

University of Groningen

## Nanodiamond sensors for microbiology and cell biology

Ong, Yori

DOI:  
[10.33612/diss.123702347](https://doi.org/10.33612/diss.123702347)

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*  
Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
2020

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

*Citation for published version (APA):*  
Ong, Y. (2020). *Nanodiamond sensors for microbiology and cell biology*. University of Groningen.  
<https://doi.org/10.33612/diss.123702347>

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

---

## Samenvatting

Het NV (Nitrogen-Vacancy) defect in diamant bestaat uit een stikstofatoom en een naastliggend roostergat, die de plaats van twee koolstofatomen in het kristalrooster innemen. Dit defect geeft diamant een rode fluorescentie met interessante eigenschappen. Allereerst is de fluorescentie afkomstig uit het defect zeer stabiel, waardoor het signaal ook onder langdurige excitatie behouden blijft. Daarnaast is het fluorescentiesignaal gevoelig voor verschillende fysische parameters, waarvan fluctuaties van magnetische velden het voornaamst zijn. Het NV<sup>-</sup> defect kan aldus worden gebruikt als een sensor voor magnetisme in zijn nabije omgeving. Natuurkundig onderzoek van de afgelopen tien jaar heeft aangetoond dat het NV<sup>-</sup> defect voor deze toepassing in resolutie en sensitiviteit superieur is aan de meeste bestaande alternatieven.

Nanodiamant (ND) kan worden gefabriceerd op twee verschillende manieren: door gecontroleerde ontsteking van koolstofrijke explosieven en het vermalen van synthetisch diamant tot partikels van tien tot enkele honderden nanometers. Fluorescente nanodiamanten die het NV<sup>-</sup> defect bevatten, worden verkregen via het veralingsproces en zijn vormen de focus van dit proefschrift. Doordat deze deeltjes opgenomen kunnen worden door biologische cellen, kunnen zij dienen als magnetische sensoren die het binnenste van de cel in kaart kunnen brengen. Een bron van magnetische ruis in het binnenste van een cel is de aanwezigheid van vrije radicalen. Deze moleculen worden gekenmerkt door een ongepaard elektron, dat het molecuul zeer reactief en bovendien paramagnetisch maakt. Vrije radicalen spelen een belangrijke rol in verschillende biologische processen, waaronder metabolisme, communicatie, veroudering en celdood. Aangezien diamanten bestaan uit koolstof, kunnen oppervlaktomodificaties met functionele biomoleculen worden uitgevoerd met methodes beschikbaar in de organische chemie.

In het eerste hoofdstuk van dit proefschrift wordt de wetenschappelijke achtergrond geïntroduceerd voor het gebruik van FNDs als nanosensoren in de biologie.

In hoofdstuk 2 van dit proefschrift bevat een review van het wetenschap-

pelijke werk aan optische detectiemethodes voor verschillende grootheden in de intracellulaire omgeving. Optische sensoren bieden een hoge ruimtelijke resolutie en kunnen worden toegepast in combinatie met conventionele onderzoeksapparatuur in de biologie, zoals fluorescentiemicroscopen en confocale microscopen. Relevante fysische en chemische grootheden in de cel zijn onder andere temperatuur, zuurgraad (pH) en de concentraties van verschillende stoffen en elementen. Hieronder vallen zuurtof, anorganische ionen, radicalen en reactieve zuurstofverbindingen, genetisch materiaal en biomarkers. De laatste omvat een breed scala aan chemische stoffen die een bekende relatie hebben met fysiologische functies of pathologie.

Hoofdstuk 3 beschrijft een experimenteel onderzoek naar de vorm en kristaloriëntatie van kleine nanodiamanten. Deze nanodiamanten hebben een mediane diameter van 25 nm en bevatten gemiddeld één  $NV^-$  defect per partikel, wat resulteert in de grootste gevoeligheid voor signalen. Het onderzoek laat zien dat, in tegenstelling tot oudere modellen van FNDs, deze FNDs niet bij benadering rond zijn, maar eerder vlak en hoekig. De gemiddelde laterale afmeting was 23 nm, met een dikte van 5 nm, resulterend in een scherfvormig aspect. Er werd uitgewezen dat de grote vlakken bovendien een voorkeursoriëntatie hebben, namelijk de  $\langle 110 \rangle$  kristalas.

De vorm en kristaloriëntatie van de FNDs hebben directe implicaties voor hun toepassing als sensoren. De eerste implicatie is dat hun vlakke vorm de maximale afstand van het  $NV^-$  defect tot het oppervlak verkleint. Aangezien het oppervlak de voornaamste bron is van magnetische ruis die spinrelaxatie- en spincoherentietijden beperkt, wordt hierdoor ook de gevoeligheid van de sensor voor externe ruis kleiner. Naast andere implicaties, zal het hoekige aspect van de partikels een rol spelen in hun opname en transport door cellen, doordat er een grotere waarschijnlijkheid bestaat voor het doordringen van biologische membranen. Tot slot worden de mogelijkheden voor het functionaliseren van het oppervlak gekenmerkt door de  $\langle 110 \rangle$  oriëntatie van de grootste kristalvlakken.

In hoofdstuk 4 wordt de interactie van nanodiamant met bacteriën onderzocht. Gram-positieve *Staphylococcus Aureus* en Gram-negatieve *Escherichia Coli* worden hiervoor gebruikt als modelorganismen. De overleving van beide typen bacteriën werd beoordeeld aan de hand van kolonietelling, na 60 minuten incubatie met nanodiamant in verschillende groottes en concentraties in steriel DI-water en fosfaatbuffer. Aanzienlijke vermindering van de levensvatbaarheid in dit experiment werd alleen waargenomen bij *S. Aureus* in fosfaatbuffer. In de vervolgsperimenten werd met MTT-assay en biofilmformatie geen bacteriostatisch

of bactericide effect van het materiaal waargenomen. In confocale microscopie werd zichtbaar gemaakt dat nanodiamanten een sterke neiging hebben zich te hechten aan de celwand van *S. Aureus*. Uit de experimentele resultaten werd geconcludeerd dat nanodiamanten, in de concentraties relevant voor toepassing als biosensors, geen significant effect hadden op de overleving van de bacteriën.

De mechanismen die ten grondslag liggen aan de antibacteriële eigenschappen van nanodiamant werden verder onderzocht in hoofdstuk 5. De beschikbare literatuur over dit onderwerp bevat schijnbaar tegenstrijdige en dubbelzinnige resultaten. Een review van de literatuur laat zien dat de variatie resulteert uit het grote aantal factoren dat een rol speelt in de uitvoering van de experimenten. Deze factoren zijn onder andere het type nanodiamant, de oppervlaktechemie, de concentratie, incubatieduur, incubatiemedium en het type bacterie waarmee geëxperimenteerd wordt. In het experimentele deel van het hoofdstuk wordt voor twee bacteriestammen de overleving beoordeeld na incubatie met nanodiamant in groeimedium. De sterk EPS (Extracellular Polymeric Substance) producerende *Staphylococcus Aureus* wordt vergeleken met *Staphylococcus Epidermidis*, die in mindere mate EPS produceert. Hoewel gevonden werd dat toenemende concentraties nanodiamant de overleving van de bacteriën steeds verlaagt, werd geen minimale inhiberende concentratie (MIC) voor de partikels gevonden. Hierdoor ontstond de hypothese dat de afname van kolonievorming niet veroorzaakt werd door bacteriostatische of bactericide werking, maar door het verminderen van het aantal losse cellen door aggregatie van cellen en nanodiamant. Deze hypothese kon voldoende worden bevestigd door aggregatie ongedaan te maken met het sonificeren van de bacteriën in het experiment. De uitkomsten van dit onderzoek werpen een nieuw licht op hoe nanodiamanten schijnbaar kunnen leiden tot antibacteriële effecten.

In hoofdstuk 6 worden de resultaten uit dit proefschrift geplaatst in het perspectief van voortschrijdend onderzoek. Mogelijke toekomstige stappen en uitdagingen voor de ontwikkeling van op nanodiamant gebaseerde biosensors worden besproken. Een in potentie relevante toepassing van directe detectie van vrije radicalen ligt in het ophelderen van het fundamentele vraagstuk in de microbiologie over de rol van vrije radicalen en reactieve zuurstofverbindingen in de werking van antibiotica. Tot slot biedt het hoofdstuk een toekomstbeeld van toekomstig onderzoek in onze onderzoeksgroep.

