

Andrzej PAWLAK, Patrycja SZYMCZYK, Edward CHLEBUS, Centre for Advanced Manufacturing Technologies, Politechnika Wrocławska, Wrocław

Adam Feliks JUNKA, Anna SECEWICZ, Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Wrocław

OCENA ZDOLNOŚCI TWORZENIA BIOFILMU *P.AERUGINOSA* NA PRÓBKACH STOPU AZ31 UZYSKANEGO W TECHNOLOGII SLM

Streszczenie: W pracy przedstawiono wyniki badań nad oceną zdolności tworzenia biofilmu szczepu bakterii *P. aeruginosa*, na powierzchni próbek wyprodukowanych z lekkiego stopu magnezu - AZ31 w technologii SLM. Ilość kolonii bakteryjnych wyhodowanych w biofilnie, jest nawet 700x wyższa, w odniesieniu do skafoldów ze stopu Ti-6Al-7Nb, wyprodukowanych w tej samej technologii.

Słowa kluczowe: Selective Laser Melting, AZ31, *P. aeruginosa*

1. WSTĘP

Technologie przyrostowe (Additive Manufacturing – AM) posiadają przewagę nad konwencjonalnymi technologiami wytwórczymi ze względu na swobodę kształtowania skomplikowanych geometrii, oszczędność materiału oraz krótki czas od projektu do wytworzenia, zwłaszcza pojedynczych przedmiotów. Spośród technologii przyrostowych (AM), szczególne znaczenie stanowią technologie oparte na proszkach metali. Dobrze rozpoznane stopy tytanu (Ti-6Al-7Nb, czy Ti-6Al-4V), są powszechnie stosowane do wytwarzania implantów, ze skomplikowaną strukturą porowatą umożliwiającą przerost tkanek kostnych, w szczególności endoprotezy stawów kolanowych i biodrowych [1]. Interesującym materiałem, który również wobec aplikacji medycznych nie pozostał obojętny jest magnez wraz z jego stopami, pozwalający na bezinwazyjne usunięcie wszczepu z organizmu żywego w skutek resorpcji. Zbyt wysokie, niekontrolowane tempo resorpcji, nie pozwalało niestety na jego opracowanie i szersze zastosowanie. Technologie przyrostowe na przykładzie Selekttywnej Laserowej Mikrometalurgii (SLM), dzięki charakterystyce procesu, pozwalają na modyfikacje właściwości mechanicznych oraz materiałowych, co może prowadzić do uzyskania nowych charakterystyk. Łącząc wartości wytrzymałości specyficznej stopów magnezu odpowiadające właściwościom tkanek kostnych oraz zdolność do resorpcji, dostrzeżono perspektywę badań tego materiału w technologiach przyrostowych.

Bakterie *Pseudomonas aeruginosa* są częstą przyczyną występowania przewlekłego zapalenia kości [2]. Pacjenci z zaburzeniami systemu immunologicznego, oraz w trakcie inwazyjnych zabiegów chirurgicznych, są szczególnie narażeni na infekcje wywołane tymi bakteriami. *P. aeruginosa* wykazuje wysoką tendencję do formowania biofilmu. Biofilm, może tworzyć się nie tylko na żywych tkankach, ale również na wszczepach takich jak implanty, stenty, itp. [3].

Celem pracy było przebadanie uzyskanego materiału w technologii laserowej mikrometalurgii (SLM), w skutek przetapiania proszku stopu magnezu AZ31 za pomocą

wiązki lasera, pod kątem skłonności formowania biofilmu przez szczepy *P. aeruginosa* na powierzchni wyprodukowanych próbek.

2. MATERIAŁ I METODY

Wykorzystując urządzenie SLM50 firmy Realizer, wyprodukowano 6 próbek o średnicy 6,2 mm i wysokości 4 mm (Rys. 1) z proszku stopu AZ31 [4]. Próbki wytwarzane były z warstwą o grubości 50 μm , stosując moc lasera na poziomie 75W. Do badań wykorzystano proszek stopu AZ31 (3% Al., 1% Zn), zakupiony od TLS Technik GmbH & Co Spezialpulver KG, o frakcji 40-106 μm . Próbki usunięto z platformy procesowej, oraz zeszlifowano struktury podporowe pełniące funkcję rusztowania, ustalającego położenie próbek podczas procesu wytwórczego.

Szczep *P. aeruginosa* ATCC15442 rosnący na podłożu stałym (McConkey), przeniesiono do podłoża płynnego (TSB) i inkubowano przez 24h w temperaturze 37° w warunkach tlenowych, bez wytrząsania. Po tym okresie, gęstość zawiesiny ustalono densytometrycznie (Densimat) na 3×10^8 komórek/ml. Do tak przygotowanej zawiesiny, wprowadzono wyprodukowane próbki. Próbki te inkubowano w temp. 37°C przez 24h. Po okresie inkubacji próbki przepłukane zostały roztworem 0,9% NaCl, celem pozbycia się z powierzchni niezwiązanych bakterii. Następnie próbki wprowadzono do 1ml detergentu 0,5% saponiny i wytrząsnęto w celu oderwania biofilmu bakteryjnego. Po wytrząsaniu zawiesinę rozcieńczono i obliczono ilości komórek bakteryjnych zasiedlających analizowane próbki. Uzyskane wyniki dodatkowo potwierdzono obserwacją wizualną za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego Zeiss EVO MA25 (SEM).



Rys. 1. Wyprodukowane w technologii SLM próbki walcowe do przeprowadzenia hodowli

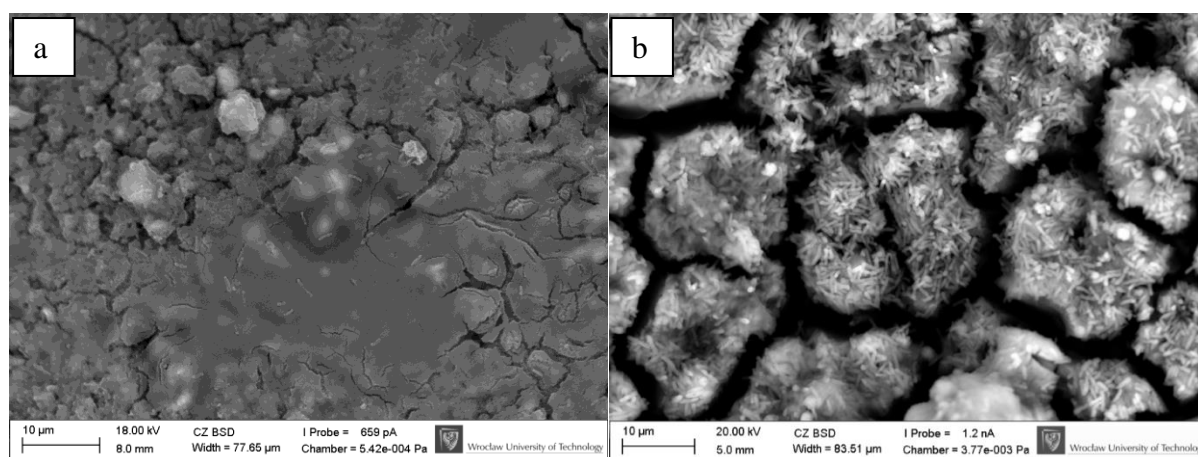
3. WYNIKI

Ilość kolonii bakteryjnych w utworzonym biofilmie na powierzchni badanych próbek wynosiła średnio $5,42 \times 10^9$ (Tabela 1). Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy zliczonymi ilościami bakterii na poszczególnych próbkach. W porównaniu do analogicznych badań, prowadzonych na skafoldach wyprodukowanych ze stopu Ti-6Al-7Nb, liczba drobnoustrojów była niemal 700-krotnie wyższa [4].

Tabela 1. Ilość komórek bakteryjnych biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, wyhodowanego na badanym materiale oraz na rusztowaniach ze stopu Ti6Al7Nb, uzyskanych w technologii SLM; cfu – colony forming units

Próbki	Powierzchnia	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	
		[cfu/próbkę]	[cfu/mm ²]	[cfu/próbkę]	[cfu/mm ²]
[rodzaj]	[mm ²]				
Skafold SLM - Ti6Al7Nb	523,28	3x10 ⁷	57 331	n.d.	n.d.
Skafold SLM - Ti6Al7Nb	756,26	n.d.	n.d.	2.33x10 ⁹	3 080 950
próbka walcowa SLM - AZ31	138,29	5.54x10 ⁹	39 168 072	4.42x10 ⁸	2 215 105

Na obrazach mikroskopowych, wyhodowanych biofilmów, wyraźnie widać już po 7 dniach pałeczki ropy błękitnej (Rys. 2a). Po 21 dniach, kolonie bakteryjne są zdecydowanie bardziej rozbudowane, a powstały biofilm dodatkowo spękany (Rys. 2b).



Rys. 2. Biofilm *P. aeruginosa*, na powierzchni wyprodukowanych próbek, a) po 7 dniach, b) po 21 dniach, SEM.

4. PODSUMOWANIE

Otrzymane wyniki wskazują na konieczność zwrócenia szczególnej uwagi na analizowany materiał ze względu na wysoką tendencję szczepu bakterii *P. aeruginosa* do tworzenia biofilmu na powierzchni stopu AZ31, uzyskanego w technologii SLM.

W przytoczonej pracy dotyczącej stopu tytanu Ti6Al7Nb [4], wykazano istotny spadek liczby komórek tworzących kolonię wskutek zastosowania chemicznej modyfikacji powierzchni, skutkujący redukcją o nawet 85%. Należy przeprowadzić dodatkowe badania, obróbki poprocesowej dla materiału uzyskanego w technologii SLM, przykładem przytoczonej publikacji, celem redukcji skłonności szczepu bakteryjnego *P. aeruginosa* do namnażania na rozpatrywanym materiale.

Przedstawione wyniki badań, wskazują na wysokie ryzyko wystąpienia etiologicznego zapalenia kości po wszczepieniu implantów wykonanych ze stopu AZ31, przetworzonego w technologii SLM. Mimo wysokiego potencjału dla opisywanego materiału pod kątem właściwości mechanicznych oraz niskiej cytotoksyczności, materiał wykazuje wysokie tendencje do tworzenia biofilmu bakteryjnego pałeczek gram-ujemnych *Pseudomonas aeruginosa*. Obecność biofilmu bakteryjnego na powierzchni wszczepu prowadzi do ochrony patogenu, przed mechanizmami obronnymi ustroju pacjenta, m.in. poprzez utrudnianie

penetracji antybiotyków i przeciwciał [5]. A to z kolei może utrudniać powrót pacjenta do pełnej sprawności po zabiegu implantacyjnym.

Badania współfinansowane ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

LITERATURA

- [1] Karoluk M., Pawlak A., Chlebus E.: Wykorzystanie technologii przyrostowej SLM w procesie przetwarzania stopu tytanu Ti-6Al-7Nb do zastosowań medycznych, Aktualne Problemy Biomechaniki, z. 8, 2014, s. 81-86
- [2] Szymczyk P., Junka A., Ziółkowski G., Smutnicka S., Bartoszewicz M., Chlebus E.: The ability of *S.aureus* to form biofilm on the Ti-6Al-7Nb scaffolds produced by Selective Laser Melting and subjected to the different types of surface modifications, Acta of Bioengineering and Biomechanics, vol. 15, no 1, 2013, p. 69-76
- [3] Bjarnsholt T.: Biofilm Infections, Springer Science. Springer, New York, 2011
- [4] Szymczyk P., Chlebus E., Junka A., Secewicz A.: Impact of surface modifications on ability of clinical *P.Aeruginosa* strains to form biofilm on the SLM-produced Ti-6Al-7NB scaffolds, Majówka Młodych Biomechaników 2014, XI Konferencja Naukowa im. prof. Dagmary Tejszerskiej, Ustroń, 9-11 maja 2014, materiały konferencyjne, s. 123-124
- [5] Zuluaga A., Galvis W., Saldarriaga J. Agudelo M., Salazar B., Vesga O.: Etiologic Diagnosis of chronic Osteomyelitis A Prospective Study. Archives of Internal Medicine, vol. 166, 2006, p. 95-100.

ABILITY OF CLINICAL *P.AERUGINOSA* STRAINS TO FORM BIOFILM ON THE SLM-PRODUCED AZ31 SPECIMENS

Abstract: In this work, results of research on ability to form biofilm by *P. aeruginosa* strains on AZ31 specimens manufactured in SLM technology are reported. The number of cells forming biofilm on specimens is even 700 times higher than on scaffolds manufactured from Ti-6Al-7Nb alloy by SLM technique.