

Recherche de l'effet des matériaux nanofibreux de polycaprolactone sur les bactéries et levures

Marta Štindlová

Département de la biochimie et microbiologie
Université de la chimie et technologie
Prague, République tchèque
ORCID : 0000-0002-5085-8983

Kamila Zdeňková

Département de la biochimie et microbiologie
Université de la chimie et technologie
Prague, République tchèque
ORCID : 0000-0002-8170-3263

Věra Jenčová

Département de chimie, Faculté des sciences, des lettres et de l'éducation
Université technique de Liberec
Liberec, République tchèque
ORCID : 0000-0001-7391-9526

Eva Kuželová Košťáková

Département de chimie, Faculté des sciences, des lettres et de l'éducation
Université technique de Liberec
Liberec, République tchèque
ORCID : 0000-0002-5758-3206

Václav Peroutka

Département de la biochimie et microbiologie
Université de la chimie et technologie
Prague, République tchèque
ORCID : 0000-0002-0597-1063

Simona Lencová

Département de la biochimie et microbiologie
Université de la chimie et technologie
Prague, République tchèque
ORCID : 0000-0002-6874-5944

Résumé — Pour pouvoir développer les matériaux nanofibreux (MN) qui minimisent le risque de contamination microbienne, il est crucial de comprendre comment ces deux entités interagissent. Aujourd'hui, on sait que la morphologie des nanofibres, notamment leur diamètre, est fondamentale pour la rétention et la formation du biofilm des bactéries et des levures. Néanmoins, les effets de fibres non-tissées en poly-ε-caprolactone (PCL), le polymère utilisé dans beaucoup de domaines différents, sont peu examinés. Alors, pour étudier les interactions entre les différents PCL MN, on a évalué deux paramètres principaux : i) le diamètre des fibres (noté comme PCL45 et PCL80) et ii) les structures créées sur la surface des fibres. Comme les organismes modèles, on a choisi les bactéries *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, et les levures *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*. D'après les données obtenues, on peut estimer qu'en cas de bactéries, la rétention est plus haute pour les cocci que pour les tiges, et les structures ne créent pas de différences significatives. En cas de levures, on ne voit pas de différence, car plus de deux ordres de grandeur de cellules sont retenues sur chaque matériel. Pour la formation du biofilm, les bactéries colonisent PCL MN moins que le polystyrène, mais les levures gardent un nombre similaire ou plus élevé. En utilisant la microscopie électronique à balayage (MEB), on voit que les microorganismes prolifèrent principalement sur un côté de PCL MN et le diamètre des fibres où les cellules savent proliférer. En plus, on a développé la méthodologie pour mesurer l'activité métabolique des biofilms sur les PCL MN qui montre que, sauf *S. aureus* ATCC 6538, toutes les bactéries sont plus actives sur les MN que sur le polystyrène. Les données pour les levures sont en train d'être évaluées.

Mots-clés — matériaux nanofibreux, bactéries, levures, biofilm, morphologie, rétention, activité métabolique

I. INTRODUCTION

Actuellement, beaucoup de domaines d'activité humaine, comme la médecine, la biotechnologie ou l'industrie agroalimentaire, utilisent les matériaux nanofibreux (MN) électrofilés. Leurs qualités avantageuses sont leur rapport surface/volume, leur perméabilité pour l'air, leur biodégradabilité ou leur compatibilité avec les systèmes biologiques. Par conséquent, la recherche primaire se concentre sur leur sécurité, que ce soit en termes physico-chimiques (toxicité, libération des particules) ou microbiologiques (colonisation) [1].

Pour prévenir la fixation microbienne sur la surface des MN, on applique des substances biocides, par exemple les nanoparticules d'argent ou de métaux, des extraits antimicrobiens ou même des substances antibiotiques et antifongiques [2]. Bien qu'il y ait une grande variété de procédés possibles, on lutte contre la résistance antibiotique ; l'effet des extraits est limité [3] et les nanoparticules peuvent être libérées dans l'environnement. Alors, il vaut mieux modifier les fibres de MN elles-mêmes pour réduire la charge environnementale et donner des qualités différentes (peut-être aussi antimicrobiennes) aux MN.

Avant le début de l'étude présentée, il était déjà établi que les caractères de MN en pur polymère avaient un effet sur les microorganismes. Par exemple, le diamètre des fibres ainsi que la densité de surface influencent la formation du biofilm et la rétention des cellules microbiennes sur les MN en polyamide [4]. En plus, il est possible de fabriquer de nouveaux MN avec les propriétés antibactériennes en créant des nanostructures sur les surfaces des fibres qui peuvent avoir la capacité de tuer les microorganismes au contact ou dans une période très courte [5]. L'autre côté de la recherche se concentre sur la production de biosenseurs pour contrôler la qualité des produits alimentaires ou de l'eau [6] et même sur la possibilité d'avoir les MN comme les supports de biofilms [7, 8].

Afin d'étudier les changements reçus par la modification structurelle, on a dirigé notre recherche sur les MN en polycaprolactone sans ou avec les structures sur leurs fibres en utilisant deux moyens différents. Le premier a produit les structures épineuses en ajoutant du polymère, l'autre a créé des structures en dégradant les fibres partiellement par une enzyme.

II. MATÉRIAUX ET MÉTHODOLOGIE

A. Les matériaux nanofibreux

Les PCL MN étaient préparés par l'électrofilage sans aiguille sur la machine NS 1WS500U (Elmarco, République tchèque) et modifiés à l'Université technique de Liberec. Les détails de ce procès sont publiés en [9] et les paramètres les plus importants sont montrés dans le Tableau 1 avec les images des structures sur la Fig. 1. Le matériel de référence était le polystyrène (le fond des plaques de microtitration).

TABLEAU 1. LES PARAMÈTRES ET LES MODIFICATIONS STRUCTURELLES DES MATÉRIAUX NANOFIBREUX

Matériel	Poids par surface (g/m ²)	Solution originale pour électrofilage (% poids)	Modification
PCL45	20,6	16	— ^a .
PCL45_80	21,7	16	Traitement double face avec PCL80 (1 % en poids) dans l'acétate de pentyle (0,85 g/l m ²)
PCL80	20,0	10	— ^a .
PCL80_80	21,5	10	Traitement double face avec PCL80 (1 % en poids) dans l'acétate de pentyle (1,50 g/l m ²)
PCL80_E	17,0	10	Immersion dans la solution enzymatique de lipase (5 U/10 mg de matériel) dans PBS pour 24 h

^a. — ... pas de valeur.

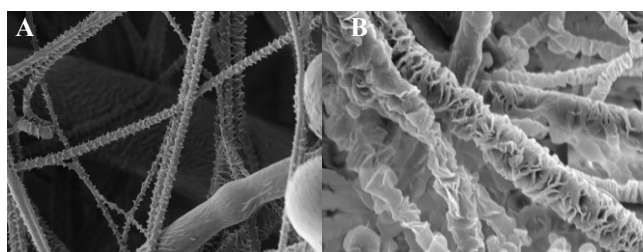


Fig. 1. Les images MEB des matériaux nanofibreux avec les modifications structurelles. A ... PCL45_80 (traitement avec PCL80 dans PeAc), B ... PCL80_E (traitement enzymatique).

B. Les cultures microbiennes

Deux bactéries et deux levures obtenues de la Collection de Microorganismes Tchèque ont été testées pour les expériences car elles possèdent des propriétés variées. On a choisi deux souches de chaque espèce ; nominativement la bactérie Gram-positive *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et 6538, et la bactérie Gram-négative *Escherichia coli* ATCC 25922 et 8739, plus les levures *Candida albicans* ATCC 10231 et 90028 (qui produisent du pseudomycélium), et *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 et CCM 8381 (qui restent toujours en cellules uniques). Les bactéries étaient cultivées dans le bouillon tryptone soja (BTS) ou sur l'agar tryptone soja (ATS) à 37 °C. Les levures étaient cultivées dans le bouillon à l'extrait de malt (BEM) ou sur l'agar à l'extrait de malt (AEM) à 25 °C.

C. Les tests réalisés

Plusieurs tests ont été conduits pour étudier les interactions de base entre les MN et les microorganismes. Le premier était la rétention : 3 ml de suspension microbienne ont été filtrés à travers une membrane de PCL NM (5 cm de diamètre, sauf PCL80_E). Les cellules restantes dans le filtrat ont été diluées et appliquées sur ATS ou AEM comme en [4] pour compter les unités formant colonie (UFC). Les membranes PCL étaient aussi préparées pour analyse de MEB et visualisées sur le Tescan Vega3 SB Easy Probe.

Les autres tests se sont concentrés sur la formation de biofilm et le nombre de cellules viables et métaboliquement actives sur les carrés de 1x1 cm de tous les PCL MN cultivés dans soit BTS, soit BEM. Les méthodologies de compte des UFC, MEB et le test d'activité métabolique ont été appliquées

pour quantifier et visualiser les biofilms qui sont en effet les agrégats de cellules irréversiblement associés à une surface [4]. Les biofilms ont été soniqués pendant 3 min pour libérer les cellules adhérant aux PCL MN d'après [4] et pour compter les UFC/cm². Un parallèle a été préparé pour MEB. La seule méthodologie problématique était la détermination de cellules métaboliquement actives. Comme les MN peuvent absorber et mal dégager les substances colorées comme le résazurin [4], on a adapté le protocole appliqué par nos collègues utilisant le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT). On a testé ces modifications pour plusieurs MN avec succès en utilisant la culture pendant 2 h et la solution de lavage composée de dodécylsulfate de sodium, de diméthylsulfoxyde et de tampon phosphate salin (PBS). En plus, on a vérifié que la mesure spectrophotométrique à 595 nm était aussi idéale, donc les laboratoires peuvent réunir ce test avec la colorisation de biofilms avec le violet de cristallin [10,11].

III. RÉSULTATS

Les PCL MN ont été testés pour toutes les conditions dans le format apte pour les analyses mentionnées ci-dessous, même si quelques-uns sont toujours en train d'être évalués par notre équipe :

A. La filtration

La filtration a été faite avec des suspensions microbiennes de la densité optique (DO) de 0,5 et 1 McFarland en utilisant les PCL MN avec les fibres lisses ou structurées avec PCL80 parce que les seuls PCL80_E peuvent être rompus facilement à cause de haute mouillabilité. Pour les bactéries, il y a une grande différence entre les espèces : *S. aureus* est retenu beaucoup plus que *E. coli* sans tenir compte du DO (2 ordres de magnitude versus moins que 1 ordre). En ce qui concerne les propriétés de MN, PCL45 est meilleur que PCL80, peut-être grâce aux espaces plus petits entre les fibres, et les structures ne fournissent pas de changements majeurs. Les levures sont plus grandes que les bactéries, donc il y a toujours la réduction de 2 ordres de magnitude ou plus pour toutes les souches. Fig. 2 montre la comparaison entre les bactéries et les levures de la DO = 0,5 McF (une souche pour chacun comme les données sont similaires). En plus, MEB a montré que ces bactéries et levures ne passent pas à travers le MN. Alors, tous les PCL MN sont pertinents pour la filtration des levures et des cocci.

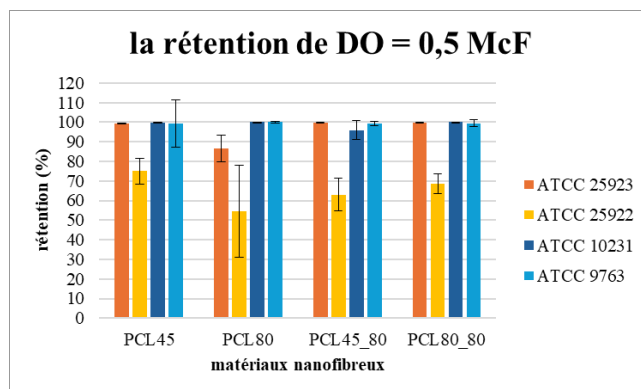


Fig. 2. Le pourcentage de la rétention de cellules de la densité optique (DO) de 0,5 McFarland. Les deux bactéries sont montrées en orange à gauche, les deux levures en bleu à droite.

B. La formation du biofilm

Pour la formation du biofilm sur les MN, on a choisi 48 h pour les bactéries et 72 h pour les levures avec la référence de la croissance sur le polystyrène. Les deux types de biofilms se sont formés sur tous les MN, ce qui correspond aux études indiquant que les PCL MN non fonctionnalisés sont facilement colonisés par des bactéries [1].

Les bactéries ont généralement colonisé les MN moins que le polystyrène, au moyen de 8,5–61,3 % avec les nombres de 1.52×10^6 – 4.55×10^8 UFC/cm², sauf la souche *S. aureus* ATCC 6538 qui a proliféré sur PCL80_E plus que sur le polystyrène. Il n'y a pas d'autres tendances générales parmi toutes les souches testées comme par exemple, *S. aureus* ATCC 6538 profite des structures et pousse plus sur les PCL modifiés ($p < 0,01$) mais *E. coli* ATCC 25922 y pousse moins ($p < 0,01$) – voir Fig. 3A.

Les levures se comportaient à l'inverse et elles ont colonisé les PCL MN plus que le polystyrène dans la plupart des cas. Le nombre de UFC était entre $5,94 \times 10^4$ – $6,58 \times 10^6$ UFC/cm². En plus, il semble que les levures préfèrent les fibres PCL80 pour leur prolifération et les structures secondaires peuvent diminuer leur nombre – voir Fig. 3B. Alors pour avoir un matériel le moins propice pour les levures, il faut choisir PCL45_80, et pour le plus propice c'est PCL80.

Les biofilms ont été aussi visualisés en utilisant MEB (voir les images de choix sur Fig. 4) pour savoir où les microorganismes croissent sur les MN. Pour les microorganismes, les petits écartements de PCL45 causent plutôt la croissance sur la surface des fibres, et les grands écartements de PCL80 permettent la croissance du biofilm aussi dans la structure du MN. Pourtant, les bactéries savent créer des pellicules de biofilms forts sur certains MN. Cependant, les levures font tout ce qu'elles peuvent pour s'enfoncer dans la structure de fibres et leurs biofilms sont moins forts.

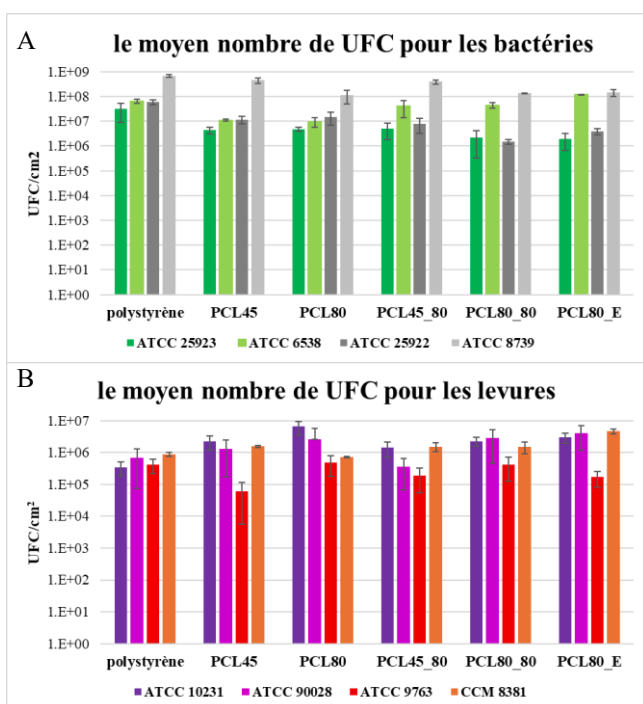


Fig. 3. Les graphes montrant les moyennes de UFC/cm² de matériel avec du biofilm de bactéries (48 h, partie A, *S. aureus* en vert, *E. coli* en gris) et des levures (72 h, partie B, *C. albicans* en violet, *S. cerevisiae* en rouge).

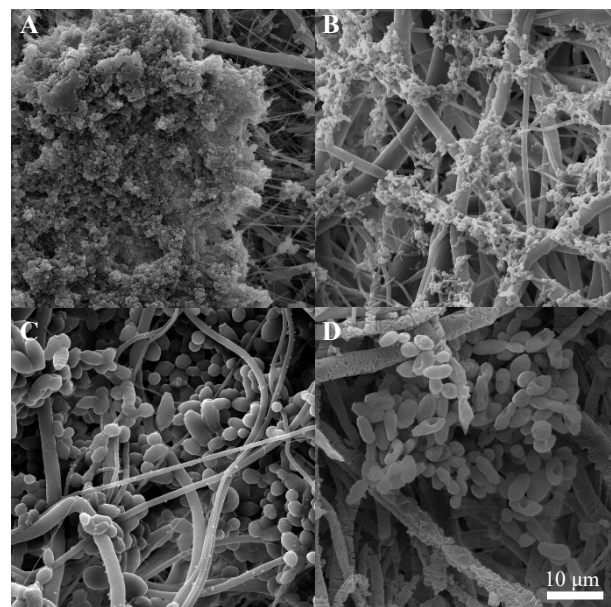


Fig. 4. Les images MEB à l'agrandissement de 5000×. A ... la pellicule de *S. aureus* ATCC 6538 sur PCL45. B ... la croissance d'*E. coli* ATCC 8739 sur PCL80_80 (les structures ne sont pas bien visibles à cause de l'agrandissement). C ... les cellules et le pseudomycélium de *C. albicans* ATCC 10231 sur PCL80. D... les cellules de *S. cerevisiae* ATCC 9763 sur PCL80_E (les structures sont déjà visibles). 10 µm

En plus, les MN sont colonisés principalement sur le côté le mieux accessible au bouillon ; peu importe si ils sont au fond ou à la surface (certains MN flottent sur le bouillon (PCL45_80) et quelques-uns noient immédiatement (PCL80_E)).

C. L'activité métabolique

Pour évaluer l'activité métabolique de biofilms (et aussi ajouter les informations sur leur viabilité après 48 h ou 72 h de culture), le test MTT a été conduit. Il y avait plusieurs facteurs à prendre en compte comme la concentration de MTT, le temps d'incubation ou la solution de lavage. [12] Malgré cela, nous avons créé un protocole qui convient à la fois aux bactéries et aux levures (avec de toutes petites variations), sans être trop laborieux pour le personnel. Cela peut permettre aux laboratoires d'unifier le protocole et de mesurer l'activité métabolique pour ces deux microorganismes en une fois (en ayant deux parallèles de chaque échantillon à cause de la ménadione).

Malgré les nombres similaires de bactéries par le compte UFC, leur activité métabolique diffère vraiment avec *S. aureus* ATCC 6538 ayant une activité plus basse sur les MN que sur le polystyrène. Il y a une différence significative entre les espèces bactériennes sauf pour PCL80_E ($p > 0,05$) et il semble que les deux types de structures sur les fibres causent l'augmentation de l'activité métabolique en comparaison avec les fibres lisses. Pour les détails, voir la Fig. 5.

Les données pour les levures sont en train d'être évaluées, mais par exemple pour PCL80, il semble que l'activité métabolique de *C. albicans* diminue en comparaison avec le polystyrène (malgré des nombres de UFC plus élevés ; $p < 0,05$), mais pour *S. cerevisiae* l'activité métabolique reste similaire ($p > 0,05$).

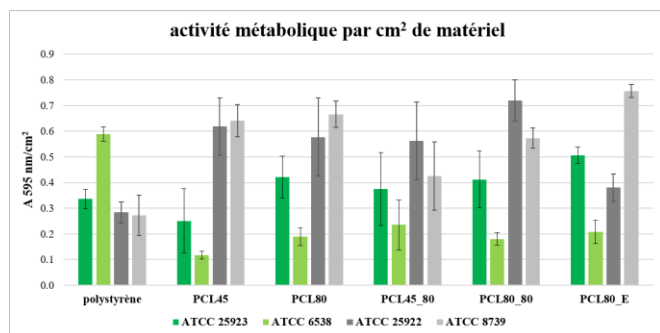


Fig. 5 La comparaison de l'activité métabolique des bactéries sur les différents matériaux (marquée comme l'absorbance à 595 nm). Les souches *S. aureus* sont en vert et les souches *E. coli* en gris.

IV. CONCLUSION

Dans cette étude, cinq PCL MN électrofilés en deux diamètres de fibre différents, soit lisses, soit structurées, ont été testés en termes d'interactions avec des souches de *S. aureus*, d'*E. coli*, de *C. albicans* et de *S. cerevisiae* dans le cadre de la rétention des cellules, de la formation du biofilm et de l'activité métabolique du biofilm. La rétention est la plus efficace pour les levures, comme elles ont des cellules plus grandes que les bactéries. Pour la rétention, le diamètre de fibres est plus important que leur structure. Le biofilm pousse dans les zones spécifiques données par les trous entre les fibres (les PCL45 sont colonisés principalement sur la surface, mais les PCL80 aussi à l'intérieur). Le nombre UFC sur les MN diffère d'après la souche et ne peut pas être généralisé parce que le diamètre et les structures peuvent soit réduire soit favoriser la formation de biofilm. En ce qui concerne l'activité métabolique, les données ne montrent pas de tendance non plus, mais elles sont liées aux UFC.

REMERCIEMENTS

Cette recherche a été soutenue par l'Agence tchèque pour la recherche (GAČR), subvention n° 23-05154S. Les auteurs remercient aussi les équipes de l'Université de la chimie et de la technologie et de l'Université technique de Liberec pour des espaces, des instruments et des échantillons pour exécuter cette recherche.

- [1] J. A. Tamayo-Ramos, C. Rumbo, F. Caso, A. Rinaldi, S. Garroni, et al., (2018) "Analysis of polycaprolactone microfibers as biofilm carriers for biotechnologically relevant bacteria." *ACS Appl Mater Interfaces*, 10(38), pp. 32773–32781.
- [2] I. Maliszewska, T. Czapka, (2022) "Electrospun polymer nanofibers with antimicrobial activity." *Polymers*, 14(9), 1661.
- [3] S. Lencova, H. Stiborova, M. Munzarova, K. Demnerova, K. Zdenkova, (2022) "Potential of polyamide nanofibers with natamycin, rosemary extract, and green tea extract in active food packaging development: Interactions with food pathogens and assessment of microbial risks elimination." *Front Microbiol*, 13, 857423.
- [4] S. Lencova, V. Svarcova, H. Stiborova, K. Demnerova, V. Jencova, et al., (2021) "Bacterial biofilms on polyamide nanofibers: Factors influencing biofilm formation and evaluation." *ACS Appl Mater Interfaces*, 13(2), pp. 2277–2288.
- [5] J. Jenkins, J. Mantell, C. Neal, A. Gholinia, P. Verkade, et al., (2020) "Antibacterial effects of nanopillar surfaces are mediated by cell impedance, penetration and induction of oxidative stress." *Nat Commun*, 11, 1626.
- [6] B. Hosnedlova, J. Sochor, M. Baron, G. Bjørklund, R. Kizek, (2019) "Application of nanotechnology-based biosensors in analysis of wine compounds and control of wine quality and safety: A critical review." *Crit Rev in Food Sci Nutr*, 60(19), pp. 3271–3289.
- [7] Hu M-X, Li J-N, Guo Q, Zhu Y-Q, Niu H-M (2019) "Probiotics biofilm-integrated electrospun nanofiber membranes: A new starter culture for fermented milk production." *J Agric Food Chem*, 67(11), pp. 3198–3208.
- [8] V. Peroutka, M. Stindlova, V. Jencova, V. Lacinova, J. Jiresova, et al., (2025) "Assessing the impact of polyamide nanofibrous material areal weight on *Lactocaseibacillus rhamnosus* biofilm formation and resistance to storage conditions and contamination." – *ACS Omega*, 10(41), pp. 47867–47878.
- [9] S. Lencova, M. Stindlova, K. Havlickova, V. Jencova, V. Peroutka, et al. (2024) "Influence of fiber diameter of polycaprolactone nanofibrous materials on biofilm formation and retention of bacterial cells." *ACS Appl Mater Interfaces*, 16(20), pp. 25813–25824.
- [10] M. Stindlova, V. Peroutka, V. Jencova, K. Havlickova, S. Lencova (2024) "Application of MTT assay for probing metabolic activity in bacterial biofilm-forming cells on nanofibrous materials." *J Microbiol Methods* 224, 107010.
- [11] M. Stindlova, V. Peroutka, K. Zdenkova, S. Lencova (2025) "Assessing metabolic activity of yeast biofilm-forming cells on nanofibrous materials using MTT assay." *Folia Microbiol*, <https://doi.org/10.1007/s12223-025-01304-1>.
- [12] E. Grela, J. Kozłowska, A. Grabowiecka, (2018) "Current methodology of MTT assay in bacteria - a review." *Acta Histochem*. 120(4), pp. 303–311.