DOI: 10.22041/ijbme.2007.13483

Iranian Journal of Biomedical Engineering 1 (2007) 19-28

In vitro Evaluation of Escherichia coli K–12 Bacteria Adhesion onto CO_2 and KrF Laser-Treated Polyethylene Terephthalate (PET)

R. Mehdinavaz–Aghdam [1], H. Mirzadeh[2,3*], M. Daliri[4], A. Zare[5]

[1]Faculty of Biomedical Engineering, Amir Kabir University of Technology, Tehran, Iran
[2]Department of Polymer Engineering, , Amir Kabir University of Technology, Tehran, Iran
[3]Iran Polymer and Petrochemical Institute, Tehran, Iran
[4]Biotechnology &Genetic Engineering Research Center, Tehran, Iran
[5]Atomic Energy Organization of Iran

Abstract

Recently there are studies in developing new methods to increase bacterial adhesion onto polymeric surfaces that are used in biological application such as cell-based biosensors. In this study the surface of polyethylene terephthalate (PET) films were irradiated using CO_2 and KrF excimer pulsed lasers and adhesion behavior of Escherichia coli k-12 (E. coli K-12) bacteria onto the irradiated surfaces was studied *in vitro*. The changes in the surface properties due to laser irradiation were characterized by scanning electron microscopy (SEM) and contact angle measurement. The results showed that laser treatment changes surface morphology and surface hydrophilicity. The number of bacteria that were adhered onto the surfaces was quantitatively investigated by fluorescent staining, microscopic observations and counting through Image Proplus software. The results showed that the number of adhered E. coli K-12 bacteria onto the irradiated surfaces by both CO_2 and KrF lasers in comparison with unmodified surfaces was increased.

Keywords: KrF laser; CO_2 laser; Laser treatment; Polyethylene terephthalate; Bacterial adhesion

* **Corresponding author**
Address: *Rouh Allah Mehdinavaz–Aghdam, Iran Polymer and Petrochemical Institute, Pajhoohesh Blvd, Km 15, Tehran-Karaj Highway, Tehran, I.R.Iran*
Tel: *+98 21 44580020*
E-mail: *h.mirzadeh@ippi.ac.ir*

DOI: 10.22041/ijbme.2007.13483

چسبندگي باكتري اشرشياكلي در شرايط آزمايشگاهي به سطح پلي‌اتيلن‌ترفتالات تابش‌ديده با ليزرهاي دي‌اكسيدكربن و كريپتون‌فلوئورايد

روحا مهدي‌نواز افدم[۱]، حميد ميرزاده[۲،۳*]، مرتضي دليري[۴]، عليرضا زارع[۵]

[۱] دانشكده مهندسي پزشكي، دانشگاه صنعتي اميركبير

[۲] دانشكده مهندسي پليمر، دانشگاه صنعتي اميركبير

[۳] پژوهشگاه پليمر و پتروشيمي ايران

[۴] مركز تحقيقات مهندسي ژنتيك و بيوتكنولوژي

[۵] پژوهشگاه ليزر، سازمان انرژی اتمی ايران

چكيده

اخيراً مطالعاتي در زمينه توسعه روش‌هاي جديد براي افزايش چسبندگي باكتريايي روي سطوح پليمري وجود دارد كه در كاربردهاي بيولوژيكي از جمله بيوسنسورهاي پايه سلولي استفاده مي‌شوند. در اين مطالعه، سطح فيلم پلي‌اتيلن‌ترفتالات (PET) در معرض نور ليزرهاي اكسايمر كريپتون فلوئورايد (KrF) و دی‌اكسيدكربن (CO_2) ضربه‌اي قرار گرفت و رفتار چسبندگي باكتري اشرشياكلي (E-coli K-12) روي سطوح پرتودهي‌شده در شرايط آزمايشگاهي (*in vitro*) بررسي شد. تغييرات خواص سطح PET حاصل از پرتودهي ليزر، توسط ميكروسكوپ الكتروني روبشي (SEM) و اندازه‌گيري زاويه تماس مشخص شد. نتايج نشان دادكه آمايش ليزري باعث تغيير مورفولوژي و همچنين آبدوستي سطح PET مي‌شود. تعداد باكتري‌هاي E-coli K-12 كه به سطح PET چسبيده بودند به طور كمي توسط رنگ‌آميزي فلورسنت، مشاهدات ميكروسكوپي و شمارش از طريق نرم‌افزار Image Proplus بررسي شد. نتايج نشان داد كه تعداد باكتري‌هاي E-coli K-12 چسبيده به سطوح پرتودهي‌شده با ليزرهاي كريپتون‌فلوئوريد و دی‌اكسيدكربن در مقايسه با سطوح اصلاح نشده افزايش يافت.

واژه‌های كليدی: ليزر كريپتون‌فلوئوريد؛ ليزر دی‌اكسيدكربن؛ آمايش ليزري؛ پلي‌اتيلن‌ترفتالات؛ چسبندگي باكترياي

*عهده‌دار مكاتبات

نشانی: تهران، كيلومتر ۱۵ بزرگراه تهران- كرج، بلوار پژوهش، پژوهشگاه پليمر و پتروشيمی ايران

تلفن: ۰۲۱-۴۴۵۸۰۰۲۰، **پيام‌نگار:** h.mirzadeh@ippi.ac.ir

۱- مقدمه

با پيشرفـت تكنولوژي نياز به موادي با برهم‌كنش سـلولي قابـل پيش‌بيني افـزايش يافتـه اسـت. در حـال حاضـر در پزشكي گرايش به سمت موادي است كه نه تنها پاسخ‌هاي منفـي جسم خارجي را ايجاد نكند بلكـه بـه طـور بالفعـل چسبندگي سلول‌ها به بستر را نيز شدت بخشد [۱].

اخيـراً مطالعـاتي در زمينه توسعـه روش‌هاي جـديد براي افزايش چسبندگي باكتـريايي روي سطـوح پليمري وجـود دارد كه در كاربردهـاي بيولوژيكي از جمله بيوسنسورهاي پايه سلولي استفاده مي‌شوند [۳،۲]. پاسخ محيطي معين بـه وسيله بـرهم‌كنـش سلـول- پليمـر، مهمترين معيار بـراي كاربرد مواد پليمري جديد در محيط‌هاي بيولوژيكي است. بـرهم‌كنـش‌هاي سلـول- پليمر اغلب به وسيله انرژي آزاد سطـح بستر، شـيمي سطـــح و توپوگرافـــي سـطح متـــأثر مي‌شوند. بـررسی تغييرات اين خـواص از طـريق آمـايش سطـح بـه عنـوان روش عمـومي بـراي بـه دسـت آوردن برهم‌كنش سلولي مطلوب در نظـر گرفته می‌شود [۴]. اكثر تحقيقات براي پيش‌بينی و اصـلاح چسبندگي سلـول‌ها يـا باكتري به سطـوح پليمري، از طريق انتخاب ماده يا سلول، اصـلاح شيمي يا بـــافت سطـــح، دمـــا و اصـلاح سـايـــر خصوصيات سطح پليمر انجام شده است [۴]. خصوصيات آبدوستي يا آبگـريزي ديواره سلـولي از اين نظـر كه روي چسبندگي آن به سطـح تأثير مي‌گذارد حائز اهميت بوده و بنابر اين مي‌تواند يك فاكتور مهم در انتخاب مـــواد بـراي محيط‌هاي بيولوژيكي باشد [۵]. بـراي مثـــال، چـسبندگي خوب سلول‌هاي اندوتليال انسان [۶] و فيبروبلاست‌ها [۷] روي سطـوح پليمري آبـدوست مشـاهـده شـده است. در حـالي كه طبـق مطالعـات انجـام شـده روي يك لاسـتيك اتيلـن- پـروپيلـن پيـونـدخـورده بـا آكريـــل‌آميـــد و ۲- هيـدروكسي اتيـل‌متـاكـريلات توسـط ليـزر، بـا افـــزايش آبدوستـي چسبندگـي ماكـروفاژها كاهش می‌يابـد [۸]. بـه منظور پيشگويـی رفتار چسبندگي باكتـري يا سلـول بايـد تمام جنبه‌هاي سطـح از جمله آبدوستي، زبري، سـميت و اثرات محيط در نظر گرفته شود.

امـروزه نور ليزر به علت نداشتن اثر سـوء بر تـوده پليمـر بيشتر از منابع ديگر براي اصلاح سطح پليمرها به كار برده مي‌شـود. تغييرات حاصـل از پرتو ليـزر محـدود به سـطح پليمر است و خسارت احتمالي بـه تـوده پليمـر نسبت بـه پرتوهاي گاما و الكتروني بـه حـداقل مي‌رسـد و خـواص مكانيكي پليمرها حفـظ مي‌شـود [۹-۱۱]. بـا تـوجـه بـــه مطالعـات انجام شده در زمينه بهينه‌سازي فيلم‌هاي پليمري با ليزر مشخص شـده است كه كندگي حاصل از پرتو ليزر بـا تغييرات شيميايـي و فيـزيكي سطـح و ايجـاد گروه‌هـاي عاملي جديد همراه است [۱۲-۱۴] و ساختـار منظمي كه در نواحـي تابش ديده ايجـاد مي‌گردد باعـث بهبـود زيـست- سازگاري پليمر مي‌شـود. مطالعـات اخير نشان مي‌دهند كه سلول‌هاي حياتـي نسبت بـه خـواص شيميايي و فيـزيكي حساسنـد و مورفـولـوژي سطـح پليمر و گروه‌هاي عاملي روي آن بـر چسبندگـي، رشد و جهـت‌گيـري سلــول‌هاي حيـاتي تأثيرگذار بـوده و مي‌تواننـد باعـث تغيير زيـست- سازگاري پليمر شوند [۱۵،۱۳].

تحقيقات انجـام شده درمورد پلي‌اتيلن‌ترفتالات نـشان داده است كه ساختـار سطـح اين پليمر بعد از قـرار گـرفتن در معرض پرتو ليـزرهای اكسايمر و دی‌اكسيدكربن از حالـت كريستالي به حالت آمورف تغيير مي‌كند [۱۷،۱۶]. همچنين در مطالعـه ديگر توسط دادستان و همكاران نشان داده شد پـرتـو ليـزر بـاعـث بـرخـي تغييـرات در مورفـولـــوژي، ترشوندگي، كريستالينيتي و تركيب شـيميايي سـطح پلـي- اتيلن‌ترفتالات مي‌شود. اثر ايـن تغييـرات روي چـسبندگي پلاكت‌ها و فيبروبلاست‌ها به سطـح پلي‌اتيلـــن‌ترفتـــالات بررسي شده است [۱۸، ۱۹]. همچنين ميرزاده و همكـاران در تحقيقات اخير نشان دادند كه ليزر اگزايمر روي سـطح پلي‌استيرن باعث تغييرات زيست‌سـازگاري پلـي‌اسـتيرن و ليزر گـاز كربنيـك باعـث تغييـرات خـون‌سـازگاري روي الاستومر سيليكون مي‌شود [۲۰-۲۲].

در اين تحقيق، اثـر ليـزرهاي دی‌اكسيـدكربن و اكسـايمـر كريپتون‌فلوئورايد بر سطـح پلي‌اتيلن‌ترفتـالات و همچنـين چسبندگي باكتـري اشـرشياكلي (E-coli K-12[1]) به سطوح

[1] Escherichia coli K-12

پرتودهي شده با ليزرهاي مذكور بررسي گرديده و سطوح بهينه با حداكثر يا حداقل جذب باكتري مورد مطالعه قرار گرفته است. نتايج اين بررسی می‌تواند در ساخت بيوسنسورها[2] برای رديابی باكتری‌ها يا سم‌های بيوشيميايی مورد استفاده قرار گيرد.

۲- مواد و روش‌ها

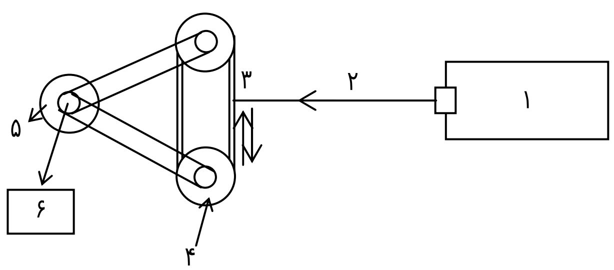
۲-۱- مواد

در اين تحقيق از فيلم پليمري پلي‌اتيلن‌ترفتالات تهيه شده از دانشگاه برونل[3] انگلستان (مركز تكنيكي Wolfong Center) براي بررسي آثار ليزر و همچنين چسبندگي باكتري E-coli K-12 روي سطح پليمر استفاده شد. نمونه‌هايی با قطر ۱۰ mm از فيلم PET پرتودهي شده و PET شاهد تهيه شد. سطح آنها توسط دستگاه تميزكننده اولتراسونيك Sonorex مدل RK31 در مخلوط آب يون زدايي و با استون شستشو داده شد و براي خشك شدن در آون خلاء با دماي ۴۰°C قرار گرفت تا به وزن ثابت برسد.

۲-۲- پرتودهي با ليزر

در اين آزمايش‌ها از ليزر ضرباني دی‌اكسيدكربن (Lumonics مدل TEA-840) با پهناي پالس ۲۰۰ ns استفاده شد. اين ليزر داراي طول موج قابل تنظيم در محدوده ۹-۱۱ µm و شاريدگي ۰/۴-۱/۵ J/cm^2 است. پرتودهي نمونه‌ها در طول موج ۹/۵۸ µm و شاريدگی ۱/۵ J/cm^2 انجام شد (شاريدگی توسط ژول‌متر و از روی اندازه پرتو ليزر محاسبه می‌شود) و سرعت تكرار ضربان يك هرتز انتخاب گرديد. با توجه به طيف IR پلی‌اتيلن‌ترفتالات، اين پليمر جذب‌هايی در ناحيه ۱۰۴۳ cm^{-1} دارد كه با طول موج ۹/۵۸ µm در ليزر دی‌اكسيدكربن مطابقت دارد.

همچنين پرتودهي توسط ليزر اكسايمر كريپتون‌فلوئورايد (Physics Instrumentation Center-RAS، مدل ۱۸۱۲) با طول موج ۲۴۸ nm و پهناي پالس ۱۰-۲۵ ns كه سرعت تكرار ضربان ليزر از ۱-۱۰۰ هرتز قابل تنظيم است، نيز انجام شد. در اين آزمايش، پهنای پالس، ۲۰ ns؛ فركانس يک هرتز



شكل ۱- شكلواره‌اي از پرتودهی ليزری پليمرها
۱: ليزر؛ ۲: نور ليزر؛ ۳: فيلم پليمري؛ ۴: قرقره دوار؛ ۵: جعبه تنظيم سرعت موتور؛ ۶: موتور گامي

و شاريدگی ۶۰ J/cm^2 انتخاب گرديد (پارامترهای فوق با استفاده از مينی‌كامپيوتر متصل به ليزر كريپتون‌فلوئورايد قابل تنظيم است). پرتودهي نمونه‌ها با انتخاب شرايط مناسب نظير انرژي، سرعت تكرار و تعداد پالس ليزر، با قرار دادن نوارهايي از فيلم پليمري روي يك موتور گامي[4] مخصوص انجام شد، به طوري كه سرعت موتور با سرعت تكرار ضربان ليزر قابل تنظيم بود (شكل ۱).

۲-۳- اندازه‌گيري زاويه تماس

به منظور مطالعه آبدوستي نمونه‌ها، زاويه تماس استاتيك قطره آب با سطوح پليمر با روش قطره چسبيده[5] به كمك دستگاه كراس G10 اندازه‌گيري شد. همه زاويه‌هاي داده‌شده ميانگين زاويه تماس قطره آب با پنج نقطه مختلف سطوح پليمر است.

۲-۴- ميكروسكوپ الكتروني روبشي (SEM)

ميكروسكوپ الكتروني روبشي فيليپس (مدل XL30) با ولتاژ ۱۰ kV و شيب صفر درجه براي مطالعه مورفولوژي سطح فيلم‌هاي پلي‌اتيلن‌ترفتالات (قبل و بعد از پرتودهي) به كار گرفته شد. نمونه‌ها قبل از قرارگيري در محفظه خلاء ميكروسكوپ الكتروني با طلا پوشش داده شدند.

۲-۵- كشت سلولي[6]

در اين آزمايش از باكتري E-coli K-12 (تهيه شده از بانك سلول انستيتو پاستور ايران) استفاده شد. محلول كشت مغذي

[2] Biosensors
[3] Brunell
[4] Step motor
[5] Sessile drop
[6] Cell Culture

حـاوي كلريـد سـديم، تريپتـون پپتون، Yeast extract و آب يون‌زدا شـده در يك بشـر تهيه شـد. بشر و محلول در يـك اتوكلاو در دماي ۱۲۱°C به مدت ۳۰ دقيقه سترون شــدند. براي ايجاد يك رده تازه و خالص از باكتري E-coli K-12 از محيط كشت جـامد (حـاوي مولر هينتون آگار جامد) استفاده شد. براي اينكه باكتري‌ها بتوانند در محيط جـامد فوق رشـد كنند از انكوباتـور ۳۷°C بـه مـدت ۲۴ ساعـت استفاده شـد. باكتـري‌ها را پـس از رشـد تـك لايـه روي مولرهينتون آگار جامد، توسـط لوپ فلـزي سترون شده برداشته و درون محلول كشت قرار داده شـدند تـا سوسپانسيوني از باكتـري بـا غلظـت ۲ * 10^5 bacteria/ml تهيه شود (با استفاده از روش مكفارلند). سپس محلول كشت حـاوي باكتـري به مـدت ۱۶-۱۴ ساعـت در دماي ۲۳°C درون حمام آبي قرار داده شـد. بـر اساس منحنـي رشد E-coli K-12 اين زمـان انكوباسيـون باعـث مي‌شـود كه باكتـري به مرحله لگاريتمی رشد خود برسد. بررسي‌ها نشان داده است كه چسبندگـي باكتـري‌ها به بسترهاي پليمـري در مرحله لگاريتمی رشد بهتر انجـام مي‌شـود [۲]. براي اطمينان از اينكه باكتري در مرحله لگاريتمی از رشد خود قرار دارد از اسپكتروفتومتر براي اندازه‌گيـري دانسيته نوري[7] محيط كشت استفاده شـد و سپس مقـادير به دست آمـده بـا منحني رشـد E-coli K-12 مقايسه شد.

نمـونه‌هاي پليمـري پلـي‌اتيلن‌ترفتالات با قطر ۱۰ ميلي‌متر در بشرهاي كوچك قرار داده و ml ۱۰۰ از محلول كشت حاوي باكتري درون آنها پـر شـد و به مـدت ۳/۵ ساعـت همـراه با تكان‌خـوردن[8] در شـرايـط محيـط نگهـداري شـد. در ادامـه نمونه‌ها توسـط محلول نمـك به مـدت يك ساعـت شستشو داده شـدند تا براي مشاهـده چسبندگي باكتري‌ها روي سطح توسط ميكروسكوپ فلورسانس آماده باشند.

۲-۶- رنگ‌آميزي[9]

رنگ فلورسنت محصول شركت Molecular Probes با نام The LIVE/DEAD Baclight Bacterial Viability Kit بـا شماره كاتالوگ L-13152 بـراي تشخيص باكتري‌هاي زنده و مرده E-coli K-12 چسبيده به سطـح نمونه‌هاي پليمري پلي-اتيلن‌ترفتالات استفاده شد. براي رنگ‌آميـزي نمونه‌ها محلول رنگ در يـك مكان دور از نـور تهيه شـد. بـا استفاده از يك ميكروپيپت، ۱۵ μl از محلول رنـگ روي سطـح نمـونـه‌هاي پليمري ريخته شد، سپس يك لامل روي ناحيه‌اي كه محلول رنگ ريخته شـده بـود، گذاشته شـد؛ نمـونه‌ها سپس در يك اتـاق تـاريـك بـه مـدت ۱۵ دقيقه نگهداري شـدنـد. زمـان انكوباسيون به رنگ فرصت مي‌دهـد تا به درون باكتـري‌هاي چسبيده روي سطح نمـونه نفـوذ كرده و امكان آشكارسـازی باكتری‌های رنگ شده توسط ميكروسكوپ فلورسانس فراهم گردد.

۲-۷- ميكروسكوپ فلورسانس

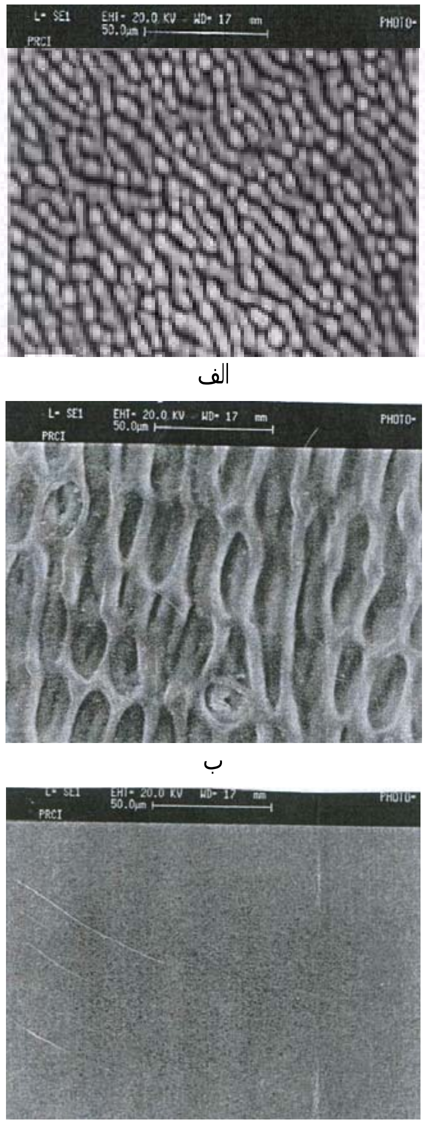
از ميكروسكـوپ فلورسـانس نيكون (Nikon مـدل E600 با بزرگنمايـي 400 ×) بـراي مشاهـده باكتري‌هايي كه به سطـح پليمـر چسبيـده بـودنـد، استفاده شـد. همچنيــن تـصـاويـر باكتري‌هاي چسبيده به سطـح پليمرها به كمـك ابزار CCD[10] (مـدل JVC-TK-C601) بـه دست آورده شــد و شمـــارش باكتري‌های زنده توسط نرم‌افزار Image Proplus انجام شد.

۳- نتايج و بحث

۳-۱- بررسي مورفولوژي سطح

تغييرات مورفولوژي در اثر پرتودهـي با ليزر دی‌اكسيد كربن با طـول مـوج μm ۹/۵۸ و ليـزر كريپتون‌فلوئوريد با طـول مـوج nm ۲۴۸ در تصاوير ميكروسكوپ الكتروني شكل ۲ نشان داده شده است. همـان طـور كه در اين شكل مشاهـده مي‌شـود در سطح پليمر تپه‌ها و دره‌هايي در اثر قرار گرفتن در معرض نـور ليزر KrF ايجاد شده است كه با مشاهدات لازار و سرينيواسان مطابقـت دارد [۱۶]. با پرتودهي نمونه با انرژي بيشتر از آستانه كندگي (آستانه كندگي PET در طول موج nm ۲۴۸، ۳۰ mJ/cm^2 است.)، يك لايه از سطـح پليمر كنده شده و در لايه زيرين بـه نام لايه ذوب، تنش‌هاي داخلـي مربـوط به كشش فيلم جهـت يافته آزاد مي‌شـوند و جامد شدن مجدد، بافت ويژه‌اي را در سطح فيلم موجب مي‌شود [۲۳،۲۴]. تغييرات مورفولوژي در اثر پرتودهي با طول مـوج μm ۹/۵۸ ليزر دی‌اكسيدكـربن در شكل ۲- ب نشـان داده شده است. تشكيل ريزساختار ايجاد

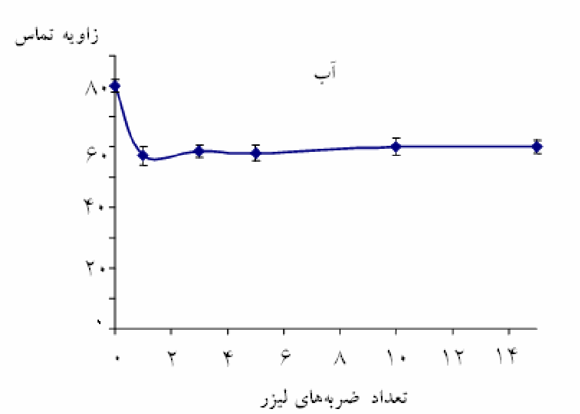
7 Optical Density
8 Shaking
9 Staining
10 Controlled Charge Coupled Device



شکل ۲- تصاوير ميكروسكوپ الكتروني PET پرتوديده با ليزر الف- KrF در طـول‌مـوج ۲۴۸ nm و ده ضـربه بـا شـاريدگـی ۶۰ J/cm2؛ ب- دي‌اكسيدكربن در طـول‌مـوج ۹/۵۸ µm و ده ضـربـه بـا شاريدگی ۱/۵ J/cm2؛ ج- PET كنترل [۱۷]

شده روي سطح PET به آزاد شدن تنش در يك لايه سطحي فيلم مذاب نسبت داده شـده است [۱۷]. از طـرفی هـر چـــه ضـريب جذب پليمر بيشتر باشد، عمـق كندگي كمتر است و نور ليزر كمتر در توده پليمر نفوذ مي‌كند [۲۵].

عامـل ديگر در تغيير ساختـار سطحـي پليمـر مقياس زمـاني در پهناي پالس ليـزر است. در ليـزرهاي اكسايمر كريپتون‌فلوئوريد پهناي پـالس از $۱۰^{-۹}$ s * ۱۰ تا $۱۰^{-۹}$ s * ۲۵ است و در ليـــزر دي‌اكسيدكربن اين زمان به $۱۰۰*۱۰^{-۹}$ s مي‌رسـد و با توجه به اينكه سرعت آسايش براي تغيير يك حـالت الكتروني به حـالت ارتعـاشي گرمايي تقـريباً $۱۰^{-۱۱}$ s است [۲۶]، در اثـر ايـن تغيير حالت فقط سطح پليمر گرم خواهد شد. ولي براي نفوذ گرما در توده پليمر در حـدود $۱۰^{-۷}$-$۱۰^{-۵}$ s زمان لازم است كه اين زمان به مراتب بيشتر از پهناي پالس در ليزر اكسايمر است. از اين رو، در ليـزر كـريپتـون‌فلـوئـورايـد نفـوذ گـرمـا بـه داخـل پليمـــر پلي‌اتيلن‌ترفتـالات كمتر صـورت مي‌گيـرد و تغييرات در سطـح پليمر باقي مي‌ماند، در حالي كه در ليزرهاي دی‌اكسيدكربن نفوذ گرمايي بيشتري صورت مي‌گيرد و تغييرات مورفولوژي در عمق بيشتري به وجود مي‌آيد.

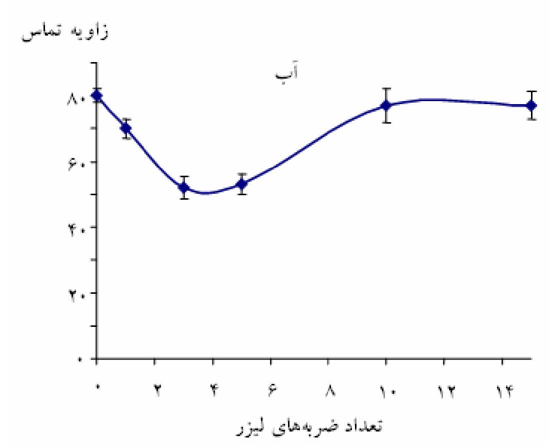


شکل ۳- تغييرات زاويه تماس قطره آب با سطح PET پرتوديده با ليزر دي‌اكسيد كربن در طول موج ۹/۵۸ µm بر حسب تغيير تعداد ضربه‌هاي ليزر

۳-۲- زاويه تماس

براي مطالعـه تغيير آبدوستي سطـح فيلم PET كه در معرض نور ليـزرهاي دی‌اكسيدكربن و كريپتون‌فلوئـورايد قرارگرفتـه است زاويه تمـاس استـاتيكي قطـره آب با سطح اندازه‌گيری شـد. همان طور كه در شكل ۳ ديده مي‌شـود بر اثر پرتودهي سطـح PET با ليـزر دی‌اكسيدكربن زاويه تمـاس قطـره آب كاهش مي‌يابد و با افزايش تعـداد ضـربه‌هاي ليزر به يك حد نسبتاً ثابت مي‌رسد.

كـاهش زاويـه تمـاس قطـره آب بـه تـشكيل هيدروپراكـسيد، هيدروكسيل، و گروه‌هاي كربونيل‌دار حاصل از بـرهم‌كنـش‌هاي راديكال‌هاي پراكسي در سطح فيلم نسبت داده مي‌شود [۲۷].

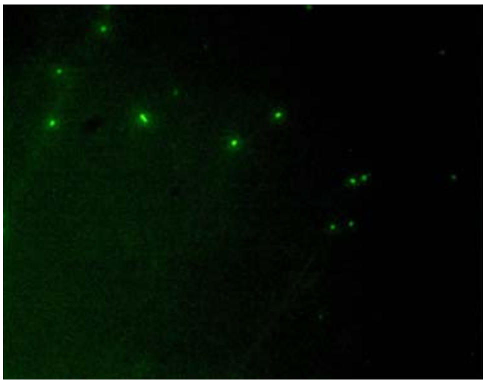


شکل ۴- تغييرات زاويه تماس قطره آب با سطح PET پرتوديده با ليزر اكسايمر كريپتون‌فلوئوريد در طول موج ۲۴۸ nm بر حسب تغيير تعداد ضربه‌هاي ليزر

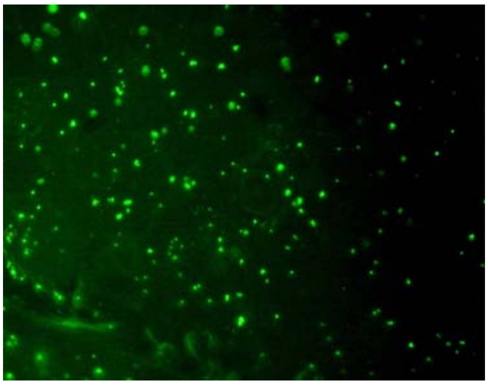
در شکل ۴، منحني زاويه تماس قطره آب با سطح فيلمي كه در معرض تابش نور ليزر اكسايمر قرار گرفته است، نسبت به تغيير تعداد ضربان ليزر رسم شده است. در اثر پرتودهی با ليزر اكسايمر و با افزايش تعداد ضربان، زاويه تماس به تدريج كم مي‌شود ولی با رسيدن به چهار ضربه بر مقدار آن افزوده مي‌گردد، به عبارت ديگر آبدوستي سطح فيلم ابتدا افزايش و سپس كاهش مي‌يابد. اين رفتار مشابه نيز در اصلاح سطح پلي‌يورتان با ليزر دی‌اكسيدكربن با طول موج ۱۰/۶ µm قبلاً مشاهده و گزارش شده است [۱۳]. كاهش زاويه تماس قطره آب با سطح پليمر بر اثر پرتو ليزر اكسايمر نشان‌دهنده افزايش آبدوستي سطح بر اثر ايجاد گروه‌هاي قطبي و تغيير ساختار شيميايي آن است. با افزايش تعداد ضربان ليزر به دليل تجزيه پراكسيدهاي روي سطح، ايجاد تخلخل و محبوس شدن اكسيژن در حفره، آبدوستي سطح كاهش مي‌يابد [۲۸،۷].

۳-۳- چسبندگي باكتريايي

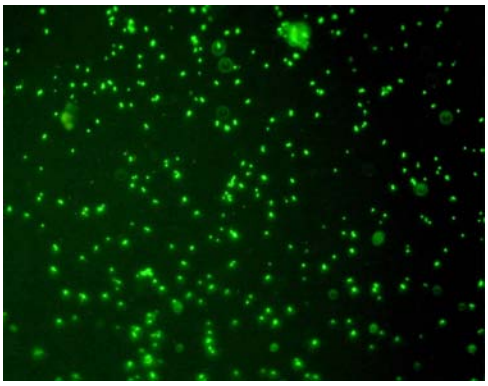
شکل ۵، تصاوير ميكروسكوپ فلورسانس باكتري‌هاي زنده چسبيده به سطح پلي‌اتيلن‌ترفتالات (PET) پرتودهي‌شده با ليزر دی‌اكسيدكربن را در مقايسه با PET شاهد (عمل‌آوري نشده) نشان مي‌دهد. همان طور كه ديده مي‌شود چسبندگي باكتري E-coli K-12 بر اثر پرتودهي با ليزر دی‌اكسيدكربن با تعداد ضربه‌هاي مختلف افزايش مي‌يابد. با توجه به



الف



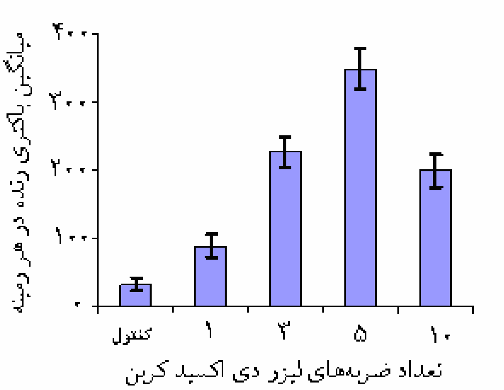
ب



ج

شکل ۵- تصاوير ميكروسكوپ فلورسانس باكتري‌هاي E-coli K-12زنده چسبيده روي الف- PET پرتونديده؛ ب- PET پرتوديده با سه ضربه ليزر CO2 در طول موج ۹/۵۸ µm؛ ج- PET پرتو ديده با پنج ضربه CO2 در طول موج ۹/۵۸ µm (با بزرگنمايي ۴۰۰)

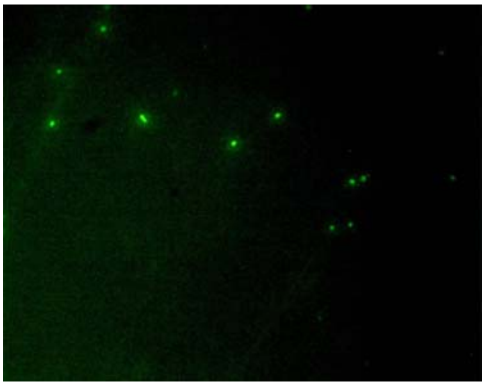
مطالعاتي كه تاكنون انجام شده، چسبندگي و رشد سلول‌ها روي نمونه‌هاي پليمري به ويژگي‌هاي سطح از قبيل آبدوستي- آبگريزي، ساختار شيميايي و مورفولوژي سطح بستگي دارد [۳۰،۲۹]. پرتودهي با ليزر دی‌اكسيد كربن در طول موج ۹/۵۸ µm ريزساختار ويژه‌اي را ايجاد مي‌كند كه اين ساختارها متناسب با ابعاد و شكل‌شان بر چسبندگي



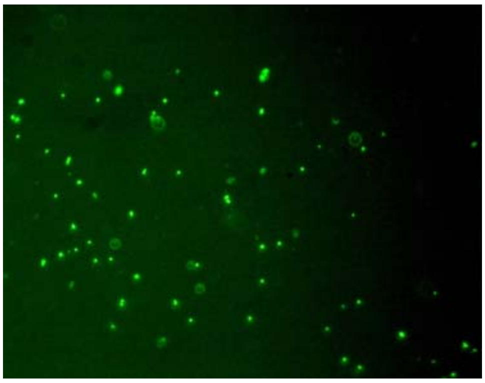
شکل ۶- تغییرات چسبندگي باكتري E-coli K-12 روي سطح PET پرتو ديده با ليـزر دی‌اكسيدكربن در طـول مـوج ۹/۵۸ µm با تعداد ضربه‌هاي مختلف (p values<۰/۰۰۱)

باكتري و رفتار سـلولي تـأثير مـي‌گذارنـد. همچنـين در اثـر پرتودهي با ليزر مذكور زاويه تماس قطره آب كاهش يافته و آبدوستي سطح در مقايسه با نمونه شاهد زياد مي‌شود كـه در نتيجه اين تغييرات يا به عبارت ديگر بـر اثـر تغييـر سـاختار شيميايي سطح، چسبندگي باكتري‌هـا روي نمونـه‌هـاي پرتـو ديده در مقايسه با نمونه شاهد افزايش يافته اسـت. شـكل ۶، نتايج حاصـل از شـمارش بـاكتري‌هـاي E-coli K-12 زنـده چسبيده به سطح پلي‌اتيلن‌ترفتالات (PET) پرتودهي شـده بـا ليزر دی‌اكسيد كربن را توسط نـرم‌افـزار Image Proplus در مقايسه با PET شاهد (عمل‌آوري نشده) نشان مي‌دهد. همان طور كه در اين شكل نيز ديده مي‌شود با افزايش ضربان ليـزر تعداد باكتري‌هاي چسبيده به سطح پليمر افزايش مي‌يابد كـه با مشاهدات ميكروسكوپي مطابقت دارد.

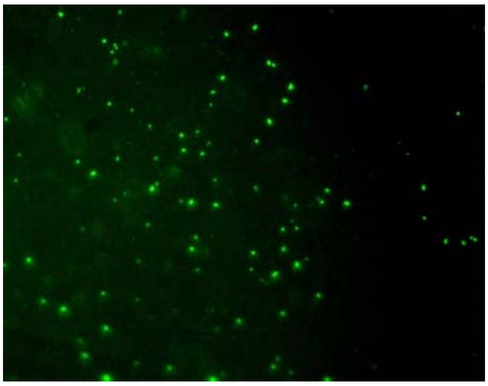
در شكل ۷، تصـوير ميكروسـكـوپ فلـورسـانس باكتري‌هاي زنده چسبيده روي سطح پلی‌اتيلن‌ترفتالات (PET) پرتودهـي شده با ضربه‌هاي مختلف ليزر اكسايمر درطول موج ۲۴۸ nm نشـان داده شـده است. همـان طـور كه مشـاهـده مي‌شـــود چسبندگي باكتـري E-coli K-12 به سطـوح پرتوديده با تعداد ضربه‌هاي مختلف بهبود يافته است و تعـداد باكتري‌هايي كه بـه سطح چسبيده‌اند در مقايسه با نمونه شاهد بيشتر اسـت. سـطح PET بر اثر پرتودهي با ليزر KrF تا ۵ ضـربه آبدوسـت شـده و بعد با ادامه پرتودهي آبگريز شده است.



الف



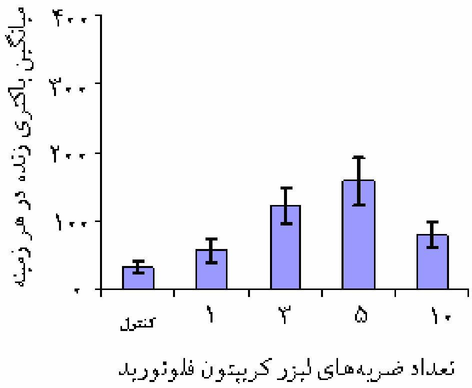
ب



ج

شكل ۷- تصاوير ميكروسكوپ فلورسانس باكتري‌هاي E-coli K-12 زنده چسبيده روي الف- PET پرتو نديده؛ ب- PET پرتوديده با سه ضربه ليزر KrF در طول موج ۲۴۸ nm ؛ ج- PET پرتوديده با پنج ضربه ليزر KrF در طول موج ۲۴۸ nm (با بزرگنمايي ۴۰۰)

با توجه به تغيير آبدوستي سـطح PET تعـداد بـاكتري‌هـاي چسبيده به سطح پليمر نيز در اثـر افزايش ضربه‌هاي ليزر ياد شده، زياد شده است كه نشان دهنده افزايش زيست‌سازگاري پليمرـ باكتري است و پس از آن با افزايش ضربه‌هاي ليـزر و كـاهش آبدوسـتي و تغييـر ماهيـت شـيميايي سـطح، تعـداد باكتري‌ها تا حدي كم شده است. از طرف ديگر با پرتـودهي



شکل ۸- تغییرات چسبندگي باكتري E-coli K-12 روي سطح PET پرتوديده با ليـزر كريپتون‌فلوئوريد در طـول موج nm ۲۴۸ با تعداد ضربه‌هاي مختلف (p values<۰/۰۰۱)

سطـح پليمر توسـط ليزر KrF ساختـار مورفولوژيکی مـنظم روي سطح ايجاد شده كه اين ساختار نيز به نوبه خـود مـي-تواند در چسبندگي باكتري‌هـا مـؤثر باشـد. شـكل ۸، نتـايج حاصـل از شمارش باكتـري‌هاي E-coli K-12 زنده (توسـط نرم‌افـزار Image Proplus) چسبيـده بـه سطـح پلـي‌اتيلـن-ترفتـالات (PET) پرتودهـی شـده با ليـزر كريپتون‌فلـوئورايد (KrF) را در مقـايسه با PET شاهـد (عمل‌آوري نشده) نشان مي‌دهد. همان طور كه در اين شكل نيـز ديده مي‌شـود بـا افزايش ضربان ليزر تعداد باكتري‌هاي چسبيده به سطح پليمر افزايش يافتـه است كه با مشاهـدات ميكروسكـوپي مطابقت دارد.

۴- نتيجه‌گيري

پرتودهي توسط ليزرهاي كريپتون‌فلوئورايد و دی‌اكسيد كربن يك ريزساختار خاصـی همـراه بـا تغييراتـي در آبدوسـتي و شيمـي سطـح پليمـر پلـي‌اتيلـن‌ترفتـالات ايجاد مي‌كند. اين تغييرات در چسبندگـي باكتـري E-coli K-12 به سطـح پلي-اتيلن‌ترفتالات پرتودهي شـده با ليـزر تأثيـر مي‌گذارد. نتـايج بـه دست آمـده از آزمايشـات كشت سلـولي و مشاهـدات ميكروسكوپي نشـان داد كه چسبندگي اين باكتـري به سطـح پرتودهي شده با ليـزر دی‌اكسيد كربن بيشتر است. چسبندگي كم باكتري‌ها به سطـح PET پرتودهـي شـده با ليزر اكسايمر كريپتون فلوئورايد ممكن است مربوط به ساختار ريز و منظم سطح PET باشد. اندازه واحـدهايي كه ساختـار سطـح PET پرتودهي شـده با ليزر اكسايمر را تشكيل داده‌اند در محدوده μm ۱ است كه بـا اندازه باكتـري‌ها، μm ۳-۱، قابل مقـايسه است و باكتري‌ها به علت اندازه‌شان نمـي‌تواننـد در فواصـل بين دره‌ها و تپـه‌هاي پرتـوديده قرار گيـرند. در صـورتي كه اندازه ساختار تشكيل شـده روي PET پرتودهـي شده با ليزر دی‌اكسيـدكربن بيشتـر از μm ۱۰ است [۲۷] كه ايـن عـامـل موجب به دام افتادن باكتري‌ها مي‌شود. از طرف ديگر در اثـر پرتودهي ليـزري سطـح PET، در مـورد ليـزر CO_2 وضعيت آبدوستـي و انرژي‌هاي سطحي متفاوتي با وضعيت آبدوستي و انرژي سطحي PET پرتوديده با ليـزر KrF ايجـاد مي‌شود كه اين تغييرات نيز نتيجه‌اي متفاوت در مورد چسبندگي باكتـري‌ها آشكار مي‌كنـد. به نظـر مي‌رسـد در مـورد ليـزر KrF آبدوستـي پارامتـر اصلي است كه روي چسبندگي باكتري‌ها تأثير مي‌گذارد در صورتي‌كه مورفولوژي و آبدوستي سطـح هر دو فاكتـورهاي مهمي هستند كه در چسبندگـي باكتـري‌ها روي سطــوح PET پرتودهي شده با ليـزر دی‌اكسيدكربن تأثير مي‌گذارند. بنابر اين با توجه به نتـايج به دست آمده مي‌توان ادعـا نمـود كه چسبندگي باكتـري E-Coli K-12 به سطـح پليمـر به مورفولوژي، شيمي و آبدوستي سطـح بستگي دارد. بـا تـوجـه بـه افزايش چسبندگي باكتري روي سطوح تابش ديده با ليزر، پيش‌بيني مي‌شـود از اين پارامتر بتوان در طراحي و ساخت بيوسنسورها براي آناليز و ثبت ميـزان حضـور باكتـري‌ها و همچنين سم‌هاي بيـوشيميايــي در محيط‌هاي آبي استفاده كرد.

مراجع

[1] Hunt JA; Quantifying the soft tissue response to implanted materials; Biomaterials 1995; 16(3): 167–170.

[2] Wimmer RF, Waddell E, Barker SLRB, Suggs A, Locascio LE, Love BJ, Love NG; Development of an Upset Early Warning Device to Predict Defloculation Events; Proceedings of the Water Environment Federation Conference and Exposition 2001.

[3] Love NG, Love BJ, Meehan K; Live cell biosensor to detect presence of biochemical toxins in water supply; IDHS Research Summit 2003.

[4] Ikada Y; Surface modification of polymers for medical applications; Biomaterials 1994; 15(10): 725–736.

[5] Van Loosdrecht MCM, Norde W, Schraa G, Zehnder AJB; The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion; Applied and Enviromental Microbiology1987; 53(8): 1893–1897.

[6] Dekker A, Beugeling T, Bantjes A, Feijen J, Van Aken WG; Adhesion of endothelial cells and adsorption of serum proteins on gas plasma-treated PTFE; Biomaterials 1991; 12: 130–138.

[7] Dadsetan M, Mirzadeh H, Sharifi-Sanjani N, Daliri M; Cell behaviors on laser surface-modification polyethylene terephtalate in vitro; Journal of Biomedical Materials Research 2001; 57: 183–189.

[8] Mirzadeh H, Katbab AA, Khorasani MT, Burford RP, Gorgin E, Golastani A; Cell attachment to laser-induced AAm and HEMA grafted ethylene propylene rubber as biomaterial: *in vivo* study; Biomaterials 1995; 16: 642–648.

[9] Mirzadeh H, Katbab AA, Burford RP; CO_2-pulsed laser induced surface grafting of acryl-amide onto ethylene propylene rubber (EPR); Radiat Phys Chem 1993; 41: 467–470.

[10] Mirzadeh H, Katbab AA, Burford RP; CO_2-Laser Graft Copolymerization of HEMA and NVP onto Ethylene-Propylene Rubber (EPR) as Biomaterial; Radiat Phys Chem1995; 46: 859–862.

[11] Khorasani MT, Mirzadeh H, Sammes PG; Laser induced surface modification of polydimethylsiloxane as a super-hydrophobic material; Radiat Phys Chem 1996;47: 881–888.

[12] Lazare S, Hoh PD, Baker JM, Srinivasan R; Controlled modification of organic polymer surface by continuous wave farultraviolet (185nm) and pulsed-laser (193nm) radiation: XPS studies; J Am Chem Soc 1984; 106: 4288–4290.

[13] Khosroshahi ME, Karkhaneh A, Orang F; A comparative study of chop-wave and super pulse CO_2 laser surface modification of Polyurethane; Iran Polymer Journal (ISI) 2004;13: 503.

[14] Khosroshahi ME, Dyer PE; Ablation mechnism of organic polymers using UV and IR lasers; Iranian Journal of Polymer Science and Tech 1995; 8:161.

[15] Watanabe H, Takata T, Tsugo M; Polymer surface modification due to excimer laser radiation-chemical and physical changes in the surface structure of poly(ethylene terephthalate); Polym Int 1993; 31: 247–250.

[16] Lazare S; Surface amorphization of Mylar films with excimer laser radiation above and below ablation threshold: ellipsometric measurements; Journal of Applied physics 1993; 74: 4953–4957.

[17] Dyer PE, Oldershaw GA, Sidhu J; CO_2 laser ablative etching of polyethylene terephthalate. Appl Phys B 1989; 48: 489–493.

[18] Mirzadeh H, Dadsetan M; Influence of laser surface modifying of polyethylene terphthalate on fibroblast cell adhesion; Radiat Phys Chem 2003; 67: 381–385.

[19] Dadsetan M, Mirzadeh H, Sharifi-Sanjani N,Salehian P; In vitro studies of platelet adhesion on laser-treated polyethylene terephthalate surface; Biomaterials 2000; 21: 540–546.

[20] Mirzadeh H, Bagheria SH; Comparison of the effect of excimer laser irradiation and RF plasma treatment on polystyrene surface, Radiation Physics and Chemistry 2007; 76: 1435–1440.

[21] Khorasani M, Mirzadeh H; Laser Surface Modification of Silicone Rubber to Reduce Platelet Adhesion; Journal of Biomaterials Science Polymer Edition 2005; 15: 59–72.

[22] Mirzadeh H, Amanpour S, Ahmadi H; Long Term Evaluation of Laser-Treated Silicone (LTS) Membrane as a Pericardial Substitute: *In Vivo* Study, Journal of Long–Term Effects of Medical Implants 2005; 15: 347–353.

[23] Kokai F, Saito H, Fujioka T; Characterization of polymer surface after KrF laser ablation by infrared spectroscopy; Macromolecules 1990; 23: 674–676.

[24] Dyer PE, Sidhu J; Excimer laser ablation and thermal coupling efficiency to polymer films; J Appl Phys 1985; 57(4): 1420.

[25] Andrew JE, Dyer PE, Foster D, Key PH; Direct etching of polymeric materials using a XeCl laser; Appl Phys Lett 1983; 43: 717–719.

[26] Knittel D, Kesting W, Schollmeyer E; Surface structuring of synthetic fibers by UV laser irradiation; Polym Int 1997; 43: 240–250.

[27] Dadsetan M, Mirzadeh H, Sharifi-Sanjani N; Effect of CO_2 laser radiation on the surface properties of polyethylene terephthalate; Radiat Phys Chem 1999; 56: 597–604.

[28] Saito N, Yamashita S, Matsuda T; Laser-irradiation induced surface graft polymerization method; J Polym Sci 1997; 35: 747–754.

[29] Lee JH, Jung HW, Kang IK, Lee HB; Cell behavior on polymer surfaces with different functional groups; Biomaterials 1994; 15: 705–711.

[30] Faid1 K, Voicu1 R, Bani-Yaghoub M, Tremblay R, Mealing G, Py C, Barjovanu R; Rapid fabrication and chemical patterning of polymer microstructures and their applications as a platform for cell cultures, Biomedical Microdevices 2005; 7: 179–184.