning av resonansfrekvensen även om de fäster vid sensoryta. Mätningar som har gjorts med QCM kan inte helt jämföras med biofilmer på sjukhus hos patienter, men QCM har kunnat modellera biofilmbildning på katetrar med hjälp av ett medium av urin/konstgjord och en polystyrenbelagd sensor. Samtidigt upptäcktes att humant albumin (HA) främjar biofilmbildning på hydrofoba ytor. (García-Bonillo et al. 2020)

Det anses allmänt att biofilmbildning på en QCM sensor observeras som en minskning av resonansfrekvensen och kan analyseras med Sauerbrey-ekvationen. Det har också rapporterats att resonansfrekvensen kan öka på grund av biofilmbildning på sensorytan. Detta kan inte förklaras med Sauerbrey-ekvationen, men fenomenet kan förklaras med den kopplade oscillator teorin. Enligt teorin är resonansfrekvensen inte bara beroende av den adsorberade massan, utan också av styvheten av den adsorberade massan på sensorytan enligt följande:

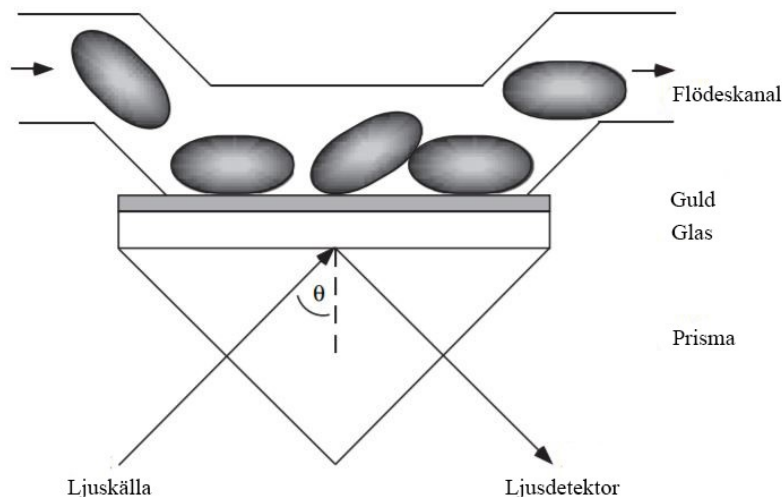
$$2(2\pi f_0)^2 = \left(\frac{K}{M} + \frac{k}{M} + \frac{k}{m}\right) \pm \sqrt{\left(\frac{K}{M} + \frac{k}{M} + \frac{k}{m}\right)^2 - 4\frac{K}{M} \times \frac{k}{m}} \quad (4)$$

där f_0 är sensorns ursprungliga resonansfrekvens, K är fjäderkonstanten, M är sensorns massa, k är fjäderkonstanten, som beskriver styvheten hos kontaktpunkten mellan partikel och sensor, och m är massan av den vidhäftande partikeln. (Olsson et al. 2011)

5.1.2 Ytplasmonresonans, SPR (surface plasmon resonance)

SPR (**Figur 6**) är den andra huvudsakliga tekniken som användes i detta arbete för adsorptionsstudier av biofilmer. SPR är en optisk biosensor som mäter förändringar i brytningsindex för att upptäcka koncentrationsvariationer av adsorberat material på en guldbelagd sensoryta (Otto 2008). I det här arbetet användes SPR102-AU guldsensorer (BioNavis), som består av ett glassubstrat, med ett adsorptionsskikt av Cr och ett plasmoniskt skikt av Au.

SPR fungerar på följande sätt: Först kommer ljusstrålen från ett medium (1) med högre brytningsindex till ett medium (2) med lägre brytningsindex, sedan reflekteras ljuset delvis och bryts delvis tills totalreflektion inne i materialet sker. Den inre reflektionen kan ske i medium (1) så länge infallsvinkeln θ är större än den kritiska vinkeln θ_c , var $\sin(\theta_c) = n_2 / n_1$. Över denna infallsvinkel uppstår elektromagnetisk energi i form av en försvinnande våg som förekommer i medium (2) och vågens amplitud minskar exponentiellt när avståndet från gränssyta mellan medium (1) och (2) ökar. När den guldbelagda sensorn befinner sig mellan dessa två medier förstärks först den försvinnande vågen, varefter den penetrerar guldsiktet och existerar i medium (2). (Otto 2008; Tang et al. 2010)

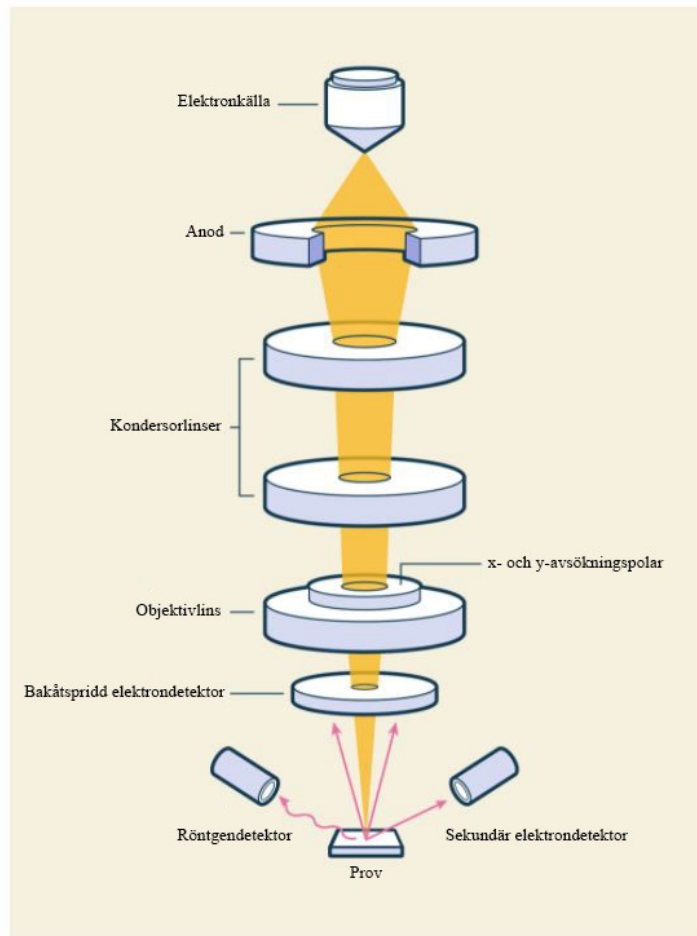


Figur 6. Mekanism av SPR (modifierat ur Otto 2008). Copyright © 2008 Elsevier Masson SAS.

SPR-tekniken har använts i många olika biofilmstudier. Den har till exempel använts i en studie för att studera effekten av lysin, som är ett enzym, på en *S. aureus*-biofilm i realtid. Studien visade att lysin snabbt fäster vid biofilmens yta, men att det på grund av lysinet tar längre tid att bryta ned biofilmen. (Hong et al. 2021) SPR har också använts för att mäta adsorption av en polysackarid, isolerad från en biofilm, på hydrofoba ytor (Bellich et al. 2019). Sudgidan et al. (2021) använde SPR för att studera biofilmer som hade bildats av bakterier isolerade från lax.

5.1.3 Svepelektronmikroskopi, SEM (scanning electron microscopy)

SEM (**Figur 7**) användes i detta arbete för att karakterisera den topografiska strukturen hos de bildade biofilmerna. Instrumentet som användes i detta arbete var Zeiss GeminiSEM 45 som var placerad i Top Analytica Ltd lokal. SEM användes speciellt för att säkerställa biofilmbildningen. SEM kan användas för att ta fram högkvalitativa bilder av den studerade ytans topografi. Instrumentet består normalt av en elektronkanon, två kondensornlinser, en objektivlins, ett elektrondetekteringssystem och deflektorer. SEM arbetar normalt i vakuum och den studerade ytan kan bombarderas med elektroner vid olika energinivåer från 1 till 30 keV. När ett prov bombarderas med elektroner, sprids elektroner och elektrondetektorer upptäcker dessa. (Khursheed 2011)



Figur 7. Schematisk bild av ett SEM-mikroskop (modifierat ur Gleichmann 2020) Copyright © 2020 Technology Networks Ltd.

SEM har använts i flera studier för att avbilda biofilmer som bildats av bakterier. Kaur et al. (2020) använde SEM för att undersöka effekten av kalciumhypoklorit och kitosanologosackarid (COS) på biofilmen och utstrykningsskikt i rotkanalen på en tand med minimala erosion. Gomes och Mergulhão (2017) studerade antibiotikas påverkan på biofilmer på olika ytor (kiseldioxid och guld) med SEM. Hu et al. (2015) använde SEM för att upptäcka biofilmbildning och aktiverade lymfocyter på ytan av släta och sträva bröstimplantat.

5.2 Provberedning och analys

Mätningarna inleddes först med QCM-mätningarna för att fastställa om proteiner adsorberades på sensorytan. Därefter påbörjades mätningarna med *S. aureus*. Slutligen utfördes mätningar med *S. aureus* och antibiotika. När QCM-mätningarna var klara utfördes SPR-mätningarna. SEM-avbildningen gjordes vid två olika tillfällen. Den första gången efter *S. aureus*-

mätningarna med QCM och den andra gången efter alla SPR-mätningarna. Slutligen gjordes en mer detaljerad dataanalysen med hjälp programvaran som kom med QCM-instrumentet och ANOVA-analys.

5.2.1 QCM-mätningarna med DMEM

QCM-mätningar initierades genom att testa hur proteiner adsorberas på en guldbelagd sensoryta (Q-Sensor QSX 303 SiO₂). Före mätningen renades sensorn med destillerat vatten och torkades med kväve, varefter den utsattes för plasmabehandling i cirka 2 min. QCM-enheten kalibrerades innan mätningarna påbörjades. Detta gjordes med ett kalibreringsverktyg som först mätte QCM-enhetens signal för en kortslutning mellan enhetens elektroder, sedan luft och slutligen med ett 100 Ω:s motstånd. Innan mätningen kunde påbörjas renades QCM-systemet med etanol och destillerat vatten. Efter varje mätning renades systemet genom att först pumpa in etanol och sedan vatten. Därefter sköljdes flödescellen med etanol och destillerat vatten. Innan *S. aureus*-biofilmerna studerades var syftet att studera proteinernas adsorption till den guldbelagda sensorn (Q-Sensor QSX 303 SiO₂).

Flödehastigheten genom flödescellen styrdes med en membranpump till 200 µl/min och flödescellens temperatur var 37 °C. Syftet var att först fylla flödescellen med destillerat vatten och sedan med proteinlösningen DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) och efter detta återigen med destillerat vatten och DMEM-lösning. Några problem orsakades av luftbubblor som störde mätningen. Bubblor kan bildas på grund av att provlösningen som var i rumstemperatur injicerades i flödescellen vars temperatur var högre (Easley et al. 2020). Bildning av luftbubblorna kunde förhindras genom att lösningarna värmdes upp till 37 °C i ett vattenbad innan mätningen påbörjades.

Även om användningen av vattenbadet löste problemet med störande luftbubblor så var mätresultaten på varandra följande mätningar inte enhetliga. Detta berodde troligen på att de ämnen som adsorberats på sensorytorna inte hade avlägsnats under rengöringen. Därför bereddes en tvättlösning av destillerat vatten, väteperoxid och ammoniumlösning för att rengöra sensorerna för repeterbara mätningar. Lösningen bereddes i förhållandet 5:1:1 och sensorerna kokades i lösningen i 10 min, varefter sensorerna sköljdes med destillerat vatten och torkades med kväve. Detta reningsförvarande av sensorerna fungerade bra och efterföljande mätningar gav mer

enhetliga resultat. Syftet med mätningarna var att se om proteiner adsorberades på sensorytorna. Vatten användes som referenslösning. Först pumpades vatten med 200 µl/min upp till 400 s, varefter lösningen byttes till DMEM och återigen till vatten och slutligen till DMEM. Syftet med nästa mätning var att fastställa hur resonansfrekvensen ändrar när man först pumpar vatten och sedan en 50 % DMEM-lösning in i flödescellen, och efter att resonansfrekvensen har stabiliserats pumpades ännu en 100 % DMEM-lösning in i flödescellen.

5.2.2 SPR-mätningar med DMEM

Efter proteinadsorptionsmätningar med QCM gjordes också parallellmätningar av DMEM-adsorption med SPR. Proteinadsorptionen testades med två olika koncentrationer, 50 % och 100 %. Lösningarna sattes till systemet på samma sätt, och temperaturen var densamma som vid QCM-mätningarna, men pumpens flödes hastighet var 100 µl/min

5.2.3 QCM-mätningarna med *S. aureus*

Experimentet med *S. aureus* bakterier initierades med cellodling. *S. aureus*-cellerna sattes i en petriskål med agarplatta. Petriskålen lämnades i inkubatorn vid 37 °C över natten. Nästa dag sattes en enda cellkoloni i ett falkonrör som innehöll 10 ml av lysogenbuljong (LB). Falkonröret inkuberades vid 37 °C under omrörning över natten.

Nästa morgon centrifugerades provet och bakterierna separerades från LB-lösningen. Därefter räknades antalet bakterier med ett Ultrospec 10 Cell Density Meter-instrument. 10 ml fosfatbuffrad koksaltlösning (PBS) tillsattes till bakterierna och mer PBS tillsattes till 1 ml bakterielösning tills önskad koncentration av bakterier uppnåddes (**Tabell 1, 2 och 8**). Denna utspädningsgrad noterades. Därefter framställdes en lösning med samma koncentration av bakterier och TSB (Tryptic Soy Broth) genom att suspendera 1 ml av den ursprungliga bakterielösningen i det tidigare er hållna utspädningsförhållandet.

För QCM-mätning av biofilmer ändrades pumpens flödes hastighet till 100 µl/min för att minska materialförbrukningen. QCM-mätningen utfördes i Biocity, så mätningförhållandena skiljde sig lite från Aurum. Mätningen påbörjades genom att först pumpa destillerat vatten i 10 min. Därefter pumpades bakterielösningen i 20 min. Under resten av mätningen pumpades TSB-lösning in i flödescellen. Efter att ha

tillsatts TSB-lösningen i 5 min stängdes flödescykeln, för att återcirkulera lösningen, för att bakterierna kunde cirkulera med TSB-lösningen under resten av mätningen. Detta innebär att samma lösning cirkulerade i systemet. Mätningen stoppades 24 h efter tillsättningen av bakterielösningen. Efter borttagning av kristallen renades QCM-systemet med etanol och vatten.

Tabell 1. Antal bakterier

Bakterie mätningar utan antibiotika	Bakterieutsädd (celler/ml)
1. Upprepning	$1,5 \cdot 10^7$
2. Upprepning	$1,7 \cdot 10^7$
3. Upprepning	$1,5 \cdot 10^7$

Efter att ha bekräftat med QCM-metoden att *S. aureus* bildar en biofilm kunde mätningar med antibiotika påbörjas. QCM gjorde det också möjligt att se hur adsorptionen av *S. aureus* på ytan såg ut under normala förhållanden och att jämföra detta tillstånd med hur den reagerade när antibiotika tillsattes. Vankomycin valdes som antibiotika eftersom det anses vara effektivt mot biofilmer och är det vanligaste antibiotika mot infektioner orsakade av *S. aureus* (Craft et al. 2019). Mätningen utfördes på samma sätt som tidigare, men 200 μ M antibiotikalösning började pumpas efter 6 h biofilmtillväxt. Flödescykeln stängdes efter 15 min för att återcirkulera lösningen, vilket möjliggjorde att antibiotikan kunde cirkulera i systemet i fram till 24 h efter att bakterierna tillsatts.

Tabell 2. Antal bakterier

Bakteriemätningar med antibiotika	Bakterieutsädd (celler/ml)
1. Upprepning	$1,2 \cdot 10^7$
2. Upprepning	$1,8 \cdot 10^7$
3. Upprepning	$1,1 \cdot 10^7$

Efter QCM-mätningarna analyserades den insamlade datan. Biofilmer har viskoelastiska egenskaper (Peterson et al. 2015). Lagringsmodulen eller den dynamisk styvheten G' beskriver materialets förmåga för att lagra energi elastiskt. Förlustmodulen G'' beskriver materialets förmåga för att skingra stress genom värme.

Tan δ är förhållandet mellan modulerna (G''/G') och det indikerar den relativa graden av energiförlust eller dämpning. (Franck 2017) Dataanalysen gav information om biofilmens tjocklek och dess viskoelastiska egenskaper. För dataanalysen användes programvaran som kom med instrumentet (KSV QCM-Z500). Den fundamentala harmoniska resonansfrekvensen användes inte för dataanalysen för att den ofta skiljer sig mycket från andra harmoniska resonansfrekvenser efter normalisering av resonansfrekvenser enligt deras mångfald. Dataanalysen gjordes med 3., 5., 7. och 9:e resonansfrekvensen. När dataanalysen gjordes för biofilmer användes parametrar för vattnets egenskaper vid 37 °C eftersom det finns vatten in i biofilmen och det ansågs vara en lämplig approximation av biofilmens egenskaper. De parametrar som användes för analysen visas i tabellerna 3–7 nedan. Resultaten analyserades ännu med envägs ANOVA-analysen i Excel med en 0,05 signifikansnivå ($\alpha=0,05$).

Tabell 3. Värdena för harmoniska resonansfrekvenser

	Fundamental
x	3. harmonisk
x	5. harmonisk
x	7. harmonisk
x	9. harmonisk
	11. harmonisk

Tabell 4. Ursprungliga egenskaper för medium

Densitet [g/cm]	0,9986	
Viskositet [mPas]	0,691	

Tabell 5. Viskoelastiska egenskaper för filmen

Densitet [g/cm ³]	0,9986	
Tjocklek [μ m]	1	x
G' [MPa]	0,1	x
G'' [MPa]	0,001	x

Tabell 6. styva filmegenskaper

Densitet [g/cm]	0,9986	
Tjocklek [μm]	0,1	
	Använda när modellering	x

Tabell 7. Egenskaper för resonatorn

f_0 [MHz]	4,95000
Densitet [g/cm^3]	2,648
μ [N/m^2]	$2,947 \cdot 10^{10}$
C_1 [fF]	13,600
	Börja analysen från ändan

5.2.4 SPR-mätningarna med *S. aureus*

Innan SPR-mätningarna påbörjades, rengjordes den guldbelagda SPR sensorn på samma sätt som QCM-sensorn. Innan mätningen påbörjades torkades sensorns glassida av med etanol. Alla fyra flödeskanalerna användes i mätningarna. Innan mätningen påbörjades fylldes flödeskanalerna med TSB. I början av mätningen tillsattes TSB:n med en hastighet av $50 \mu\text{l}/\text{min}$, eftersom för mycket luftbubblor skulle ackumuleras i en långsammare hastighet. Den första mätningen behövde dock upprepas på grund av bubbelbildning. Lösningarna som tillsattes för nästa mätning förvarades i ett vattenbad på samma sätt som för QCM-mätningarna för att förhindra bubbelbildning. De första 5 min av mätningen tillsattes TSB-lösning, varefter bakterielösningen tillsattes i 20 min. TSB-lösningen tillsattes sedan fram till slutet av mätningen, det vill säga tills 24 h hade förflutit sedan starten av bakteriemätningen. 15 min efter det att TSB-lösningen börjades tillsätta, återcirkulerades lösningen i systemet.

Efter att ha bekräftat med SPR-metoden att *S. aureus* bildar en biofilm kunde mätningar med antibiotika påbörjas. Vankomycin valdes som antibiotika för att resultaten kunde jämföras med QCM-mätningarna. Mätningen utfördes på samma sätt som tidigare, men $200 \mu\text{M}$ antibiotikalösning tillsattes efter 6 h biofilmtillväxt. Efter 15 min stängdes flödescykeln för att återcirkulera lösningen, vilket möjliggjorde att

antibiotikan kunde cirkulera i systemet fram till 24 h efter början av bakteriellmatning. Efter mätningen togs sensorn bort och SPR-systemet tvättades först med Hellmanex (5 %) i 5 min, sedan med etanol (70 %) i 5 min och slutligen med MilliQ-vatten i 5 min. Hellmanex är ett alkaliskt vätskekoncentrat som användas för att rena kvarts- och glasceller.

Tabell 8. Antal bakterier

Bakteriemätningar	Bakterieutsädd (celler/ml)
1. Upprepning	$1,2 \cdot 10^7$
Bakteriemätningar med antibiotika	Antal av bakterierna (celler/ml)
1. Upprepning	$1,2 \cdot 10^7$

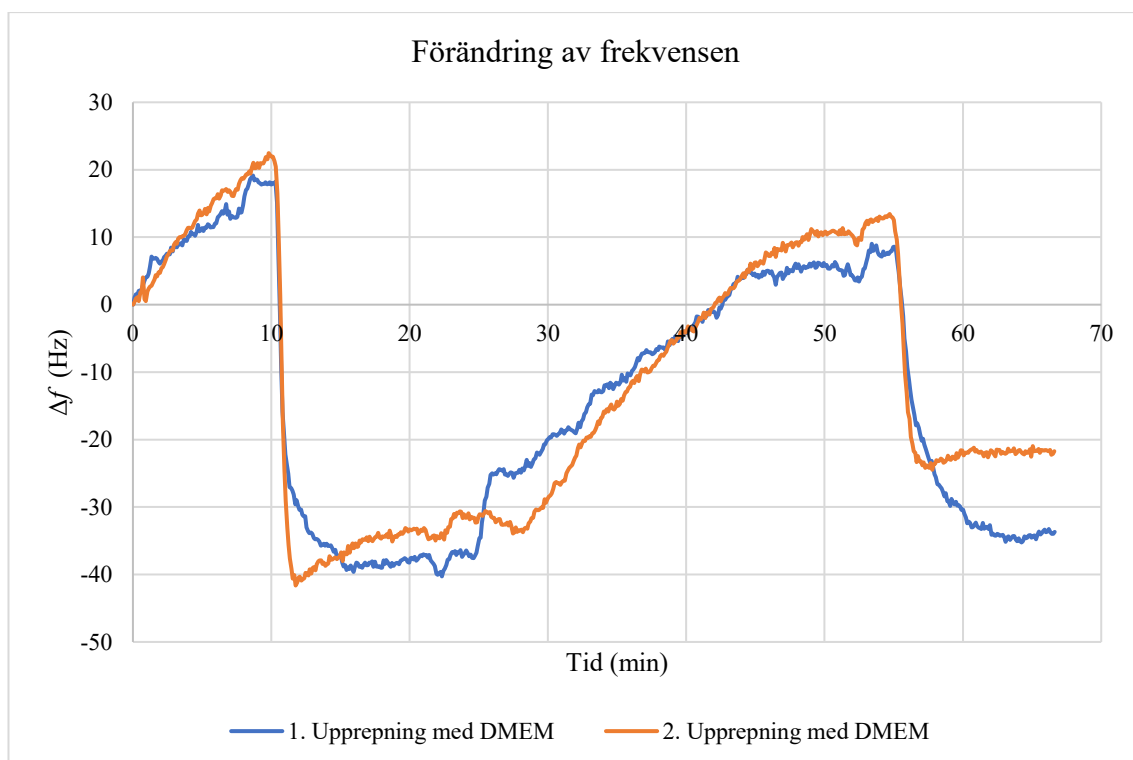
5.2.5 SEM-avbildning efter mätningarna

Efter mätningarna fixerades provet för SEM-avbildning genom att försiktigt skölja QCM- och SPR-sensorerna i PBS-lösning, varefter kristallen placerades i 4% formaldehydlösning (suspenderad i PBS) i 30 min. Kristallen sköljdes sedan försiktigt med PBS och slutligen med MilliQ-vatten. Kristallen fick sedan torka vid rumstemperatur, varefter kristallen placerades i en petriskål i ett kylskåp för att vänta på SEM-avbildning. Innan avbildningen ytbelagdes sensorerna med platina. SEM-bilderna togs i Top Analyticas anläggning med deras SEM-EDS-enhet.

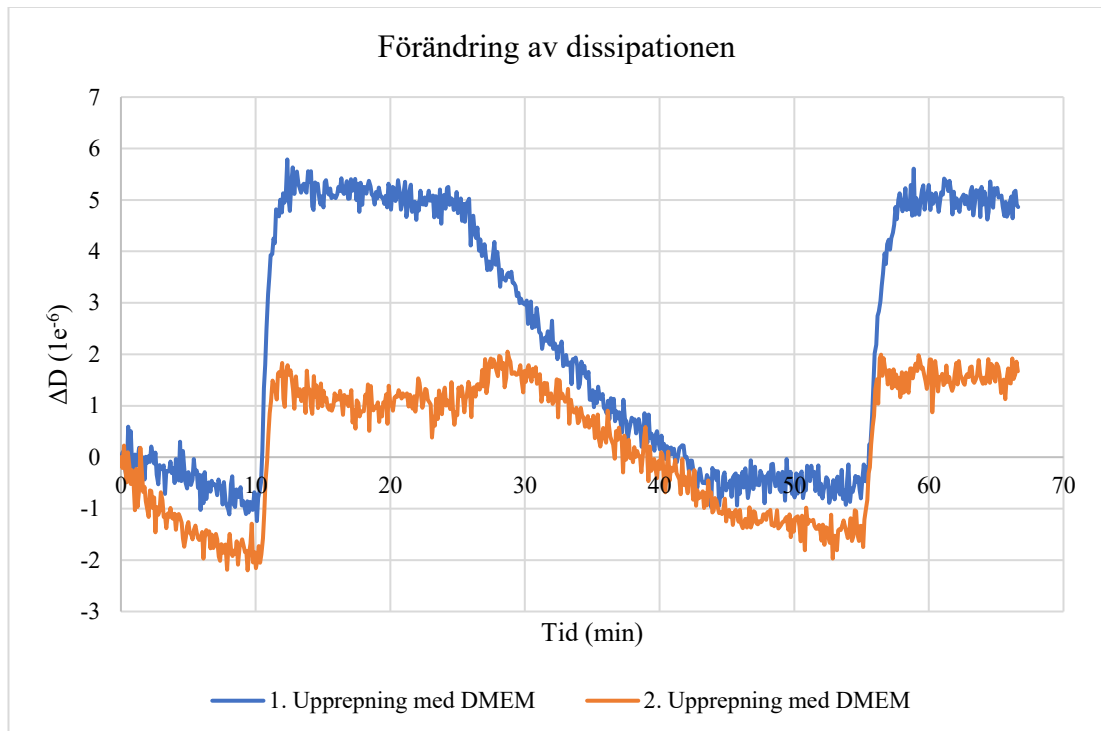
6 Resultat och diskussion

6.1 Proteinadsorption

Proteinadsorptionen testades först med QCM. **Figur 8** visar en snabb minskning av resonansfrekvensen då proteinerna (100 % DMEM-lösningen) adsorberas på sensorytan omkring 10 min. Efter 15 min byttes lösningen tillbaka till vatten och resonansfrekvensen började öka långsamt med tiden. Detta betyder att proteinerna desorberade från sensorytan när flödescellen fylldes med vatten. Lösningen byttes återigen till DMEM och omkring 55 min började proteinerna igen att snabbt adsorbera på sensorytan, men resonansfrekvensen sjönk inte till samma nivå som innan injektionen av DMEM. Skillnaden är cirka 10 Hz vilket är en signifikant skillnad. Detta betyder att det förblir proteiner på ytan, det vill säga, en del proteiner adsorberas irreversibelt på ytan. Eftersom proteiner endast har en svag adsorption till sensorytan är det en fråga om fysisorption där molekylerna adsorberades till ytan med hjälp av van der Waals krafter (Karge och Weitkamp 2008).

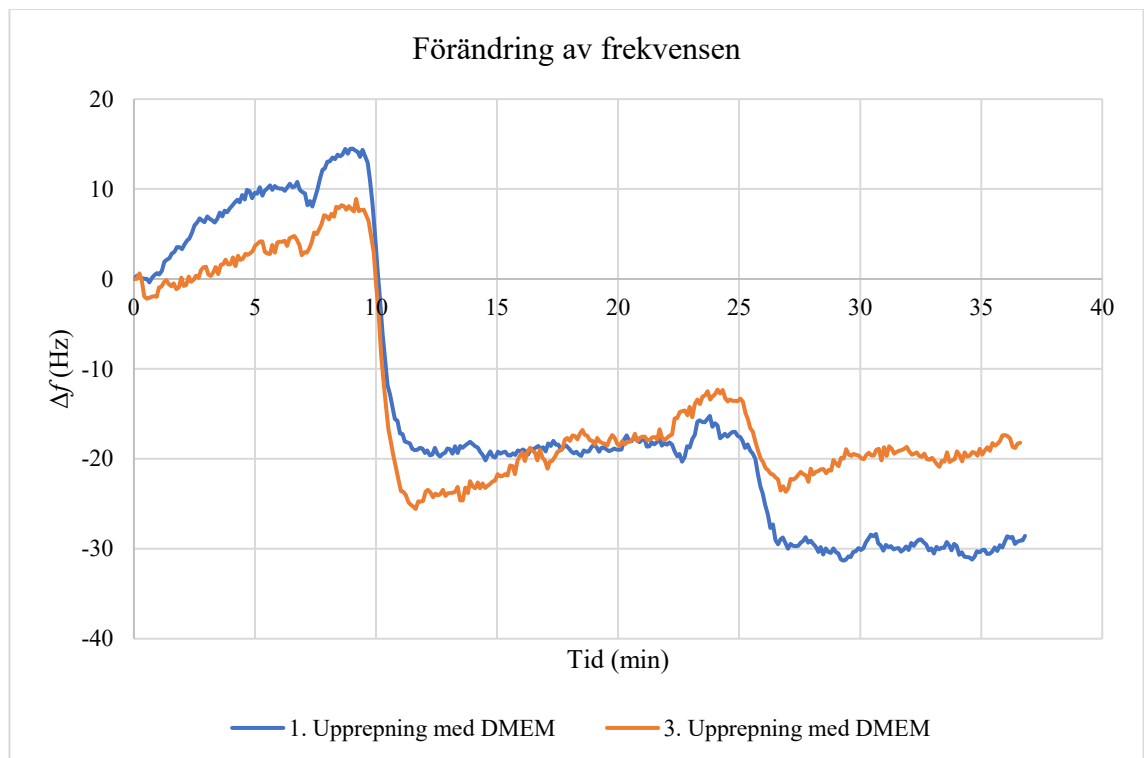


Figur 8. Förändring av den 3:e harmoniska resonansfrekvensen när proteinerna i 100 % DMEM adsorberas och desorberas.

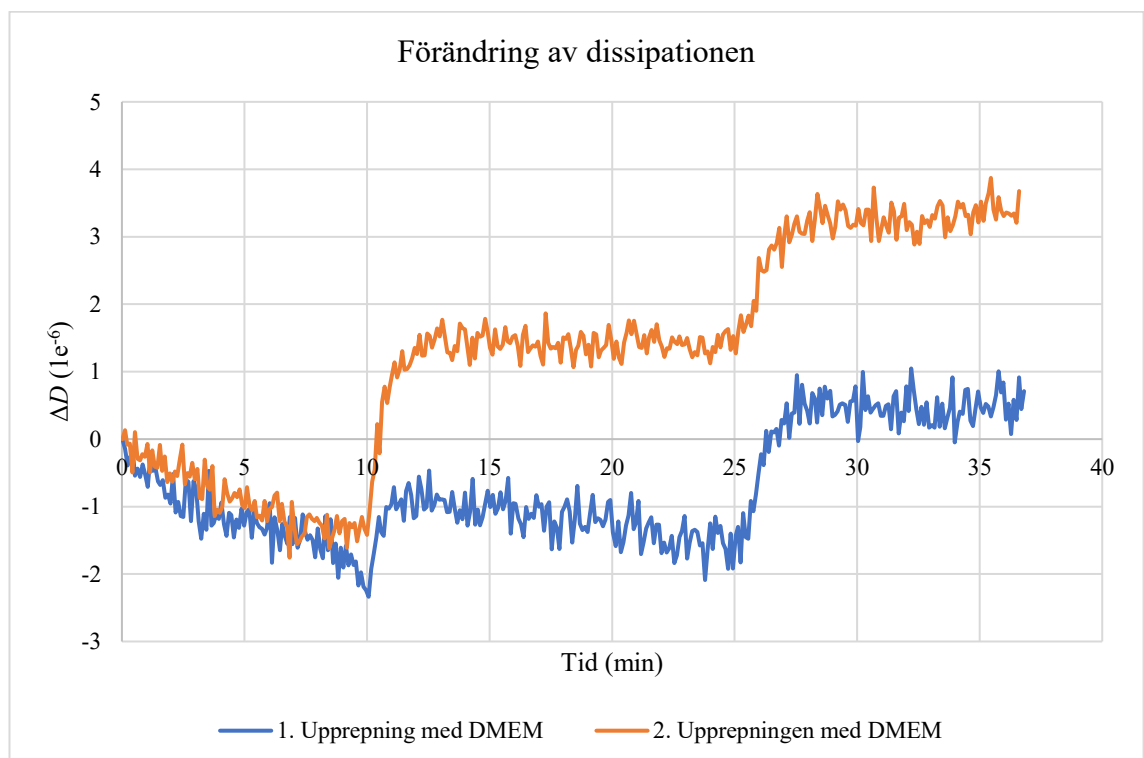


Figur 9. Förändring av dissipationen för den 3:e harmoniska resonansfrekvensen när proteinerna i 100 % DMEM adsorberas och desorberas.

Efter den första mätningen monitorerades adsorptionen av proteiner i två olika koncentrationer med QCM. **Figur 10** visar att resonansfrekvensen börjar att minska omkring 10 min efter tillsättning av 50 % DMEM-lösningen. Grafen visar också att resonansfrekvensen sjönk ytterligare när 100 % DMEM-lösning tillsattes 10 min senare. Grafen visar att när 50 % DMEM-lösning tillsattes var förändringen i frekvens större än när 100 % DMEM-lösning tillsattes. Detta kan bero på att 50 % DMEM-lösningen redan i praktiken bildade nästan ett saturerat skikt av proteiner på ytan och att det därför inte adsorberades mera proteiner på ytan när koncentrationen höjdes. Frekvensförändringen mellan de olika faserna kan beräknas från grafen. Skillnaderna räknades ut från den högsta resonansfrekvensen av vatten och 100 % DMEM-lösning.



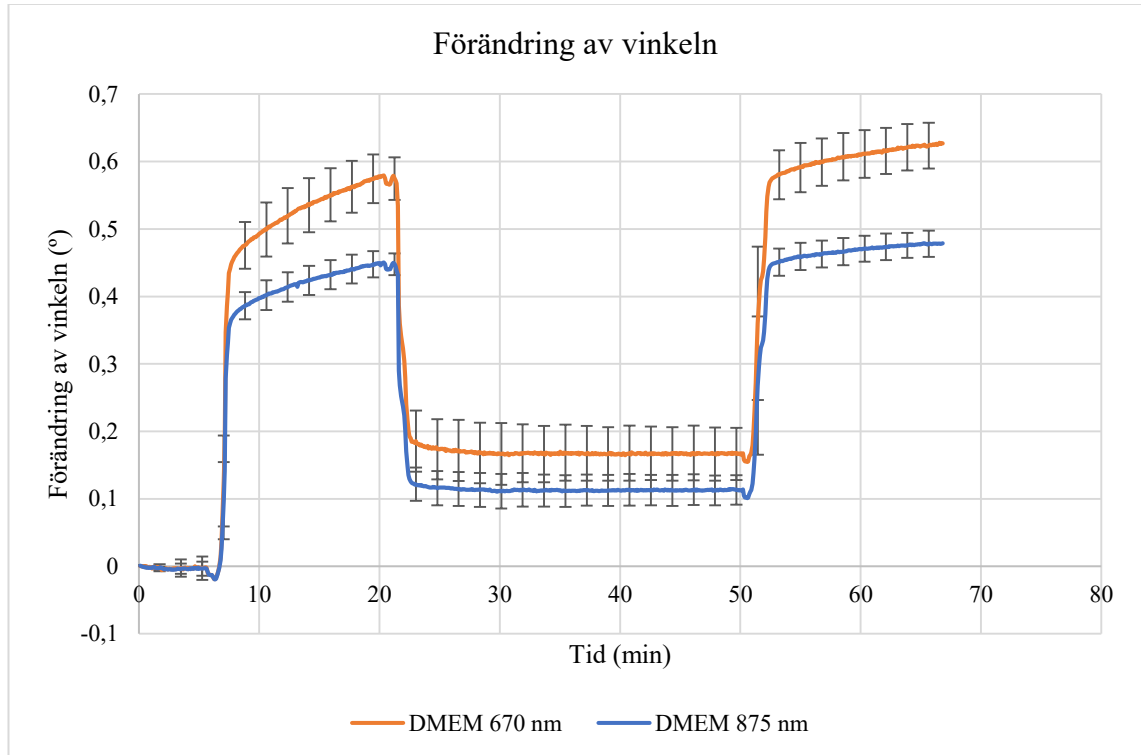
Figur 10. Förändring av den 3:e harmoniska resonansfrekvensen när proteinerna i 50 % och 100 % DMEM-lösningen adsorberas.



Figur 11. Förändring av dissipationen för den 3:e harmoniska resonansfrekvensen när proteinerna i 50 % och 100 % DMEM adsorberas.

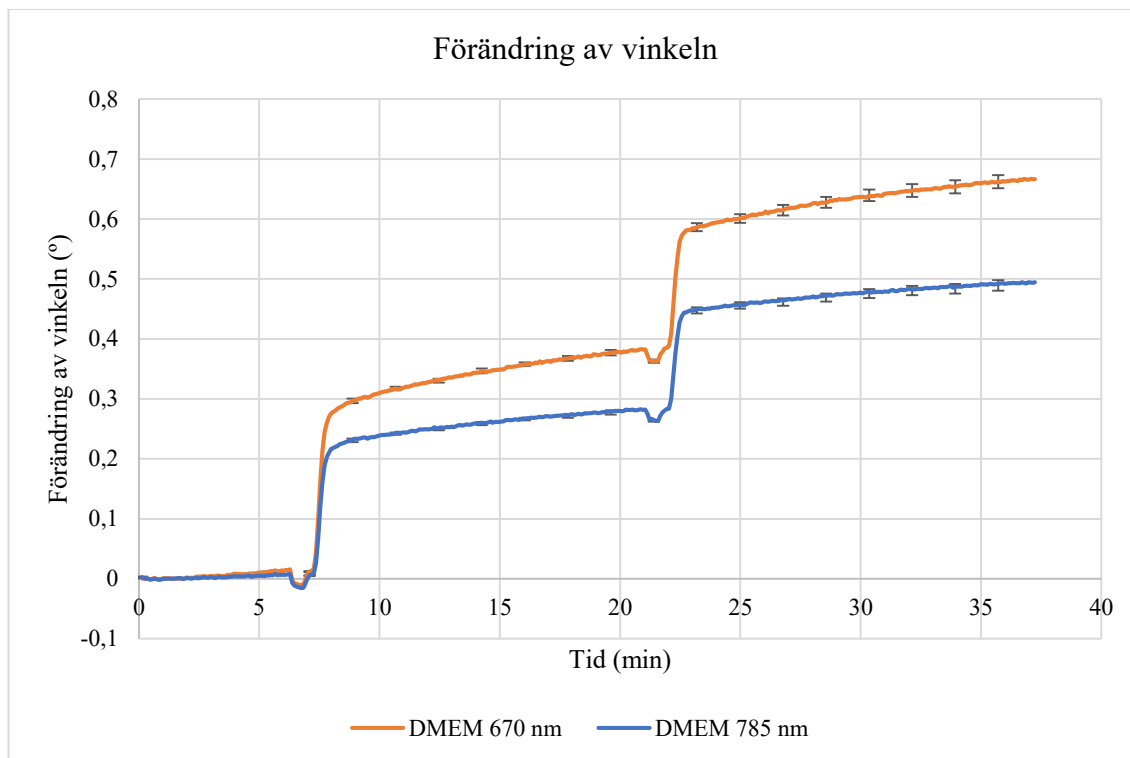
QCM-kristallerna som användes hade en fundamental resonansfrekvens på 5 MHz. Frekvensförändringen för den 3:e harmoniska resonansfrekvensen (15 MHz) varierade mellan 30–63 Hz i upprepningarna, vilket leder till att frekvensförändringen är under 2,0 % av den ursprungliga resonansfrekvensen. Enligt förklaringen i kapitlet 5.1.1 betyder detta att det adsorberade proteinlagret kan betraktas som tunt. Förändringen av dissipationen varierade mellan 3,2–7,1 (**Figur 9 och 11**), vilket tyder på att proteinlagret inte var stelt. Detta kan också bestämmas från ekvation (3).

SPR-mätningarna utfördes med DMEM-lösning på samma sätt som QCM-mätningarna, så att de kunde jämföras med varandra. **Figur 12 och 13** visar att proteinerna adsorberades på guldsensorns yta på samma sätt vid SPR-mätningarna som de adsorberades vid QCM-mätningarna. **Figur 12** visar att resonansvinkeln började öka efter att 100 % DMEM-lösning tillsattes. När vatten tillsattes efter den 100 % DMEM-lösningen sjönk resonansvinkeln närmare den ursprungliga nivån. När DMEM-lösningen tillsattes igen började resonansvinkeln öka igen. Liksom i QCM-mätningarna kunde proteinadsorption observeras i SPR-mätningar när DMEM-lösningen kom in i flödecellen, men byte av lösningsmedlet påverkar också brytningsindexen, vilket därmed kan påverka resonansvinkeln. När vatten tillsattes istället för 100 % DMEM-lösningen kunde desorption av proteiner observeras, men alla proteiner lossnade inte från sensorytan. Detta kan ses av grafen genom att resonansvinkeln aldrig sjunker till sin ursprungliga nivå efter tillsättningen av vatten. Proteinerna började återigen adsorbera till ytan efter tillsättningen av 100 % DMEM-lösningen en andra gång.



Figur 12. Förändring av SPR resonansvinkeln när proteinerna i 100 % DMEM adsorberas.

Proteinadsorptionen testades också med hjälp av SPR-metoden, vilket innebar att man efter att ha tillsatt vatten först tillsatte 50 % DMEM-lösning och sedan utspädd DMEM-lösning (100 %). **Figur 13** visar att resonansvinkeln började öka när proteinerna började adsorbera. Resonansvinkeln ökade med ungefär hälften efter matningen av 50 % DMEM-lösning jämfört med resonansvinkeln efter matningen av 100 % DMEM-lösning, vilket är i enlighet med resultaten från QCM-mätningarna.



Figur 13. Förändring av SPR resonansvinkeln när proteinerna i 50 % och 100 % DMEM adsorberas.

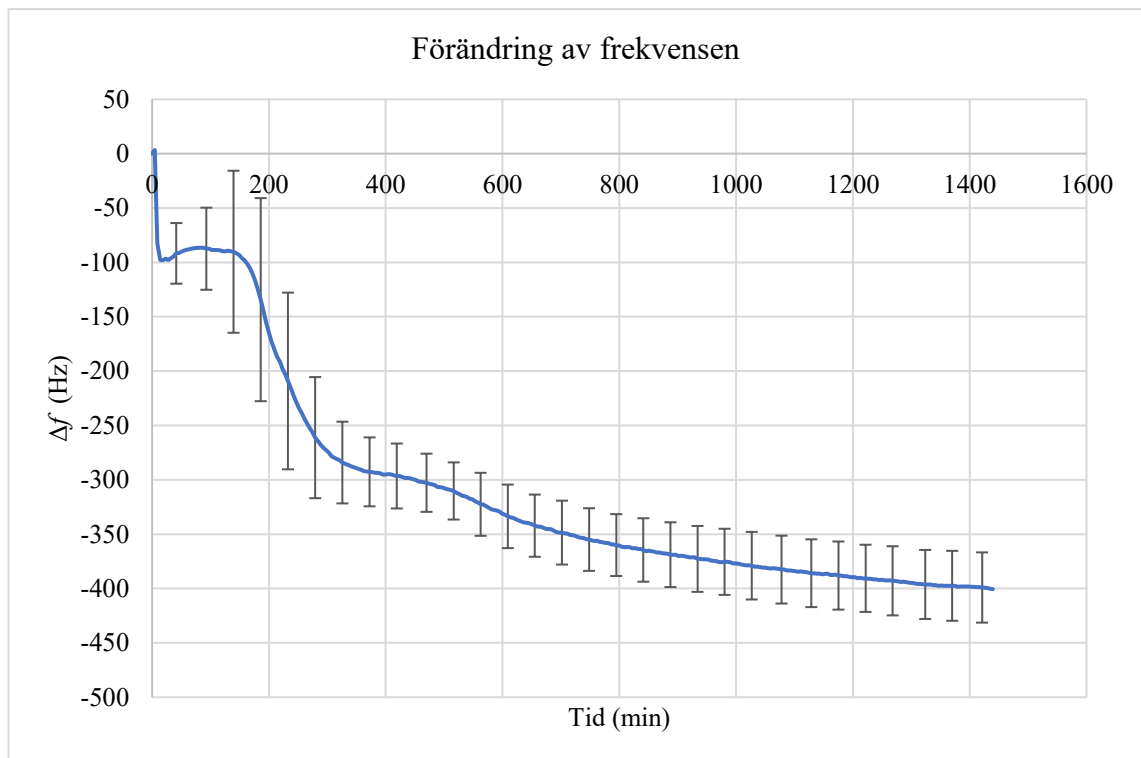
Resultaten av QCM- och SPR-mätningarna med DMEM-lösningen stöder varandra. I båda mätningarna observerades att proteiner började adsorbera på sensorytan när lösningen kom in i flödescellen. Båda resultaten visade också att när lösningen byttes till vatten efter matningen av proteinlösningen började proteinerna desorbera. Graferna från båda mätningarna visar att när proteiner adsorberas på sensorytan är det fråga om fysisorption och en del av proteiner adsorberas irreversibelt

6.2 Biofilmbildning

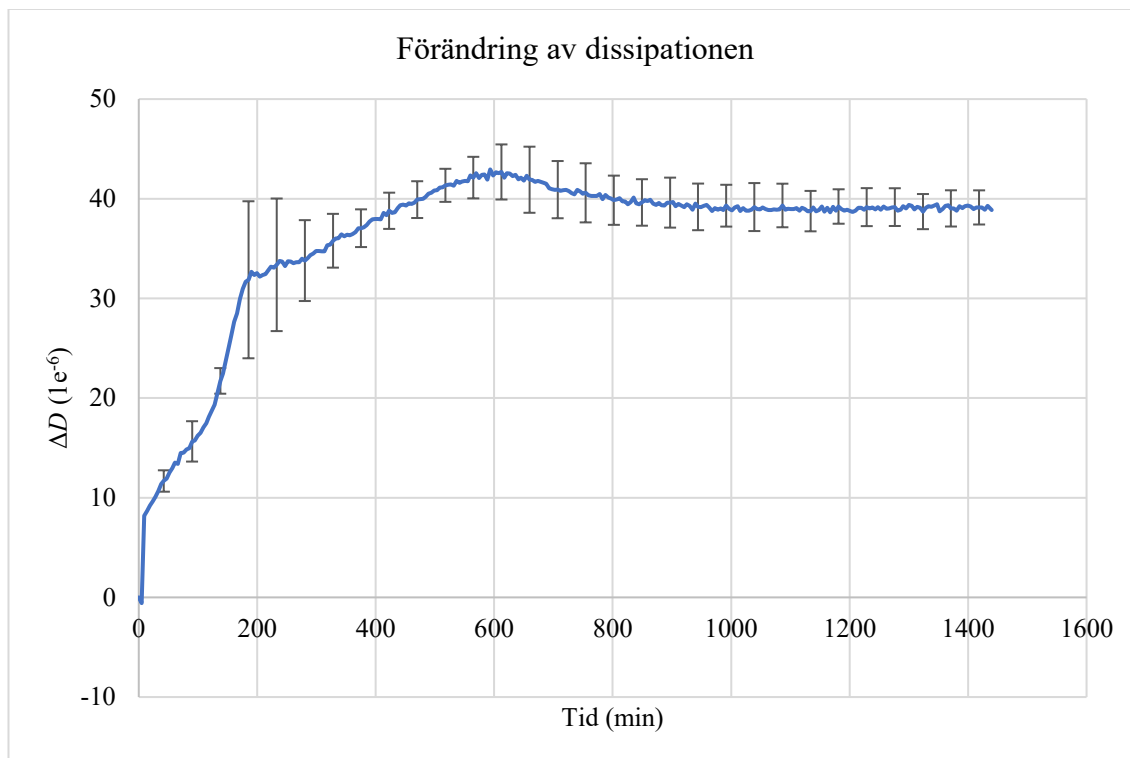
6.2.1 QCM-mätningarna med *S. aureus*

QCM-mätningarna visade att biofilmen börjar växa ovanpå sensorn. **Figur 14** visar att när bakterierna började adsorbera på sensoryta ökade resonansfrekvensen under cirka 150–180 min. Eftersom bakteriernas adsorption till ytan följer oscilleringsteorin, är resonansfrekvensen beroende av hur styv bindningen mellan ytan och bakterierna är. Efter ökningen av resonansfrekvensen började resonansfrekvensen sjunka och resonansfrekvensen sjönk med tiden. Frekvensminskningen beror troligen på att den extracellulära matrisen följer massbelastningsteorin, enligt vilken resonansfrekvensen

minskar med ökande massa. När biofilmen mognar börjar den bilda en extracellulär matris, och när mängden av matris ökar börjar massbelastningsteorin påverka resonansfrekvensen mer än den oscillerande teorin. Resonansfrekvensens minskningshastighet saktar med tiden när biofilmen mognar och dess massa ökar inte i samma takt som i början. **Figur 15** visar att dissipationen ökade fram till 600 min, varefter den började sjunka lite och planade sedan ut.



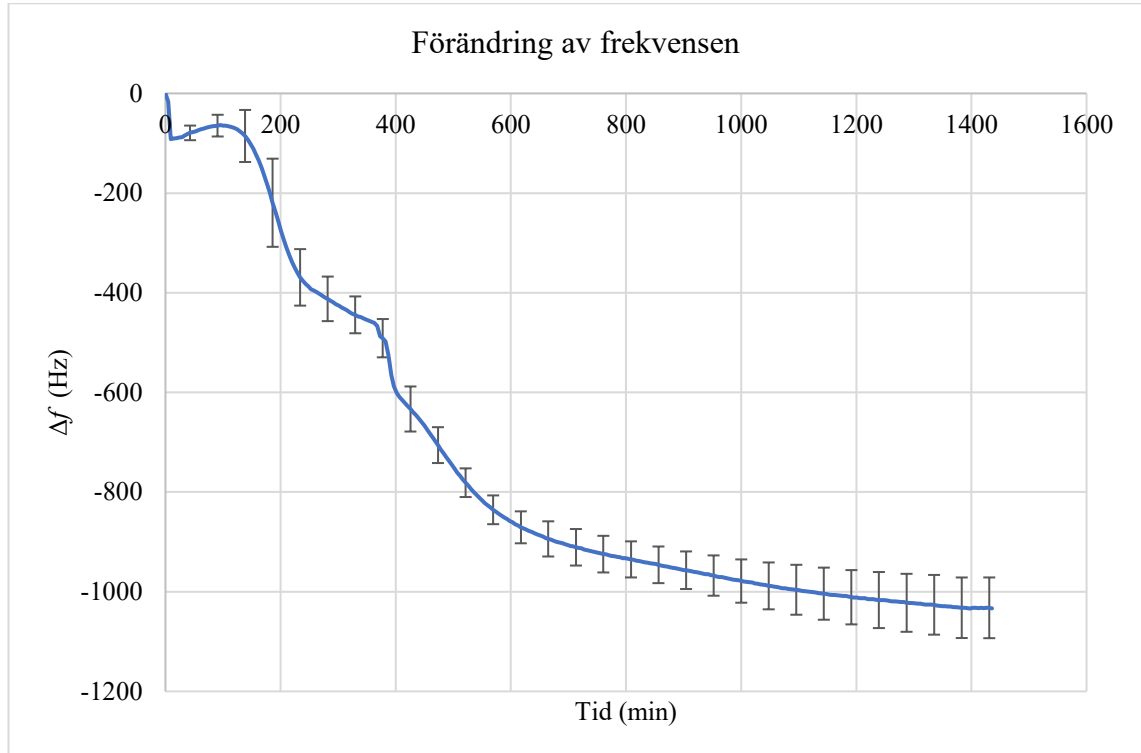
Figur 14. Förändring av resonansfrekvensen under biofilmbildningen. Tillsättningen av bakterier började vid tidpunkt 0 min.



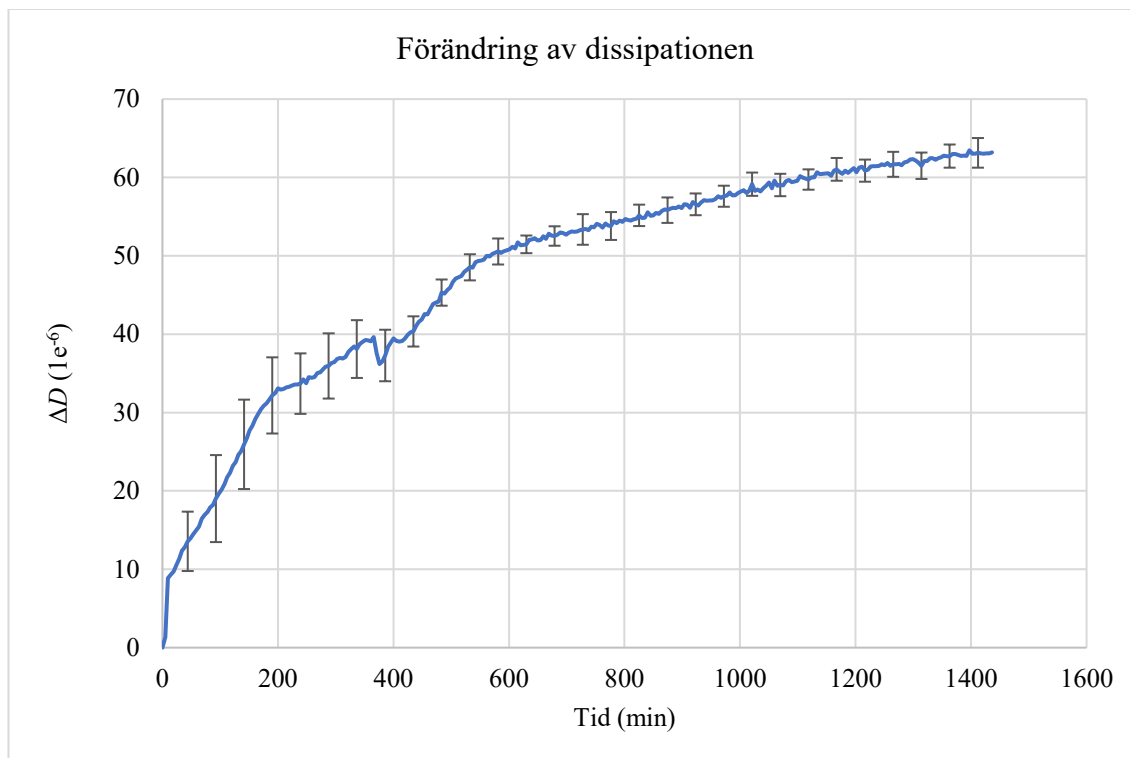
Figur 15. Förändring av dissipationen under biofilmbildningen. Tillsättningen av bakterier började vid tidpunkt 0 min.

Resultaten av de tre mätningarna utan antibiotika var relativt enhetliga, nästa steg var därför att göra mätningar med antibiotikan. Mätningarna utfördes på samma sätt som tidigare, men 200 μM antibiotikalösning tillsattes i systemet efter 6 h av biofilmbildningen. Efter 15 min stängdes flödescykeln, vilket gjorde att antibiotikan kunde verka i systemet fram till 24 h efter starten av bakteriematningen. **Figur 16** visar att biofilmbildningen påverkar resonansfrekvensen på ungefär samma sätt som tidigare. Men efter tillsatsen av antibiotikan minskar resonansfrekvensen kraftigt och frekvensförändringen i slutet av mätningen är minst dubbelt så stor som i de tidigare mätningarna. **Figur 17** visar att dissipationen fortsatte att öka efter tillsättningen av antibiotika. Antibiotika kan ha orsakat komprimering av biofilmen och lett till en tätare biofilm, vilket kan ha ökat dissipationen. Minskning av frekvensen är inte endast beroende av massan. Om den adsorberade filmens viskoelasticitet ökar kan detta också leda till en drastisk minskning av frekvensen. Resultaten av QCM-mätningen tyder på att antibiotikan dödade en del av bakterierna varefter de lossnade från biofilmen och lämnade tomrum i den extracellulära matrisen. Detta ledde till att extracellulära matrisen kollapsade delvis men det blev också mer viskoelastisk på grund av en lösare

matrisstruktur, medan de överlevade bakterierna fortsatte att öka sig och bildade mera extracellulär matris.



Figur 16. Förändring av resonansfrekvensen under biofilmbildningen. Tillsättningen av bakterier började vid tidpunkt 0 min och tillsättningen av antibiotika började vid tidpunkt 360 min.

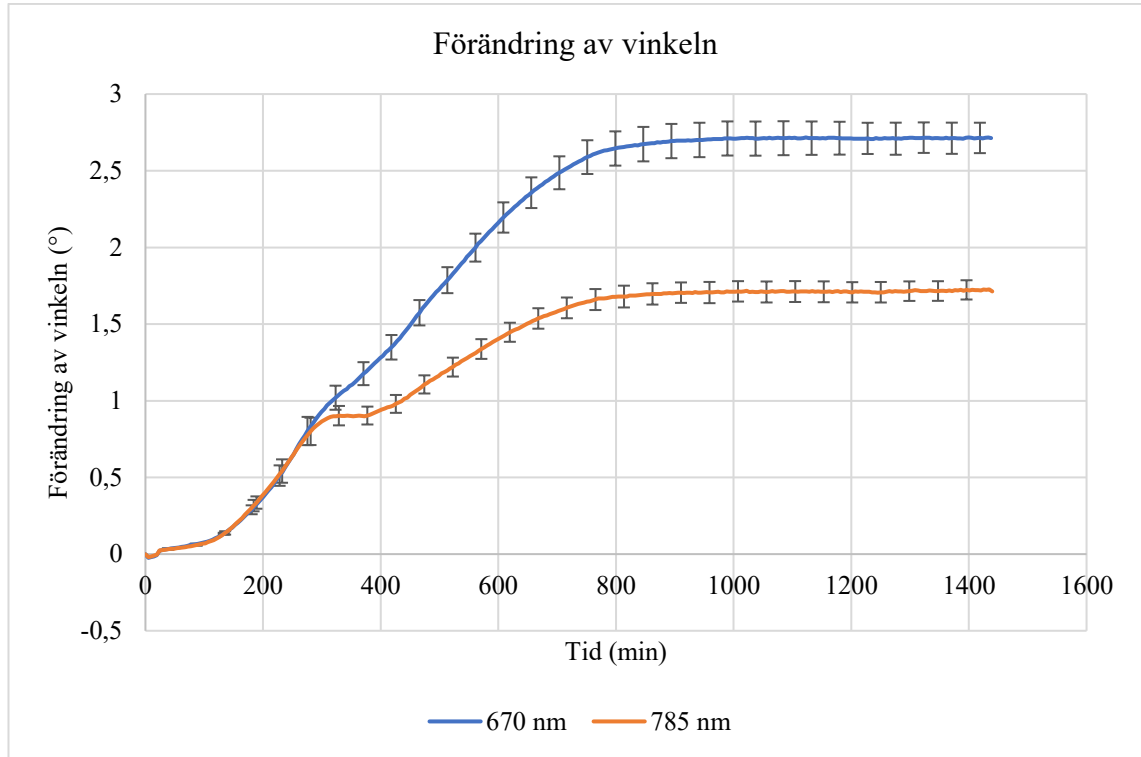


Figur 17. Förändring av dissipationen under biofilmbildningen. Tillsättningen av bakterier började vid tidpunkt 0 min och tillsättningen av antibiotika började vid tidpunkt 360 min.

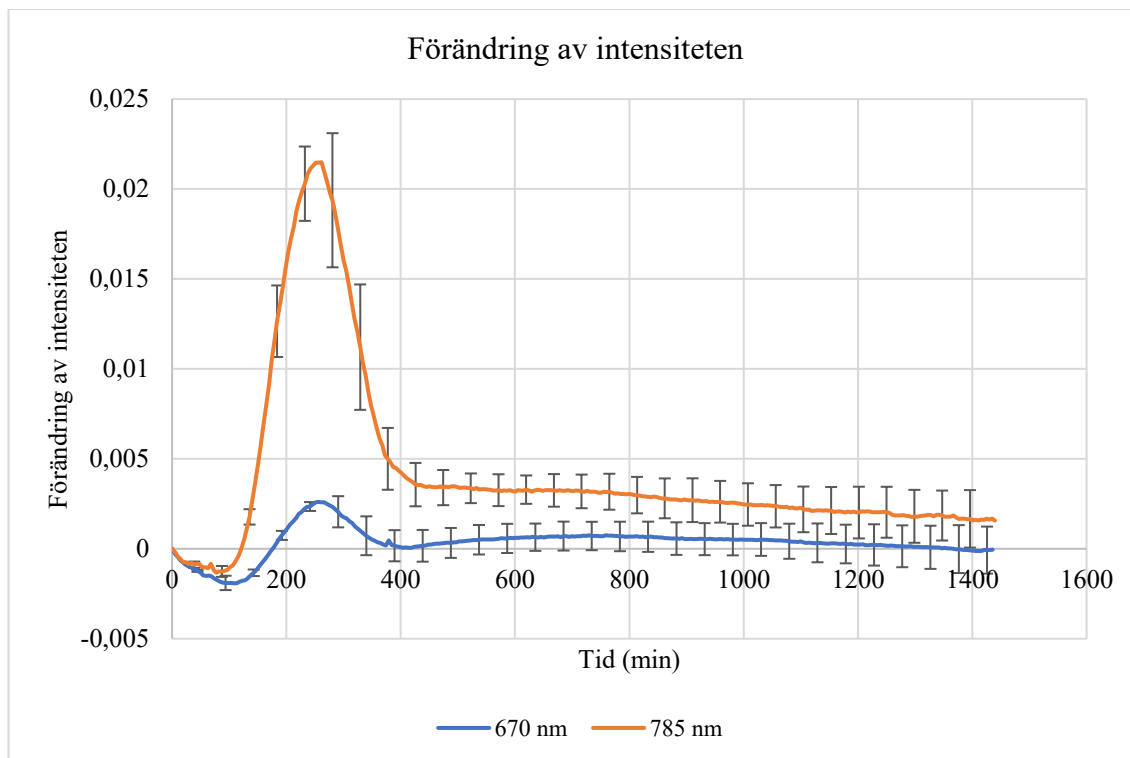
6.2.2 SPR-mätningarna med *S. aureus*

SPR-mätningarna visade att biofilmen börjar växa ovanpå sensorn. **Figur 18** visar att resonansvinkeln ökade upp till 800 min och förblev stabil därefter planerade den ut till en konstant nivå. Även omkring 300 min höll resonansvinkeln sig stabil en stund och började sedan öka igen. Samtidigt nådde intensiteten sin högsta nivå och minskade sedan tills resonansvinkeln började öka igen. **Figur 19** visar att intensiteten nådde sin högsta nivå omkring 275 min och minskade närmare sin ursprungliga nivå vid omkring 400 min. Graferna (**Figur 18 och 19**) tyder på att biofilmen började först att bilda öar av bakteriekolonier omkring 100 min. När intensiteten nådde sin högsta punkt började bakterierna att producera den extracellulära matrisen, vilket leder till att intensiteten började sjunka då matrisen började fylla tomrummet mellan öarna av bakteriekolonierna. När intensiteten hade återgått ungefär till sin ursprungsnivå (cirka 400 min) täckte biofilmen hela sensorytan. Efter detta fortsatte bakterierna att föröka sig och de bildade mera extracellulär matris ändå tills bakteriefilmen mognade och signalen planade ut omkring 800 min. På grund av att luftbubblor störde mätningarna

var endast en mätning utan antibiotika och en mätning med antibiotika utan luftbubblor framgångsrika, och därför visar graferna medeltalet av tre flödeskanaler från en mätning.

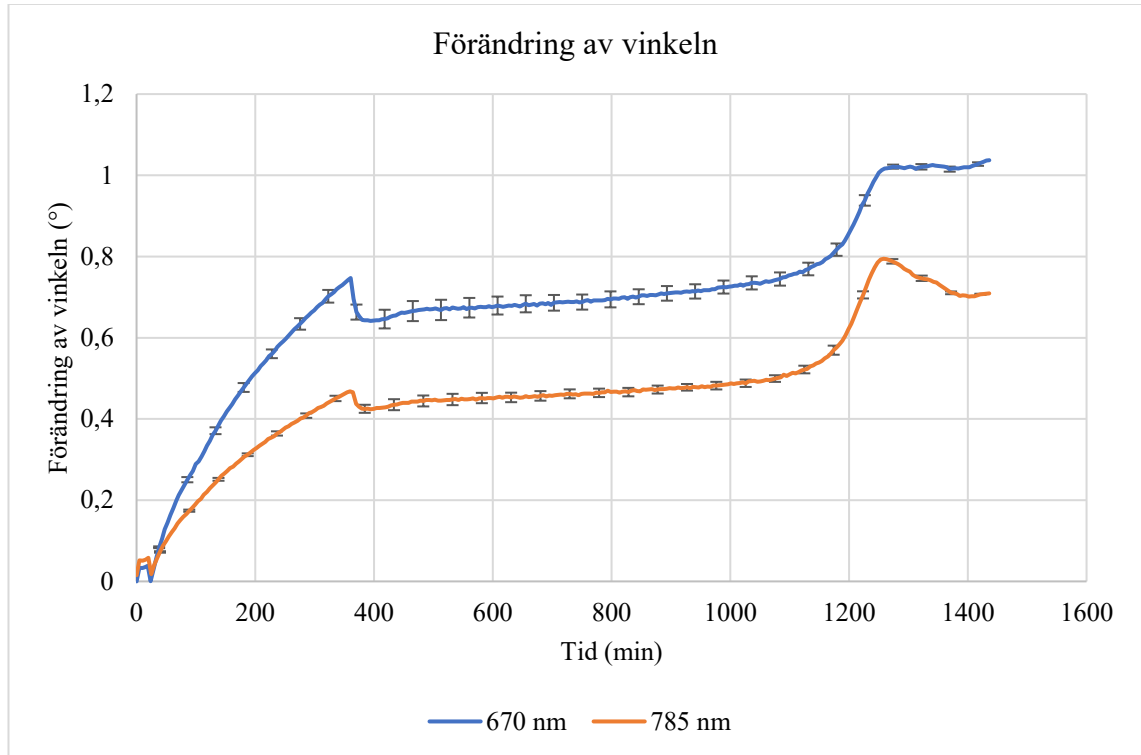


Figur 18. Förändring av resonansvinkeln under biofilmbildningen. Tillsättningen av bakterier började vid tidpunkt 0 min.

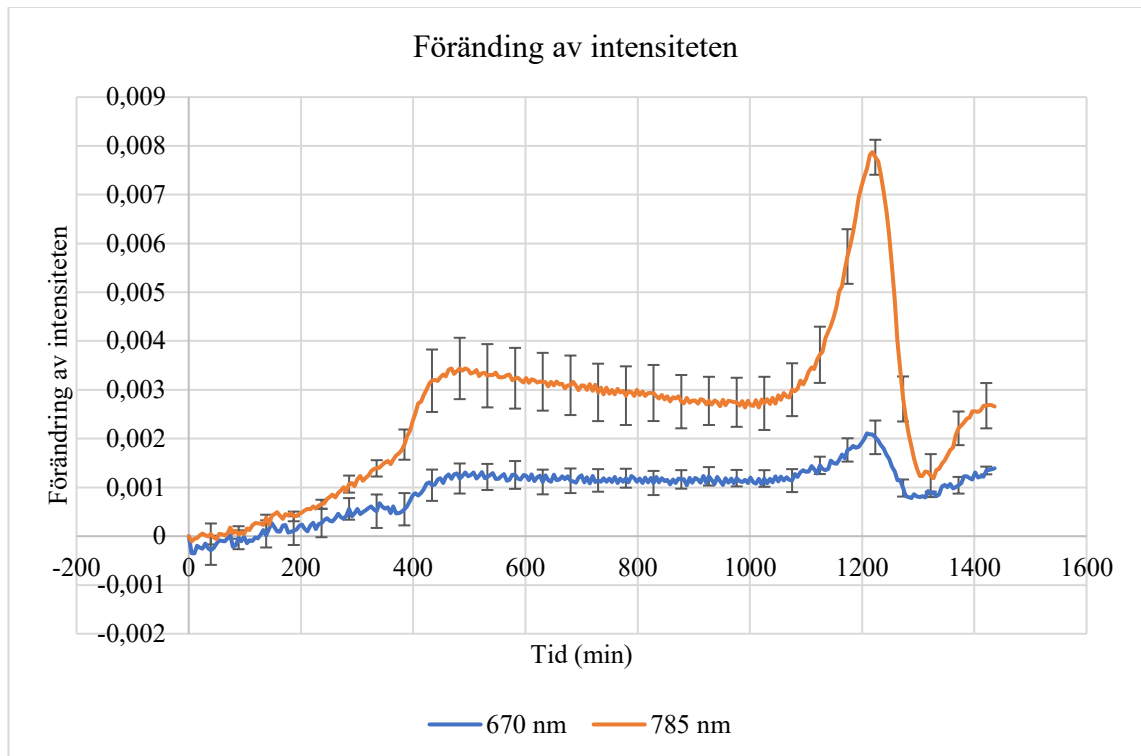


Figur 19. Förändring av intensiteten under biofilmbildningen. Tillsättningen av bakterier började vid tidpunkt 0 min.

Antibiotika tillsattes när biofilmen hade bildats i 6 h (360 min). **Figur 20** visar att biofilmen har vuxit på samma sätt som vid mätningen utan antibiotika fram till 360 min. När antibiotika tillsattes till systemet började resonansvinkeln sjunka. Detta tyder på att en del av bakterierna hade dött. Resonansvinkeln planade ut snabbt och förblev ganska stabil fram till 1100 min då resonansvinkeln började växa kraftigt. Detta indikerar att biofilmen började att växa igen efter 1100 min. Stabil resonansvinkel tyder på att mängden av materialet höll sig konstant under antibiotika behandling. Detta kan endast förklaras med att en del av bakterierna dödades och lossnade från den extracellulära matrisen, medan andra bakterier överlevde och förökade sig samtidigt som de producerade extracellulär matris. Efter 1270 min började resonansvinkeln stabilisera/minska igen tills mätningen slutade. **Figur 21** visar att intensiteten nådde en maximal nivå vid cirka 1220 min och sjönk nära sin ursprungliga nivå vid cirka 1300 min, vilket visar när biofilmen täckte hela sensorytan. Detta indikerar att antibiotikan hade saktat ner biofilmbildningen.



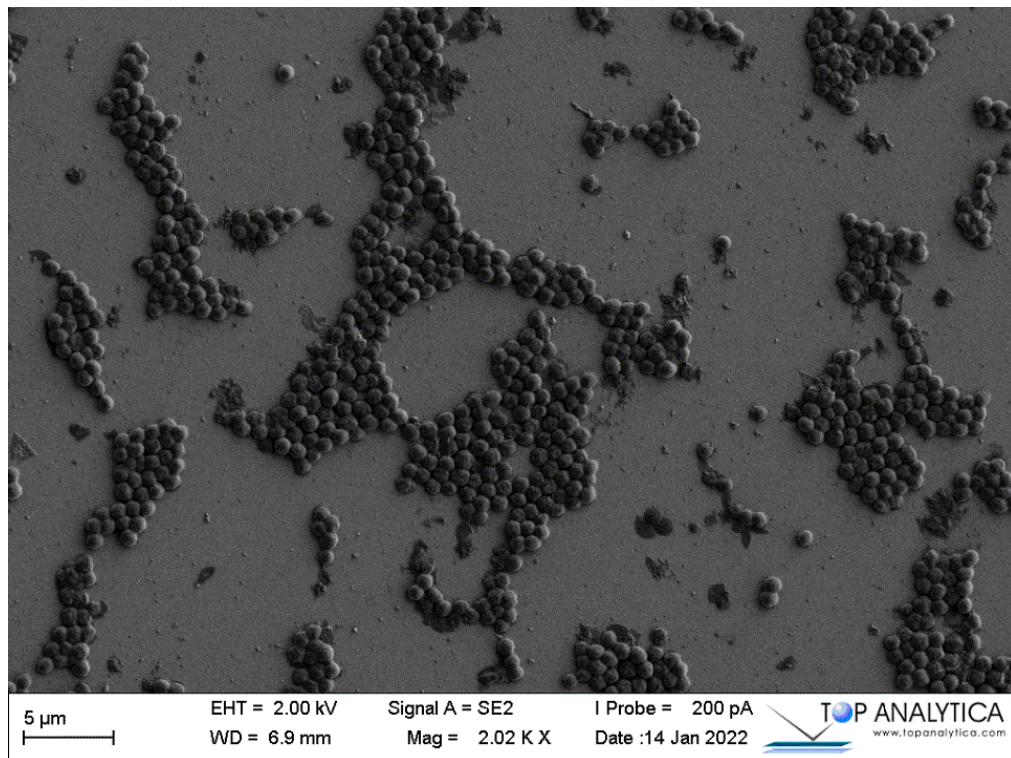
Figur 20. Förändring av resonansvinkeln under biofilmbildningen. Tillsättningen av bakterier började vid tidpunkt 0 min och tillsättningen av antibiotika började vid tidpunkt 360 min.



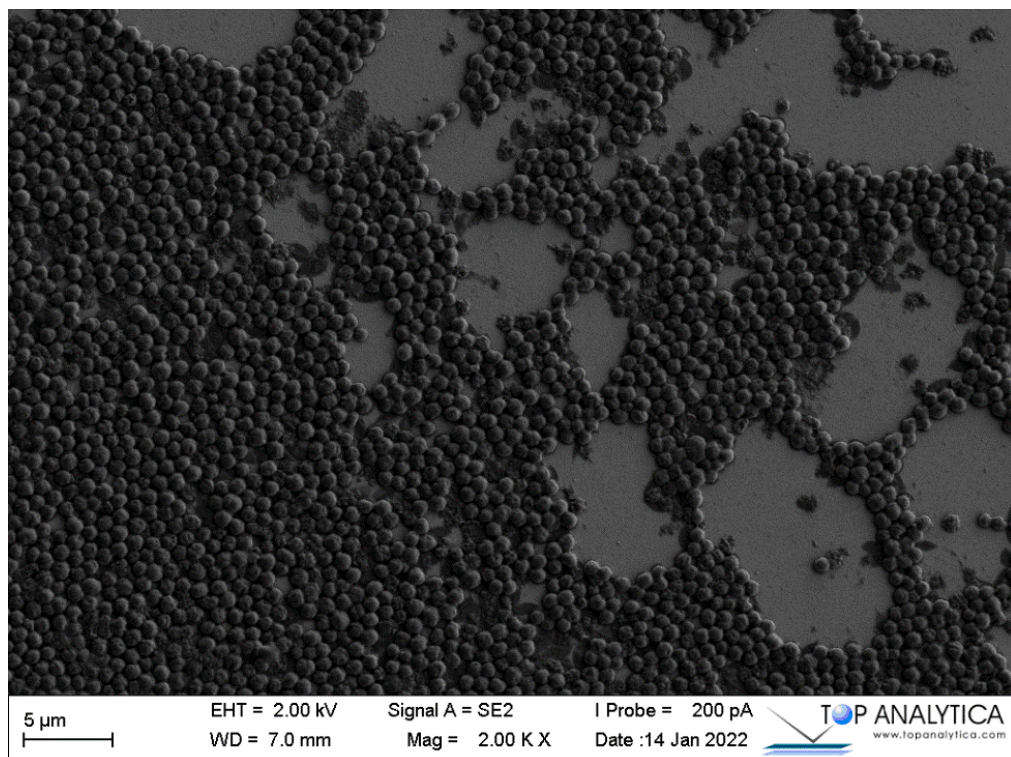
Figur 21. Förändring av intensiteten under biofilmbildningen. Tillsättningen av bakterier började vid tidpunkt 0 min och tillsättningen av antibiotika började vid tidpunkt 360 min.

6.2.3 SEM-avbildning efter mätningarna

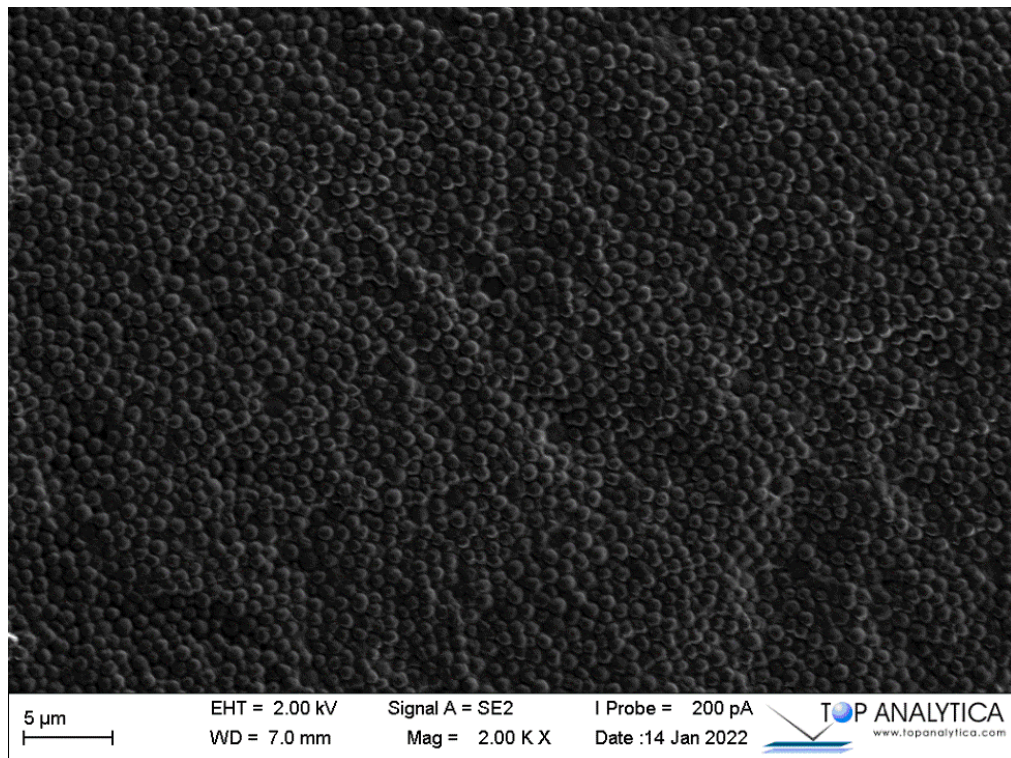
SEM-bilderna visade att bakterierna hade adsorberats på QCM- och SPR-sensorernas yta inom 24 timmar. Biofilmbildningen var inte homogen över hela sensorytorna, utan bakterierna var tätare i vissa områden än i andra. **Figurerna 22–28** visar att det finns många enstaka bakterier (0,5–1,0 μm), som ofta förekommer i grupper. Densiteten av bakterierna varierade mycket. SEM-bilderna visade också att bakterierna deformerades av antibiotika efter 18 h. **Figurerna 26–28** visar att i en del av bakterier hade membranet brutit och de ser ”ihåliga” ut. Detta indikerar att dessa bakterier är döda och att dom har tömts på sitt innehåll, vilket stöder den tidigare tolkningen ifrån QCM och SPR resultaten.



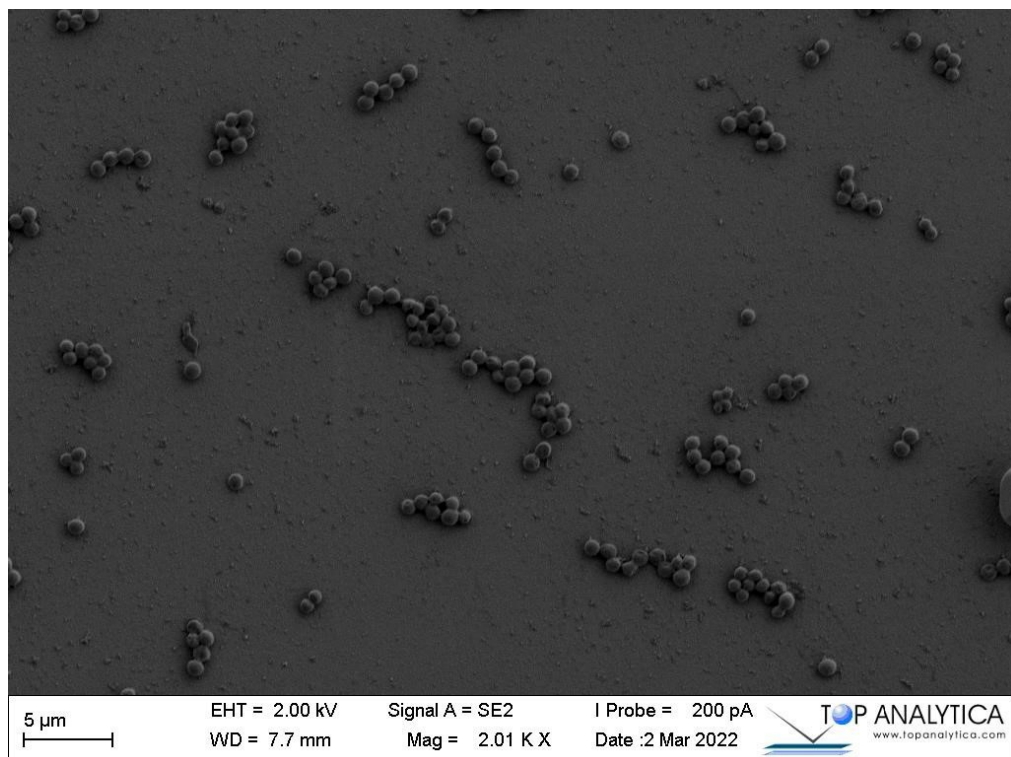
Figur 22. SEM-bild av biofilmen efter 24 h tillväxt (QCM).



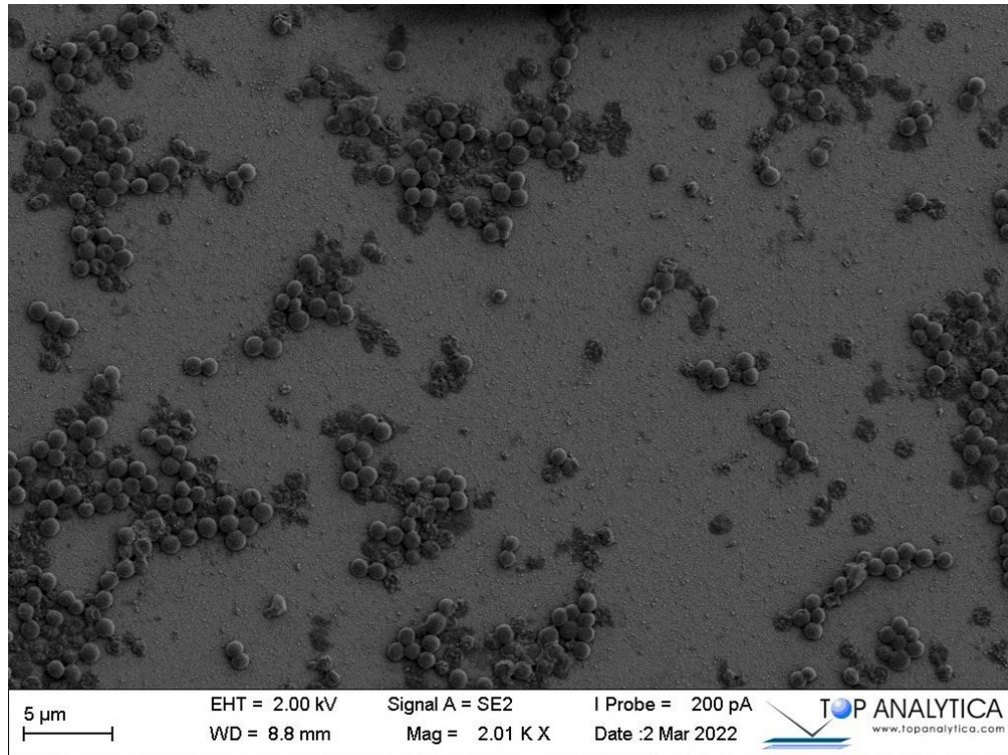
Figur 23. SEM-bild av biofilmen efter 24 h tillväxt (QCM).



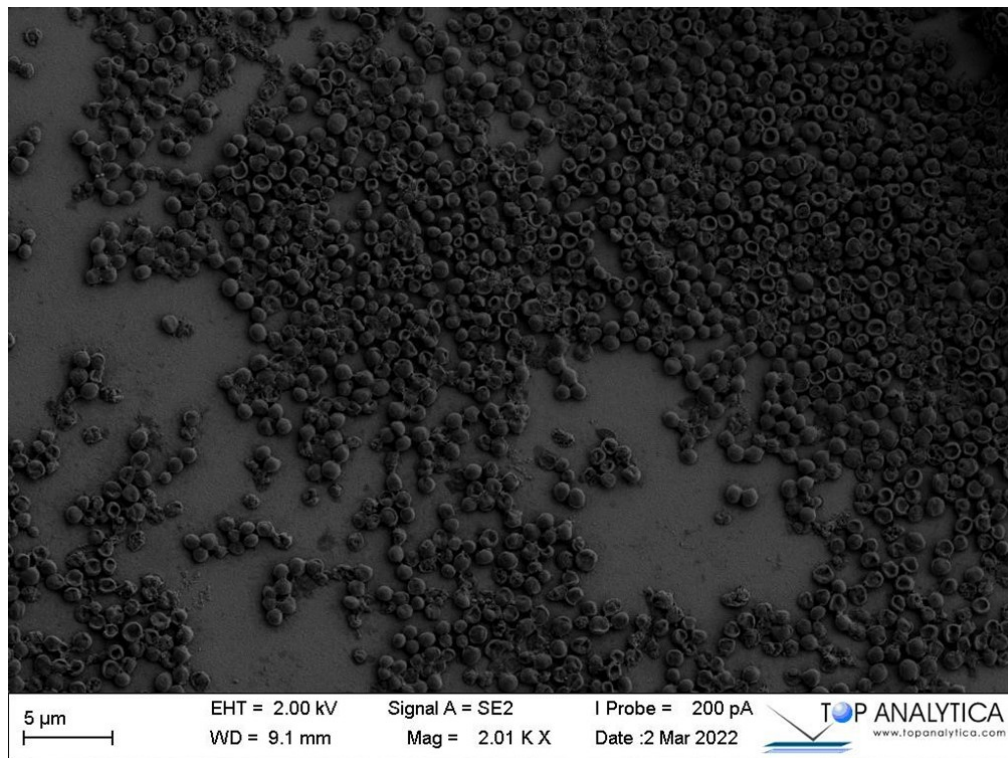
Figur 24. SEM-bild av biofilmen efter 24 h tillväxt (QCM).



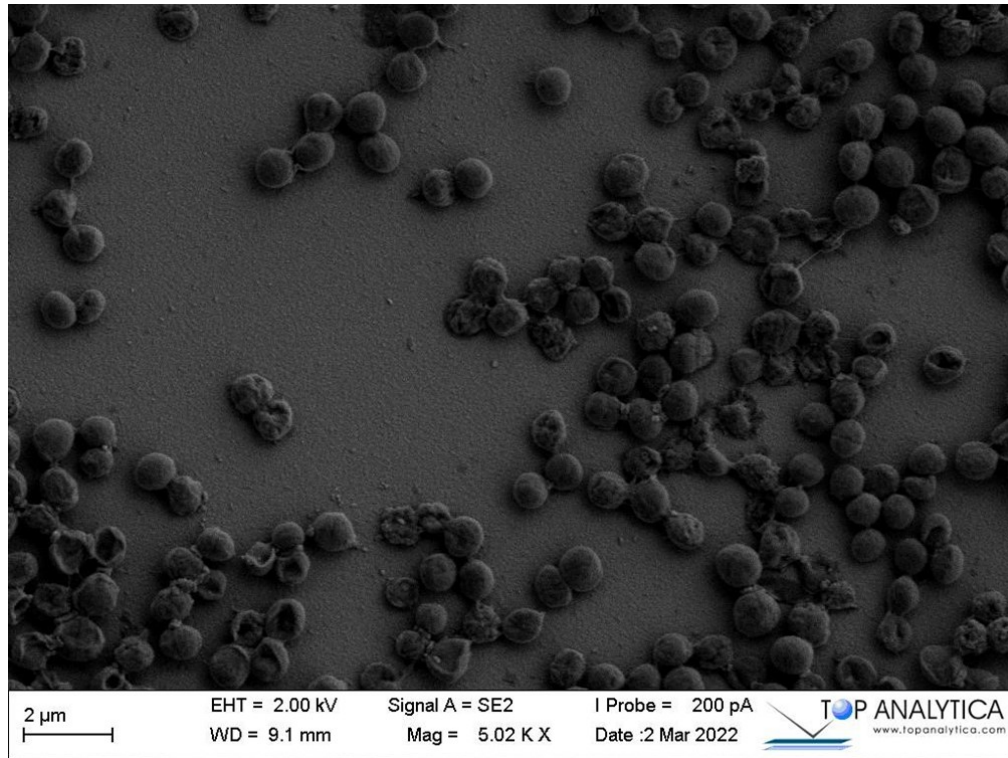
Figur. 25 SEM-bild av biofilmen efter 24 h tillväxt (SPR).



Figur 26. SEM-bild av biofilmen efter 6 h tillväxt och 18 h antibiotikaexponering (QCM).



Figur 27. SEM-bild av biofilmen efter 6 h tillväxt och 18 h antibiotikaexponering (SPR).



Figur 28. SEM-bild av biofilmen efter 6 h tillväxt och 18 h antibiotikaexponering (SPR).

6.3 Biofilmens viskoelastiska egenskaper

Två punkter valdes ut för analys med QCM: en i början av mätningen strax innan bakterielösningen detekterades och en i slutet av mätningen. Analysen utfördes för att fastställa effekten av antibiotikatillsatsen på biofilmens tjocklek och viskoelastiska egenskaper. I analysen togs hänsyn till både den styva delen av filmen, som ligger närmare sensorn, och den viskösa delen av filmen, som är tjockare. Efter analysen gjordes grafer som visade de högsta och lägsta värdena för de tre mätningarna. Dessutom visar x-markeringarna i **Figurerna 29–34** medelvärdet av de tre mätningarna och linjen visar medianen av dessa mätningar.

Tabell 9. Förändringar i filmtjocklek under biofilmbildning utan antibiotika

	Viskös filmtjocklek [μm]	Styv filmtjocklek [μm]	Total filmtjocklek [μm]
1. Upprepning utan antibiotika	1,29809	0,05854	1,35664
2. Upprepning utan antibiotika	1,16121	0,06096	1,22217
3. Upprepning utan antibiotika	1,13208	0,05398	1,18606
Medeltal	1,19713 \pm 0,07237	0,05782 \pm 0,00289	1,25496 \pm 0,07340

Tabell 10. Förändringar i viskoelastiska egenskaper under biofilmbildning utan antibiotika

	G'	G''	tan δ
1. Upprepning utan antibiotika	0,17245	0,00210	0,01218
2. Upprepning utan antibiotika	0,13732	0,00202	0,01471
3. Upprepning utan antibiotika	0,13022	0,00217	0,01666
Medeltal	0,14667 \pm 0,02261	0,00210 \pm 0,00007	0,01452 \pm 0,00183

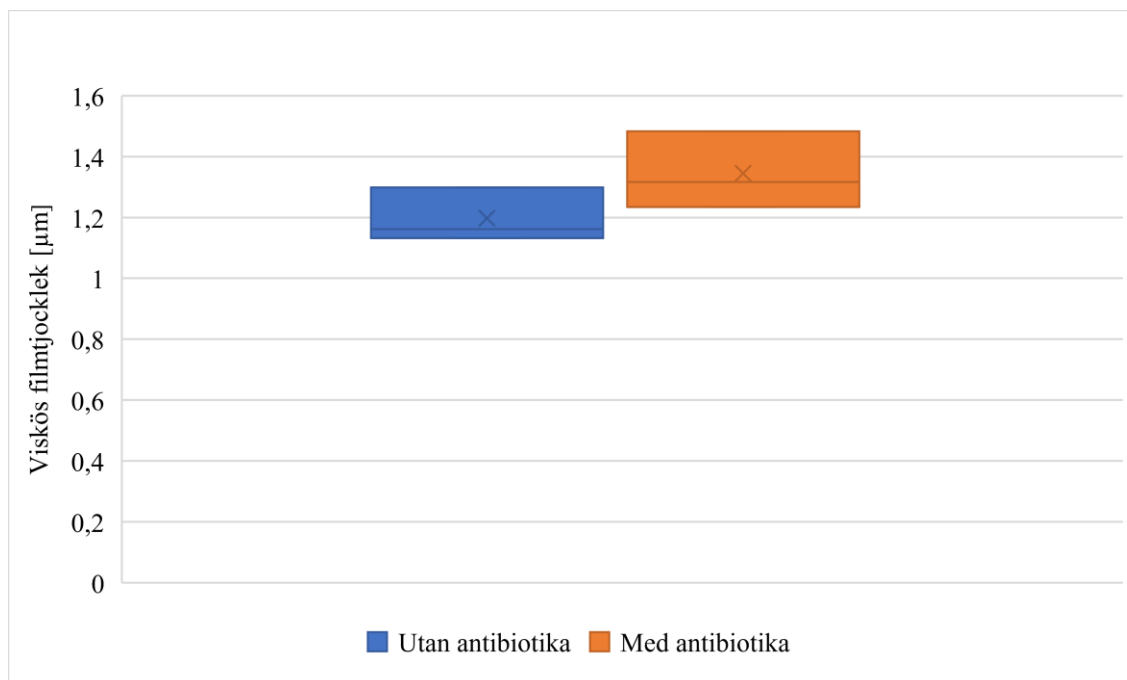
Tabell 11. Förändringar i filmtjocklek under biofilmbildning med antibiotika

	Viskös filmtjocklek [μm]	Styv filmtjocklek [μm]	Total filmtjocklek [μm]
1. Upprepning med antibiotika	1,31657	0,08487	1,40144
2. Upprepning med antibiotika	1,48275	0,07850	1,56121
3. Upprepning med antibiotika	1,23407	0,08758	1,32165
Medeltal	1,34446 \pm 0,10342	0,08370 \pm 0,00380	1,4281 \pm 0,0996

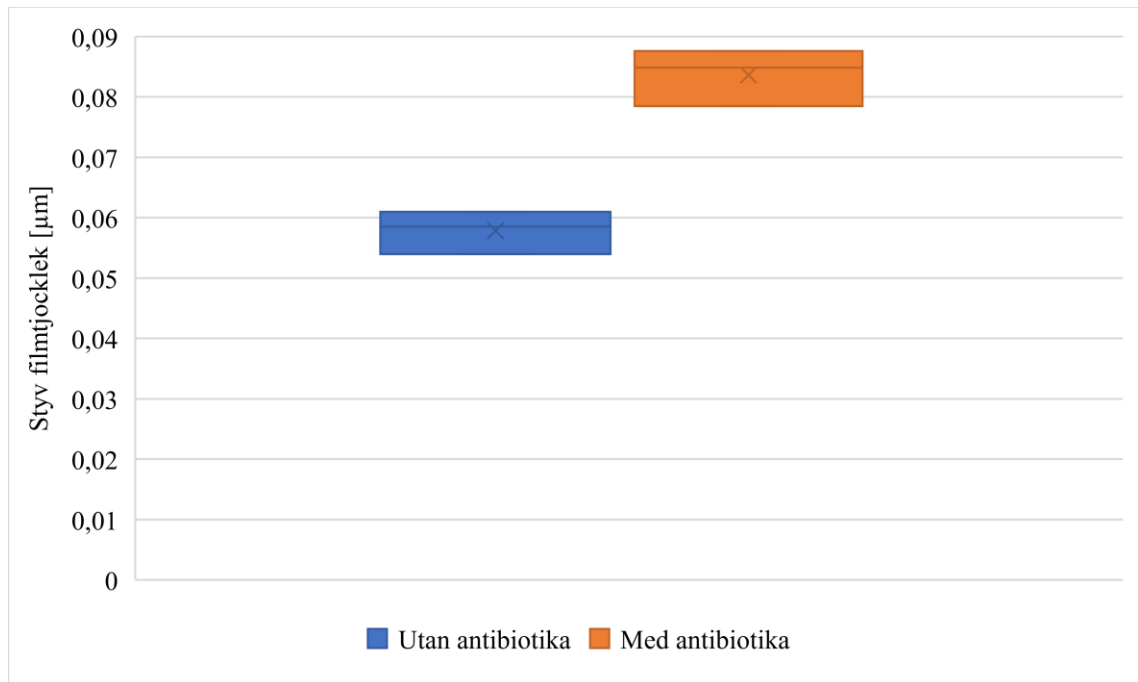
Tabell 12. Förändringar i viskoelastiska egenskaper under biofilmbildning med antibiotika

	G'	G''	tan δ
1. Upprepning med antibiotika	0,17096	0,00298	0,01741
2. Upprepning med antibiotika	0,21833	0,00285	0,01304
3. Upprepning med antibiotika	0,14947	0,00276	0,01845
Medeltal	0,17958 \pm 0,02877	0,00286 \pm 0,00011	0,0163 \pm 0,00234

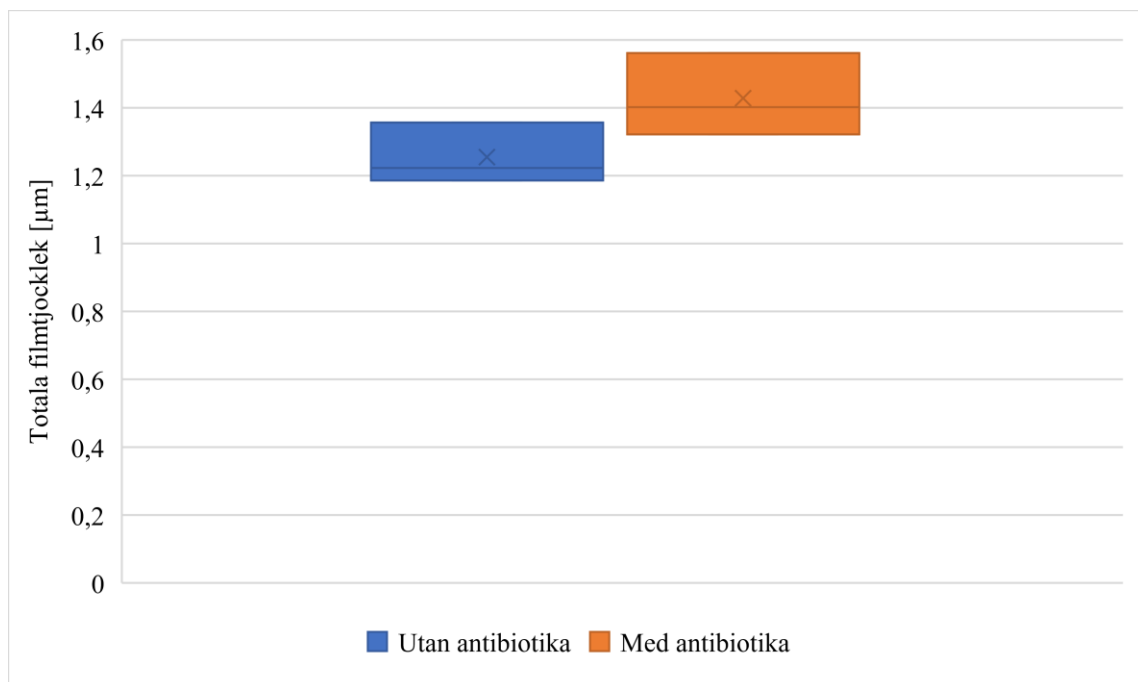
Figur 29 och 30 (Tabell 9 och 11) visar att både den viskösa och styva filmtjockleken är större efter tillsättningen av antibiotika jämfört med biofilmen som formades utan antibiotika. **Figur 31 (Tabell 9)** visar att den totala filmtjockleken var större för biofilmen efter tillsättningen av antibiotika. **Figur 32 (Tabell 11)** visar att biofilmen som formades utan antibiotika är mer elastisk än biofilmen efter tillsättning av antibiotika. **Figur 33 och 34 (Tabell 10 och 12)** visar att G'' och $\tan\delta$ är större efter tillsättningen av antibiotika. Efter dataanalysen kan man dra slutsatsen att tillsättningen av antibiotika inte bryter ned biofilmen, tvärtom blir biofilmen tjockare vilket kan bero på att bakterierna som dödats inte håller samman biofilmen lika starkt mera och att en del av biofilmen kollapsar. Detta kan också ses i biofilmens viskoelastiska egenskaper eftersom antibiotikan deformerades bakterierna i biofilmen. Detta kan också observeras i dissipation-grafen, som fortsätter att öka långsamt efter tillsättning av antibiotika. ANOVA analysen indikerade att skillnaden i styv filmtjockleken mellan biofilmer som inte behandlats och sådana som hade behandlats med antibiotika var statistiskt signifikant på en $p \leq 0,05$ nivå. Analysen indikerade också att skillnaden i G'' är signifikant på en $p \leq 0,05$ nivå.



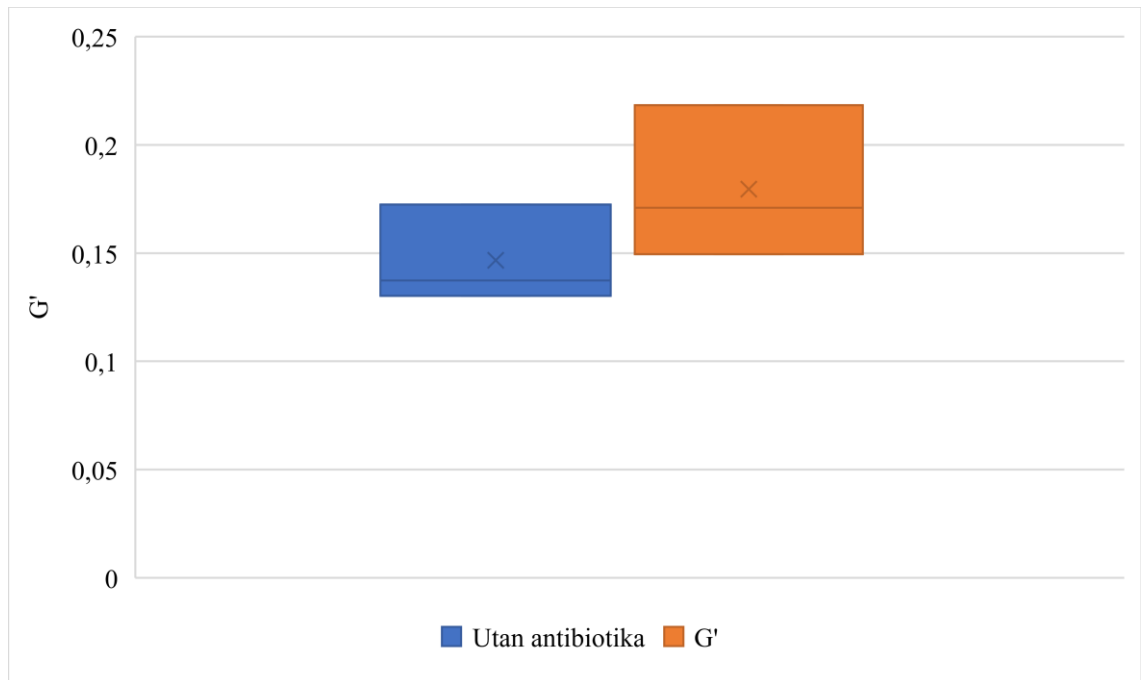
Figur 29. Viskös filmtjocklek av biofilmen efter 24h tillväxt.



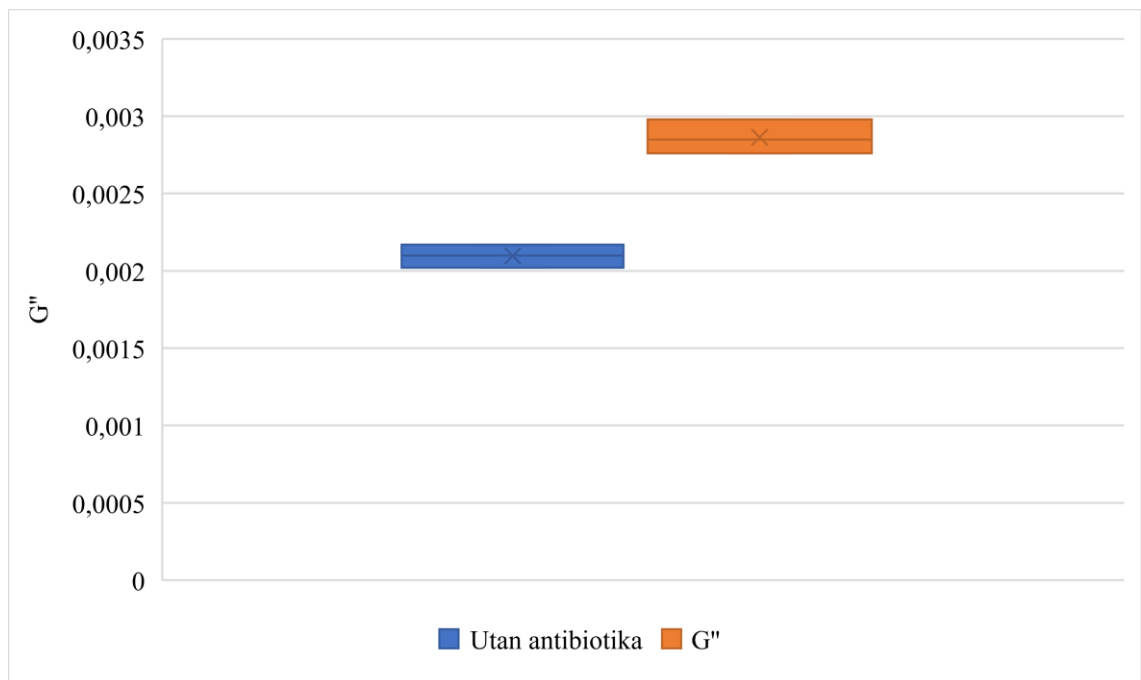
Figur 30. Styv filmtjocklek av biofilmen efter 24h.



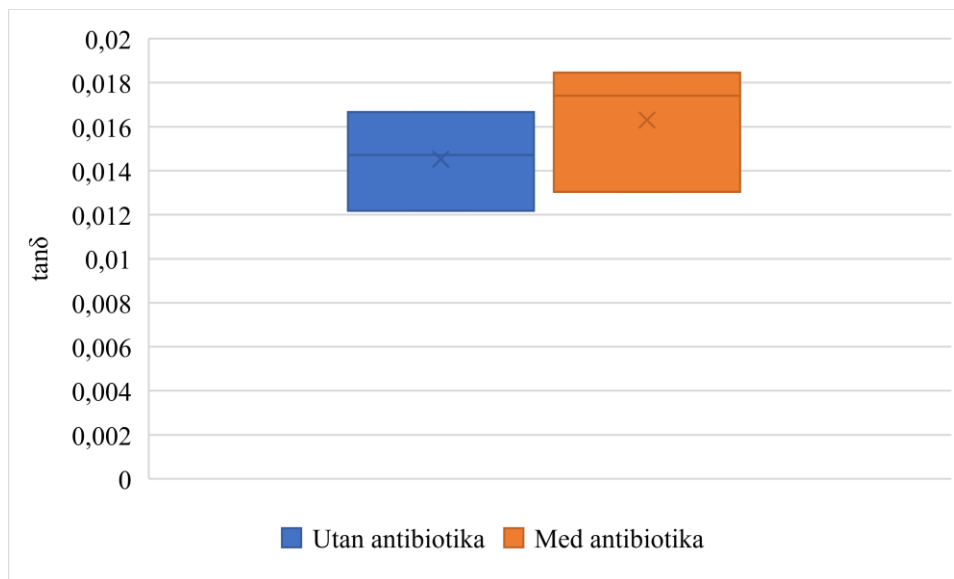
Figur 31. Totala filmtjocklek av biofilmen efter 24h.



Figur 32. G' av biofilmen efter 24h.



Figur 33. G'' av biofilmen efter 24h.



Figur 34. $\tan\delta$ av biofilmen efter 24 h.

6.4. Mätmetodernas begränsningar och fortsatta studier

Mätningarna visade att bildandet av luftbubblor är ett betydande problem med både QCM- och SPR-metoderna. Detta kunde undvikas genom en QCM-mätutrustning med vattenbad, men SPR-mätningar var känsliga för luftbubblor trots vattenbadet. Dessutom beror mätningens framgång på sensorns renhet. Samma sensor kan återanvändas, men biofilmen kanske inte lossnar fullständigt trots tvättlösningen. Båda mätmetoderna gör det enkelt att monitorera biofilmens tillväxt i realtid, men om man vill veta mer om strukturen hos den bildade biofilmen, bör biofilmen avbildas.

Den här studien visade att bakterier bildar en biofilm ovanpå guldsensorerna i QCM och SPR, men i verkligheten är situationen ofta annorlunda. Till exempel, biofilmer i samband med konstgjorda leder bildas ofta ovanpå polystyren. Forskningen kunde således fortsätta genom att jämföra olika sensorbeläggningar. QCM- och SPR-metoder upptäcker en förändring i massan på sensorytan. En brist i dessa tekniker är att om antibiotikan inte bryter ned den extracellulära matrisen så kan effekten av antibiotikan vara svår att upptäcka. Av denna anledning skulle QCM- och SPR-metoderna vara bäst lämpade för att undersöka beläggningar som hämmar bakterieadsorption eller ämnen som bryter ned den extracellulära matrisen. Teknikerna kan dock upptäcka biofilmbildningen på sensorytorna, samt upptäcka strukturella och viskoelastiska

förändringar i biofilmen. Resultaten av studien visar hur svårt det är att avlägsna biofilm enbart med antibiotika.

7 Sammanfattning

Syftet med den här studien var att monitorera biofilmbildningen med hjälp av QCM- och SPR-metoder. Båda teknikerna kunde upptäcka biofilmbildning med förändringar i olika parametrar. Dessutom bekräftades biofilmbildningen med hjälp av SEM. Antibiotikans effekt på biofilmbildningen testades också. Det konstaterades att tillsatsen av vankomycin till en 6 h gammal biofilm bryter inte ned biofilmen eller stoppar dess masstillväxt. Även om biofilmen inte bryts ned så visade SEM-bilderna att vankomycin deformerade bakterierna, vilket ledde till förändringar i biofilmens viskoelastiska egenskaper. Alla mätningarna gjordes med en guldbelagd sensor, vilket inte helt motsvarar den verkliga situationen när en biofilm bildas på ett implantat som ofta är gjort av polystyren. Forskningen skulle kunna fortsättas genom att använda kristaller som har olika beläggningar, och genom att tillsätta antibiotika vid olika tidpunkter och koncentrationer. I framtiden skulle biofilmers tillväxt kunna förhindras genom användning av nya material/beläggningar och biofilmer skulle kunna brytas ned genom användning av medel som förhindrar intercellulär kommunikationen och som bryter ned den extracellulära matrisen.

8 Källförteckning

Abenojar, E. C., Wickramasinghe, S., Ju, M., Uppaluri, S., Klika, A., George, J., Barssoum W., Frangiamore S., Higuera-Rueda C. A. & Samia, A. C. S. 2018. Magnetic Glycol Chitin-Based Hydrogel Nanocomposite for Combined Thermal and d-Amino-Acid-Assisted Biofilm Disruption. *ACS infectious diseases*, 4(8), s. 1246-1256.

Akens, M. K., Chien, C., Katchky, R. N., Kreder, H. J., Finkelstein, J. & Whyne, C. M. 2018. The impact of thermal cycling on *Staphylococcus aureus* biofilm growth on stainless steel and titanium orthopaedic plates. *BMC musculoskeletal disorders*, 19(1), s. 260.

Amari, D. T., Marques, C. N. H. & Davies, D. G. 2013. The Putative Enoyl-Coenzyme A Hydratase DspI Is Required for Production of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Dispersion Autoinducer cis-2-Decenoic Acid. *Journal of Bacteriology*, 195(20), s. 4600-4610.

Amer, M., Turo, A., Salazar, J., Berlanga-Herrera, L., Garcia-Hernandez, M. J. & Chavez, J. A. 2020. Multichannel QCM-Based System for Continuous Monitoring of Bacterial Biofilm Growth. *IEEE transactions on instrumentation and measurement*, 69(6), s. 2982-2995.

Artini, M., Papa, R., Barbato, G., Scoarughi, G., Cellini, A., Morazzoni, P., Bombardelli, E. & Selan, L. 2012. Bacterial biofilm formation inhibitory activity revealed for plant derived natural compounds. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20(2), s. 920-926.

Barbucci, R., Casolaro, M. & Magnani, A. 1992. Characterization of biomaterial surfaces: ATR-FTIR, potentiometric and calorimetric analysis. *Clinical materials*, 11(1), s. 37-51.

Bellich, B., Distefano, M., Syrgiannis, Z., Bosi, S., Guida, F., Rizzo, R., Brady J. W. & Cescutti, P. 2019. The polysaccharide extracted from the biofilm of *Burkholderia multivorans* strain C1576 binds hydrophobic species and exhibits a compact 3D-structure. *International journal of biological macromolecules*, 136, s. 944–950.

Bhattacharya, M., Wozniak, D. J., Stoodley, P. & Hall-Stoodley, L. 2015. Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Expert review of anti-infective therapy*, 13(12), s. 1499-1516.

BioLogic Science Instruments. 2021. QCM: When is the Sauerbrey equation valid? Webbplats 21.11.2021. Hänvisat 12.1.2022. <https://www.biologic.net/topics/bluqcm-when-is-the-sauerbrey-equation-valid/>

Boles, B. R. & Horswill, A. R. 2008. Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS pathogens*, 4(4), s. 1–13.

Bos, R., van der Mei, H. C. & Busscher, H. J. 1999. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. *FEMS microbiology reviews*, 23(2), s. 179-230.

Buhmann, M. T., Stiefel, P., Maniura-Weber, K. & Ren, Q. 2016. In Vitro Biofilm Models for Device-Related Infections. *Trends in biotechnology (Regular ed.)*, 34(12), s. 945-948.

Camilli, A. & Bassier, B. L. 2006. Bacterial Small-Molecule Signaling Pathways. *Science (American Association for the Advancement of Science)*, 311(5764), s. 1113-1116.

Chambers, H. F. & DeLeo, F. R. 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature reviews. Microbiology*, 7(9), s. 629-641.

Choi, J., Kwak, Y., Yoo, H., Lee, S., Kim, H., Han, S., Choi, H., Kim, H., Cho, E. & Lee, K. 2016. Trends in the distribution and antimicrobial susceptibility of causative pathogens of device-associated infection in Korean intensive care units from 2006 to 2013: Results from the Korean Nosocomial Infections Surveillance System (KONIS). *The Journal of hospital infection*, 92(4), s. 363-371.

Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I. & Penadés, J. R. 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology*, 183(9), s. 2888-2896.

Craft, K. M., Nguyen, J. M., Berg, L. J. & Townsend, S. D. 2019. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. *MedChemComm*, 1(8), s. 1231-1241.

-
- Dengler, V., Foulston, L., DeFrancesco, A. S. & Losick, R. 2015. An Electrostatic Net Model for the Role of Extracellular DNA in Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 197(24), s. 3779-3787.
- Dong, G., Liu, H., Yu, X., Zhang, X., Lu, H., Zhou, T. & Cao, J. 2018. Antimicrobial and anti-biofilm activity of tannic acid against *Staphylococcus aureus*. *Natural product research*, 32(18), s. 2225-2228.
- Donlan, R. M. 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), s. 881–890.
- Donlan, R. M. 2008. Biofilms on Central Venous Catheters: Is Eradication Possible? *Bacterial Biofilms*, 322, s. 133-161.
- Durso, L. M., Miller, D. N. & Wienhold, B. J. 2012. Distribution and quantification of antibiotic resistant genes and bacteria across agricultural and non-agricultural metagenomes. *PloS one*, 7(11), s. 1-12.
- Easley, A. D., Ma, T., Eneh, C. I., Yun, J., Thakur, R. M. & Lutkenhaus, J. L. 2021. A practical guide to quartz crystal microbalance with dissipation monitoring of thin polymer films. *Journal of polymer science (2020)*. s. 1-18.
- Foulston, L., Elsholz, A. K. W., DeFrancesco, A. S. & Losick, R. 2014. The extracellular matrix of *Staphylococcus aureus* biofilms comprises cytoplasmic proteins that associate with the cell surface in response to decreasing pH. *mBio*, 5(5), s. 1-9.
- Franck, A. 2017. Viscoelasticity and dynamic mechanical testing. TA instruments Germany, s. 1-6.
- Fux, C., Costerton, J., Stewart, P. & Stoodley, P. 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in microbiology (Regular ed.)*, 13(1), s. 34-40.
- Gleichmann, N. 2020. SEM vs TEM. Webbplats 25.2.2020. Hänvisat 11.2.2022. <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/sem-vs-tem-331262>
- García-Bonillo, C., Texidó, R., Reyes-Carmenaty, G., Gilabert-Porres, J. & Borrós, S. 2020. Study of the Human Albumin Role in the Formation of a Bacterial Biofilm on Urinary Devices Using QCM-D. *ACS applied biomaterials*, 3(5), s. 3354-3364.

-
- Gomes, L. C. & Mergulhão, F. J. 2017. SEM Analysis of Surface Impact on Biofilm Antibiotic Treatment. *Scanning*, 2017, s. 1-7.
- Gracel, D. & Fetsch, A. 2018. Chapter 1 - Staphylococcus aureus—A Foodborne Pathogen: Epidemiology, Detection, Characterization, Prevention, and Control: An Overview. Fetsch, A. (Ed). Staphylococcus aureus. London: Academic Press. s. 3-10.
- Greene, L. R. 2012. Guide to the elimination of orthopedic surgery surgical site infections: An executive summary of the Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology elimination guide. *American journal of infection control*, 40(4), s. 384–386.
- Gross, M., Cramton, S. E., Götz, F. & Peschel, A. 2001. Key role of teichoic acid net charge in Staphylococcus aureus colonization of artificial surfaces. *Infection and immunity*, 69(5), s. 3423-3426.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. & Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms: From the Natural environment to infectious diseases. *Nature reviews. Microbiology*, 2(2), s. 95-108.
- Harmata, A. J., Ma, Y., Sanchez, C. J., Zienkiewicz, K. J., Elefteriou, F., Wenke, J. C. & Guelcher, S. A. 2015. d-amino Acid Inhibits Biofilm but not New Bone Formation in an Ovine Model. *Clinical orthopaedics and related research*, 473(12), s. 3951-3961.
- Harron, K., Mok, Q., Hughes, D., Muller-Pebody, B., Parslow, R., Ramnarayan, P. & Gilbert, R. 2016. Generalisability and Cost-Impact of Antibiotic-Impregnated Central Venous Catheters for Reducing Risk of Bloodstream Infection in Paediatric Intensive Care Units in England. *PloS one*, 11(3), s. 1-11.
- Hatt, J. K. & Rather, P. N. 2008. Role of Bacterial Biofilms in Urinary Tract Infections. *Bacterial Biofilms*, 322, s. 163-192.
- Heilmann, C., Hussain, M., Peters, G. & Götz, F. 1997. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of Staphylococcus epidermidis to a polystyrene surface. *Molecular microbiology*, 24(5), s. 1013-1024.

-
- Hong, W., Nyaruaba, R., Li, X., Liu, H., Yang, H. & Wei, H. 2021. In-situ and Real-Time Monitoring of the Interaction Between Lysins and *Staphylococcus aureus* Biofilm by Surface Plasmon Resonance. *Frontiers in microbiology*, 12, s. 1-9.
- Hu, H., Jacombs, A., Vickery, K., Merten, S. L., Pennington, D. G. & Deva, A. K. 2015. Chronic Biofilm Infection in Breast Implants Is Associated with an Increased T-Cell Lymphocytic Infiltrate: Implications for Breast Implant-Associated Lymphoma. *Plastic and reconstructive surgery (1963)*, 135(2), s. 319–329.
- Huang, C. T., Yu, F. P., McFeters, G. A. & Stewart, P. S. 1995. Nonuniform spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(6), s. 2252–2256.
- Hutchings M. I., Truman A. W. & Wilkinson, B. 2019. Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, s. 72-80.
- Høiby, N., Ciofu, O., Johansen, H. K., Song, Z., Moser, C., Jensen, P. Ø., Molin, S., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T. & Bjarnsholt, T. 2011. The clinical impact of bacterial biofilms. *International journal of oral science*, 3(2), s. 55-65.
- Høiby, N. 2011. Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *BMC medicine*, 9(1), s. 32.
- Jeflerson, K. K., Goldmann, D. A. & Pier, G. B. 2005. Use of Confocal Microscopy to Analyze the Rate of Vancomycin Penetration through *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6), s. 2467–2473.
- Jennings, J. A., Courtney, H. S. & Haggard, W. O. 2012. Cis-2-decenoic Acid Inhibits *S. aureus* Growth and Biofilm In Vitro: A Pilot Study. *Clinical orthopaedics and related research*, 470(10), s. 2663-2670.
- Karge, H. G. & Weitkamp, J. 2008. *Adsorption and diffusion*. 1st ed. 2008. Berlin: Springer. s. 4.
- Kaur, G., Kumar Reddy, T., Venkatesh, K. & Mahalakshmi, K. 2020. Effects of chitosan oligosaccharide and calcium hypochlorite on *E. Faecali* dental biofilm and smear layer removal - SEM analysis. *Indian journal of dental research*, 31(4), s. 550–556.

-
- Khursheed, A. 2011. *Scanning electron microscope optics and spectrometers*. Singapore; Hackensack, N.J.: World Scientific Pub. Co. s. 1-70
- Kolodkin-Gal, I., Romero, D., Cao, S., Clardy, J., Kolter, R. & Losick, R. 2010. D-Amino Acids Trigger Biofilm Disassembly. *Science (American Association for the Advancement of Science)*, 328(5978), s. 627-629.
- Kowalczyk, D., Ginalska, G., Piersiak, T. & Miazga-Karska, M. 2012. Prevention of biofilm formation on urinary catheters: Comparison of the sparfloxacin-treated long-term antimicrobial catheters with silver-coated ones. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 100B(7), s. 1874-1882.
- Kuehl, R., Al-Bataineh, S., Gordon, O., Luginbuehl, R., Otto, M., Textor, M. & Landmann, R. 2009. Furanone at Subinhibitory Concentrations Enhances Staphylococcal Biofilm Formation by luxS Repression. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(10), s. 4159-4166.
- Kwieciński, J., Eick, S. & Wójcik, K. 2008. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on Staphylococcus aureus in biofilms and stationary growth phase. *International journal of antimicrobial agents*, 33(4), s. 343-347.
- Latif, U., Can, S., Hayden, O., Grillberger, P. & Dickert, F. L. 2013. Sauerbrey and anti-Sauerbrey behavioral studies in QCM sensors—Detection of bioanalytes. *Sensors and actuators. B, Chemical*, 176, s. 825-830.
- Leid, J. G., Shirtliff, M. E., Costerton, J. W. & Stoodley, P. 2002. Human Leukocytes Adhere to, Penetrate, and Respond to Staphylococcus aureus Biofilms. *Infection and Immunity*, 70(11), s. 6339–6345
- Lewis, K. 2005. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Moscow)*, 70(2), s. 267-274.
- Lewis, K. 2008. Multidrug Tolerance of Biofilms and Persister Cells. *Bacterial Biofilms*, 322, s. 107-131.
- López, D., Vlamakis, H. & Kolter, R. 2010. Biofilms. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(7), s.1-11.

-
- Lowy, F. D. 2003. Antimicrobial resistance: The example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of clinical investigation*, 111(9), s. 1265-1273.
- Mah, T. 2012. Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future microbiology*, 7(9), s. 1061-1072.
- Mann, E. E., Rice, K. C., Boles, B. R., Endres, J. L., Ranjit, D., Chandramohan, L., Tsang, L. H., Smeltzer, M. S., Horswill A. R. och Bayles, K. W. 2009. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PloS one*, 4(6), s. 1-12.
- Mann, E. E., Wozniak D. J. 2011. Pseudomonas biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol.* 36(4), s. 893-916.
- Marrie, T. J., Nelligan, J. & Costerton, J. W. 1982. A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation (New York, N.Y.)*, 66(6), s. 1339–1341.
- McConoughey, S. J., Howlin, R., Granger, J. F., Manring, M. M., Calhoun, J. H., Shirtliff, M., Kathju, S. & Stoodley, P. 2014. Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future microbiology*, 9(8), s. 987-1007.
- Melander, R. J. & Melander, C. 2017. The Challenge of Overcoming Antibiotic Resistance: An Adjuvant Approach? *ACS infectious diseases*, 3(8), s. 559-563.
- Moormeier, D. E., Bose, J. L., Horswill, A. R. & Bayles, K. W. 2014. Temporal and stochastic control of *Staphylococcus aureus* biofilm development. *mBio*, 5(5), s. 1-12.
- Moormeier, D. E. & Bayles, K. W. 2017. *Staphylococcus aureus* biofilm: A complex developmental organism. *Molecular microbiology*, 104(3), s. 365-376.
- Morgenstern, M., Erichsen, C., von Räden, C., Metsemakers, W. J., Kates, S. L., Moriarty, T. F. & Hungerer, S. 2016. Staphylococcal orthopaedic device-related infections in older patients. *Injury*, 47(7), s. 1427-1434.
- Müller, R., Gröger, G., Hiller, K., Schaimalz, G. & Ruhl, S. 2007. Fluorescence-based bacterial overlay method for simultaneous in situ quantification of surface-attached bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 73(8), s. 2653-2660.

-
- Novick, R. P. & Geisinger, E. 2008. Quorum sensing in staphylococci. *Annual review of genetics*, 42(1), s. 541-564.
- Norde, W. 1995. Adsorption of Proteins at Solid-Liquid Interfaces. *Cells and Materials*. 5(1), s. 96-112.
- O'Gara, J. P. 2007. ica and beyond: Biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS microbiology letters*, 270(2), s. 179-188.
- Olsson, A. L. J., van der Mei, H. C., Busscher, H. J. & Sharma, P. K. 2009. Influence of Cell Surface Appendages on the Bacterium–Substratum Interface Measured Real-Time Using QCM-D. *Langmuir*, 25(3), s. 1627-1632.
- Olsson, A. L., van der Mei, H. C., Busscher, H. J. & Sharma, P. K. 2011. Acoustic sensing of the bacterium–substratum interface using QCM-D and the influence of extracellular polymeric substances. *Journal of colloid and interface science*, 357(1), s. 135–138.
- Opperman, T. J., Kwasny, S. M., Williams, J. D., Khan, A. R., Peet, N. P., Moir, D. T. & Bowlin, T. L. 2009. Aryl Rhodanines Specifically Inhibit Staphylococcal and Enterococcal Biofilm Formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(10), s. 4357-4367.
- Otto, K. 2008. Biophysical approaches to study the dynamic process of bacterial adhesion. *Research in microbiology*, 159(6), s. 415-422.
- Otto, M. 2004. Quorum-sensing control in Staphylococci – a target for antimicrobial drug therapy? *FEMS microbiology letters*, 241(2), s. 135-141.
- Parvizi, J., Gehrke, T. & Chen, A. F. 2013. Proceedings of the International Consensus on Periprosthetic Joint Infection. *The bone & joint journal*, 95-B(11), s. 1450-1452.
- Peterson, B. W., He, Y., Ren, Y., Zerdoum, A., Libera, M. R., Sharma, P. K., van Winkelhoff, A-J., Neut, D., Stoodley, P., van der Mei, H. C. & Busscher, H. J. 2015. Viscoelasticity of biofilms and their recalcitrance to mechanical and chemical challenges. *FEMS microbiology reviews*, 39(2), s. 234–245.

-
- Pohanka, M. 2021. Quartz Crystal Microbalance (QCM) Sensing Materials in Biosensors Development. *International journal of electrochemical science*, s. 1–10.
- Pompilio, A., Geminiani, C., Bosco, D., Rana, R., Aceto, A., Bucciarelli, T., Scotti, L. & Di Bonaventura, G. 2018. Electrochemically Synthesized Silver Nanoparticles Are Active Against Planktonic and Biofilm Cells of *Pseudomonas aeruginosa* and Other Cystic Fibrosis-Associated Bacterial Pathogens. *Frontiers in microbiology*, 9, s. 1349.
- Prescott, J. F. 2014. The resistance tsunami, antimicrobial stewardship, and the golden age of microbiology. *Veterinary microbiology*, 171(3-4), s. 273-278.
- Quave, C. L., Estévez-Carmona, M., Compadre, C. M., Hobby, G., Hendrickson, H., Beenken, K. E. & Smeltzer, M. S. 2012. Ellagic acid derivatives from *Rubus ulmifolius* inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation and improve response to antibiotics. *PloS one*, 7(1), s. 1-16
- Rani, S. A., Pitts, B., Beyenal, H., Veluchamy, R. A., Lewandowski, Z., Davison, W. M., Buckingham-Meyer, K. & Stewart, P. S. 2007. Spatial Patterns of DNA Replication, Protein Synthesis, and Oxygen Concentration within Bacterial Biofilms Reveal Diverse Physiological States. *Journal of Bacteriology*, 189(11), s. 4223-4233.
- Rice, K. C., Mann, E. E., Endres, J. L., Weiss, E. C., Cassat, J. E., Smeltzer, M. S. & Bayles, K. W. 2007. The *cidA* Murein Hydrolase Regulator Contributes to DNA Release and Biofilm Development in *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS*, 104(19), s. 8113-8118.
- Shafiqul Islam, A. K. M., Krishnan, H., Ahmad, M. N., Nadaraja, P. & Uddin, A. B. M. H. 2021. A Novel Molecular Imprint Polymer Quartz Crystal Microbalance Nanosensor for the Detection of Andrographolide in the Medicinal Plant Extract. *Russian journal of electrochemistry*, 57(6), s. 671-679
- Sievert, D. M., Rudrik, J. T., Patel, J. B., McDonald, L. C., Wilkins, M. J. & Hageman, J. C. 2008. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002–2006. *Clinical infectious diseases*, 46(5), s. 668-674
- Simon, S. S. & Sanjeev, S. 2007. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers. *Food control*, 18(12), s. 1565-1568.

-
- Smith, K., Perez, A., Ramage, G., Gemmell, C. G. & Lang, S. 2008. Comparison of biofilm-associated cell survival following in vitro exposure of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms to the antibiotics clindamycin, daptomycin, linezolid, tigecycline and vancomycin. *International journal of antimicrobial agents*, 33(4), s. 374-378.
- Smith, K., Gemmell, C. G. & Lang, S. 2013. Telavancin shows superior activity to vancomycin with multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in a range of in vitro biofilm models. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 32(10), s. 1327–1332.
- Spormann, A. M. 2008. Physiology of Microbes in Biofilms: Bacterial Biofilms. *Current topics in microbiology and immunology*, 322, s. 17-36.
- Stewart, P. S. & Franklin, M. J. 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature reviews. Microbiology*, 6(3), s. 199-210.
- Stogios, P. J. & Savchenko, A. 2020. Molecular mechanisms of vancomycin resistance. *Protein science*, 29(3), s. 654-669.
- Tang, Y., Zeng, X. & Liang, J. 2010. Surface Plasmon Resonance: An Introduction to a Surface Spectroscopy Technique. *Journal of chemical education*, 87(7), s. 742–746.
- Tapiainen, T., Salo, J. & Uhari, M. 2010. Bakteribiofilmit infektioaudeissa. *Lääketieteellinen Aikakausikirja Duodecim*, 126(7), s. 765–772.
- Tegoulia, V. A. & Cooper, S. L. 2002. *Staphylococcus aureus* adhesion to self-assembled monolayers: Effect of surface chemistry and fibrinogen presence. *Colloids and surfaces, B, Biointerfaces*, 24(3-4), s. 217-228.
- THL. 2021. Antibioottiresistenssi. Webbplats 11.11.2021. Hänvisat 27.1.2022. <https://thl.fi/fi/web/infektiaudit-ja-rokotukset/taudit-ja-torjunta/antibioottiresistenssi>.
- Trampuz, A., Steckelberg, J. M., Osmon, D. R., Cockerill, F. R., Hanssen, A. D. & Patel, R. 2003. Advances in the laboratory diagnosis of prosthetic joint infection. *Reviews in medical microbiology*, 14(1), s. 1-14.

-
- Trampuz, A. & Widmer, A. F. 2006. Infections associated with orthopedic implants. *Current opinion in infectious diseases*, 19(4), s. 349-356.
- Turnbull, I. R., Buckman, S. A., Horn, C. B., Bochicchio, G. V. & Mazuski, J. E. 2018. Antibiotic-Impregnated Central Venous Catheters Do Not Change Antibiotic Resistance Patterns. *Surgical infections*, 19(1), s. 4-47.
- Urish, K. L., MD, DeMuth, P. W., Craft, D. W., Haider, H. & Davis, C. M., MD. 2014. Pulse Lavage is Inadequate at Removal of Biofilm from the Surface of Total Knee Arthroplasty Materials. *The Journal of arthroplasty*, 29(6), s. 1128-1132.
- Vázquez-Sánchez, D., Habimana, O. & Holck, A. 2012. Impact of Food-Related Environmental Factors on the Adherence and Biofilm Formation of Natural *Staphylococcus aureus* Isolates. *Current microbiology*, 66(2), s. 110-121.
- Vázquez-Sánchez, D. & Rodríguez-López, P. 2018. Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus*. Fetsch, A. (Ed). *Staphylococcus aureus*. London: Academic Press. s. 87-103.
- Vuento, R. 2020. Antibiootit. Lääkärikirja Duodecim. Webbplats 8.10.2020. Hänvisat 8.11.2022. <https://www.terveyskirjasto.fi/dlk01177>
- Webb, H., Boshkovikj, V., Fluke, C., Truong, V., Hasan, J., Baulin, V., Lapokov, R., Estrin, Y., Crawford, R. J. & Ivanova, E. 2013. Bacterial attachment on sub-nanometrically smooth titanium substrata. *Biofouling (Chur, Switzerland)*, 29(2), s. 163-170.
- Wilkinson, H. N., Iveson, S., Catherall, P. & Hardman, M. J. 2018. A Novel Silver Bioactive Glass Elicits Antimicrobial Efficacy Against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in an ex Vivo Skin Wound Biofilm Model. *Frontiers in microbiology*, 9, s. 1450.
- Whitchurch C. B., Tolker-Nielsen T., Ragas P. C, Mattick J. S. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295(5559), s. 1487.
- Yao, F. & Strauch, M. A. 2005. Independent and Interchangeable Multimerization Domains of the AbrB, Abh, and SpoVT Global Regulatory Proteins. *Journal of bacteriology*, 187(21), s. 7546.

Yarwood, J. M., Bartels, D. J., Volper, E. M. & Greenberg, E. P. 2004. Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Journal of Bacteriology*, 186(6), s. 1838-1850.

Yim, G., Huimi Wang, H. & Davies FRS, J. 2007. Antibiotics as signalling molecules. *Philosophical transactions. Biological sciences*, 362(1483), s. 1195-1200.