

بررسی رفتار آنتی‌باکتریال آلیاژ لایه نازک شیشه فلز پایه زیرکونیوم

Zr₃₀Cu₂₀Al₁₀Ag₁₀Cr₁₀Si₁₀Br₁₀ اعمال شده بر روی فولاد زنگ نزن ۳۱۶

حسین شفیعی^۱، امیر سیف‌الدینی^{۱*}، سعید حسنی^۱ و علی عبیدای^۲

۱- دانشکده مهندسی معدن و متالورژی، دانشگاه یزد

۲- دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه صنعتی اصفهان

چکیده: فولادهای زنگ نزن ۳۱۶ و ۳۰۴ از جمله آلیاژهایی هستند که به‌طور معمول برای ساخت تجهیزات پزشکی از جمله ابزارهای جراحی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این فولادها، به علت این‌که هیچ‌گونه خاصیت کنترل‌کننده‌ای در جلوگیری از رشد باکتری و یا از بین بردن باکتری از خود نشان نمی‌دهد، هنگامی که در تماس با باکتری‌ها قرار می‌گیرند، به‌شدت آلوده می‌شوند. با اعمال پوشش‌هایی با خاصیت آنتی‌باکتریال بالا تا حد زیادی می‌توان بر این مشکل غلبه کرد. یکی از این پوشش‌ها که در سال‌های اخیر توجه زیادی از محققین را به خود جلب کرده است، استفاده از پوشش‌های لایه نازک شیشه فلزی پایه زیرکونیوم می‌باشد. لذا در این پژوهش، پس از مطالعه و بررسی تأثیر عناصر مختلف در رفتار آنتی‌باکتریال یک پوشش، ابتدا آلیاژی با ترکیب شیمیایی Zr₃₀Cu₂₀Al₁₀Ag₁₀Cr₁₀Si₁₀Br₁₀ طراحی و تولید شد. در ادامه با اعمال لایه نازکی از آلیاژ مذکور با ساختار آمورف بر روی زیر لایه فولاد زنگ نزن ۳۱۶، رفتار این پوشش در مقابله با دو باکتری متداول بیمارستانی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. در ابتدا پس از توزیع و مخلوط کردن عناصر انتخاب شده با نسبت استوکیومتری لازم، همگن‌سازی آن‌ها توسط یک آسیاب مکانیکی و استفاده از دستگاه تف‌جوشی به کمک قوس پلاسما، تارگتی با ترکیب شیمیایی مورد نظر تولید شد. بررسی‌های ساختاری اولیه نشان داد که عناصر موجود در ترکیب هدف از توزیع یکنواختی برخوردارند. در ادامه با به‌کارگیری ترکیب هدف تولید شده در دستگاه پوشش‌دهی نوع کندوپاش، لایه‌های نازکی از آلیاژ مذکور با ضخامت‌های مختلف بر روی زیر لایه فولاد ۳۱۶ ایجاد شد. بررسی‌های اولیه نشان داد که این پوشش‌ها ضمن برخورداری از یک پیوستگی خوب با زیر لایه، دارای ساختار شیشه‌ای و آمورف می‌باشند. در ادامه رفتار آنتی‌باکتریال پوشش ایجاد شده در مقابله با دو باکتری اشرشیا کلی *Escherichia Coli* و استافیلوکوک اورئوس *Staphylococcus Aurous* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده نشان داد که پوشش‌های ایجاد شده به دلیل دارا بودن دو عنصر مس و نقره دارای خاصیت آنتی‌باکتریال بالایی در مقابله با دو باکتری یاد شده می‌باشند. از طرفی بر اساس بررسی‌های انجام گرفته، اعمال پوشش یاد شده به‌علت کاهش حدوداً ۵۰ درصدی زبری زیر لایه، می‌تواند نقش مهمی در عدم چسبیدن انواع پلاکت‌های خونی انسانی و حیوانی، همچنین سلول‌های سرطانی انسانی و حیوانی به ابزارهای جراحی تولید شده با استفاده از فولادهای زنگ ۳۱۶ داشته باشند.

واژه‌های کلیدی: لایه نازک شیشه‌های فلزی پایه زیرکونیوم، خواص آنتی‌باکتریال، زبری، چسبندگی سلول‌های سرطانی.

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: seifoddini@yazd.ac

Investigation of the Antibacterial Behavior of Thin Film Metallic Glass Alloy $Zr_{30}Cu_{20}Al_{10}Ag_{10}Cr_{10}Si_{10}Br_{10}$ Applied on 316 Stainless Steel Substrate

H. Shafyei¹, A. Seifoddini^{1*}, S. Hasani¹ and A. Obeydavi²

1- Department of Mining and Metallurgical Engineering, Yazd University
2- Department of Materials Engineering, Isfahan University of Technology

ABSTRACT

Stainless steels 316 and 304 are among the alloys commonly used to make medical equipment, including surgical instruments. These steels, however, do not exhibit properties that control bacterial growth or destroy bacteria upon contact, leading to significant contamination. This problem can be largely mitigated by applying coatings with high antibacterial properties. One such coating that has attracted considerable attention from researchers, in recent years, is Zr-based metallic glass coatings. In this study, after studying the effects of different elements on the antibacterial behavior of coatings, an alloy with the chemical composition $Zr_{30}Cu_{20}Al_{10}Ag_{10}Cr_{10}Si_{10}Br_{10}$ was designed and produced. A thin layer of this amorphous alloy was then applied to a 316 stainless steel substrate, and its behavior against two common hospital bacteria was studied. After weighing and mixing the selected elements in the required stoichiometric ratios and homogenizing them using a mechanical ball mill, a target with the desired chemical composition was produced using Spark Plasma Sintering (SPS). Structural investigations revealed a uniform distribution of the elements in the produced target. Using this target, thin layers of the alloy with different thicknesses were deposited on the 316 stainless steel substrate. Preliminary investigations showed that the coatings, in addition to forming a good bond with the substrate, possess a glassy and amorphous structure. The antibacterial behavior of the coatings against Escherichia Coli and Staphylococcus Aureus was then investigated. The results showed that the coatings, due to the presence of copper and silver, exhibit high antibacterial properties against these bacteria. Furthermore, the application of the coating, which reduces the roughness of the polished 316 substrate by 50%, can significantly affect the adhesion of human and animal blood platelets, as well as human and animal cancer cells, to surgical instruments made from 316 stainless steel.

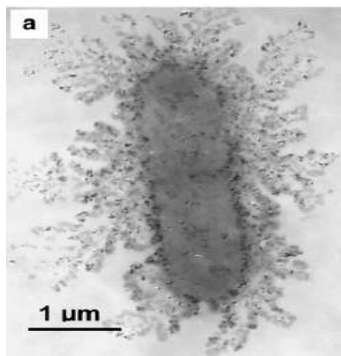
Keywords: Zr-based thin film metallic glass, Antibacterial properties, Roughness, Adhesion of cancer cells.

۱- مقدمه

کردن کار مشکلی است. لذا ایجاد پوشش‌هایی با خاصیت ضد میکروبی روی سطوح آن‌ها از جمله موضوعات مهم و مطرح در دنیا می‌باشد (۲). مطالعات نشان می‌دهد یکی از جدیدترین پوشش‌هایی که به‌عنوان پوشش‌های آنتی‌باکتریال توجه محققین را به خود جلب کرده است، پوشش‌های پایه زیرکونیوم و با ساختار شیشه‌ای می‌باشد. وجود عناصری هم‌چون مس، نقره و یا حتی آلومینیوم در این پوشش‌ها باعث ایجاد خاصیت ضد میکروبی در آن‌ها شده، علاوه بر این به دلیل وجود ساختار شیشه‌ای و صافی سطح خیلی بالایی امکان چسبیدن باکتری‌های و تشکیل بیوفیلم‌ها روی آن‌ها کم‌تر است.

لازم به ذکر است که مس و نقره به‌عنوان دو عنصر آنتی‌باکتریال از سال‌های بسیار قدیم تاکنون مورد استفاده قرار می‌گرفته است. برای مثال هرودتس مورخ یونانی به این نکته

یکی از مشکلات عمده در بیمارستان‌ها، عفونت تجهیزات بیمارستانی است که در بسیاری از موارد می‌تواند باعث بیماری‌ها و یا احیاناً مرگ و میر افراد درگیر گردد. فولادهای زنگ نزن ۳۰۴ و ۳۱۶ از جمله فولادهایی است که در تجهیزات جراحی و پزشکی به‌طور وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرند. این فولادها، به علت این‌که هیچ‌گونه خاصیت کنترل‌کننده در رشد باکتری و یا از بین برنده آن‌ها از خود نشان نمی‌دهند، هنگامی که در تماس با باکتری‌ها قرار می‌گیرند، به‌شدت آلوده می‌شوند. این باکتری‌ها به‌عنوان یک میکرو ارگانیسم به‌شدت به ابزارهای مربوطه چسبیده و در طی انجام فرآیندی باعث ایجاد فیلم نازکی (بیوفیلم) (۱) بر روی این سطوح می‌گردند، درحالی‌که حذف کردن و یا از بین بردن آن توسط ضدعفونی



شکل ۱- تصویر تهیه شده توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری از تجمع ذرات نقره در اطراف یک باکتری اشرشیا کلی، تخریب جداره آن و ورود به داخل باکتری (۸).

ابزار جراحی و یا به عبارتی بر میزان چسبیدن باکتری‌ها به این ابزارها تأثیرگذار باشد، میزان ناهمواری‌های سطحی آن‌ها می‌باشد.

اصولاً میزان زبری و ناهمواری‌های موجود بر روی سطح یکی از مؤلفه‌های مهم در تعیین نحوه انجام واکنش سطحی قطعات با محیط اطراف و یا چسبیدن مواد به آن‌ها می‌باشد. با توجه به یافته‌های اخیر، یکی از راهکارهای مهم که می‌تواند باعث کاهش چسبندگی سلول‌های سرطانی به این ابزارها گردد، ایجاد پوشش‌هایی با حداقل زبری سطح می‌باشد. لذا به نظر می‌رسد اعمال پوشش‌های لایه نازک شیشه فلز به علت دارا بودن صافی سطح بسیار خوب، بتواند این هدف را تأمین کند (۹). در یک جمع‌بندی کلی می‌توان گفت قدرت چسبندگی سلولی به یک ابزار پزشکی را می‌توان عمدتاً به سه عامل: میزان زبری سطح، انرژی سطحی و ترکیب شیمیایی زیر لایه نسبت داد (۱۰-۱۴).

در مورد عامل اول یعنی رابطه بین میزان زبری سطوح با میزان چسبندگی سلول‌های سرطانی تاکنون مطالعات وسیع و گسترده‌ای انجام شده است (۹ و ۱۴-۱۸).

برای نمونه اتمبل^۳ و همکارانش (۱۹) گزارش کرده‌اند که اعمال لایه نازک شیشه فلز $Zr_{39}Cu_{39}Ag_{22}$ بر روی فولاد زنگ نزن ۳۰۴، به علت افزایش میزان صافی سطح بیش‌تر پوشش در

اشاره کرده است که پادشاهان ایران باستان هنگامی که عازم جنگ می‌شدند، برای حمل آب مورد نیاز خود از ظروف نقره‌ای استفاده می‌کردند (۳) و یا گزارش شده است که مس و ترکیبات در بردارنده عنصر مس از دیر هنگام برای درمان عفونت‌های میکروبی، قارچی و یا ویروسی مورد استفاده قرار می‌گرفته است (۵ و ۶). گرس^۱ و همکارانش (۷) گزارش کرده‌اند که همه موجود زنده میکروسکوپی (میکروارگانیزم) اگر به مدت طولانی در تماس با سطوح مسی قرار گیرد، نمی‌توانند به حیات خود ادامه دهند. به همین دلیل در آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا عنصر مس به‌عنوان اولین ماده جامد ضد میکروبی ثبت شده است. مطالعات حاکی از این است که یون‌های مس و نقره موجود در پوشش‌های اصلی خاصیت آنتی‌باکتریال پوشش‌های تولیدی است. این‌که یون‌های مس یا نقره چگونه باکتری‌ها را نابود می‌کنند، باید گفت یون‌های نقره با نشستن بر روی غشای سلول باکتری، به‌راحتی وارد سلول می‌شوند. آن‌ها، به پروتئین‌های غشایی که مسئول انتقال مواد به داخل و خارج باکتری هستند، متصل شده و عملکرد آن‌ها را مختل می‌نمایند. در نتیجه باکتری، بر اثر عدم تغذیه، از بین می‌رود (۸). همچنین گزارش شده، باکتری‌ها برای زنده ماندن نیاز به اکسیژن دارند. یون‌های نقره سیستم تنفسی باکتری‌ها را مسدود کرده و در نتیجه جذب اکسیژن مختل می‌شود. محققان با بررسی‌هایی که بر روی پروتئین‌های موجود در باکتری اشرشیا^۲ انجام داده‌اند، دریافته‌اند که یون‌های نقره باعث جداسازی و ضعف شدن اتصال بین پروتئین و DNA موجود در سلول می‌شوند. نقره با اتصال به DNA جلوی تقسیم سلول‌ها را می‌گیرد و در حقیقت مانع از تکثیر و ازدیاد آن‌ها می‌گردد (۷-۸).

در شکل (۱)، که توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری تهیه شده، نشان داده شده است که چگونه نانو ذرات نقره در اطراف یک باکتری اشرشیا کلی تجمع نموده و با تخریب جداره آن در حال ورود به داخل باکتری می‌باشند (۸).

پارامتر دیگری که می‌تواند بر رفتار آنتی‌باکتریال سطح یک

جدول ۱- مقدار پودرهای مصرفی اولیه جهت تهیه ترکیب هدف^۱ مورد نظر

عنصر	Zr	Cu	Al	Ag	Cr	Si	B
درصد اتمی	۳۰	۲۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
درصد وزنی	۴۳/۷	۲۰/۳	۴/۳	۱۷/۲	۸/۳	۴/۵	۱/۷

شده نشان می‌دهد که بور باعث بهبود رفتار زیست سازگاری و افزایش مقاومت خوردگی (۲۲) و نقره باعث افزایش پایداری حرارتی و بهبود خواص خوردگی پوشش خواهد شد (۲۳).

۲-۲-۲- مراحل انجام آزمایشات

۲-۲-۱- توزین پودر مواد و انجام آلیاژسازی مکانیکی

ابتدا پودر مواد اولیه مورد نیاز، به نسبت استوکیومتری، لازم توسط یک ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن شده و سپس بعد از افزودن نیم گرم اسید استناریک به آن‌ها توسط دستگاه آسیاب گلوله‌ای مدل PM100 تحت عملیات آسیاب کاری مکانیکی قرار گرفت. این عملیات تحت اتمسفر آرگون، با نسبت گلوله به پودر ۱۰ به ۱، به مدت ۳ ساعت و با سرعت چرخش ۲۰۰ rpm انجام شد. مقدار پودرهای مصرفی برای تولید آلیاژ $Zr_{30}Cu_{20}Al_{10}Ag_{10}Cr_{10}Si_{10}B_{10}$ در جدول (۱) ارائه شده است.

۲-۲-۲- تهیه ترکیب هدف مورد نیاز برای انجام فرایند

کندوپاش

پس از مخلوط کردن پودرها توسط روش آسیاب کاری، و تهیه ترکیب هدف مورد نیاز برای کندوپاش، از فرایند تف جوشی به کمک قوس پلاسما^۹ (SPS) استفاده شد. در این رابطه از دستگاه SPS موجود در دانشگاه صنعتی اصفهان استفاده شد. این دستگاه قابلیت کار تا دمای ۲۵۰۰ درجه سانتی‌گراد با اندازه‌گیری دما و میزان خلاء 10^{-5} میلی‌تور را دارد. پارامترهای انتخابی برای انجام آزمایشات در جدول (۲) آورده شده است. در شکل (۲) نیز تصویری از یک نمونه از تارگت‌های آلیاژی تولید شده نشان داده شده است.

مقایسه با زیر لایه، باعث کاهش چسبندگی باکتری اشرشیا کلی به پوشش شده است. و یا در سال ۲۰۱۴، توسط چن^۴ و همکارانش (۲۰) گزارش شده اعمال پوشش آمورف Zr-Cu-Al-Ag بر روی زیر لایه فولاد زنگ نزن ۳۰۴، به علت کاهش زبری سطح از ۷ نانومتر به ۱ نانومتر، رشد، تکثیر و حرکت میکروب‌ها را با مشکل بیشتری روبرو کرده است. در سال ۲۰۱۹ جابد^۵ و همکارانش (۲۱) در مورد رفتار آنتی‌باکتریال دو پوشش لایه نازک پایه زیرکونیم با ترکیب‌های $Zr_{46}Ti_{40}Ag_{14}$ و $Zr_{46}Ti_{43}Al_{11}$ نشان دادند که سطوح صاف‌تر، چسبندگی باکتریایی کم‌تری را از خود نشان می‌دهند. هم‌چنین بوراس^۶ و همکارانش دریافتند رابطه مستقیمی بین بی‌نظمی‌های سطحی و تشکیل ترومبوز وجود دارد (۱۷). یا هوانگ^۷ و همکارانش (۱۸). نیز گزارش نموده‌اند که اعمال پوشش آمورف اکسید تیتانیم با صافی سطح بالا بر روی فولاد زنگ‌نزن ۳۱۶ می‌تواند باعث کاهش چسبندگی پلاکت‌ها به دستگاه‌های بیو پزشکی گردد.

۲- مواد و روش تحقیق

۲-۱- مواد اولیه

در این پژوهش، برای تهیه آلیاژ از پودر عناصر فلزی و شبه فلزی با درصد خلوص بالا شامل پودرهای زیرکونیوم، مس، نقره، آلومینیوم، کروم، سیلیسیم، بور، استفاده شد. هم‌چنین برای انجام لایه نشانی، از فولاد زنگ‌نزن ۳۱۶ و ویفر سلیکونی به‌عنوان زیر لایه استفاده شد. لازم به ذکر است مس، نقره و آلومینیوم به علت دارا بودن خاصیت آنتی‌باکتریال، کروم به علت افزایش مقاومت به خوردگی و دو عنصر سیلیسیم و بور به علت بالا بردن احتمال آمورف شدن پوشش، از مهم‌ترین دلایل انتخاب این عناصر بوده‌اند. علاوه بر این مطالعات انجام

جدول ۲- شرایط انجام فرایند SPS

دما	فشار	زمان	جریان	ولتاژ	پالس (خاموش و روشن)	خلا
(سانتی‌گراد)	(مگاپاسگال)	(دقیقه)	(آمپر)	(ولت)	(میلی‌ثانیه)	(تور)
۸۵۰	۴۰	۱۰	۱۱۰۰	۲/۵	۲۴۰-۶۰	۰/۰۱

۵-۲-۲- مطالعات ساختاری پوشش‌ها

بررسی مورفولوژی سطح پوشش، اندازه‌گیری ضخامت آن‌ها، و هم‌چنین انجام آنالیز عنصری سطح پوشش از دستگاه‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی^{۱۱}، میکروسکوپ روبشی نشر میدانی^{۱۲} و میکروسکوپ نیروی اتمی^{۱۳} استفاده شد. برای مطالعه لایه‌های نازک تولید شده با بستی از آزمون پراش اشعه ایکس با زاویه خیلی کم^{۱۴} استفاده کرد. برای این منظور و اطمینان از آمورف بودن ساختار پوشش از دستگاه پراش پرتو ایکس مجهز به سیستم Grazing Incident Beam موجود در شرکت نقش پراش صنعتی اصفهان واقع در شهرک علمی تحقیقاتی اصفهان استفاده شد.

۶-۲-۲- بررسی رفتار آنتی‌باکتریال پوشش‌ها

رفتار آنتی‌باکتریال پوشش در برابر دو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی بر اساس استاندارد شماره Z2801: 2000 (۲۴) طی مراحل زیر انجام گرفت:

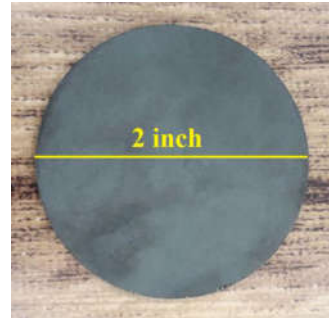
۱- تهیه دو باکتری استافیلوکوکوس آرئوس^{۱۵} (ATCC 25923) و باکتری اشریشیاکلی^{۱۶} (ATCC 25922) از مرکز میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران با غلظت اولیه 10^6 CFU/ml (CFU/ml= Colony Forming Unit / milli liter).

۲- قرار دادن نمونه‌های بدون پوشش و نمونه‌های پوشش‌دار در داخل پتری دیش‌های استریل شده حاوی دو باکتری بالا

۳- نگهداری پتری دیش‌ها به مدت ۲۴ ساعت در یک انکوباتور لرزشی با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

۴- خارج کردن پتری دیش‌ها از داخل انکوباتور و انجام عملیات رقیق‌سازی سری محلول حاوی باکتری‌های موجود.

لازم به ذکر است که عملیات رقیق‌سازی سری با استفاده از



شکل ۲- یک نمونه از ترکیب هدف‌های تولید شده با استفاده پودر فلزات توسط دستگاه SPS.

۳-۲-۲- آماده‌سازی سطحی زیر لایه

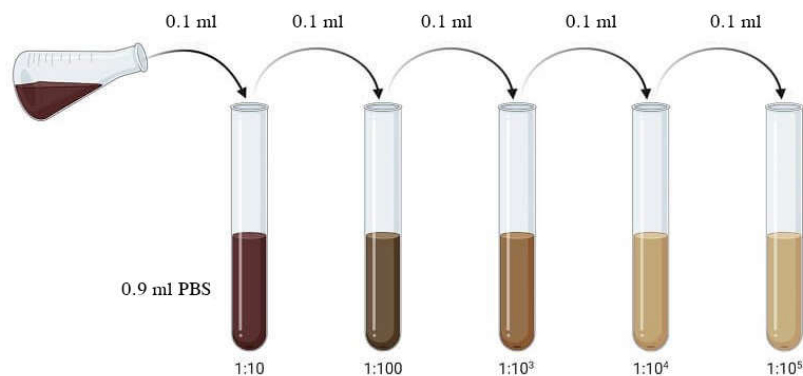
برای تهیه زیر لایه از ورق فولاد زنگ نزن ۳۱۶ استفاده شد. ابتدا نمونه‌هایی به ابعاد 1×1 سانتی‌متر تهیه شدند. پس از زدودن آلودگی‌های سطحی و عملیات سنباده‌زنی تا سنباده ۱۲۰۰، عملیات پولیش بر روی آن‌ها انجام شد. سپس نمونه‌ها توسط آب و اتانول شستشو و خشک شده و آماده لایه نشانی گردیدند.

۴-۲-۲- لایه نشانی به روش کندوپاش (مگترون اسپاترینگ)^{۱۰}

برای تهیه لایه‌های نازک شیشه فلزی، از دستگاه کندوپاش با جریان DC، مدل DST3-A استفاده شد. لازم به ذکر است که عملیات پوشش‌دهی علاوه بر این که بر روی نمونه‌هایی از فولاد زنگ نزن ۳۱۶ انجام شد، بر روی تعداد نمونه از نوع ویفر سیلیکونی نیز انجام شد. در جدول (۳) نیز پارامترهای انتخاب شده در حین فرایند پوشش‌دهی جهت دستیابی به دو پوشش با ضخامت‌های متفاوت (توسط تغییر دادن جریان) ارائه شده است.

جدول ۳- پارامترهای پوشش‌دهی دستگاه کندوپاش

پارامتر	نوع پوشش	ضخامت یک میکرون	ضخامت نیم میکرون
فشار خلأ اولیه (تور)		10^{-4}	10^{-4}
فشار خلأ حین پوشش‌دهی (تور)		$9/8 \times 10^{-3}$	$6/35 \times 10^{-3}$
توان (وات)		$10^4 = 347 \times 0/3$	$361 = 361 \times 0/1$
ولتاژ (ولت)		۳۴۷	۳۶۱
جریان (آمپر)		۰/۳	۰/۱
فاصله ترکیب هدف تا زیرلایه (سانتی‌متر)		۱۲	۱۲
دمای زیرلایه (درجه سانتی‌گراد)		دمای محیط	دمای محیط
سرعت چرخش زیرلایه (rpm)		۱۰	۱۰
زمان پوشش‌دهی (دقیقه)		۶۰	۶۰
شار گاز آرگون (cm ³ /min)		۱۰	۱۰



شکل ۳- نحوه انجام عملیات رقیق‌سازی سری

(توضیح = محلول بافر فسفات سالین یک محلول نمکی - آبی است که متشکل از کلرید سدیم، فسفات سدیم، کلرید پتاسیم و فسفات سدیم می‌باشد. این محلول به علت نداشتن اثر سمی بر روی باکتری‌ها برای رقیق کردن محلول‌های دربردارنده باکتری‌ها استفاده می‌شود).

۵- انجام عملیات کشت باکتری در محیط مایع (Liquid Culture): این عملیات به منظور رشد باکتری‌ها زنده باقیمانده انجام شد. در این مرحله هر باکتری که هنوز مانده زنده باشد، رشد کرده و به یک کلونی بزرگ تبدیل می‌شود، به گونه‌ای که با چشم غیر مسلح قابل رؤیت بوده و به راحتی قابل شمارش می‌باشد.

محلول بافر فسفات سالین^{۱۷} و در طی ۵ مرحله و به صورت متوالی مطابق با شکل (۳) انجام شد:

مطابق با شکل بالا در هر مرحله از رقیق‌سازی ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول حاوی باکتری با ۰/۹ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین مخلوط گردید.

شایان ذکر است که پس از ۵ مرحله انجام عملیات رقیق‌سازی، به ترتیب محلول‌هایی با رقت $1:10^1$ ، $1:10^2$ ، $1:10^3$ ، $1:10^4$ و $1:10^5$ به دست می‌آید.

هدف از انجام این عملیات رقیق‌سازی، فراهم آوردن امکان شمارش باکتری‌ها می‌باشد.

برای انجام عملیات کشت، پس از رقیق‌سازی، ابتدا ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول سپانسیون رقیق شده نهایی به محیط کشت مولر هیتون آگار (Muller - Hinton Agar) انتقال داده شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید تا رشد و تکثیر باکتری‌های زنده صورت گیرد.

(توضیح = محیط کشت مولر هیتون آگار محیطی است متشکل از عصاره گوشتی، نشاسته، آگار (نوعی جلبک) و آب مقطر می‌باشد. محیط مولر هیتون آگار به‌عنوان یک محیط استاندارد برای رشد باکتری‌ها استفاده می‌شود، به‌گونه‌ای که تمامی موجودات زنده بر روی این محیط به‌راحتی می‌توانند رشد کنند).

۶- خروج پتری دیش‌ها از درون انکوباتور پس از ۲۴ ساعت و انجام عملیات عکس‌برداری از نمونه‌ها به‌منظور شمارش باکتری‌های زنده باقی‌مانده.

۷- محاسبه نرخ آنتی‌باکتریال پوشش‌ها و زیر لایه در برابر دو باکتری داده شده با استفاده از رابطه داده شده.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مطالعات ساختاری ترکیب هدف تولید شده

به‌منظور مطالعات ساختاری ترکیب هدف مورد استفاده برای فرآیند پوشش‌دهی و نحوه توزیع عناصر مختلف در آن، نقشه عنصری، هم‌چنین آنالیز شیمیایی ترکیب هدف تولید شده، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی مورد مطالعه قرار گرفت. مطابق شکل (۴) نشان می‌دهند، کلیه عناصر از توزیع یکنواختی در ترکیب هدف تولید شده برخوردارند. گرچه ذرات کروم، به علت درشت‌تر بودن، نتوانسته‌اند در هنگام آسیاب‌کاری توزیع کاملاً یکنواختی هم‌چون دیگر عناصر پیدا کنند.

۳-۲- مشخصه‌یابی پوشش‌های تولیدی

برای اطمینان از آمورف بودن لایه‌های نازک تولید شده از آزمون پراش اشعه ایکس با زاویه خیلی کم^{۱۸} GIXRD استفاده

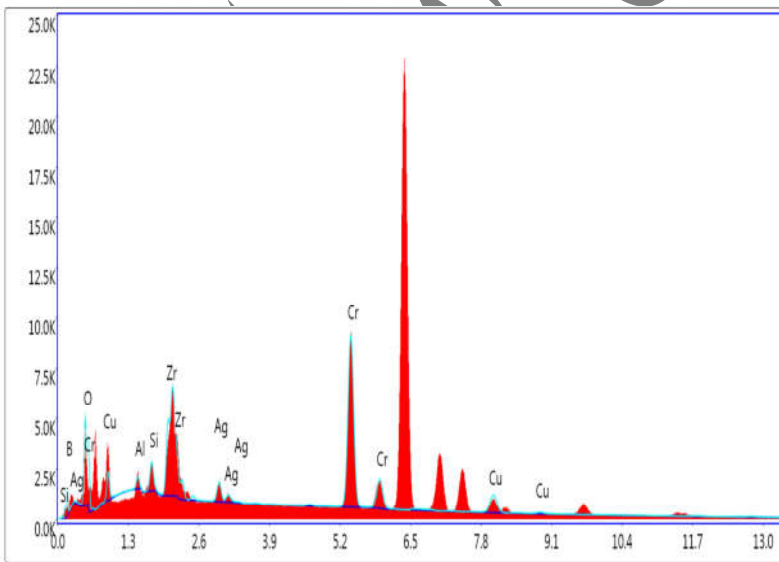
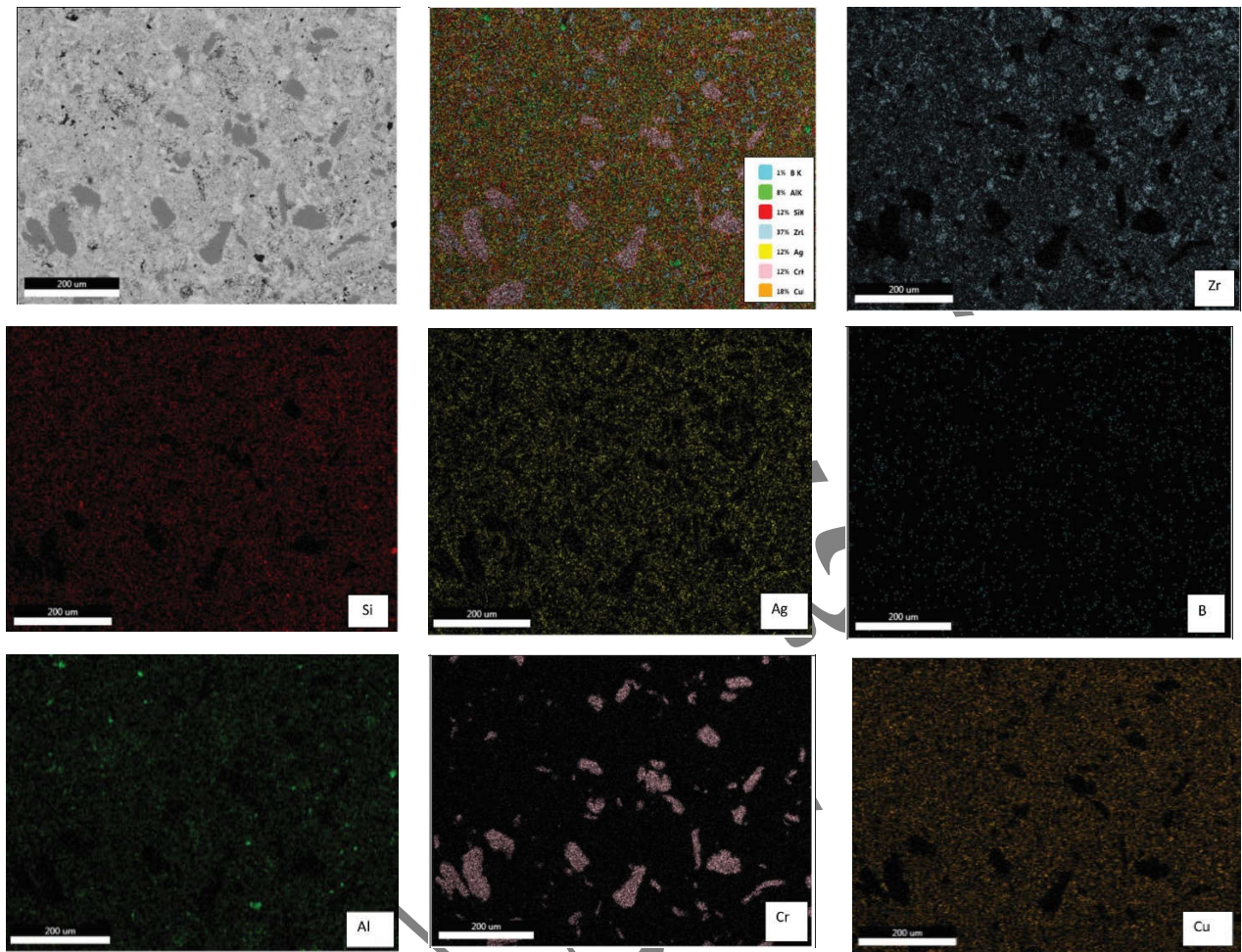
شد. در شکل‌های (۵) و (۶) به‌ترتیب الگوی پراش اشعه ایکس لایه نازک شیشه فلزی با ترکیب $Zr_{30}Cu_{20}Al_{10}Ag_{10}Cr_{10}Si_{10}B_{10}$ مربوط دو نمونه تولید شده به‌ترتیب با توان ۳۶ وات (۰/۱ آمپر) و توان ۱۰۴ وات (۰/۳ آمپر) نشان داده شده است. عدم وجود هرگونه پیک شاخص در این دو نمودار (به جز دو پیک ایجاد شده ناشی از زیر لایه سیلیکونی در نمونه با ضخامت کم‌تر) حاکی از عدم وجود هرگونه ساختار کریستالی در این دو نمونه می‌باشد. لذا با اطمینان بیش‌تری می‌توان گفت که پوشش‌های ایجاد شده دارای ساختار آمورف می‌باشند.

در شکل‌های (۷) و (۸) نیز تصاویر میکروسکوپی از سطح مقطع دو پوشش ایجاد شده با توان‌های مختلف نشان داده شده است. اندازه‌گیری ضخامت پوشش‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی FESEM نشان داد که نمونه تولید شده با توان ۳۶ وات (۰/۱ آمپر) دارای ضخامت ۵۰۴ نانومتر (حدوداً ۰/۵ میکرون)، و نمونه تولید شده با توان ۱۰۴ وات (۰/۳ آمپر) دارای ضخامت ۱/۱ میکرون می‌باشد. همان‌گونه که این تصاویر نشان می‌دهد این پوشش‌ها از صافی سطح و یکنواختی ضخامت نسبتاً خوبی برخوردارند. علاوه بر این پیوستگی بسیار خوبی در فصل مشترک بین پوشش و زیر لایه وجود دارد.

در شکل (۹) نیز ترکیب شیمیایی پوشش داده شده نشان داده شده است. الگوی رسم شده نشان می‌دهد که تمامی عناصری است که در ترکیب هدف مورد استفاده قرار گرفته‌اند، در پوشش نیز حضور دارند. لازم به ذکر است فلز بور به علت سبک بودن در آنالیز انجام شده خود را نشان نداده است.

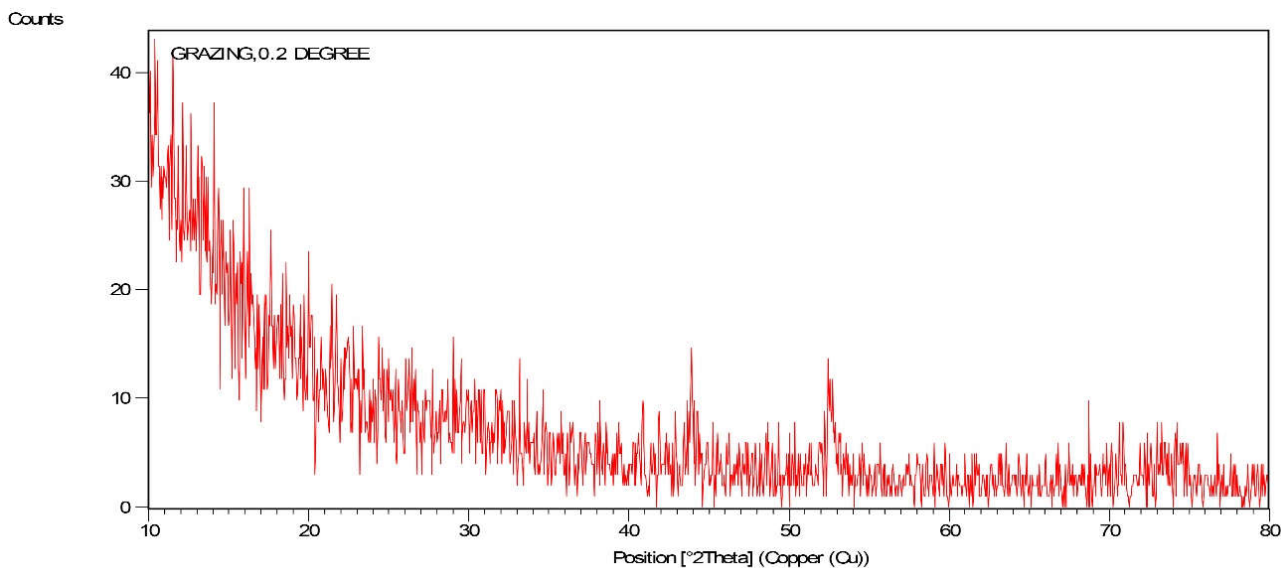
۳-۳- بررسی رفتار آنتی‌باکتریال پوشش ایجاد شده

همان‌گونه که قبلاً گفته شد، دو باکتری استافیلوکوک اورئوس و باکتری اشریشیا کولی از مشکل‌زاترین باکتری‌های بیمارستانی به‌حساب می‌آیند. این دو باکتری که مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند، باعث گسترش عفونت و ایجاد مشکلات جدی در سرتاسر دنیا گردیده‌اند. لذا در این پژوهش

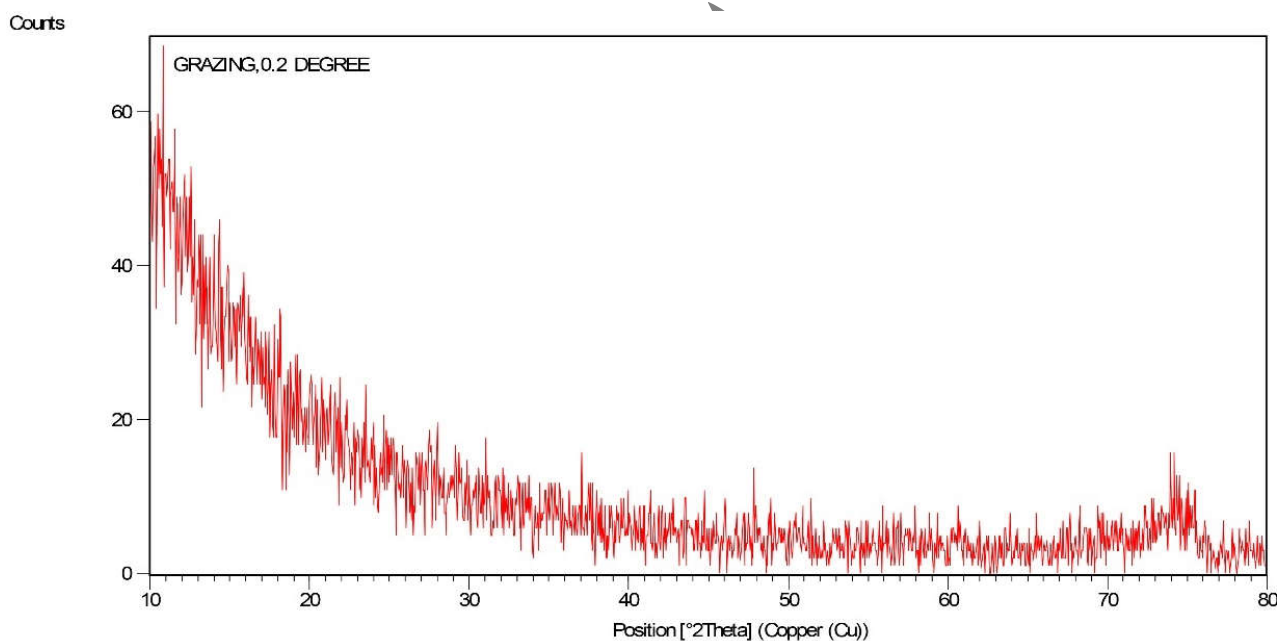


Element	Weight %	Atomic %
B K	18.12	50.99
O K	3.64	6.93
AlK	1.27	1.44
SiK	2.09	2.26
ZrL	11.38	3.80
AgL	4.23	1.19
CrK	47.30	27.67
CuK	11.96	5.73

شکل ۴- نقشه توزیع عنصری و آنالیز شیمیایی عناصر آلیاژی مختلف موجود در ترکیب هدف تولید شده توسط دستگاه SPS.



شکل ۵- الگوی پراش اشعه ایکس GIXRD لایه نازک شیشه فلزی تولید شده با توان ۳۶ وات (۱/۰ آمپر)

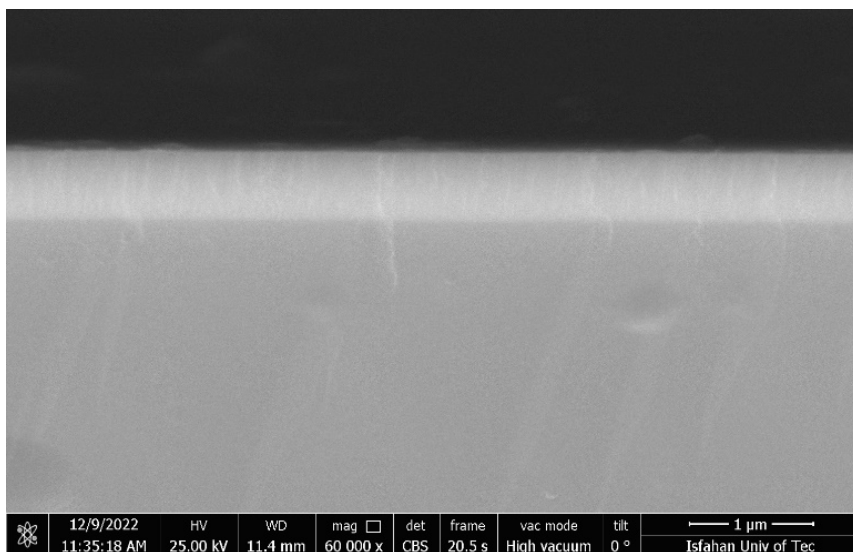


شکل ۶- الگوی پراش اشعه ایکس GIXRD لایه نازک شیشه فلزی تولید شده با توان ۱۰۴ وات (۳/۰ آمپر)

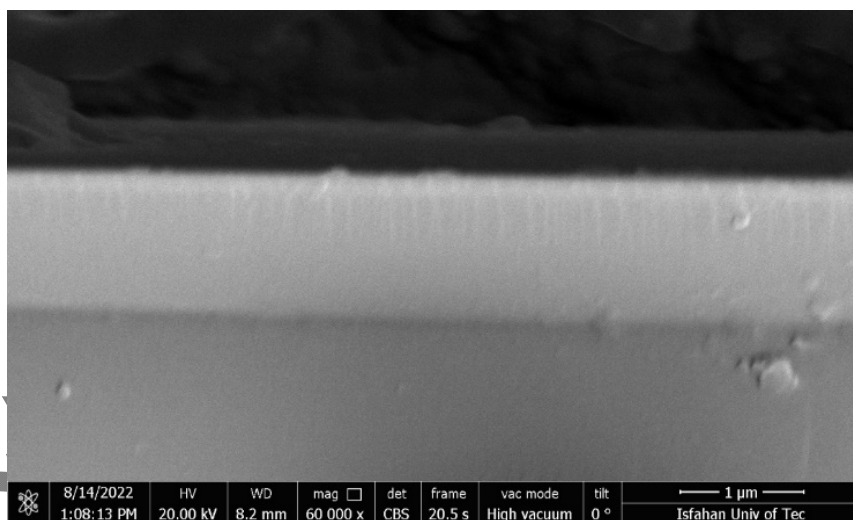
۳-۴- محاسبه نرخ آنتی باکتریال پوشش

بر اساس استاندارد ذکر شده، پس از قراردادن نمونه‌های بدون پوشش و نمونه‌های پوشش دار در تماس با دو باکتری یاد شده، نگهداری آن در درون یک انکوباتور لرزشی به مدت زمان ۲۴ ساعت، انجام عملیات رقیق سازی، کشت دادن باکتری‌های زنده

رفتار آنتی باکتریال پوشش‌های ایجاد شده در برابر این دو باکتری و بر اساس استاندارد شماره Z2801: 2000 (۲۴) مورد مطالعه قرار گرفت. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد تقریباً در اکثر پژوهش و آزمون‌ها، رفتار آنتی باکتریال پوشش‌ها، با استفاده از این استاندارد مورد ارزیابی قرار گرفته است.



شکل ۷- تصویر میکروسکوپی از سطح مقطع پوشش ایجاد شده تولید شده با توان ۳۶ وات (۱/۰ آمپر) - ضخامت ۰/۵ میکرون.



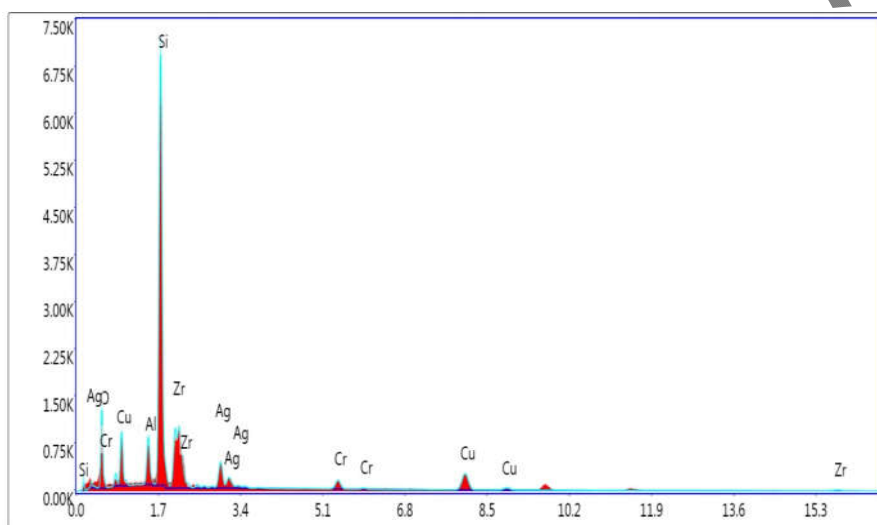
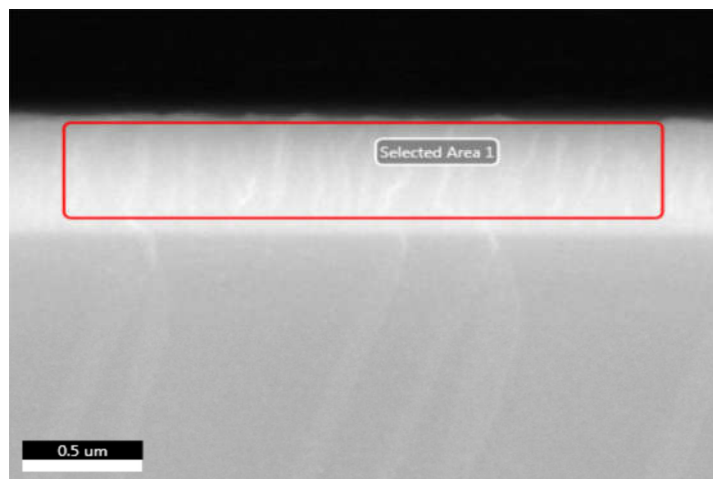
شکل ۸- تصویر میکروسکوپی از سطح مقطع پوشش ایجاد شده تولید شده با توان ۱۰۴ وات (۳/۰ آمپر) - ضخامت ۱/۱ میکرون.

در شکل (۱۰- الف و ب) به ترتیب تصاویری از باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس و اشرشیا کلی موجود بر روی نمونه‌های بدون پوشش در لحظات اولیه تماس با زیرلایه و قبل از هرگونه عملیات رقیق‌سازی نشان داده شده است. همان‌گونه که قبلاً گفته شد غلظت اولیه باکتری‌ها در حدود 10^6 باکتری بر میلی لیتر می‌باشد.

باقی‌مانده در محیط مولر هینتون و نهایتاً تصویربرداری و انجام عملیات شمارش آن‌ها، نرخ آنتی‌باکتریال پوشش‌ها در مقابله با این دو باکتری با استفاده از معادله ۱ (۲۶) محاسبه شد.

$$\text{Rate Antibarial \%} = \frac{N_0 - N}{N_0} \times 100 \quad (1)$$

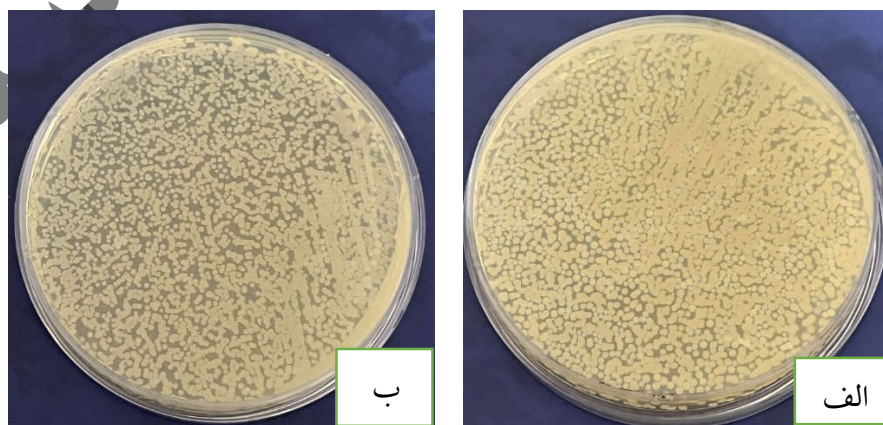
درحالی‌که N_0 و N به ترتیب برابر تعداد کلونی‌های باکتری زنده باقیمانده بر روی سطح نمونه فولاد زنگ نزن ۳۱۶ بدون پوشش و نمونه‌های پوشش داده شده می‌باشد.



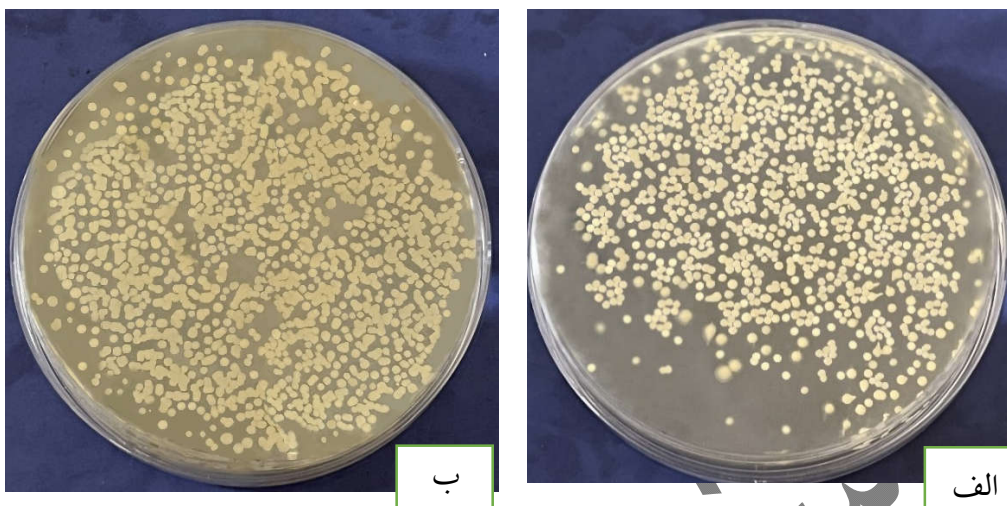
Element	Weight %	Atomic %
O K	19.73	37.72
AlK	4.76	5.40
SiK	39.76	43.31
ZrL	15.44	5.18
AgL	8.40	2.38
CrK	2.56	1.50
CuK	9.35	4.50

Lsec: 10.1 0 Cnts 0.000 keV Det: Octane Elite Plus

شکل ۹- تصویر میکروسکوپی از سطح مقطع پوشش به همراه آنالیز شیمیایی پوشش توسط آزمون EDAX



شکل ۱۰- تصاویری از دو باکتری الف) استافیلوکوک اورئوس و ب) اشرشیا کلی موجود بر روی نمونه‌های فولاد زنگ نزن ۳۱۶ بدون پوشش در لحظات اولیه تماس قبل از هرگونه عملیات رقیق‌سازی



شکل ۱۱- تصاویری از باکتری‌های زنده باقیمانده الف) استافیلوکوک اورئوس و ب) اشرشیا کلی بر روی نمونه‌های بدون پوشش در انتهای آزمون و بعد از ۵ مرحله عملیات رقیق‌سازی

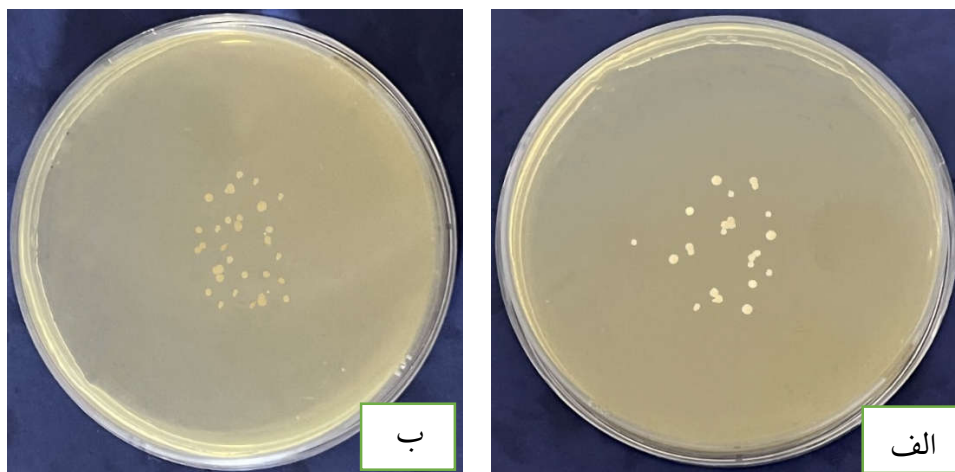
حال با داشتن تعداد باکتری‌های اولیه و تعداد باکتری‌های زنده باقیمانده بر روی پوشش و استفاده از معادله ۱، می‌توان نرخ متوسط آنتی‌باکتریال هر پوشش را محاسبه کرد. نتایج نشان می‌دهد که نرخ متوسط آنتی‌باکتریال پوشش برای باکتری استافیلوکوک اورئوس برابر ۹۸ درصد و نرخ متوسط آنتی‌باکتریال پوشش برای باکتری اشرشیا کلی برابر ۹۷ درصد به دست آمد.

مشاهده می‌شود که پوشش‌های ایجاد شده توانسته‌اند رفتار آنتی‌باکتریال خوبی از خود نشان دهند و تفاوت معناداری در رفتار آنتی‌باکتریال و ضد میکروبی پوشش در برابر این دو باکتری وجود ندارد. می‌توان گفت، وجود درصد بالایی از عناصر مس، نقره و حتی آلومینیوم در پوشش تولید شده، علت اصلی خاصیت بالای آنتی‌باکتریال آن در برابر دو باکتری اشرشیا کلی و استافیلوکوک اورئوس می‌باشد.

نتایج حاصل از این پژوهش همراستا با نتایج به دست آمده توسط سایر محققین می‌باشد. تمامی این یافته‌ها حاکی از رفتار آنتی‌باکتریال آلیاژهای مختلف لایه نازک شیشه فلز پایه زیرکونیوم، که در بردارنده دو عنصر مس و نقره باشند، در برابر این دو باکتری اشرشیا کلی و استافیلوکوک اورئوس می‌باشند.

در شکل‌های (۱۱- الف و ب) به ترتیب تصاویری از باکتری‌های زنده استافیلوکوک اورئوس و اشرشیا کلی موجود بر روی نمونه‌های بدون پوشش در انتهای آزمون و بعد از ۵ مرحله عملیات رقیق‌سازی نشان داده شده است. تعداد زیاد باکتری‌های زنده باقی‌مانده بر روی زیر لایه حاکی از عدم خاصیت آنتی‌باکتریال فولاد زنگ نزن ۳۱۶ می‌باشد. تعداد متوسط باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس باقی مانده بر روی این نمونه‌ها، پس از رقیق‌سازی نهایی، برابر با 1110 CFU/ml و برای باکتری اشرشیا کلی برابر با 1220 CFU/ml می‌باشد.

تصویربرداری و شمارش باکتری‌های زنده باقیمانده بر روی نمونه‌های پوشش داده شده نشان می‌دهد که تعداد باکتری استافیلوکوک اورئوس زنده باقی‌مانده بر روی پوشش برابر 23 CFU/ml می‌باشد. هم‌چنین تعداد متوسط باکتری اشرشیا کلی زنده باقی مانده بر روی پوشش مذکور برابر 32 CFU/ml می‌باشد. در شکل‌های (۱۲- الف و ب) به ترتیب تصاویری از باکتری‌های زنده استافیلوکوک اورئوس و اشرشیا کلی موجود بر روی نمونه‌های پوشش داده شده در انتهای آزمون و پس از ۵ مرحله عملیات رقیق‌سازی نشان داده شده است.



شکل ۱۲- تصاویری از باکتری‌های زنده باقیمانده الف) استافیلوکوک اورئوس و ب) اشرشیا کلی بر روی نمونه‌های پوشش داده شده در انتهای آزمون و بعد از ۵ مرحله عملیات رقیق‌سازی

همکارانش (۲۱) رفتار آنتی‌باکتریال دو شیشه فلز لایه نازک پایه زیرکونیم که یکی دارای عنصر نقره و دیگری دارای عنصر آلومینیوم مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد، از این دو آلیاژ با ترکیب‌های $Zr_{46}Ti_{40}Ag_{14}$ و $Zr_{46}Ti_{43}Al_{11}$ آلیاژی که دارای نقره می‌باشد، رفتار آنتی‌باکتریال بهتری نسبت به آلیاژی که دارای عنصر آلومینیوم می‌باشد، از خود نشان می‌دهد. این آلیاژ نیز مقاومت بیشتری در برابر رشد باکتری‌های مقاوم در برابر پنی‌سیلین از خود نشان می‌دهد.

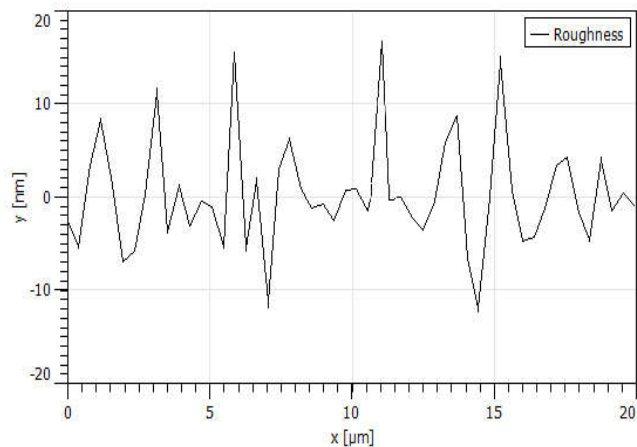
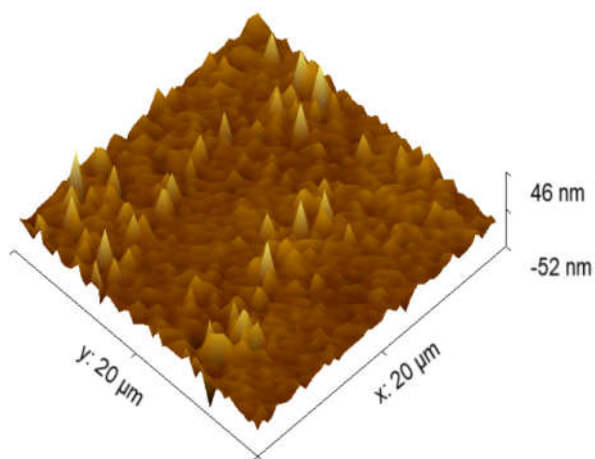
هم‌چنین مطالعات انجام شده توسط سویرامانین^{۳۳} (۲۸) در سال ۲۰۱۵ نشان داد که اعمال لایه‌های نازک شیشه‌های فلزی پایه تیتانیم $Ti_{40}Cu_{36}Pd_{14}Zr_{10}$ بر روی زیر لایه فولاد زنگ نزن ۳۱۶L باعث کاهش افزایش خاصیت آب‌گریزی و هم‌چنین بهبود خاصیت آنتی‌باکتریال زیر لایه در برابر باکتری اشرشیاکلی می‌گردد.

۳-۴- بررسی میزان زبری پوشش‌های ایجاد شده و نقش

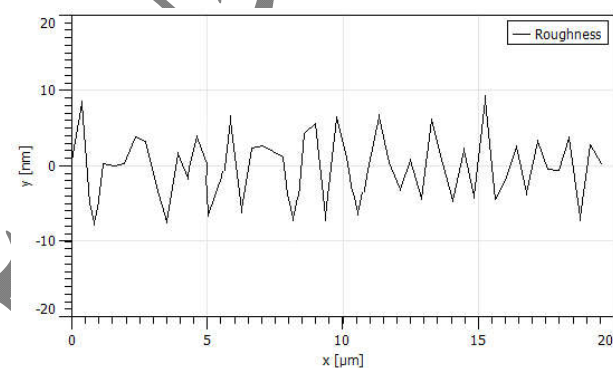
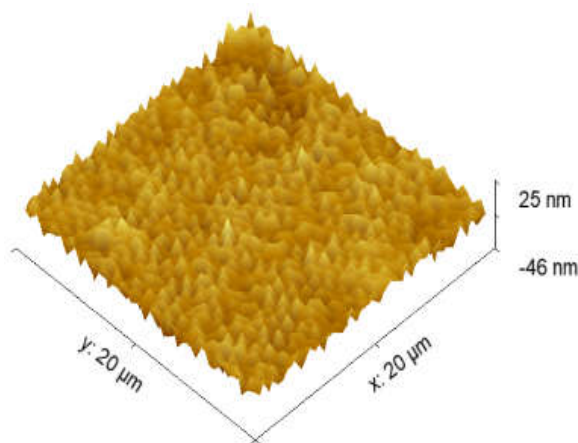
زبری در چسبندگی سلول‌های سرطانی به آن‌ها

به‌طور کلی می‌توان گفت میزان صافی سطح ابزارها و تجهیزات پزشکی می‌تواند رابطه مستقیم با میزان بهبودی و سلامت یک فرد بیمار داشته باشد. برای مثال ابزارهای جراحی که برای برداشتن یا یک تومور سرطانی استفاده می‌شوند، زمانی که در

برای مثال در آزمون‌های انجام شده توسط چو^{۱۹} و همکارانش (۲۵) بر روی رفتار آنتی‌باکتریال پوشش شیشه فلز پایه زیرکونیم حاوی عنصر مس، مشخص شد که یون‌های مس با آزاد شدن از سطح پوشش و ورود به محلول حاوی باکتری باعث تخریب و نابودی این دو نوع باکتری می‌گردد. در این پژوهش نرخ ضد میکروبی این پوشش بر علیه دو باکتری فوق‌الذکر حدود ۹۹ درصد گزارش شده است (۲۴). و یا در پژوهشی که در سال ۲۰۱۷ توسط لی^{۲۰} و همکارانش (۲۶) انجام شد، تأثیر مقدار نیتروژن در آلیاژ $Zr-Cu-Al-Ag-N$ بر رفتار آنتی‌باکتریال این پوشش در تماس با دو باکتری اشرشیا کلی و استافیلوکوک اورئوس مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت. مشاهده شد، برای تمامی پوشش‌ها و با درصدهای مختلف نیتروژن، سرعت آنتی‌باکتریال بالاتر از ۹۹ درصد بوده است. درحالی‌که برای فولاد زنگ نزن ۳۰۴ هیچ‌گونه توانایی ضد میکروبی وجود ندارد و تعداد باکتری‌های باقیمانده بسیار زیاد است (۲۶). و یا پژوهش انجام شده توسط سابرامانین^{۳۱} و همکارانش (۲۷) در مورد رفتار زیست‌سازگاری آلیاژ $Zr_{48}Cu_{36}Al_{8}Ag_{8}$ اعمال شده بر روی فولاد زنگ نزن ۳۱۶ کم کربن مشخص شد که پوشش‌های ایجاد شده کاملاً در مقابل رشد دو باکتری اشرشیا کلی و استافیلوکوک اورئوس از خود مقاومت نشان داده‌اند. در سال ۲۰۱۹ توسط جابد^{۳۲} و



شکل ۱۳- منحنی‌های زبری و تصویر سه بعدی تهیه شده از زیر لایه فولاد زنگ نزن ۳۱۶ در حالت کاملاً پولیش شده



شکل ۱۴- منحنی زبری و تصویر سه بعدی تهیه شده از سطح پوشش اعمال شده بر روی زیر لایه فولادی

را نیز دچار مشکل کند.

با توجه به اهمیت این موضوع، در این پژوهش میزان زبری سطح زیر لایه فولاد زنگ نزن ۳۰۴ به صورت کاملاً پولیش شده و پوشش آلیاژی $Zr_{30}Cu_{20}Al_{10}Ag_{10}Cr_{10}Si_{10}B_{10}$ اعمال شده مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت.

در شکل‌های (۱۳) و (۱۴) منحنی‌های زبری و تصاویر تهیه شده از سطوح این نمونه‌ها توسط میکروسکوپ AFM آورده شده است.

نتایج حاکی از آن است که زبری سطح فولاد زنگ نزن ۳۱۶ در حالت کاملاً پولیش شده برابر با $Ra = 4/08$ نانومتر و برای نمونه‌های پوشش داده شده برابر با $Ra = 2/11$ نانومتر می‌باشد.

تماس مستقیم با بافت تومور قرار می‌گیرند، مستعد چسبندگی سلول‌های سرطانی به خود هستند. این سلول‌های سرطانی، که اغلب زنده هستند، پس از چسبیده شده به این ابزارها، به بافت‌های سالم و طبیعی منتقل شده و به‌طور بالقوه باعث ایجاد تومورهای سرطانی جدید می‌شوند. بنابراین دستیابی به روش‌ها و یا راهکارهایی برای کاهش دادن میزان چسبیدن سلول‌ها به ابزارهای جراحی می‌تواند یکی از چالش‌های به‌روز و مطرح در مهندسی پزشکی به حساب آید. به‌طور خلاصه می‌توان گفت چسبیدن پلاکت‌ها و سلول‌های سرطانی نه تنها به ابزارهای جراحی می‌تواند مشکل آفرین باشد، بلکه می‌تواند با چسبیدن به تجهیزات تشخیصی و درمانی تشخیص متخصصین

نایج به دست آمده از این پژوهش حاکی از آن است که آلیاژ لایه نازک طراحی شده پایه زیرکونیوم با ترکیب شیمیایی $Zr_{30}Cu_{20}Al_{10}Ag_{10}Cr_{10}Si_{10}Br_{10}$ به علت برخورداری از ساختار آمورف، صافی سطح بالا و پیوستگی خوب با زیر لایه، توانسته است رفتار آنتی‌باکتریال بسیار خوبی در مقابله با دو باکتری متداول بیمارستانی و مقاوم در برابر پنی‌سیلین، اشرشیا کلی و استافیلوکوک اورئوس از خود نشان دهد. نرخ آنتی‌باکتریال این پوشش در مقابله با این دو باکتری به ترتیب برابر ۹۷ و ۹۸ درصد به دست آمد. وجود یون‌های مس و نقره عامل اصلی خاصیت آنتی‌باکتریال این پوشش می‌باشند. یون‌های این دو عنصر به راحتی می‌توانند وارد سلول شده و با اتصال به پروتئین‌هایی که مسئول انتقال مواد به داخل و خارج سلول هستند، عملکرد آن‌ها را مختل کنند. از طرفی نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که اعمال این پوشش، به دلیل دارا بودن ساختار آمورف باعث کاهش زبری سطح فولاد ۳۱۶، به میزان حدود ۵۰ درصد می‌گردد. چنانچه این پوشش بر روی ابزارهای جراحی ساخته شده از این آلیاژ اعمال گردد، می‌تواند نقش مهمی در کاهش میزان چسبندگی انواع پلاکت‌ها و سلول‌های سرطانی بر روی آن‌ها و در نتیجه انتقال آن از بافت‌های آسیب دیده به بافت‌های سالم، در حین هنگام برش بافت‌های معیوب گردد.

تشکر و سپاسگزاری

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اذعان دارند هیچ نوع تضاد منفعی با شخص، شرکت یا سازمانی برای این پژوهش ندارند.

این نشان می‌دهد اعمال پوشش باعث افزایش صافی سطح زیر لایه به میزان ۴۸ درصد گردیده است.

لذا به نظر می‌رسد، چنانچه پوشش طراحی شده بر روی ابزارهای پزشکی تهیه شده از فولاد زنگ نزن ۳۱۶، حتی در حالت پولیش شده، اعمال گردد، این پوشش با کاهش حدوداً ۵۰ درصدی زبری سطح می‌تواند، به عنوان یک پوشش کارآمد، نقش مهمی در جلوگیری از عفونت‌های بعد از عمل جراحی و سلامت افراد داشته باشد.

لازم به ذکر است که نتایج به دست آمده در این پژوهش هم‌راستا با نتایج محققین قبلی می‌باشد. همان‌گونه که در مقدمه بیان شد قسمت عمده این تحقیقات بر روی تأثیر زبری بر میزان چسبندگی انواع سلول‌های پلاکتی انسانی و حیوانی و انواع سلول‌های سرطانی متمرکز شده است (۱۷ و ۲۹-۳۴).

به عنوان نمونه تصاویر تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی ارائه شده توسط چانگ^{۲۴} و همکارانش (۳۶) نشان می‌دهد که اعمال پوشش لایه نازک شیشه فلز $Zr_{53}Cu_{33}Al_9T$ با زبری ۱۹/۱۰ نانومتر، به علت صافی سطح بالا باعث کاهش چسبندگی سلول‌های سرطانی به پوشش شده است. نتایج حاکی از کاهش قابل ملاحظه تعداد هر سه نوع سلول سرطانی مری (SK-GT-4)، سلول سرطانی پستان (MBA-MB-231)، و سلول سرطانی روده بزرگ (WiDr) بر روی این پوشش پایه زیرکونیوم، نسبت نمونه‌های بدون پوشش، می‌باشد (۳۲). همچنین بررسی تصاویر میکروسکوپی نشان می‌دهد که میزان چسبندگی پلاکت‌های انسانی و پلاکت‌های خوک بر روی این پوشش آمورف به مراتب کم‌تر نمونه‌های بدون پوشش است. لازم به ذکر است که چسبندگی سلول‌های پلاکتی به عنوان اولین مرحله در تشکیل لخته‌های خون در نظر گرفته می‌شود.

۴- نتیجه‌گیری

واژه‌نامه

1. Grass G.
2. Escherichia Coli

3. Etiemble
4. Chen

5. Jabed
6. Bourassa
7. Huang
8. Target
9. Spark Plasma Sintering
10. Magnetron Sputtering
11. SEM
12. FESEM
13. AFM
14. GIXRD

15. Staphylococcus Aureus
16. Escherichia Coli
17. Phosphate Buffered Saline
18. Grazing Incidence X-ray Diffraction
19. Chu
20. Lee
21. Subramanian
22. Jabed
23. -Subramanian
24. Chang

مراجع

1. Hyde F.W, Alberg M. and Smith K. Comparison of fluorinated polymers against stainless steel, glass and polypropylene in microbial biofilm adherence and removal, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1997, vol.19, p. 142–149.
2. Garg R. , Gonuguntla S., Sk S., Iqbal M.S. ,Dada A.O., Pal U., Ahmadipour M., Sputtering thin films: Materials, applications, challenges and future directions, *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 330, 2024, 103203, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2024.103203>.
3. Rai M, Yadav A, and Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials, *Biotechnology Advances*, 2009, 27, p. 76–83, doi:10.1016/j.biotechadv.2008.09.002.
4. Clement J. L, and Jarrett P. S. Metal-Based Drugs, *Antibacterial Silver*, 1994, Vol. 1, Nos. 5-6, p. 467-482.
5. Borkow G, and Gabbay J. Copper, An Ancient Remedy Returning to Fight Microbial, Fungal and Viral Infections, *Current Chemical Biology*, 2009, vol. 3, NO. 3, p. 272-278, DOI: 10.2174/187231309789054887.
6. Borkow G, and Gabbay J. Copper as a Biocidal Tool, *Current Medicinal Chemistry*, 2005, vol.12, No.18, p. 2163-2175.
7. Grass G, Rensing C, and Solioz M. Metallic Copper as an Antimicrobial Surface, *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, Vol. 75, No.5, p. 1541–1547. doi:10.1128/AEM.02766-10.
8. Dallas .P, Sharma V. K, Zboril R. Silver polymeric nanocomposites as advanced antimicrobial agents: Classification, synthetic paths, applications, and perspectives, *Advances in Colloid and Interface Science*, 2011, Vol. 166, Issues 1–2, 10 August, p. 119-135, doi:10.1016/j.cis.2011.05.008.
9. Chu J.P, Liu T.-Y, Li C.-L, Wang C.-H, Jang J.S.C, Chen M.-J, Chang S.-H, Huang W.-C. Fabrication and characterizations of thin film metallic glasses: anti-bacterial property and durability study for medical application, *Thin Solid Films* 561, (2014), p. 102–107, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tsf.2013.08.111>.
10. Truong V.K, Lapovok R, Estrin Y.S, Rundell S, Wang J.Y, Fluke C.J, Crawford R.J, Ivanova E.P. The influence of nano-scale surface roughness on bacterial adhesion to ultrafine-grained titanium, *Biomaterials* 31(2010), p. 3674–3683, doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.071.
11. Wang Y.B, Li H.F, Cheng Y, Zheng Y.F, Ruan L.Q. In vitro and in vivo studies on Ti-based bulk metallic glass as potential dental implant material, *Mater. Sci. Eng. C* 33(2013), p. 3489–3497, <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2013.04.038>.
12. Schroers J, Kumar G, Hodges T.M, Chan S, Kyriakides T.R. Bulk metallic glasses for biomedical applications, *JOM* 61(2009), p. 21–29, DOI: 10.1007/s11837-009-0128-1.
13. Howlett C.R, Evans M.D.M, Walsh W.R, Johnson G, Steele J.G. Mechanism of initial attachment of cells derived from human bone to commonly used prosthetic materials during cell culture, *Biomaterials* 15 (1994), p. 213–222.
14. Hallab N.J, Bundy K.J, O'Connor K, Moses R.L, Jacobs J.J. Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion, *Tissue Eng.* 7 roughness characteristics for directed cell adhesion, *Tissue Eng.* 7 (2001), p. 55–71.
15. Lampin M, Warocquier-Clérout R, Legris C, Degrange M, Sigot-Luizard M.F. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration, *J. Biomed. Mater. Res.* 36 (1997), p. 99–108.
16. Deligianni D.D, Katsala N.D, Koutsoukos P.G, Missirlis Y.F. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength, *Biomaterials* 22 (2001), p. 87–96.
17. Bourassa M.G, Cantin M, Sandborn E.B, Pederson E. Scanning electron microscopy of surface irregularities and thrombogenesis of polyurethane and poly-ethylene coronary catheters, *Circulation* 53 (1976), p. 992–996, <http://circ.ahajournals.org/> by guest on March 29, 2015.
18. Huang Q, Yang Y, Hu R, Lin C, Sun L, Vogler E.A. Reduced platelet adhesion and improved corrosion

- resistance of superhydrophobic TiO₂-nanotube-coated 316L stainless steel, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 125 (2015), p. 134–141, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.11.028>.
19. Etienneble A, Der Loughian C, Apreutesei M, Langlois C, Cardinal S, Pelletier J.M, Pierson J.P, Steyer P. Innovative Zr-Cu-Ag thin film metallic glass deposited by magnetron PVD sputtering for antibacterial applications, *Journal of Alloys and Compounds* 707 (2017), p. 155-161, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jallcom.2016.12.259>
 20. Chen H. W, Hsu K. Ch, Chan Y. Ch, Duh J.G, Lee J.W, Shian-Ching Jang J, Chen G.J, "Antimicrobial properties of Zr-Cu-Al-Ag thin film metallic glass, *Thin Solid Films*, 561 (2014), p. 98–101, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tsf.2013.08.028>.
 21. Javed A, Mudassar Khan M, Camilleri J, Greenlee-Wacker M, Shabib I. Property optimization of Zr-Ti-X (X=Ag, Al) metallic glass via combinatorial development aimed at prospective biomedical application, *Surface and Coatings Technology*, 2019, Vol. 37225, August, p. 278-287, <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2019.05.036>.
 22. Rajan T.S., Mitun Das, Sasi Kumar P., Arockiarajan A., Subramanian B., Biological performance of metal metalloid (TiCuZrPd:B) TFMG fabricated by pulsed laser deposition, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 202, June 2021, 111684, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111684>
 23. Zhang E., Wang W., Liang D., Wei X., Zhu Y., Chen Q., Zhou Q., Huang B., Shen J., Superior corrosion-resistant Zr-Ti-Ag thin film metallic glasses as potential biomaterials, *Applied Surface Science*, Vol. 670, 2024, 160712, <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2024.160712>.
 24. JIS Z2801, Antimicrobial Products test for Antimicrobial Activity and Efficacy, Japanese Industrial Standard, 2000, p. 2001.
 25. Chu J-H, Lee J., Chang C-C., Chan Y-C., Liou M.L., Lee J-W. Jang, J. S-C., Duh J-G., Antimicrobial characteristics in Cu-containing Zr-based thin film metallic glass, *Surface & Coatings Technology*, 2014, Vol. 259, Part A, 25, p. 87-93, doi: 10.1016/j.surfcoat.2014.05.019
 26. Lee J., Liou M-L. Duh J-G., The development of a Zr-Cu-Al-Ag-N thin film metallic glass coating in pursuit of improved mechanical, corrosion, and antimicrobial property for bio-medical application, *Surface and Coatings Technology*, 2017, Vol. 310, 25 January, p. 214-222. <http://dx.doi.org/10.1016/j.surfcoat.2016.12.076>
 27. Subramanian B, Maruthamuthu S, Thanka Rajan S. Biocompatibility evaluation of sputtered zirconium-based thin film metallic glass-coated steels, *International Journal of Nanomedicine*, 2015, October, p. 17-29. <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S79977>.
 28. Subramanian B. In vitro corrosion and biocompatibility screening of Sputtered Ti₄₀Cu₃₆Pd₁₄Zr₁₀ thin film metallic glasses on steels, *Materials Science and Engineering C47* (2015), p. 48–56, <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.11.01>.
 29. George J.N. Direct assessment of platelet adhesion to glass: a study of the forces of interaction and the effects of plasma and serum factors, platelet function, and modification of the glass surface, *Blood* 40 (1972), p. 862–874.
 30. Vijayanad K, Pattanayak D.K, Mohan T.R, Banerjee R. Interpreting blood-bio-material interactions from surface free energy and work of adhesion, *Trends Biomater. Artif. Organs* 18 (2005), p. 73–83.
 31. Busch R, Strohbach A, Rethfeldt S, Walz S, Busch M, Petersen S, Felix S, Sternberg K., New stent surface materials: the impact of polymer-dependent inter-actions of human endothelial cells, smooth muscle cells, and platelets, *Acta Biomater.* 10 (2014), p. 688–700, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.015>.
 32. May R.M, Magin C.M, Mann E.E, Drinker M.C, Fraser J.C, Siedlecki C.A, Brennan A.B, Reddy S.T., An engineered micropattern to reduce bacterial colonization, platelet adhesion and fibrin sheath formation for improved biocompatibility of central venous catheters, *Clin. Transl. Med.* 4 (2015) 9. DOI 10.1186/s40169-015-0050-9.
 33. Dowling D.P, Miller I.S, Ardhaoui M, Gallagher W.M. Effect of surface wettability and topography on the adhesion of osteosarcoma cells on plasma-modified poly-styrene, *J. Biomater. Appl.* 26 (2011), p. 327–347, DOI: 10.1177/0885328210372148.
 34. Crear J, Kummer K.M, Webster T.J. Decreased cervical cancer cell adhesion on nanotubular titanium for the treatment of cervical cancer, *Int. J. Nanomedicine* 8 (2013), p. 995–1001.
 35. Chang C. H, Lib C. L, Yu C. C, Chen Y. L, Chyntara S, Ming-Jen Chen J. P. C and Chang S.-H., Beneficial effects of thin film metallic glass coating in reducing adhesion of platelet and cancer cells: Clinical testing, *Surface & Coatings Technology* 344 (2018), p. 312–321, <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.03.040>
 36. Furie B, Furie B.C. Mechanisms of thrombus formation, *N. Engl. J. Med.* 359 (2008), p. 938–94.