

Podziękowania

Badania zostały przeprowadzone w ramach projektu PORTAL (kontrakt nr NCBiR/ERA-NET MATERA/5/2009).

Acknowledgments

The research has been performed as a part of the PORTAL Project (contract No. NCBiR/ERA-NET MATERA/5/2009).

Piśmiennictwo

- [1] Gu Y.W., Yong M.S., Tay B.Y., Lim C.S.: Synthesis and bioactivity of porous Ti alloy prepared by foaming with TiH₂. *Materials Science and Engineering*, vol. C 29 (2009) 1515-1520.
- [2] Karageorgiou V., Kaplan D.: Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26 (2005) 5474-5491.
- [3] Oh I.H., Nomura N., Masahashi N., Hanada S.: Mechanical properties of porous titanium compacts prepared by powder sintering. *Scripta Mater.* 49 (2003) 1197-1202.

References

- [4] Li J.P., Li S.H., de Groot K., Layrolle P.: Preparation and characterization of porous titanium. *Key Eng. Mater.* 218 (2002) 51-54.
- [5] Alvarez K., Nakajima H.: Metallic scaffolds for bone regeneration. *Materials*, 2 (2009) 790-832.
- [6] Łachwa A.: *Rozmyty świat zbiorów, liczb, faktów, reguł i decyzji. Problemy współczesnej nauki, teoria i zastosowania.* Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, Warszawa 2001.

WPŁYW DOMIESZEK NA PROCESY STERYLIZACJI BIOSZKŁA MAŁYMI DAWKAMI PROMIENIOWANIA JONIZUJĄCEGO

S.SZARSKA, I.MALISZEWSKA, K.TUPICA

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, 50-370 WROCŁAW
MAILTO: STANISLAWA.SZARSKA@PWR.WROC.PL

Streszczenie

W pracy pokazano wpływ domieszek na właściwości strukturalne bioszkieł. Przedstawiono sposoby otrzymywania i domieszkowania jonami srebra, miedzi lub żelaza, cienkich warstw bioszkieł otrzymanego metodą zol-żel. Określono aktywność bakteryjną Gram-ujemnych pałeczek ropy błękitnej *Pseudomonas aeruginosa* and Gram-dodatniego gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus* w domieszkowanych próbkach. Zbadano wpływ promieniowania ultrafioletowego na przeżywalność bakterii.

q: bioszkieł, efekt antybakteryjny, procesy sterylizacji, nanocząsteczki srebra

[*Inżynieria Biomateriałów*, 99-101, (2010), 47-50]

Wstęp

Biomateriały po wprowadzeniu do organizmu mogą ulec infekcji. Właściwości fizyczne materiału mogą wzmacniać jego odporność na mikroorganizmy. Biomateriał niemodyfikowany, nie posiadający metalicznych domieszek, nie wykazuje właściwości bakteriobójczych. Wiadomo jednak,

INFLUENCE OF DOPANTS ON STERILIZATION PROCESS OF BIOGLASS OF SMALL DOSE RADIATION

S.SZARSKA, I.MALISZEWSKA, K.TUPICA

WROCLAW UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, WROCLAW, POLAND
MAILTO: STANISLAWA.SZARSKA@PWR.WROC.PL

Abstract

A recent study has shown that the occurrence of structural alteration of the bioglass which accompanies the remarkable change in glass properties depends on the ions to be incorporated. In this paper, the preparation and antibacterial activity of doped with silver, copper and iron (respectively) bioactive glass thin films, obtained by sol-gel processing, are reported. The antibacterial activity against Gram-negative *Pseudomonas aeruginosa* and Gram-positive *Staphylococcus aureus* has been examined. The influence of UV irradiation of different doses on these samples has been investigated.

Keywords: bioglass, antibacterial effect, sterilization process, silver nanoparticles

[*Engineering of Biomaterials*, 99-101, (2010), 47-50]

Introduction

Biomaterials, after their implantation into the organism, can enhance infections. At implantation, the surface of biomaterials provides easy access into both tissue cells and bacteria. The physical properties of the material gives protection against microorganisms. Bacteria can participate

że niektóre metale np. srebro znalazły zastosowanie jako środek wspomagający zwalczanie drobnoustrojów. [1,2] Oprócz wpływu srebra na przebieg procesów sterylizacji zbadany zostanie wpływ innych pierwiastków, takich jak żelaza czy miedzi [3] oraz adhezja bakterii do bioszkieł otrzymanych w zależności od ich składu. Do sterylizacji użyte będzie promieniowanie ultrafioletowe.

Po sterylizacji określona zostanie przeżywalność bakterii w zależności od składu materiału, na którym się znajdowały, oraz od czasu naświetlania.

Materiały

Na podstawie wcześniejszych badań [5,6] otrzymano bioszkieła o składzie $36\text{CaO}\cdot 60\text{SiO}_2\cdot 4\text{P}_2\text{O}_5$ (mol%) (G- próbki). Podstawowy żel otrzymano z mieszaniny: TEOS-Si(OC₂H₅)₄; Ca(NO₃)₂·4H₂O; OP(C₂H₅O)₃; C₂H₅OH; 2N HNO₃ jako katalizator reakcji hydrolizy. Ten hydrolizat mieszano około 2 godzin. Potem hydrolizat domieszkowano Fe₂O₃ lub CuCO₃ i mieszano 15 min. Metodą spin-coating pokrywano szkiełka mikroskopowe. Wysuszone próbki były grzane z predkością 2°C/min do 550°C i przetrzymane około 2 godzin. Próbki zawierające srebro były domieszkowane po otrzymaniu bioszkieła.

Zdolność specjalnych mikroorganizmów takich jak bakterie lub grzyby do otrzymywania cząstek metalicznych jest znana. Syntezę nanocząstek poprzez grzyby *Penicillium* opisano w pracy Sadowski et al. [3] Otrzymana biomasa grzybowa użyta w biosyntezie rosła w cieczy zawierającej: 7g/l KH₂PO₄; 2 g/l K₂HPO₄; 0,1 g/l MgSO₄·7H₂O; 1g/l (NH₄)₂SO₄; 0,6 g ekstraktu drożdży i 10 g glukozy.

Próbki bioszkieła były zanurzone w cieczy zawierającej nanocząsteczki srebra przez 7 dni, w temp. pokojowej w zamkniętym naczyniu bez dostępu światła. Obecność brązowego koloru na powierzchni szkła wskazywała, że srebro koloidalne pokryło bioszkieło. Próbki poddano działaniu płynu SBF (symulowany roztwór fizjologiczny) przez okres 7 dni w temperaturze 37°C, pH płynu wynosiło 7,3.

Bakteriami, które posiewano był gronkowiec złocisty (SA), czyli *Staphylococcus aureus* i pałeczka ropy błękitnej (PA), czyli *Pseudomonas aeruginosa*. Do badań wykorzystano 24 godzinne bulionowe hodowle obu szczepów. Hodowlę bakterii prowadzono na podłożu płynnym w bulionie odżywczym. Podłoże było sterylizowane w autoklawie w temperaturze 121°C pod ciśnieniem 1,5 atmosfery przez 20 minut. Do 5 ml sterylnego bulionu odżywczego dodano 1 ml badanej hodowli i w takiej zawiesinie umieszczono próbki bioszkieła. Całość poddano inkubacji przez 5 dni, w cieplarni, w temperaturze odpowiednio 37°C dla gronkowca złocistego i 28°C dla pałeczki ropy błękitnej. Po 5 dniach próbki bioszkieła wyjęto z hodowli bakteryjnych i poddano sterylizacji. Po sterylizacji próbki bioszkieła wraz z próbkami kontrolnymi (bez sterylizacji) ponownie umieszczono w bulionie odżywczym i inkubowano przez okres 24 godzin. Następnie zmierzono gęstość optyczną hodowli OD 550nm za pomocą spektro-

TAB.1. Gęstość optyczna hodowli pałeczki ropy błękitnej i gronkowca złocistego po kontakcie z próbkami bioszkieł.

TAB.1. Mean values of optical density (OD) of the solution of *P.aeruginosa* and *S. aureus* culture after doped-bioglasses contact

	Próbka Sample G	Próbka Sample G+Fe	Próbka Sample G+Cu	Próbka Sample G+Ag
PA	0,54	0,40	0,39	0,31
SA	0,62	0,67	0,55	0,39

in metal corrosion. It has been demonstrated that strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* possess enzymes that can destroy metals. The contact between the material and bacteria may occur through one of three pathways: direct contamination, contiguous spread and hematogenous spread. Experimental investigations into bacterial colonization of biomaterial were conducted by Gristina et al. [2]. *S. aureus* showed a preference for metals rather than polymers. The antibacterial effects of silver doped silica thin films on *E.coli* and *S. aureus* were examined by the film attachment method. The coating films had an excellent antibacterial performance [3]. It has observed that a silver coating on orthopedic external fixation pins reduces the adhesive action of *P. aeruginosa*, *E.coli*, and *S. aureus*. [4] The resistance of biomaterials surface to infections can be maintained by sterilization, antibiotic impregnation or by improving the colonization by host tissue cells [1].

In the present study the bioglass thin films doped with silver, copper and iron were successfully prepared by the sol-gel method to be applied to antibacterial materials.

Here, we report on experimental enquires into physical processes which govern the efficiency of sterilization by UV.

Materials

In agreement with procedures proposed by Hensch group [8,9], bio-gel glasses with the nominal compositions $36\text{CaO}\cdot 60\text{SiO}_2\cdot 4\text{P}_2\text{O}_5$ (mol%) were obtained as a G- sample.

The basic gel has been prepared from the mixture of: tetraethoxysilane TEOS-Si(OC₂H₅)₄; calcium nitrate tetrahydrate Ca(NO₃)₂·4H₂O dissolved in distilled water; triethylphosphate OP(C₂H₅O)₃ dissolved in ethanol C₂H₅OH used as an organic solvent; 2N acid HNO₃ as a catalyst of the reaction of hydrolysis. The hydrolyzate components were mixed for about 2 hours. Then the hydrolyzate was doped with Fe₂O₃ or CuCO₃ and mixed for 15 min. The coated microscopic glass substrates gelation was obtained by the spin-coating method. The gel is then subjected to controlled thermal processes; aged at 60°C for 72 h, dried in an oven with a cycle ending at 120°C. All the dried composites were heated in air at 2°C/min speed to 550°C and kept for about 2 hours. After the process of the bioglass formation, the samples were doped with silver nanoparticles.

The ability of certain microorganisms, such as bacteria or fungi, to control the synthesis of metallic nanoparticles should be available. The extracellular synthesis of silver nanoparticles by the fungus *Penicillium* was described by Sadowski et al. [4]. A fungal biomass preparation used for biosynthesis experiments was grown in liquid medium, containing 7g/l KH₂PO₄; 2 g/l K₂HPO₄; 0,1 g/l MgSO₄·7H₂O; 1g/l (NH₄)₂SO₄; 0,6 g yeast extract; 10 g glucose.

Bioglass samples were kept for 7 days in 5 ml of the liquid with silver nanoparticles. The bonding process of silver particles with bioglass samples took place in the room temperature, in a closed vessel, without light. The appearance of brown color on the surface of bioglass samples indicated that biomaterials were covered by colloidal silver particles. Afterwards, the samples were dried at 40°C for 24h.

The bacteria tested were Gram-positive strains (*Staphylococcus aureus* - Polish Collection of Microorganisms (PCM) 9944) and Gram-negative rods of *Pseudomonas aeruginosa* (PCM 2124).

To the 5 ml of sterile clear soup, 1 ml of investigated culture was added, and in such suspension some samples of bioglass were placed. Then the whole mixture was incu-

fotometru Spekol 11.

Próbki różnią się między sobą składem. Działaniu hodowli poddane zostały próbki z domieszką srebra (G+Ag), miedzi (G+Cu), żelaza (G+Fe), oraz próbki niedomieszkowane (G). Określona została gęstość optyczna hodowli bakteryjnych, przy długości fali 550 nm, w których przebywały próbki bioszkieł. Im większa liczba komórek bakterii w roztworze tym znaczniejsza mętność, ponieważ ilość światła rozpraszane-go przez komórki jest wprost proporcjonalna do ich liczby. Uzyskane rezultaty badań adhezji pałeczki ropy błękitnej umieszczone zostały w TABELI 1.

Można zauważyć, że gęstość optyczna kultur bakterii, w którym znajdowały się próbki nie zawierające domieszek (G) jest znacznie większa niż dla bulionu z domieszkowanymi próbkami. Może to świadczyć o tym, że miedź, żelazo oraz srebro dodane do bioszkieł utrudniają pałeczkom ropy błękitnej (PA) oraz gronkowca złocistego kolonizację powierzchni materiału.

W przypadku próbek przebywających w hodowli gronkowca złocistego, próbki zawierające żelazo zostały zasiedlone przez bakterie w większym stopniu, niż szkło kontrolne. Świadczy o tym większa gęstość optyczna dla próbek z żelazem (G+Fe) niż dla próbki czystej (G) i innych (TAB.1). Zaistniała sytuacja może wynikać z natury gronkowca złocistego. Bakterie ta chętnie rozmnażają się i tworzą biofilm w środowisku zawierającym żelazo. Gęstość optyczna hodowli bakteryjnych, w których znajdowały się próbki zawierających srebro, niezależnie od rodzaju drobnoustrojów, osiąga zawsze wartości najniższe. Oznacza to, że adhezja bakterii do powierzchni, która w swym składzie zawiera srebro, jest znacznie spowolniona. Wpływ miedzi na adhezję bakterii do powierzchni bioszkieł jest również zauważalny. Wartości gęstości optycznej dla próbek z miedzią (G+Cu) są zawsze niższe niż wartości dla próbek czystych (G) oraz z domieszką żelaza (G+Fe), jednak nie spadają poniżej wartości ekstynkcji uzyskanych dla próbek z domieszką srebra (G+Ag). Oznacza to, że miedź w mniejszym stopniu niż srebro spowalnia tworzenie się biofilmu na powierzchni tworzywa, ale przeciwdziała kolonizacji podłoża skuteczniej niż żelazo.

Sterylizacja

Każde urządzenie, które zostaje wprowadzone do organizmu, musi być sterylne. Procesy sterylicacji są często prowadzone za pomocą promieniowania UV. Oddziaływanie między promieniowaniem, a bakteriami jest oparte na zmianie indukowanej w łańcuchach DNA mikroorganizmów, które blokują metabolizm komórkowy i reprodukcję [1]. Sterylicowane za pomocą lampy UV były wszystkie próbki. Wyniki pomiarów gęstości optycznych poszczególnych hodowli

TAB.2. Przeżywalność gronkowca złocistego po sterylicacji promieniowaniem ultrafioletowym
TAB.2. Survival rate of bacteria after the sterilization by ultraviolet radiation

OD	Sample G		Sample G+Cu		Sample G+Ag		Sample G+Fe	
	Average	%	Average	%	Average	%	Average	%
Control sample	0,62	100	0,55	100	0,39	100	0,67	100
5 min	0,29	46	0,31	57	0,38	86	0,21	31
15 min	0,35	56	0,17	31	0,29	74	0,30	45
30 min	0,11	18	0,14	25	0,31	78	0,34	51
60 min	0,19	31	0,15	27	0,20	50	0,35	52

bated for 5 days, at 37°C for *S. aureus* and at 28°C for *P. aeruginosa*. After 5 days the bioglass samples were taken out from bacteria cultures and sterilized. Next, the bioglass samples (and control samples) were placed in clear soup and incubated for 24 h. Finally, the optical density (OD) of each clear soup was measured for 550nm on a spectrophotometer Spekol 11.

Samples are differentiated as far as the basic composition of the dopants is concerned. *S.aureus* and *P.aeruginosa* were inoculated on silver-doped (G+Ag), copper-doped (G+Cu), iron-doped (G+Fe) and undoped (G) bioglass. The optical density of a solution indicated the formation of a bacterial colony. Taking into account the number of bacteria which stuck to biomaterial creating a biofilm, the quantity of light dispersed by cells is directly proportional to the number of bacteria (optical density OD).

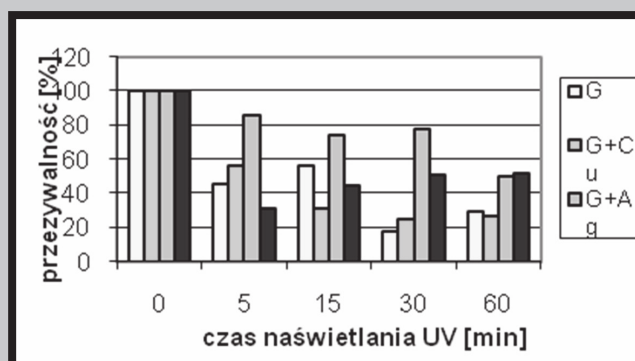
The results of an investigation into bacterial adhesion are presented in TAB.1. It may be observed that optical density of bacteria cultures in samples without dopants (G) is much higher than in clear soup with doped samples. It may be a proof that copper, iron and silver added to bioglasses make the colonization of the material surface difficult for *P.aeruginosa*.

The admixtures of silver and copper also slow down the growth of *Staphylococcus*. Yet the introduction of iron does not bring about the same effect; on the contrary, these bacteria quickly propagate and create a biofilm in iron-containing medium (TABLE 1 – the highest value of OD). This element is here a factor determining pathogeny. Materials containing this metal are a good base for *Staphylococcus*. Optical density of bacteria cultures in samples doped with silver, independent of the type of microorganisms, always reaches the lowest values. It means that the adhesion of bacteria to the surface containing silver is significantly slowed down. Copper slows down the growth of a biofilm on the surface of materials. In a smaller degree than silver, but it stops the colonization more effectively than iron. Independent of the type of bacteria, the obtained results are similar.

Sterilization of biomaterials

Any device that is to be implanted into the body must comply with sterile conditions. Thus the sterilization procedures are the UV radiation. Interactions between radiation and bacteria are based on the alterations induced on the DNA chains of the microorganisms, with the block of the cell metabolism or reproduction [1].

The results of measurements concerning optical density of particular cultures were averaged and placed in TABLE 2. The survival of bacterial cultures after the contact with



RYS. Przeżywalność gronkowca złocistego po sterylicacji promieniowaniem ultrafioletowym
FIG. Survival rate of bacteria after the sterilization by ultraviolet radiation

zostały uśrednione i umieszczone w jednej tabeli (TAB.2.). Wyznaczona została również przeżywalność hodowli bakteryjnych po kontakcie z bioszklami. Przeżywalność wyrażona w procentach określa ile drobnoustrojów przetrwało proces sterylizacji i w okresie doby po sterylizacji rozmnożyło się w bulionie odżywczym. Rezultaty zostały przedstawione również na wykresie słupkowym.

Po naświetlaniu UV próbek przez okres 5, 15, 30 i 60 minut obserwujemy zupełnie inny wpływ domieszek na rozwój bakterii niż przed sterylizacją. Również czas ekspozycji na promienie ma wpływ na uzyskany efekt. Początkowo, przed sterylizacją, w próbce kontrolnej dla bioszklka ze srebrem znajdowała się najmniejsza ilość gronkowca złocistego. Po sterylizacji UV przez okres 5 minut najmniejszą gęstość optyczną obserwujemy dla hodowli odpowiadającej próbce zawierającej żelazo, naświetlanie przetrwało tylko 31% bakterii. Ten sam efekt dla materiału zawierającego miedź został osiągnięty dopiero po 15 min. Jednak wśród bioszkieł naświetlanych 15 minut najlepsze działanie antybakteryjne wykazuje miedź. Przy tak krótkim czasie naświetlania nie obserwujemy antybakteryjnego działania srebra. Mała dawka promieni UV oraz obecność srebra prawdopodobnie spowodowała uruchomienie u bakterii mechanizmów obronnych i przyspieszenie metabolizmu.

Bakterie w sytuacji zagrożenia zaczęły rozmnażać się szybciej. Działanie bakterioobójcze srebra jest widoczne dopiero po 60 min. naświetlania UV. W przypadku bioszkieł domieszkowanych miedzią, liczebność spada równomiernie, już po 5 minutach pozostała tylko połowa hodowli. Analizując wyniki badań gęstości optycznej hodowli odpowiadających bioszklom z różnymi pierwiastkami w składzie, nie można zaobserwować równomiernego spadku liczebności mikroorganizmów, za wyjątkiem próbek domieszkowanych miedzią. Nie jest możliwe określenie jednego optymalnego czasu, po którym wyginęłyby wszystkie drobnoustroje. Im dłużej bioszklka pozostawały pod działaniem ultrafioletu tym więcej drobnoustrojów przeżyło na ich powierzchni. Może to oznaczać, że bakterie przyzwyczyły się do panujących warunków, wytworzyły mechanizmy obronne i przetrwały napromieniowanie ultrafioletem. Aby uniknąć takiej sytuacji można próbować sterylizować materiały kilkakrotnie przez okres kilku minut. Być może wówczas drobnoustroje nie zdążą przystosować się do zaistniałych warunków i kolejna dawka promieniowania spowoduje ich wyginiecie. Oceniając efekt sterylizacji po czasie 60 minut, można zauważyć że we wszystkich przypadkach wyginęło 50% i więcej drobnoustrojów. Najlepszy efekt uzyskano dla bioszklka z domieszką żelaza. Mimo iż z kontroli adhezji wynika, że żelazo przyspiesza rozmnażanie się drobnoustrojów. Można stwierdzić, że żelazo w połączeniu z promieniowaniem ultrafioletowym jest skutecznym środkiem sterylizującym.

bioglasses (FIG.2) was also calculated. The survival rate show how many microorganisms survived the sterilization and after twenty-four hours reproduced in clear soup.

After the UV irradiation of samples for 5, 15, 30 and 60 min the influence of dopants on bacterial growth is completely different than before the sterilization. The time of exposition of irradiation has an influence on the obtained result.

Initially, before the sterilization, the control sample for a silver-doped bioglass contained the smallest amount of *S. aureus*. After the UV sterilization which lasted 5 min, the lowest optical density is observed in the culture of an iron-doped sample. For the material containing copper, the same effect was achieved only after 15 min. However, copper is characterized by the highest antibacterial activity among the bioglasses irradiated for 15 min. The result for a sample containing silver is even higher.

During such a short time of irradiation we can not see the antibacterial activity of silver. Small doses of UV irradiation induce a silver-matrix cation exchange and the antibacterial effect disappears. If silver containing samples were exposed to UV irradiation, they would change their color. This is because Ag^+ ions were not completely trapped in the silica matrix and a bioglass network also was not completely densified. Probably, a small dose of UV irradiation and the presence of silver triggered the defense mechanisms in bacteria and accelerated their metabolism. When threatened, bacteria started to reproduce quicker. The antibacterial activity of silver is clearly seen only after 60 min of irradiation. The number of *S. aureus* dropped by half. In the case of bioglass containing copper, the reduction of bacteria after UV sterilization was proceeding steadily and after a 5 min exposure and a 24-hour incubation, it amounted to approximately 50% against *S. aureus*. After 1 hour of UV sterilization, the reduction of bacteria was about 73%. Analyzing the results of researches into the optical density of cultures corresponding to bioglasses containing various elements, it is not possible to calculate one optimal time after which all the microorganisms would be killed. The longer the bioglasses were under the influence of ultraviolet, the more microorganisms survived on their surfaces. It may mean that bacteria adjusted to external conditions, worked out their defense mechanisms and survived the ultraviolet irradiation. To avoid such a situation, the materials should be sterilized several times, for several minutes. Maybe the microorganisms will not get used to the conditions and the following dose of irradiation will cause their extinction.

Estimating the effect of sterilization after 60 minutes, it can be seen that 50% and more microorganisms died in all cases. The best result was achieved for the iron-doped bioglass. A thorough enquiry into the mechanism of adhesion has shown that iron accelerates the reproduction of microorganisms. Nevertheless, it also appears that iron together with ultraviolet radiation is an effective sterilizer.

Piśmiennictwo

- [1]. Giardino R, Aldini NN, Infection and sterilization, in: Integrated Biomaterials Science (R.Barbucci, ed.), Kluwer Academic, New York, 2002;815-832
- [2]. Hyung-Jun J, Sung-Chul Y, Seong-Geun O, Preparation and antibacterial effects of $Ag-SiO_2$ thin films by sol-gel method, *Biomaterials* 2003; 24: 4921-4928
- [3]. Sadowski Zygmunt, Maliszewska Irena.: Biosynthesis of silver nanoparticles using microorganisms, X Ukrainian-Polish Symposium. Proceedings, Lviv-Uzliissia, 2006; 77-80

References

- [4]. Szarska S, Kaźmierczak J, Matyasik M, Barwiński B, Stręk W, Spectroscopic studies of Cu^{2+} and Fe^{2+} ions in sol-biogel material, *Radiation Measurement*, in press.
- [5]. Pereira MM, Clark AE, Hench LL, Calcium phosphate formation on sol-gel-derived bioactive glasses in vitro, *J Biomed Mater Res.*,1994;28: 693-698
- [6]. Jones JR, Hench LL, Factors affecting the structure and properties of bioactive foam scaffolds for tissue engineering, *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2004; 68B: 36-44