

Diss. ETH No. 20428

**Novel antibacterial strategies –
From smart to living materials**

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

LUKAS CYRILL GERBER

MSc ETH Chem Bio Eng

Born February 28, 1983
Citizen of Langnau i. E., Switzerland

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Wendelin J. Stark, examiner
Prof. Dr. Andrew J. de Mello, co-examiner

Zurich, 2012

Zusammenfassung

Ob ein Zelt aus Leder, eine Münze aus Gold, schmutzabweisende Autoscheiben oder Operationsbesteck aus Edelstahl – seit jeher entwickeln und verwenden wir Materialien, um unseren Alltag angenehmer und unsere Arbeit produktiver und effizienter zu gestalten. Dabei kombinieren wir heutzutage verschiedenste Materialien und erschaffen so faszinierende, oft multifunktionale Materialien. Die hier vorliegende Doktorarbeit beschreibt neue Konzepte zur Herstellung von intelligenten Materialien und zeigt auf, wie diese erfolgreich genutzt werden können, um antibakterielle Eigenschaften zu erreichen. Dabei werden drei unterschiedliche Ansätze verfolgt, um *smarte* Materialien herzustellen. Solche Materialien sind reaktionsfähig und reagieren adaptiv auf Umwelteinflüsse und wirken so konventionellen Problemen wie vorzeitiger Erschöpfung oder Resistenzbildung entgegen.

Kapitel 1 zeigt, wie sich Materialien im Laufe der Zeit entwickelt haben – von passiven Baustoffen wie Steinen über Plastik zu intelligenten, adaptiven Materialien. Durch die Kombination und Weiterentwicklung entstanden immer komplexere und funktionellere Materialien. Der Fokus wird auf verschiedene antimikrobielle Strategien gelegt, und klassische passive Materialien werden adaptiven Materialien gegenübergestellt. Während ein passives Material ‚nur‘ statische Funktionen innehat, können neuere Materialien auch Stoffe an die Umgebung absondern und mit ihr interagieren. Gerade bei antibakteriellen oder sonstigen Wirkstoff absondernden Materialien ist eine kontrollierte Abgabe äusserst wünschenswert. Klassischerweise wird ein Material mit einer Funktion geladen, zum Beispiel einem antibakteriellen Agens, welches dann während der Anwendung kontinuierlich abgegeben wird. Um die Emission auf ein Minimum zu beschränken, und dadurch entgegengesetzt die Haltbarkeit zu erhöhen, werden derzeit *smarte* Materialien erforscht. Solche intelligente Materialien geben ihre zuvor geladenen Wirkstoffe erst dann ab, wenn diese auch wirklich gebraucht werden. Noch einen Schritt weiter gehen die im Rahmen dieser Dissertation entwickelten *living materials*. Durch die Integration von biologischen, lebendigen Komponenten (sprich Mikroorganismen) in ein bestimmtes Material können die Eigenschaften gesteuert und benötigte Produkte direkt vom Material selbst hergestellt werden. Dadurch entfällt der Ladevorgang und es wird eine theoretisch unbegrenzte Lebensdauer ermöglicht.

Kapitel 2 beschreibt die Entwicklung von reaktiven antibakteriellen Fasern. Dabei kommt Silber als aktive Substanz zum Einsatz. Bekannterweise haben Silberionen ebenso wie auch die Ionen vieler anderer Metalle wie zum Beispiel Kupfer, Zinn oder Eisen eine schädli-

gende Wirkung auf Bakterien und Pilze. Hier kommen anstelle von konventionellem, antibakteriell wirkendem Silber nun Komposit-Nanopartikel zum Einsatz. Die Partikel bestehen aus 20-50 Nanometer grossen Tricalciumphosphat (TCP) Trägerpartikeln, welche mit 1-2 Nanometer grossen Silbernanoteilchen bestückt sind. Nach der Herstellung werden diese Partikel in Nylon Fasern eingearbeitet. Da TCP ein essentieller Nährstoff für Bakterien ist und von diesen gerne abgebaut wird, werden Silberionen nur dann in die Umgebung entlassen, wenn die Trägerpartikel von Bakterien konsumiert werden und demzufolge auch wirklich gebraucht werden. Die hier hergestellten Fasern mit inkorporierten Silber/TCP Partikeln haben einen totalen Silbergehalt von nur 0.026 % und zeigten eine hervorragende Wirkung gegen die Bakterien *Escherichia coli* und *Streptococcus sanguinis*. Innerhalb von 24 Stunden konnten die koloniebildenden Einheiten um 99.999 % respektive um 99.6 % reduziert werden. Dank der impulsgesteuerten Freisetzung wird in Zeiten, in denen keine bakterielle Belastung vorliegt, auch kein wertvolles Silber freigesetzt. Dadurch wird die Lebenszeit eines solchen Materials deutlich verlängert. Weiterhin ist dieses System dank der Nano-Struktur sehr effektiv. Infolge des grossen Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen wirken Nanopartikel besonders schnell und gut. Die einfache und günstige Herstellung von Polymeren und Polymerfasern mit Ag/TCP verspricht vielfältige Applikationen zum Beispiel im Textil- oder (Zahn-) Bürstenbereich.

Kapitel 3 erläutert die Herstellung von antimikrobiellen Materialien durch aktiven Entzug von Nährstoffen. Phosphat ist für alle Lebewesen ein essentieller Baustein und wird von der Natur als Bestandteil von Erbgut (DNA), Proteinen und Energieträgern (ATP) universell eingesetzt. Daher limitiert eine unzureichende Phosphatquelle oft das weitere Wachstum eines Organismus und stellt daher einen attraktiven Ansatzpunkt für eine Nährstoffentzug-Strategie dar. Reguliert man aktiv die Verfügbarkeit eines essentiellen Nährstoffes in einem Ökosystem, kann so die Population kontrolliert werden. Hier wird beschrieben, wie Lanthanoxid Nanopartikel (La_2O_3) verwendet werden, um das lebenswichtige Phosphat aus Nährlösungen zu entfernen. Lanthan, ein Übergangsmetall der Gruppe der *Seltenen Erden*, ist bekannt für seine hohe Affinität zu Phosphat und wird bereits in der Form von Lanthan-carbonat in der Medizin bei Patienten mit Leberkrankheiten eingesetzt, um deren Phosphatgehalt im Blut zu reduzieren. In Kapitel 3 wird der Effekt von Lanthanoxid Nanopartikeln in phosphathaltigen Kulturen von Bakterien, Pilzen und Algen untersucht. Durch den Entzug von Phosphat werden das mikrobielle Wachstum gehemmt und schliesslich die Organismen abgetötet. Während in phosphatreichen Nährlösungen kein toxischer Effekt beobachtet wer-

den kann, töten die Partikel alle untersuchten Organismen unterhalb eines bestimmten Verhältnisses von Phosphat zu Lanthanoxid ab. Solange noch freies Phosphat und ungesättigtes Lanthan verfügbar ist, wird dieses vom Lanthan gebunden. Erst wenn sehr wenig freies Phosphat vorhanden ist, werden die Organismen von noch unverbrauchtem Lanthan angegriffen, im Wachstum gehemmt und schliesslich abgetötet. Der hier untersuchte Mechanismus liefert wertvolle Erkenntnisse zum biologischen Verhalten von Lanthanoxid und lässt gegebenenfalls eine Anwendung in der Trinkwasseraufbereitung oder Abwasserreinigung zu. Dieselbe Strategie (Nährstoffentzug) könnte möglicherweise auch auf andere *Seltenen Erden-Oxide* ausgeweitet werden.

Kapitel 4 zeigt, wie sogenannte *living materials* konzipiert und entwickelt werden. Inspiriert durch die flauschige, weisse Pilzschicht auf Camembert Käse werden klassische Polymertechniken mit lebendigen Organismen gepaart und dadurch *living materials* erschaffen. Die pilzige Oberfläche des Camemberts ist nicht nur für die Reifung des Käses und für den einzigartigen, von Gourmets geschätzten Geschmack verantwortlich, sondern übernimmt als aktiver Organismus auch die Verteidigung des Käses. Durch die dichte Hyphen-Schicht hindurch können keine anderen Mikroben den Käse erreichen und ihn kontaminieren. Um dieses Konzept biotechnologisch in Materialien auszunutzen, wird ein Pilz (*Penicillium roqueforti* – ein harmloser, geniessbarer Edelschimmelpilz) in eine künstlich erschaffene biologische Nische gesperrt. Diese ist weniger als einen halben Millimeter dick und bis zu 500 cm² gross. Abgetrennt durch eine Plastikfolie auf der einen und eine sehr dünne, nanoporöse Membran auf der anderen Seite, kann sich der Pilz nur innerhalb dieses begrenzten Volumens ausbreiten. Die Löcher in der Membran sind klein genug, um ein Austreten des Pilzes oder dessen Sporen zu verhindern, erlauben jedoch zugleich den Austausch von Nährstoffen, Gasen und Stoffwechselprodukten mit der Umgebung. In diesem vierten Kapitel wird beschrieben, wie erstmals solche *living materials* hergestellt und erfolgreich getestet wurden. Um die Aktivität des *living materials* zu demonstrieren, wurde eine Zuckerlösung auf die Oberflächen gegeben und so eine künstliche Verschmutzung simuliert und die selbst-reinigende Wirkung getestet. Es zeigte sich, dass die Oberflächen innerhalb einiger Tage vom aufgebrauchten Zucker befreit wurden. Dabei nahm die Pilzdichte innerhalb der Schicht kontinuierlich zu. Für anwendungsorientierte Materialien ist es wichtig, dass eine Oberfläche auch längere Zeit haltbar und aktiv ist. Um solche Anwendungszyklen zu simulieren, wurden die *living materials* nach einer ersten Selbstreinigungsphase einer Hungerperiode unterworfen. Generell sind Pilze in der Lage, Sporen zu bilden, welche lange Zeiten der Trockenheit, Temperaturextreme und Nährstoff-

mangel überdauern können. Tatsächlich konnten auch hier die Oberflächen nach einer Ruhephase für einen zweiten Reinigungszyklus eingesetzt werden.

Die Inkorporation von anderen Lebewesen, z.B. anderen Pilzen (siehe Kapitel 5), Algen oder Bakterien, eröffnet eine Fülle von neuartigen intelligenten Materialien, welche spezifische Aufgaben übernehmen können. Neben fantasievollen Anwendungen wie fotosynthesisierenden, selbstreinigenden Hochhaus-Fassaden ist insbesondere auch die Verwendung von *living materials* als Produktionseinheit denkbar. Durch die kontinuierliche Ernährung werden konstant sekundäre Metaboliten gebildet und via Membran an die Umgebung abgegeben. Dadurch erhält man eine vorteilhafte in-situ Abtrennung des Produktes.

Kapitel 5 verwendet das in Kapitel 4 vorgestellte Konzept der *living materials* um selbst-sterilisierende Oberflächen zu kreieren. Analog wird hier der Penicillin produzierende Schimmelpilz *Penicillium chrysogenum* in eine künstliche biologische Nische gesperrt. Während der Pilz in seiner begrenzten Schicht wächst, produziert er Penicillin, welches diffusiv auf die Oberseite der Membran gelangt. Neben der quantitativen Bestimmung des Penicillin-gehalts wird auch die direkte Wirkung auf Bakterien untersucht. Während Gram-positive Bakterien effektiv abgetötet werden, sind Gram-negative Bakterien aufgrund ihrer Penicillin-resistenz nicht beeinträchtigt.

Diese hier vorgestellten Oberflächen zeigen, wie *living material* als intelligente Materialien zum Einsatz kommen können. Dank der Produktion der aktiven Substanz direkt vom Material selbst, hat ein solches Material eine theoretisch unbegrenzte Lebensdauer, da der Vorrat an Agens niemals erschöpft ist.

In **Kapitel 6** folgt eine Rekapitulation der im Rahmen dieser Doktorarbeit erforschten und hier vorgestellten Materialien. Ein Ausblick auf kommende Forschungs- und Anwendungsmöglichkeiten, insbesondere von *living materials*, beschliesst diese Arbeit.

Summary

Whether a tent made of leather, a golden coin, dirt-repellent windshields, or surgical instruments made of stainless steel – since the beginning of time, we are utilizing materials to be more productive, more efficient, and to make our lives as comfortable as possible. Nowadays, various techniques and materials are combined to produce multi-functional materials with fascinating characteristics. The thesis at hand describes novel concepts to create intelligent materials and presents how these strategies can be used to successfully fabricate antibacterial materials. Three novel different *smart* materials are presented here. Smart materials are adaptive and accommodate changing environmental conditions and therefore avoid conventional problems such as early exhaustion or manifestation of bacterial resistances against antibiotics.

Chapter 1 recapitulates the historical evolution of materials – from passive materials like stones to plastics and finally to intelligent, adaptive materials. By the continual enhancement and combination of different materials, complex and functional materials were created. This first chapter focuses on agent-releasing materials, antimicrobial strategies, and compares classic to adaptive materials. While a passive material holds only static functions, newer materials are enabled to emit substances to the environment and interact with it. Especially for substance releasing materials (e.g. antibacterial agents), a controlled delivery is highly desirable. Classically, a material is preloaded with a function, typically small molecules, which are then continuously released during exposure. To reduce the emissions to a minimum, *smart* materials are currently being explored. Such intelligent materials only release the antecedently loaded molecules when they are really needed. By the integration of biological, living microorganisms into materials one can go even one step further. In this thesis, *living materials* are developed that take advantage of the microorganisms' properties and capability to produce and release active agents. This eliminates the preloading process and allows for a theoretically unlimited shelf life.

Chapter 2 describes the development of reactive antibacterial fibers based on the well-known antibacterial properties of silver. Silver ions and many other metal ions such as copper, tin, or iron, have a damaging effect on bacteria and fungi. Here, engineered composite nanoparticles are used instead of conventional bulk silver. The particles consist of 20-50 nm tricalcium phosphate (TCP) carrier particles which are spiked with small 1-2 nm sized silver nanoparticles. The composite silver-TCP particles are incorporated into nylon fibers which are

subsequently tested for their antibacterial effect. Since TCP is an essential nutrient for bacteria and therefore consumed by them, silver ions are only released to the environment when the carrier particles are degraded by bacteria. The fibers produced here have a total silver content of only 0.026 % and presented an excellent antibacterial activity against the bacteria strains *Escherichia coli* and *Streptococcus sanguinis*. Within 24 hours the colony-forming units were reduced by 99.999 %, respectively by 99.6 %. Thanks to the bacteria-triggered release of silver, no valuable and toxic silver is released in times with no bacterial contamination. Therefore, the shelf life of such a material is significantly increased. Moreover, this system is very effective due to the extremely small size of nanoparticles. The large surface to volume ratio of nanoparticles allows a quick and particular efficient effect. The simple and inexpensive production of polymer fibers containing silver-TCP nanoparticles promises a variety of applications in textiles or (tooth) brushes.

Chapter 3 shows how to create antimicrobial materials by the withdrawal of essential nutrients. Phosphate is an essential building block for all creatures and universally used in genetic material (DNA), proteins and energy carriers (ATP). Often the lack of phosphate limits the further growth of a population. Generally, by withdrawing any essential nutrient from a life cycle, a population can be limited. Here, lanthanum oxide nanoparticles (La_2O_3) are employed to remove essential phosphate from nutrient solutions and thus to limit and even expunge algae, fungi, and bacteria populations. Lanthanum, a transition metal in the group of the rare earths elements, is known for its high affinity to phosphate and is already used in medical applications for patients with liver disease: Lanthanum carbonate is applied to reduce the phosphate levels in the patients' blood. In chapter 3, the effect of lanthanum oxide nanoparticles in phosphate-containing bacteria, fungi and algae cultures is examined. While in phosphate-rich solutions no toxic effect was observed, below a certain phosphate to lanthanum oxide ratio all organisms were killed by the particles. As long as free phosphate and unsaturated lanthanum was available, the phosphate was bound by the lanthanum. Only when very little free phosphate was present, the growth was inhibited and the organisms were directly attacked and ultimately killed by the lanthanum oxide. The study of this mechanism provides valuable insights to the biological behavior of lanthanum oxide and may provide applications in drinking water or wastewater treatment. The same strategy of nutrient deprivation could possibly be extended to other rare earth oxides.

Chapter 4 introduces so-called *living materials*. Inspired by the fluffy fungal layer on Camembert cheese, classic material science techniques are coupled with living organisms in

order to design and fabricate *living materials*. The fungus on the Camembert is not only responsible for the maturation of the cheese and the unique taste esteemed by gourmets, but also actively defends the cheese from other microorganisms. The dense layer of hyphae prevents the cheese from undesired contaminations. To imitate this natural concept, artificial biological niches are provided and seeded with a fungus (*Penicillium roqueforti* – a harmless, edible mold). The fungus is confined to polymeric structures that are less than half a millimeter thick and up to 500 cm² large. Separated by a plastic film on one side and a very thin nanoporous membrane on the other side, the fungus can only spread within this limited volume. The pores in the membrane are small enough to prevent the escape of the fungus or its spores, but simultaneously allow the exchange of nutrients, gases, and metabolic products with the environment. In this fourth chapter, it is described how *living materials* have been successfully fabricated and tested for the first time. To demonstrate the activity and test the self-cleaning effect of *living materials*, a sugar solution was applied to the surfaces in order to simulate an artificial food spill. Within a few days, the surfaces consumed all applied sugar and the hyphae density inside the *living material* increased continuously. Importantly for application-oriented materials, the stability and cyclic behavior of the *living materials* were investigated. To simulate such an application cycle, the surfaces were subjected to a starvation period after the first self-cleaning phase. Fungi are able to form spores, which survive long periods of dryness, temperature extremes and lack of nutrients. Indeed, the surfaces could be awakened again from a waiting state and reused for a second cleaning cycle.

The incorporation of other organisms, e.g. other fungi (see Chapter 5), algae, or bacteria into *living materials* uncovers plenty of novel smart materials. Besides fanciful applications such as photosynthetic, self-cleaning high-rise buildings, the use of *living materials* as production units is conceivable. By continuous nourishment of *living materials*, steadily formed secondary metabolites are delivered via membrane into the environment. This provides a convenient in-situ separation of product and production site.

Chapter 5 utilizes the concept of *living materials* presented in Chapter 4 to produce self-sterilizing surfaces. Similarly, the penicillin-producing fungus *Penicillium chrysogenum* was confined to an artificial biological niche. While the fungus grew inside its well-defined layer, penicillin was produced and diffusively transported to the upper side of the membrane. In addition to quantitative measurement of the penicillin content, the direct effect on bacteria was examined. While Gram-positive bacteria were killed effectively, Gram-negative bacteria remained unaffected due to their penicillin resistance. The here presented surfaces show how

living materials can be used as intelligent materials with an *on site* production of active substances. Therefore, the material theoretically has an unlimited shelf life as the agent is never exhausted.

Chapter 6 recapitulates the concepts explored in this thesis. An outlook, in particular on future applications of *living materials*, concludes this work.