

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ**

**GÜMÜŞ NANOPARÇACIKLARIN ANTİBAKTERİYEL
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ VE YENİ GÜMÜŞ
NANOMALZEMELERİN SENTEZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GİZEM GÜMEN

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2022

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ**



**GÜMÜŞ NANOPARÇACIKLARIN ANTİBAKTERİYEL
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ VE YENİ GÜMÜŞ
NANOMALZEMELERİN SENTEZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GİZEM GÜMEN

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2022

Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi tarafından 2021FEBE009 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

GİZEM GÜMEN

ÖZET

GÜMÜŞ NANOPARÇACIKLARIN ANTİBAKTERİYEL ETKİLERİNİN İNCELENMESİ VE YENİ GÜMÜŞ NANOMALZEMELERİN SENTEZİ YÜKSEK LİSANS TEZİ

GİZEM GÜMEN

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜYESİ ŞÜKRÜ GÖKHAN ELÇİ)

DENİZLİ, AĞUSTOS - 2022

Bu tez çalışmasında koruyucu ajan olarak gallik asit, sitrik asit ve tallik asit kullanılarak 2 farklı boyutta, toplam 6 farklı gümüş nanoparçacık (AgNP) sentezlenmiş olup bu parçacıkların antibakteriyel özelliklerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Elde edilen AgNP'lerin karakterizasyon işlemleri uygun spektral analiz yöntemleri kullanılarak sırasıyla; transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ultraviyole görünür ışık (UV-Vis) spektrometresi ve parçacıkların zeta potansiyeli ölçümleri yapılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, nanoparçacıkların antimikrobiyal aktivitesi, Clinical Laboratory Institute standardına (Anonymous 2020, M100 | Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 31st Edition, Clinical Laboratory Institute) göre disk difüzyon yöntemi kullanılarak çeşitli gram pozitif ve gram negatif bakteri üzerinde tanımlanmıştır. Test mikroorganizmaları olarak gram pozitif; *Bacillus Subtilis*, *Staphylococcus Aureus* ve gram negatif; *Escherichia Coli*, *Pseudomonas Aeruginosa* bakterileri kullanılmıştır. Tannik asit yüzey kaplamalı (7 ve 30 nm), sitrik asit yüzey kaplamalı (8 ve 30 nm), ve gallik asit yüzey kaplamalı (7 ve 29 nm) olarak sentezlenmiş gümüş nanoparçacıkların bu bakteriler üzerindeki zon oluşum değerleri incelenerek antibakteriyel özellikleri karşılaştırılmıştır. AgNP'lerin antimikrobiyal etkileri incelenirken farklı yüzey kaplamalı ve boyutlu parçacıkların, gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerinde farklı konsantrasyonlardaki derişimlerine karşı oluşan zon miktarlarının parçacıkların sahip olduğu zeta potansiyel değerlerine göre değişim göstermesinin yanında bakterinin gram negatif veya pozitif olmasına göre de farklılık gösterdiği sonucuna varılmıştır. Gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarından (TEM) gümüş nanoparçacıkların dar bir boyut dağılımına sahip küresel (7 ve 29 nm) şekile sahip olduğu da gözlemlenmiştir. Yapılan ölçümlerde nanoparçacıkların yüzey kaplamasının ve boyutunun antibakteriyel etkisini değiştirdiği gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar daha önce yapılmış olan çalışmaları destekler niteliktedir.

ANAHTAR KELİMELER: Nanoteknoloji, Gümüş, Nanoparçacık, Gümüş, Antibakteriyel Etki, Gram Pozitif, Gram Negatif, Bakteri

ABSTRACT

**INVESTIGATION OF ANTIBACTERIAL EFFECTS OF SILVER
NANOPARTICLES AND SYNTHESIS OF NEW SILVER
NANOPARTICLES
MSC THESIS
GİZEM GÜMEN
PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOMEDICAL ENGINEERING**

(SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. SUKRU GOKHAN ELCI)

DENİZLİ, AUGUST 2022

In this thesis, a total of 6 different silver nanoparticles (AgNP) in 2 different sizes were synthesized by using gallic acid, citric acid and thallic acid as protective agents, and it was aimed to compare the antibacterial properties of these particles. The characterization processes of the obtained AgNPs, using appropriate spectral analysis methods, respectively; transmission electron microscopy (TEM) ultraviolet-visible (UV-Vis) spectrometry and zeta potential measurements of particles. In this study, the antimicrobial activity of nanoparticles was defined on various gram positive and gram negative bacteria using the disk diffusion method according to the Clinical Laboratory Institute standard (Anonymous 2020, M100 | Performance Standards for Antimicrobial Suceptibility Testing, 31st Edition, Clinical Laboratory Institute). Gram positive as test microorganisms; Bacillus Subtilis, Staphylococcus Aureus and gram negative; Escherichia Coli, Pseudomonas Aeruginosa bacteria were used. The antibacterial properties of the synthesized silver nanoparticles with tannic acid surface coating (7 and 30 nm), citric acid surface coating (8 and 30 nm), and gallic acid surface coating (7 and 29 nm) on these bacteria were examined and their antibacterial properties were compared. While examining the antimicrobial effects of AgNPs, it was concluded that the amount of zones formed against the concentrations of different surface coated and sized particles on gram-positive and gram-negative bacteria varies according to the zeta potential values of the particles, as well as depending on whether the bacteria are gram negative or positive. It was also observed from the characterization studies (TEM) that the silver nanoparticles have a spherical (7 and 29 nm) shape with a narrow size distribution. In the measurements made, it was observed that the surface coating and size of the nanoparticles changed the antibacterial effect. The results obtained support the previous studies.

KEYWORDS: Nanotechnology, Silver, Silver Nanoparticle, Antibacterial Effect, Gram Positive , Gram Negative, Bacteria

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vi
SEMBOL LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1 Tezin Amacı	2
1.2 Projenin Özgün Değeri	2
1.3 Literatür Özeti	3
2. GÜMÜŞ VE NANOTEKNOLOJİ	16
2.1 Gümüş ve Özellikleri.....	16
2.2 Gümüşün Tarihçesi.....	17
2.3 Nanobilim ve Nanoteknoloji	18
2.3.1 Nanoteknolojinin Tarihçesi.....	19
2.3.2 Nanoparçacık Üretim Yöntemleri.....	20
2.4 Nanogümüş.....	20
2.5 Nanogümüşün Yüzey Kimyası ve Antibakteriyel Etkisi.....	21
3. PATOJENİK MİKROORGANİZMALAR	23
3.1 Giriş	23
3.2 Escherichia Coli.....	23
3.2.1 Morfolojisi	24
3.3 Staphylococcus Aureus	24
3.3.1 Morfolojisi	24
3.4 Bacillus Subtilis.....	25
3.4.1 Morfolojisi	25
3.5 Pseudomonas Aeruginosa.....	26
3.5.1 Morfolojisi	27
4. YÖNTEM	28
4.1 Gümüş Nanoparçacıkların Sentezi	28
4.1.1 7 nm Gallik Asit (GA) kaplı AgNP sentezi	28
4.1.2 29 nm Gallik Asit (GA) kaplı AgNP sentezi	29
4.1.3 8 nm Sitrik Asit (SA) kaplı AgNP sentezi	29
4.1.4 30 nm Sitrik Asit (SA) kaplı AgNP sentezi	29
4.1.5 7 nm Tannik Asit(TA) kaplı AgNP sentezi	30
4.1.6 30 nm Tannik Asit(TA) kaplı AgNP sentezi	31
4.2 Nanogümüşün Antibakteriyel Ölçümü.....	31
4.3 Nanoparçacıkların Karakterizasyonu	33
5. BULGULAR	34
5.1 UV-Vis Ölçümü.....	35
5.2 TEM Görüntülemesi.....	36

5.3	Antibakteriyel Aktivite Ölçümü.....	39
5.4	ZETA Potansiyeli Ölçümü	44
6.	SONUÇ.....	45
7.	TARTIŞMA	46
8.	KAYNAKÇA	48
9.	ÖZGEÇMİŞ.....	58

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	: Lycurgus kupası.....	20
Şekil 2.2	: S. aureus'a karşı in vitro antibakteriyel testin görüntüleri.....	21
Şekil 4.1	: Farklı büyüklükteki gümüş nanoparçacıkların sentezi için tasarım koşulları.....	30
Şekil 4.2	: 30 nm Sitrik Asit Kaplı Nanogümüş Çözeltisi	30
Şekil 4.3	: Nano gümüş çözeltilerini santifirüjlemek amacıyla kullanılan santifirüj cihazı.....	32
Şekil 4.4	: Sentezlenmiş nanogümüş çözeltileri.....	32
Şekil 5.1	: Farklı boyuttaki ve 3 farklı yüzey gruplu parçacıkların UV-Vis spektrumlarının karşılaştırılması.....	34
Şekil 5.2	: Sentezlenen nano gümüş parçacıklarına ait spektrumların boyutlara göre karşılaştırılması	35
Şekil 5.3	: Gallik Asit kaplı nano gümüş parçacıklarının TEM görüntüleri (7 nm).....	36
Şekil 5.4	: Gallik Asit kaplı nano gümüş parçacıklarının TEM görüntüleri (29 nm).....	37
Şekil 5.5	: Sitrik Asit kaplı nano gümüş parçacıklarının TEM görüntüleri (29 nm).....	37
Şekil 5.6	: Sitrik Asit kaplı nano gümüş parçacıklarının TEM görüntüleri (30 nm).....	38
Şekil 5.7	: Tannik Asit kaplı nano gümüş parçacıklarının TEM görüntüleri (8 nm).....	48
Şekil 5.8	: Tannik Asit kaplı nano gümüş parçacıklarının TEM görüntüleri (30 nm).....	39

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1 : Modifiye edilmemiş ve sodyum dodesil sülfat (SDS) Tween-80 ve PVP 360 bağlanmış AgNP'lerin minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) sonuçları.	11
Tablo 1.2 : 4 Bakteri Türüne Karşı Boyuta Bağlı Antibakteriyel Aktivite.....	14
Tablo 2.1 : Gümüş Metaline Ait Bazı Özellikler.....	16
Tablo 5.1 : Escherichia coli bakterisine karşı nanoparçacıkların oluşturduğu zonların ölçümleri	41
Tablo 5.2: Bacillus subtilis bakterisine karşı nanoparçacıkların oluşturduğu zonların ölçümleri	42
Tablo 5.3: Staphylococcus aureus bakterisine karşı nanoparçacıkların oluşturduğu zonların ölçümleri	42
Tablo 5.4: Pseudomonas aeruginosa bakterisine karşı nanoparçacıkların oluşturduğu zonların ölçümleri.	43
Tablo 5.5: Parçacık yükleri ile bakteri türlerine karşı oluşan antibakteriyel etkilerin karşılaştırılması.....	43
Tablo 5.6: Sentezlenmiş nanoparçacıkların zeta potansiyel değerleri.....	44

SEMBOL LİSTESİ

Ag	:	Gümüş
AgNO₃	:	Gümüş Nitrat
AgNP	:	Gümüş Nanoparçacık
UV-Vis	:	Ultraviyole ve Görünür Işık Spektrometresi
TEM	:	Geçirimli Elektron Mikroskobu
ICP-MS	:	İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi
ZETA	:	Zeta Potansiyeli
MS	:	Kütle Spektrometrisi
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
MDR	:	Çoklu İlaç Direnci
PVP	:	Polivinilpirolidon
NP	:	Nanoparçacık
AFM	:	Atomik Kuvvet Mikroskobu
IGC	:	İnert Gaz Yoğunlaştırma
ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri
STEM	:	Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskobu
FDA	:	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GA	:	Gallik Asit
SA	:	Sitrik Asit
MİK	:	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
MBK	:	Minimal Bakterisidal Konsantrasyon
TA	:	Tannik Asit
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimine başlamama ön ayak olan, araştırmamın her aşamasında öneri, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, sabrı ve anlayışı ile akademik anlamda gelişmeye katkı sunan, nanoparçacık üretimi ve karakterizasyon işlemlerinde desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Şükrü Gökhan Elçi'ye ,

Laboratuvarını, beceri ve deneyimlerini benimle paylaşıp deneylerimi tamamlamamda yardımcı olan pozitif enerjisi ve anlayışlı kişiliğiyle beni motive eden Sayın Prof. Dr. Ahmet Koluman'a ,

Tüm eğitim hayatımda her zaman beni cesaretlendiren, bana güvenen ve desteklerini hissettiren sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

Mevcutta kullanılan antibiyotik tedavilerine direnç kazanan patojenlere bağı artan hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonlar tüm dünyada büyüyen bir sorun meydana getirmektedir. Bu nedenle antimikrobiyal direnç, en yaygın bakteriyel hastalıkların bir sonucu olarak morbidite ve mortalite artışını ortaya çıkardığı için insan sağlığına yönelik en büyük tehditlerden birisidir (Walker ve diğ. 2009). Oluşan bu tehditlerin sonucunda günümüzde alternatif tedavi arayışlarına ihtiyaç artmıştır (Chen ve diğ. 2008). Geleneksel olmayan antibakteriyel ajanlar, yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin çoğuna karşı gelişen çeşitli patojenik mikroorganizmaların dirençlerinin üstesinden gelmek için büyük ilgi görmektedir (Dos Santos ve diğ. 2014). Maddelerin atomik ve moleküler düzeylerde kontrol ve işlem görebilir forma dönüştürülmesi olarak tanımlanan nanoteknoloji, sağlık alanında gün geçtikçe daha fazla umut veren tedavi stratejilerini sergilemektedir (Pelgrift ve diğ. 2013). Bu noktada gümüş nanoparçacıklarının yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu ve sağlık alanında çokça kullanıldığı bilinmektedir (Yun'an ve diğ. 2018).

Nanoteknolojiye bakıldığı zaman Ag nanoparçacıkları(AgNP) biyouyumlu, biyobozunur fonksiyonel özellikleri açısından bu noktada tıpta uzun zamandır kullanılan bir malzeme olarak karşımıza çıkmaktadır. AgNP'nin antimikrobiyal özelliğinden dolayı, yara iyileştirme uygulamalarında biyomalzeme olarak kullanılmasını sağlamıştır. AgNP'ler yaranın etrafında nemli bir ortam sağlayarak mikrobiyal etkenlere karşı da bir engel oluşturulması sağlamıştır. Tıpta dokunun enfeksiyonlardan korunması amacıyla malzeme seçiminde başvurulan AgNP yüksek düzeyde biyouyumluluk ve antimikrobiyal özellik sağlamaktadır. Gümüşün antibakteriyel etki mekanizmasını inceleyen çalışmalar incelenecek olursa; gümüş, sülfidril enzimlerini inaktive eder, amino, imidazol, karboksil ve fosfat grupları ile bağ oluşturur. Bu durum ise bakterinin solunum zincirini bozarken DNA replikasyonunun da bozulup prokaryotlarda mitozun durmasına neden olur. Ayrıca metalik nanoparçacıkların yüzey/hacim oranlarının yüksek olması ve bu sayede güçlü antimikrobiyal etki gösterebilmeleri gelecek çalışmalar için de umut vericidir. (Mahenda ve diğ. 2009).

1.1 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının öncelikli hedefi çeşitli Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerden alacağımız 4 bakteri türünün (*E. coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Bacillus Subtilis*, *Staphylococcus Aureus*) farklı boyut ve yüzey kaplamalarına sahip (gallik asit, sitrik asit, tannik asit), antibakteriyel etkisi bilinen gümüş nanoparçacıklara olan dirençlerinin incelenmesidir. Bu noktada gallik asit, sitrik asit ve tannik asit kaplamalı 7-8 ve 29-30 nm'lik gümüş nanoparçacıklar sentezlenecektir. TEM, UV-Vis Spektrometrisi ve Zeta potansiyel yöntemleri ile sentezlenen parçacıkların karakterizasyonu gerçekleştirilecek olup disk difüzyon yöntemi ile de antibakteriyel aktivitesi belirlenecektir. Yapılan bu ölçümlerle farklı yüzey kimyasına sahip ve farklı boyutlarda nanoparçacıkların antibakteriyel sonuçları karşılaştırmalı olarak kıyaslanacaktır. Gümüş nanoparçacıkların antibakteriyel etki göstermesi nanoparçacığın boyutu ile ilişkili olduğu daha önceki çalışmalarda kanıtlanmıştır (Nereyda ve diğ. 2008) .Bu yüzden nanoparçacıkların boyutlarının belirlenmesi bu noktada parçacığın kararlılık yapısının incelenmesinden ziyade antibakteriyel etkinliğin düzeyini arttıran bir basamak olması hedeflenmiştir. Yapılmak istenen bu çalışma ile hem gümüş nanoparçacıkların (AgNP) antibakteriyel etkilerinin daha iyi anlaşılması için literatüre katkı yapılacak olup hem de yeni sentezlenecek parçacıklar ile ileride antibiyotiklerin yerini alabilecek nanoparçacıkların oluşturulması hedeflenmiştir.

1.2 Projenin Özgün Değeri

Geleneksel olmayan antibakteriyel ajanlar için son yıllarda nanoteknolojik gelişmeler ile birlikte, nanoparçacıklar ön plana çıkmaktadırlar. Özellikle, işlenmiş nanoparçacıklar bu anlamda gelişmiş özelliklere sahiptir. Bu parçacıklar içerisinde AgNP'lar, çoklu ilaca dirençli (MDR) bakterilerin sebep olduğu hastalıkları tedavi etmek için antibiyotiklere alternatif olarak incelenmektedir. Gümüş nanoparçacıkların antibakteriyel etkisi genellikle nanoparçacıkların yüzeyinde yer alan ligand gruplarının bakteriye bağlanması, iyon salınımı ve ardından oluşan yüksek oksidatif stres ile ilgilidir. Bu sayede farklı yüzey kimyalarına sahip parçacıklar geliştirilerek antibakteriyel etkisi yüksek ve insan sağlığına zararı olmayan parçacıkların geliştirilmesi antibiyotik dirençli bakterilere karşı bir çözüm oluşturması açısından

büyük önem arz etmektedir.

Literatürde birçok farklı gümüş nanoparçacık incelenmiştir. Bu çalışmalar genel olarak nanoparçacıkların boyutları (5 nm den 70 nm'ye kadar) (Tang ve Zheng 2018) ve şekilleri (küresel, çubuk, prizma, vb.)(Acharya ve diğ. 2018) üzerinde yoğunlaşmış olup, parçacıkların yüzeylerinde kullanılan koruyucu ligandların, gümüş nanoparçacıkların antibakteriyel etkisinde rolünün olup olmadığı üzerine incelemelere literatürde rastlanılmamıştır. Küçük boyutlu parçacıkların, yüzey alanlarının geniş olması, yüzey kimyalarının daha kolay modifiye edilebilmeleri ve hücre içerisine daha kolay alınabilmeleri gibi sebeplerden ötürü 40 nm ve altındaki nanoparçacıkların etkilerinin incelenmesi önem taşımaktadır (Wu ve diğ 2018). Bu çalışmada, üç farklı yüzey kaplamasına sahip (sitrik asit, gallik asit ve tannik asit) aynı boyutlardaki gümüş nanoparçacıkların (7 ve 30 nm) sentezlenmesi hedeflenmekte olup ve bu parçacıkların antibakteriyel etkilerinin anlaşılması ve karşılaştırılması hedeflenmektedir. Hali hazırda literatüre bakıldığında, gümüş nanoparçacıkların antibakteriyel etkilerinin anlaşılması için mekanistik çalışmalar devam etmektedir. Literatürde en büyük eksiklik, farklı yüzey kimyasına sahip aynı boyutlu parçacıkların yüzey kimyasının antibakteriyel etkiye katkısının olup olmadığına incelenmemiş olmasıdır. Bu tez çalışması ile bu açığın giderilmesi sağlanacaktır.

1.3 Literatür Özeti

Nanoteknoloji, bilim ve teknolojide özellikle farklı nanomalzemelerin ve nanoparçacıkların geliştirilmesinde sayısız uygulamaları olan, gelişmeye devam eden bir araştırma alanıdır. Nanoparçacıklar, 1 nm ila 100 nm arasında küçük parçacıklar olarak kabul edilmiş olup günümüzde biyotıp, tarım, eczacılık, tekstil, gıda teknolojisi, kataliz, sensörler, mekanik gibi çeşitli bilim alanlarında kullanılmaktadır (Akter ve diğ. 2020) , (Hamouda ve diğ 2019). Eşsiz özelliklere sahip gümüş, altın, çinko, kadmiyum sülfür, bakır, demir, titanyum dioksit vb. dahil olmak üzere farklı nanoparçacık çeşitleri vardır (Kulkarni ve diğ. 2014) , (Jamkhande ve diğ. 2019).

Nanoparçacıklar, mikroplarla mücadelede biyolojik etiketlemede ve kanser tedavisinde geniş bir uygulama alanına sahiptir (Durán, ve diğ. 2005). Farklı nanoparçacıklar arasında, gümüş nanoparçacıklar (AgNP'ler), biyomedikal bilimin antibakteriyel, antifungal, antioksidan, anti kanser, anti inflamatuvar gibi farklı

dallarında geniş uygulama alanları nedeniyle son yıllarda en popüler çalışma konularından biri olmuştur (El-Naggar ve diğ. 2017).

Nanoteknoloji, yapılan çalışmalar ile sağlık alanında gün geçtikçe daha fazla umut veren tedavi stratejilerini sergilemektedir. Gümüş türlerinin antibakteriyel aktivitesi eski zamanlardan beri bilinmektedir (Gurunathan ve diğ. 2009). Gümüşün tarihçesine bakıldığında ilk olarak antik çağda Fenikeliler, Mısırlılar, Romalılar ve Yunanların yiyeceklerini ve sularını temizleyip uzun süre saklamak için gümüş kap kullandığı, sütün içine gümüş paralar attıkları görülmüş olup bu gelenek II. Dünya Savaşı'na kadar devam etmiştir. Cerrahi enfeksiyonları önlemek veya tedavi etmek için ilk girişim Makedonlar tarafından yara iyileşmesini hızlandırmak için gümüş plakalar kullanılmasıyla görülmüştür. Hipokrat, ülserleri tedavi etmek ve yara iyileşmesini desteklemek için gümüş müstahzarlar reçete etmiştir (Miotto 2019), (Mulfinger ve diğ. 2007). M.Ö 1000 yıllarında suyun mikroorganizmalardan dezenfeksiyonu, ülser ve yanık tedavilerinde de kullanıldığı bilinmektedir. 1800'lü yılların başlarında gümüşün göz damlası olarak kullanıldığı ve daha sonrasında penisilin bulunmasıyla birlikte kullanımın azaldığı ancak 1960'lı yıllarda % 0.5' lik gümüş nitrat çözeltisinin yanık tedavisinde tekrardan kullanıldığı bildirilmiştir (Rai ve diğ. 2009). Literatürde gümüş sülfadiazinin *Bacillus Subtilis*, *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia Coli*, *Pseudomonas Aeruginosa* gibi bakterilere karşı etkin olduğu ayrıca antifungal ve antiviral etkinliklere de sahip olduğu bildirilmektedir (Rai ve diğ. 2009).

Son dönemlerde mikroorganizmaların çoklu antibiyotik direnci geliştirmeleri ve sağlık tedavilerinin ekonomik olarak sağlanabilmesi amacı ile çok sayıda araştırmacı daha iyi ve etkili antibakteriyel ajan arayışına girmiştir. Gümüş; antibakteriyel, antifungal ve antiviral özellikleri ile geniş spektrumlu bir antimikrobiyal madde olarak yüzyıllardır pek çok alanda güvenle kullanılmaktadır.

Bakır, çinko, titanyum, altın gibi diğer metallerin de antimikrobiyal özellikleri olduğu bilinmektedir. Fakat gümüşün çok geniş spektrumlu bir antibiyotik olması, bakteri direncinin neredeyse hiç bulunmamasından dolayı bakterilere, virüslere ve diğer ökaryotik mikroorganizmalara karşı en iyi antibakteriyel etki gösterdiği bildirilmiştir (Duncan 2011).

Gümüş iyonlarının DNA'daki kükürt ve fosfor ile etkileşimi, DNA replikasyonunda, hücre çoğalmasında ve hatta mikropların sonlandırılmasında bir dizi sorun yaratabilir. Gümüş iyonları sitoplazmadaki ribozomları denatüre ederek protein sentezini durdurabilir (Durán ve diğ. 2016). Ayrıca düşük konsantrasyonlardaki nanogümüşün ökaryotik hücreler için toksik olmadığı gözlemlenmiştir. Ag^+ iyonlarının solunum zincirini oksidatif fosforilasyondan ayırdığı veya sitoplazmik membran boyunca proton-hareket gücünü çökerttiği de Pal ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir (Pal ve diğ. 2007). Morones ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalara göre de Ag^+ 'ın bakterilerle etkileşimi, nanoparçacıkların boyutu ve şekli ile doğrudan ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (Morones ve diğ. 2005).

1928'de Penisilin'in keşfiyle, antibiyotikler altın çağına girmiştir. Birçok antibiyotik ya doğal ürünlerden veya kimyasal sentezlerden elde edilerek çok sayıda hayatın kurtarılmasında büyük bir rol almışlardır (Aminov 2010). Ancak antibiyotiklerin aşırı ve gelişigüzel kullanımı beklenmeyen bir çok sonucu da beraberinde getirmiştir. Yeni antibiyotiklerin geliştirilmesine yönelik araştırmaların azalması ve bakterilerde antibiyotik direncinin hızla artmasıyla mevcut antibiyotik tedavilerinin etkili olmadığı çoklu ilaca dirençli bakteriyel (MDR) patojenlere bağlı artan hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonlar büyüyen bir çok sorunu da beraberinde getirmiştir (Fleming 1929). Antimikrobiyal direnç, bu nedenle en yaygın bakteriyel hastalıkların bir sonucu olarak morbidite ve mortalite artışını belirlediğinden, insan sağlığına yönelik en büyük tehditlerden birisi haline gelmiştir (Aminov 2010). Antibiyotiklerin uygunsuz kullanımı sonucu direnç genleri ortaya çıkmış ve bu nedenle dirençle mücadelede ilk adım olarak antibiyotik tüketiminin azaltılması gereksinimi ortaya çıkmıştır (Fleming 1929). Antimikrobiyal direnç parametresi

kişiyeye, bakteri süşuna ve geliştirilen direnç mekanizmasına bağlı olan değişen karmaşık bir mekanizmadır. Yeni geliştirilen antibiyotiklere karşı direncin ortaya çıkması, antibiyotik tüketiminin izlenmesi, önlenmesi, teşhisi ve bu ilaçların kötüye kullanımının hızlı bir şekilde azaltılması ihtiyacını daha da desteklemektedir. Bu nedenle, tedavi sonuçlarını iyileştirmek ve toksisiteyi ve direnç geliştirme riskini azaltmak için antibiyotiklerin farmakokinetiğini ve farmakodinamiklerini optimize etmek gereklidir (Wright ve diğ. 2014). Direnç sorununu ele almak için, antimikrobiallerin kullanım protokollerini, bu ilaçların yalnızca diğer tüm tedavi seçenekleri başarısız olduğunda uygulanacak şekilde değiştirmek gerekecektir ve çoklu ilaca dirençli patojenlerin küresel olarak yayılmasına karşı savaşmak için hükümetlerin ve akademik ağların ortak çabalarına ihtiyaç vardır. Sonuç olarak, yaşamı tehdit eden çeşitli bakteriyel patojenlere karşı yeni antibiyotikler geliştirmek son derece acildir. Yaşanan bu gelişmelerin sonucunda alternatif tedavi arayışları da hız kazanmıştır. Bu nedenle, geleneksel olmayan antibakteriyel ajanlar, en sık kullanılan antibiyotiklere karşı çeşitli patojenik mikroorganizmalardan gelişen direncin üstesinden gelmek için büyük ilgi görmektedir. Tasarlanmış nanoparçacıklar, özellikle çoklu ilaca dirençli (MDR) bakterilerin neden olduğu çeşitli enfeksiyonları tedavi etmek için uygun bir alternatif olarak bu zorluğun üstesinden gelmek için büyük bir potansiyele sahiptir. Tasarlanmış nanoparçacıkların antibakteriyel etkisi genellikle nanoparçacıkların bakterilere yüzey bağlanması, iyon salımı ve ardından yüksek oksidatif stres oluşumu ile ilgilidir. Bu nedenle, bakteri hücrelerinin nanoparçacık aracılı tedavilere karşı birden fazla eş zamanlı gen mutasyonu geliştirmesi zorlaşır ve bu sayede antibiyotik dirençli bakterilerin bile yok edilmesine olanak sağlamaktadır (Fleming 1929),(Aminov 2010), (Wright ve diğ. 2014).

AgNP'lerin antibakteriyel mekanizmalarının temelden anlatılması, AgNP'lerin yapısal faktörlerinin antibakteriyel aktivitesi üzerindeki etkisini aydınlatmanın anahtarıdır. Yakın tarihli bir çalışmada, Ivask ve diğerleri, yaklaşık 4000 *Escherichia coli* (*E. coli*) tek gen delesyon suşunu, şekilleri, kaplama ligandı, yüzey yükleri ve boyutlarına göre değişen çok çeşitli AgNP'lere maruz bırakarak ilgili toksikolojik yolları araştırmıştır (Ivask ve diğ. 2014). AgNP'nin, antibakteriyel aktivitede yer alan yolların büyük ölçüde parçacığın fizikokimyasal özelliklerine bağlı olduğu, parçacığa özgü toksisite sergilediğini bulmuşlardır. Şimdiye kadar, AgNP'lerin hücre duvarı ve membranına tutunmasının, AgNP'lerin ve gümüş iyonlarının neden olduğu hücre içi biyomoleküllerin ve yapıların hasarlarının ve AgNP'lerin ve gümüş iyonlarının neden olduğu oksidatif stresin AgNP'lerin antibakteriyel eylemlerinde rol oynadığına genel olarak inanılmaktadır (Aminov 2010), (Wright ve diğ. 2014).

1889'da, M. C. Lea tarafından sitrat ile stabilize edilmiş bir gümüş kolloidin ilk sentezleri bildirmiştir. Bu yöntemle elde edilen parçacıkların ortalama çapı 7 ile 9 nm olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca 1902 yılından da önce çeşitli proteinler kullanılarak nanogümüşün stabilizasyonu sağlandığı ve 10 nm boyutunda nanogümüşlerin elde edildiği rapor edilmiştir (Frens ve diğ. 1969).

20. yüzyılın başlarında Collargol, Argylol ve Protargol gibi farklı ticari isimler altında bilinen tıbbi nano ölçekli gümüş kolloidlerin ticari satışı başlamış ve 50 yıllık bir süre boyunca kullanımları yaygınlaşmıştır. Bu nanogümüş ürünler reçetesiz satılan ilaçlar olup tıp doktorları tarafından frengi ve diğer bakteriyel enfeksiyonlar gibi çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılmıştır (Fung ve diğ. 1996).

AgNP'ler, çok çeşitli gram-negatif ve gram-pozitif bakterilerin yanı sıra antibiyotiğe dirençli suşlar için de etkili antibakteriyel ajanlardır (Selwal ve diğ. 2016), (Hebeish ve diğ. 2014). *Acinetobacter*, *Salmonella*, *Pseudomonas* bakterileri gram negatif mikroorganizmalara örnektir. Gram pozitif mikroorganizmalar, *Eubacteria*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* ve *Streptococcus* cinslerini içerir. Antibiyotiğe dirençli mikroorganizma suşları arasında vankomisine ve metisiline dirençli *Enterococcus Faecium* ve *Staphylococcus Aureus* bulunur. Yakın zamanda 5-32 nm arasında çapa sahip AgNP'lerin farklı ilaçların bu bakteriler antibakteriyel etkisini iyileştirdiği gösterilmiştir (Hebeish ve diğ. 2014).

Mevcut yöntemlerde hem indirgeyici ajanın hem de stabilizatör, büyüme süreci üzerinde kontrole izin vererek, boyutu ve genellikle Ag NP'lerin şeklini ayarlamak için etkili araçlar sağlar. Örneğin, AgNO₃'ün oda sıcaklığında sodyum borohidrit (Creighton yöntemi) ile indirgenmesi rutin olarak oldukça dar boyut dağılımına sahip ~10 nm parçacıklar elde edilebildiği görülmüştür (Creighton ve diğ. 1979).

Benzer şekilde, etilen glikol ve polivinilpirolidon (PVP)'nin stabilizatör olarak birlikte kullanımı, sıcaklığın dikkatli bir şekilde düzenlenmesi yoluyla çekirdeklenme ve büyüme süreçlerinin kontrolüne izin verdiği için geniş bir boyut ve geometri aralığında AgNP'ler ürettiği gözlemlenmiştir (Zeng ve diğ. 2010).

Özellikle, işlenmiş nanoparçacıklar gelişmiş özelliklere sahiptirler ve bu parçacıklar içerisinde AgNP'lar çoklu ilaca dirençli (MDR) bakterilerin sebep olduğu çeşitli enfeksiyonları tedavi etmek için antibiyotiklere alternatif olarak incelenmektedir (Natan ve diğ. 2017), (Wang , Hu, & Shao , 2017). Gümüş NP'ların antibakteriyel etkisi genellikle nanoparçacıkların yüzeyinde yer alan ligand gruplarının bakteriye bağlanması, iyon salımı ve ardından oluşan yüksek oksidatif stres ile ilgilidir. Bu nedenle bakterinin bu ligand gruplarına sahip NP'lara karşı eşzamanlı olarak birden fazla gen geliştirmesi zorlaşmaktadır. Bu sayede farklı yüzey kimyalarına sahip parçacıklar geliştirilerek antibakteriyel etkisi yüksek ve insan sağlığına zararı olmayan parçacıkların geliştirilmesi antibiyotik dirençli bakterilere karşı bir çözüm oluşturması açısından büyük önem arz etmektedir (Crofts ve diğ. 2017).

Gümüş bir Lewis asidi olarak kabul edildiğinden hücre zarının, proteinlerin ve DNA bazlarının ana bileşenleri olan fosfor ve kükürt içeren biyomoleküller Lewis bazı ile reaksiyona girmeye eğilimlidir (Aminov 2010). Bu nedenle, ilk olarak, AgNP'ler hücre duvarında ve membranda birikerek açıkça morfolojik değişikliklere neden olabilir. Burada sitoplazmanın büzülmesi, membran ayrılması, sayısız elektron yoğun çukurlar ve son olarak parçalanmış membran transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile gözlemlenebilir (Sondi ve diğ. 2004).

Gümüş NP'lerin mükemmel antimikrobiyaller olduğuna ve bu nedenle yeni nesil antimikrobiyaller olarak anıldığına dair kanıt sağlayan birçok rapor vardır (Rai ve diğ. 2009). Ramalingam ve ark. biyosentezlenmiş *E. coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı antibakteriyel aktivitesini değerlendirmiştir. Sonuçlar, AgNP'lerle etkileşim sonucu, bakterilerin yüzey yükünün, *E. coli* için -28.5 ± 2.9 'dan -3.5 ± 0.8 mV'a ve *P. aeruginosa* için -20.6 ± 1.8 'den -5.4 ± 0.5 mV'a nötre doğru hareket ettiğini göstermiştir (Ramalingam ve diğ. 2016). Bakteriyel yüzey yükünün nötralizasyonu, hücre zarı geçirgenliğini değiştirip hücrenin ölmesine neden olmuştur. Ayrıca, AgNPler işlemde sonra yüzey olukları, zar üzerinde büyük boşluklar ve büyük miktarda hücre kalıntısı oluşturmuş ve bu oluşumlar atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile gözlemlenmiştir. Aynı zamanda, AgNP'lerin yapışması zar sertliğini arttırmış olup zarı düzensiz duruma aktararak öldürme işlemi sırasında yağ asitleri, proteinler ve karbonhidratlar gibi zar bileşenlerini bozmuştur.

AgNP, membran geçirgenliğini, solunum zincirini, hücre bölünmesini ve iyon taşınımını zar proteinlerine bağlanarak önemli ölçüde engelleyebilir (örneğin, solunum zinciri proteinleri ve taşıma proteinleri gibi). AgNP tedavisinde artan membran geçirgenliğinin neden olduğu hücre içeriğinin sızması ve sitoplazmik membrandan kontrolsüz taşınması sıklıkla gözlemlenir. Ek olarak, membran proteinlerine bağlanan AgNP'ler ayrıca fosfat iyonlarının alımını ve salınımını engelleyip enerji üretimini engelleyen solunum zincirini bozabilirler. Hücre zarlarına bağlandıktan sonra, AgNP ayrıca bakterilere nüfuz edebilir ve lipitler, proteinler ve DNA gibi hücre yapıları ve biyomoleküllerle etkileşime girerek, transkripsiyonun, translasyonun, protein sentezinin inhibisyonuna ve hücre işleyişin bozulmasına yol açabilirler (Fleming ve diğ. 1929). Bu arada, DNA'nın kesilmesi veya denatürasyonu ve şeker metabolizmasının bloke edilmesi de AgNP'lerin antibakteriyel etkisi ile ilişkilendirilmiştir. Tüm bu veriler birlikte ele alındığında, birkaç temel hücre fonksiyonunun bozulması hücre nekrozuna ve ölüme sebep olur. Ek olarak, gram negatif bakterilerle karşılaştırıldığında, gram pozitif bakteriler, nispeten daha kalın hücre duvarları ve daha fazla peptidoglikanları nedeniyle AgNP tedavisine karşı daha dirençlidirler. Örneğin, bir Gram-pozitif olan *Staphylococcus Aureus* bakterisi türleri, AgNP'leri ve iyonları hücre duvarına etkili bir şekilde yapıştırabilen ve böylece antibakteriyel etkilerini önleyebilen ≈ 30 nm'lik bir peptidoglikan tabakasına sahiptir. Ayrıca, AgNP'lerin yapışması, mikroorganizmaların negatif yüklü hücre zarı ile pozitif

yüzey yüklü AgNP'ler arasındaki elektrostatik çekim ile önemli ölçüde desteklenebilir, bu da pozitif yüklü AgNP'leri negatif yüklü olanlara kıyasla daha güçlü antibakteriyel ajanlar haline getirir (Abbaszadega ve diğ. 2015).

Çok sayıda çalışma, AgNP'lerin antibakteriyel aktivitelerinin, oksijen varlığında AgNP'lerin oksidatif çözünmesiyle oluşturulabilen ve uygulanabilen gümüş iyonu salınımı ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Reidy ve diğ. 2013). Benzer şekilde, gümüş iyonları da membran veya proteinler üzerinde yaygın olarak bulunan sülfhidril, amino, imidazol, fosfat ve karbonil grupları gibi gruplara karşı yüksek afiniteye sahiptir (Dibrov ve diğ. 2002).

Gümüş iyonları, proteinin tiyol gruplarına (SH) bağlanabilir ve kararlı S-Ag bağları oluşturur. Böylelikle, proteinlerin 3 boyutlu yapısını değiştirebilir ve aktif bağlanma bölgeleri bloke edebilir (Dibrov ve diğ. 2002). Gümüş iyonları, potasyum (K⁺) iyonlarının mikrobiyal hücrelerden taşınmasını ve salınmasını bozabilir. Aynı zamanda adenosin trifosfat (ATP) sentezini bloke edebilir (Bragg ve Rainnie 1974). Ayrıca gümüş iyonları, DNA, RNA, çözünmeyen bileşikleri oluşturan peptitler gibi çok çeşitli diğer biyomoleküllerle kolayca koordine olabilir ve böylece hücre bölünmesini ve üremesini engeller (Holt ve Bard 2005).

Stabilite, pol (diallildimetilamonyum) klorür çözeltisi kullanılarak modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş gümüş nanokolloidlerin titrasyonu incelenmiş olup agregasyon süreci, dinamik ışık saçılımı (DLS) ve UV-Vis spektrum ölçümleri kullanılarak izlenip TEM ile gözlemlenmiştir. Bu çalışmada bir iyonik yüzey aktif madde (sodyum dodesil sülfat-SDS), beş iyonik olmayan yüzey aktif madde (Tween 80, Brij 35, 58, 97 ve 98) ve yedi polimer (PEG 1500, 4000, 1000 ve 35000, PVP 10, 40 ve 360), AgNPs yüzeyindeki kimyanın değiştirilmesinde kullanılmıştır.

Tüm ligandlar arasında, SDS, Tween-80 ve PVP 360, gümüş kolloidlerin agregasyonuna karşı mükemmel dağılım kararlılığı sağlanmıştır. SDS ile modifiye edilmiş AgNP'lerin elektrostatik itme ve sterik etkiye atfedilen en yüksek stabiliteyi sergilediği, ardından Tween-80 ve PVP 360'ın geldiği gözlemlenmiştir. Çeşitli AgNP'lerin antibakteriyel aktivitelerini kantitatif olarak değerlendirmek için, modifiye edilmemiş ve SDS, Tween-80 ve PVP 360 ile modifiye edilmiş AgNP'ler ve ayrıca referans olarak AgNO₃ solüsyonu, standart bir seyreltme mikrometodu kullanılarak

çeşitli bakteri suşlarına karşı uygulanmış ve karşılık gelen minimum inhibitör konsantrasyonları belirlenmiştir. Tablo 1.1 'de bu çalışmalar sonucunda elde edilmiş veriler listelenmiştir. Diğer AgNP türleri ile karşılaştırıldığında, SDS ile modifiye edilmiş AgNP'ler en yüksek antibakteriyel aktiviteyi sergilerken, Tween-80 ve PVP 360 ile stabilize edilmiş AgNP'lerin antibakteriyel aktivitelerinde karşılaştırılabilir bir seviyede olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışma ile birlikte, kimyasal kararlılıkları ile SDS-AgNP'lerin en yüksek antibakteriyel aktivitesi, bu parçacıkların olağanüstü dağılılabirliklerine ve hücre zarı ile güçlü etkileşimlerine bağlı olduğu düşünülmektedir (Kvitek ve diğ. 2008).

Tablo 1.1 Modifiye edilmemiş ve sodyum dodesil sülfat (SDS), Tween-80 ve PVP 360 bağlanmış AgNP'lerin minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) sonuçları.

(Koyu ile gösterilmiş değerlerde, modifiye edilmiş parçacığın daha iyi antibakteriyel etki gözlemlenmektedir.)

Test edilen Bakteri suşu	Minimum Inhibitör Konsantrasyonu [$\mu\text{g mL}^{-1}$ Ag]				
	Ag+	Modifiye edilmemiş parçacık	Yüzeğe bağlanmış yapılar		
			SDS	Tween 80	PVP 60
Enterococcus faecalis CCM 4224	1.69	6.75	3.38	6.75	6.75
S. aureus CCM 3953	1.69	3.38	1.69	3.38	3.38
E. coli CCM 3954	0.84	1.69	1.69	1.69	3.38
P. aeruginosa CCM 3955	0.84	3.38	1.69	3.38	1.69
P. aeruginosa	0.84	3.38	3.38	1.69	1.69
Staphylococcus epidermidis	0.84	1.69	0.84	1.69	1.69
Staphylococcus epidermidis	0.84	1.69	1.69	1.69	1.69
Staphylococcus aureus MRSA	0.84	3.38	1.69	3.38	1.69
Enterococcus faecium VRE	1.69	6.75	3.38	3.38	3.38
Klebsiella pneumoniae ESBL	1.69	6.75	6.75	3.38	6.75

Ag⁺ salımının AgNP'lerin E. coli'ye karşı antibakteriyel aktiviteleri üzerindeki etkisi Long ve ark. tarafından araştırılmıştır. Sitrata, merkaptopropionik asit (MPA), merkaptotoksanoik asit (MHA) ve merkaptopropiyonik sülfonik asit (MPS) dahil olmak üzere farklı kaplama ligandlarına sahip dört çeşit 10 nm AgNP kullanılarak, bu ligandların çeşitli koordinasyon sayılarındaki farklılık, karbon zincir uzunluğundaki değişiklikleri ve farklı uç grupları nedeniyle Ag⁺ salımı, yüzey Ag atomu aktivitesinin ve O₂ erişiminin manipülasyonu incelenmiştir. AgNP'lerin diğer üç türü ile karşılaştırıldığında, sitratla kaplanmış AgNP'ler, yüzey Ag atomlarına en zayıf bağ ve oksijen izolasyonu kapasitesi nedeniyle en yüksek iyon salma oranı ve en güçlü antibakteriyel aktivite sergilemiştir. Yazarlar, sitotoksiteyi, parçacıkların girdiği ve daha sonra iyonize olduğu bir Truva atı tipi mekanizma yoluyla hücre içi gümüş iyon salımına bağlamıştır. Sırasıyla, bakteri membranı ile bağlanma solunum zinciri fonksiyonunun bozulmasına neden olur, bunun sonucu olarak hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) artar ve buna karşılık gelen lipid peroksidasyonu sonucunda hücre ölümü gerçekleşir (Long ve diğ. 2017).

Dağılım ve kimyasal stabiliteye ek olarak, boyut, AgNP'lerin antibakteriyel aktivitesinde bir başka önemli faktördür. Baker ve diğerleri 2005'te parçacık boyutunun AgNP'lerin antimikrobiyal etkisi üzerindeki etkisini araştırmıştır. AgNP'ler sırasıyla inert gaz yoğunlaştırma (IGC) ve birlikte yoğunlaştırma (COCON) olmak üzere iki büyük ölçekli vakum sentez tekniği ile üretilmiş ve ardından iki farklı boyuttaki AgNP'lerin hem çözelti içinde hem de agar üzerinde E. coli'ye karşı antibakteriyel incelemeleri gerçekleştirilmiştir. Her iki AgNP türü de nispeten geniş tabakalar şeklinde boyut dağılımları sergilemiştir. Bu çalışmada iki AgNP türünün boyutları sırasıyla 5 ila 70 nm (ortalama boyut 15 nm) ve 50 nm ila 100 nm (ortalama boyut 75 nm) arasında değişmektedir. Sonuçlar, daha küçük boyutlu (15 nm) AgNP'lerin E. coli hücrelerine karşı daha yüksek antibakteriyel aktivite sergilediğini ortaya koymuştur (Baker ve diğ. 2005).

E. coli bakterisine ek olarak, 1-100 nm aralığında AgNP'lerin boyuta bağlı antibakteriyel etkisini değerlendirmek için üç gram negatif bakteri daha kullanılmıştır. Morones ve diğerleri tarafından 30 dakika boyunca Luria-Bertani kültür ortamında AgNP'lerle inkübe edildikten sonra her bakteri türü toplanıp daha sonra bakteri yüzeyinde AgNP'lerin yerini ve dağılımını belirlemek için yüksek açılı halka şeklindeki karanlık alan (HAADF) taramalı transmisyon elektron mikroskobu (STEM)

kullanılarak analiz edilmiştir (Morones ve diğ. 2005). Sonuçlar, yalnızca 1-10 nm AgNP'lerin bakteri zarına bağlanabildiğini göstermiştir. AgNP'lerin bakterisidal mekanizmasını daha derinden anlamak için, STEM kullanarak AgNP'lere maruz bırakılan E. coli hücreleri analiz edilmiştir. STEM görüntüleri, AgNP'lerin bakteri zarına yapıştığını ve nihayetinde bakteri sitoplazmasına girdiğini göstermiştir. Ayrıca, hücrelerin içinde bulunan AgNP'ler, hücre zarına bağlı nanoparçacıklara benzer boyutlara (1-10 nm) sahip olduğu ve bu yalnızca zara bağlı AgNP'lerin bakteri içine girebildiğini göstermiştir. Yazarlar, yalnızca $\approx 1-10$ nm parçacıkların ilkel bağlanmasını, küçük NP'lerin yüksek derecede reaktif yönlerine, elektronik etkilerine ve daha büyük bir yüzey/hacim oranına bağlamıştır. Tüm bu sonuçlar, daha küçük boyutlu gümüş NP'lerin bakteri ile doğrudan etkileşim için daha verimli hale getirdiğini ve bunun sonucunda hücrenin ölümüne neden olduğunu göstermiştir.

Yüksek antibakteriyel aktivite sergileyen daha küçük AgNP'ler de Lok ve diğerleri tarafından gözlemlenmiştir. Onların sonuçları, 9 nm'lik AgNP'lerin, 60 nm'lik daha büyük eşdeğerinden çok daha yüksek (~ 9 kat) antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu gösterdi. Daha küçük AgNP'lerin çok kolay oksitlendiği göz önüne alındığında, gümüş nanoparçacıkların gözlenen antibakteriyel aktivitelerinin esas olarak AgNP'lerin oksidasyonundan (Ag^+) kaynaklandığını varsaymış olup yapmış oldukları deneyler ile de bu hipotezi kanıtlamışlardır. Deneyler sonucunda antibakteriyel etkinin oluşmasında önerdikleri mekanizma, daha büyük yüzey alanı kütle oranına sahip daha küçük AgNP'lerin parçacık yüzeyine daha fazla Ag^+ adsorbe edebilmesi ve bunun sonucunda daha yüksek antibakteriyel aktivitelerle sonuçlanması şeklindedir (Lok ve diğ. 2006).

Benzer boyuta bağlı antibakteriyel aktivite, 9 ila 21 nm arasında değişen farklı büyüklükteki AgNP'leri sentezleyen Choi ve Hu tarafından da gözlemlenmiştir (Choi ve diğ. 2008). Boyuta bağlı toksisiteyi, nitrifikasyon bakterilerini farklı ortalama büyüklükteki AgNP'lerle 0,05–1 mg L⁻¹ nihai toplam konsantrasyonlarında inkübe ederek belirlemişlerdir. Sonuçlar, inhibisyonun, ortalama parçacık boyutundan ziyade 5 nm'den ($R^2 = 0.738$) daha küçük nanogümüş bolluğu ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu göstermiştir; bu da daha küçük AgNP'lerin (<5 nm) bakteriye karşı, nanoparçacıkların diğer fraksiyonlarından (örneğin, 10, 15, 20 nm, $R^2 = 0.04-0.39$) daha yüksek potans sergilediğini göstermiştir. Elde ettikleri sonuç, Morones ve arkadaşlarının, yalnızca $\approx 1-10$ nm'lik AgNP'lerin membrana bağlanabildiği ve

ardından bakteriye girebildiği yönündeki bulgularıyla da tutarlılık göstermektedir (Morones ve diğ. 2005).

Agnihotri ve diğ. 2014) hassas bir şekilde çekirdeklenmeyi kontrol ederek ayarlanabilir boyutlarda (5, 7, 10, 15, 20, 30, 50, 63, 85 ve 100 nm) yüksek oranda monodispers AgNP'leri başarıyla hazırlamışlardır (Agnihotri ve diğ. 2014). Boyutun antibakteriyel aktivite üzerindeki etkisini belirlemek için *E. coli* MTCC 443, *E. coli* MTCC 739, *Bacillus subtilis* MTCC 441 (*B. subtilis* MTCC 441) ve *S. aureus* NCIM 5021 bakterisi olmak üzere dört bakteri suşu kullanmışlardır. Farklı büyüklükteki AgNP'lerin MİK ve MBK değerleri ölçülmüştür (Tablo 1.2). Sonuçlar, boyutun 100 nm'den 20 nm'ye düştükçe antibakteriyel aktivitenin kademeli olarak arttığını göstermiş ve bu ayrıca disk difüzyon testleri ile de doğrulanmıştır. Önemli olarak, 10 nm altı ölçekte, AgNP'lerin antibakteriyel etkisi, parçacık boyutu 10'dan 7 nm'ye, 7 nm'den 5 nm'ye düştükçe çarpıcı biçimde arttığı yönündedir (Tablo 1.2). Bu davranış, 10 nm'nin altında boyutlara sahip gümüş nanoparçacıkların kullanıldığı ve çeşitli bakteri suşlarına karşı belirgin toksik etki gösterdiği önceki birkaç çalışma ile iyi bir uyum içindedir. Özetlemek gerekirse, parçacık boyutunun AgNP'lerin antibakteriyel etkinliğini belirleme üzerindeki etkisi, özellikle gümüş parçacıkların boyutları 10 nm'nin altında olduğunda, daha küçük parçacıkların genellikle daha büyük muadillerine kıyasla gelişmiş bir antibakteriyel güçsergilediğine dair genel bir eğilim sunar.

Tablo 1.2: 4 Bakteri Türüne Karşı Boyuta Bağlı Antibakteriyel Aktivite

E. coli MTCC 443, *E. coli* MTCC 739, *B. subtilis* MTCC 441 ve *S. aureus* NCIM 5021 bakteri türleri dahil olmak üzere dört bakteri türüne karşı boyuta bağlı antibakteriyel aktivite belirlenmiştir. A) Minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC, $\mu\text{g mL}^{-1}$) B) Dört bakteriye karşı farklı büyüklükteki AgNP'lerin ölçülen minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBC, $\mu\text{g mL}^{-1}$)

A										
Bakteri Türü	Ag(5)	Ag(7)	Ag(10)	Ag(15)	Ag(20)	Ag(30)	Ag(50)	Ag(63)	Ag(85)	Ag(100)
E. coli MTCC 443	20	20	30	30	40	50	Nil	90	90	110
E. coli MTCC 739	60	90	90	90	100	100	120	140	160	160
B. substilis MTCC 441	30	40	40	50	50	60	80	90	110	120
S. aureus NCIM 5021	70	70	80	100	90	100	130	160	180	200
B										
E. coli MTCC 443	30	30	40	50	50	80	100	110	130	140
E. coli MTCC 739	90	100	100	110	120	120	140	170	170	180
B. substilis MTCC 441	40	50	50	60	70	80	100	120	130	140
S. aureus NCIM 5021	80	90	100	100	100	120	160	200	>200	>200

Yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahip küçük nanoparçacıklar, daha düşük konsantrasyonlarda bile daha etkili bir antibakteriyel etki sağlar. Üçgen şekilli AgNP'ler en güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. AgNP'ler çok çeşitli mantarlara karşı etkilidir ve Aspergillus, Candida ve Saccharomyces türleri dahil olmak üzere daha hızlı etkili mantar öldürücülere sahiptir. Ek olarak, bu nanoparçacıklar, sığır mastitisinden izole edilen mayaların aksine gerçektir (Tyavambiza ve diğ. 2021), (Wijnhoven ve diğ. 2009).

2. GÜMÜŞ VE NANOTEKNOLOJİ

2.1 Gümüş ve Özellikleri

Simgesi Ag olan gümüşün atom numarası 47 ve atom ağırlığı 107,87 gramdır. Beyaz, parlak ve değerli bir element olan gümüşün kaynama noktası 1950 °C ve özgül ağırlığı 10,5 g/cm³ 'tür. Genellikle bileşiklerinde +1 değerlik alır ve ışığı çok iyi yansıtmaktadır. Dövülebilir ve esnek metaldir ve bir gram gümüş 2 km uzunluğunda ince tele dönüşebilmesi de buna bir örnektir. Oksitlenmeye karşı direnci yüksekti ve bakırdan daha zor, altından ise daha kolay oksitlenmektedir. Nitrik asit ve derişik sıcak sülfürik asitte kolayca eriyebilmektedir. Havadaki hidrojen sülfürün kükürdü ile gümüşün birleşmesinden dolayı üzerinde kararma meydana gelebilmektedir. Gümüş, periyodik tabloda ağır metaller grubu içerisinde yer almaktadır ve birçok özelliği bakır'a benzemektedir. Aralarındaki en önemli fark ise bakırın genellikle bileşiklerinde iki değerlikli olmasıdır (Altuner 2013).

Gümüş İngilizcede Silver , Latincece Argentum olarak adlandırılan gümüşün tabiatta 107 (%51.35) ve 109 (%48.65) olmak üzere iki izotopu bulunur. Gümüş metaline ait bazı özellikler Tablo 1.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1 : Gümüş Metaline Ait Bazı Özellikler

YOĞUNLUĞU (20°C)	10.49 g / cm ³
ERİME NOKTASI	960.5 °C
KAYNAMA NOKTASI	1950 °C
KRİSTAL ŞEKLİ	Kübik
RENGİ	Beyaz
SPESİFİK ISISI (0 °C)	0.0559 cal/g °C
DİRENÇ (20°C)	1.59 µΩ/cm

2.2 Gümüşün Tarihçesi

İnsanlar tarafından kullanılmış olan ilk metallere biri olan gümüş, tarihsel sürecinde hep altınla birlikte anılmıştır. Gümüşten daha değerli bir maden olan altın, doğada daha çok bulunduğu için ilk çağdan beri en çok kullanılan metallere biri olmuştur. Gümüşün ise cevherlerinin daha alt katmanlarda bulunmasının nedeni ile daha sonraki tarihlerde kullanılmaya başlandığı görülmüştür. Gümüşün beyaz, korozyona dayanıklı ve nadir bulunan bir metal olmasından dolayı günümüze kadar kullanımını artarak devam etmiştir (Mellor 1961).

Gümüş metalinden ilk olarak M.Ö. 3000 yıllarında Mısırlılar, M.Ö. 2500 yıllarında Çinliler ve Persler tarafından kullanıldığı bahsedilmiştir. M.Ö. 800 yıllarında ise Nil nehri çevresinde para olarak kullanılmaya başlanmıştır. Norveç'te, Güney Peru'da ve Colorado'da kazılar sırasında işlenmiş halde büyük gümüş külçeleri bulunmuştur (Altuner, 2013).

Tarama tünelleme mikroskopunun kullanılmaya başlanması ile nanoteknoloji çalışmaları hız kazanmıştır. Bu mikroskop ile iletken bir yüzey üzerindeki atomların yerleri değiştirilerek yapısal özellikleri değiştirilebilmiştir (Yadav 2005). 1920 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nin (FDA) onaylaması ile koloidal gümüş, yara tedavilerinde kullanılmaya başlanmıştır fakat 1940'lı yıllarda penisilin kullanımı yaygınlaşması ile gümüşün bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanımını giderek azalmıştır. Gümüşün tekrar popüler kullanımını % 0,5 AgNO₃ çözeltisi olarak 1960'lı yıllarda yanık tedavilerinde olmuştur. 1968 yılında AgNO₃, sülfonamid antibiyotiği ile birleştirilerek gümüş sülfadiazin kremi üretilmiştir. Sonrasında fullerenlerin ve karbon nanotüplerin keşfi (1986) ve 2000'li yıllardaki Amerika'nın nanoteknoloji üzerinde yaptığı büyük yatırımlar dünyadaki diğer pek çok ülkenin de bu alana ilgisini arttırmıştır (Yadav 2005).

Yakın zamanda ise doktorlar gümüşün farklı oranlarda eklendiği yara bezlerinin kullanımını başlatmışlardır (Hoş 2010). Yapılan son çalışmalara göre dünya çapında yaklaşık 320 ton/yıl nanogümüş üretildiği ve kullanıldığı tahmin edilmektedir (Gottschalk ve diğ. 2010).

2.3 Nanobilim ve Nanoteknoloji

Nano terimi kelimesi Yunanca “bodur, cüce” anlamına gelen “nanos” kelimesinden türetilmiştir. Nano boyut bir metrenin milyarda birine (1nm=10⁻⁹m) karşılık gelmektedir. Bu da yaklaşık on hidrojen atomunun genişliğine eşit olmaktadır (Yula ve Deveci 2007). İnsan saç teli çapının 5000 nanometre olduğu düşünülürse ne kadar küçük bir ölçekten bahsedildiği daha rahat anlaşılacaktır (Putheti 2015).

Nanoteknoloji, maddelerin kontrollü olarak boyutlarının değiştirilerek maddenin atomik-moleküler boyutunda yeni özelliklerde malzeme üretmek için uygulanan mühendislik çalışmalarıdır. Nanomalzemeler; metal, yarıiletken ya da yalıtkan olarak farklı optik, elektronik ve kimyasal özellikler ile elde edilebilirler. Nanomalzemeler boyuta bağlı olarak farklı kimyasal ve fiziksel özellikler gösterebilmektedir. Yüzey/Hacim oranının büyük olması, nanomalzemeleri en ön plana çıkartan özelliktir (Nalwa 2007).

Modern araştırmaların ön safhalarında yer alan nanobilim ve nanoteknoloji aynı zamanda 21. yüzyılın yeni devrimi olarak kabul görmektedir. Nanobilim ve nanoteknoloji kavramları farklı bilgi kaynaklarına ve yazarlara göre değişik tanımlarla ifade edilebilmektedir. Dünya genelindeki kaynakların nanobilim ve nanoteknoloji kavramlarını birbirleri yerine kullanılıyor olması yaygın olarak karşılaşılan bir durumdur. Fakat bu iki kavramın arasında belirgin farkların olduğu bilinmektedir (Sebastian ve Gimenez, 2016).

Malzemelerin nanoboyuta indirgenmesi malzemeye aşağıdaki özellikler kazanmasına olanak sağlar.

- Artan Mukavemet ve Sertlik
- Yüksek Yayınım
- Yüksek Elektrik Direnci
- Artan Özgül Isı
- Yüksek Termal Genleşme Katsayısı
- Düşük Termal İletkenlik
- Yumuşak Manyetik Özellikler

2.3.1 Nanoteknolojinin Tarihçesi

Nano boyutlarla ilgili ilk fikirler ünlü fizikçi Richard Phillips Feynman tarafından öne sürülmüştür. Feynman, 29 Kasım 1959 tarihinde Amerikan Fizikçiler Cemiyeti toplantısında “There’s Plenty of Room at the Bottom—An Invitation to Enter a New Field of Physics”, (Aşağıda daha çok yer var: Fiziğin yeni bir sahasına davet) başlığı ile yaptığı konuşması nanobilim ve nanoteknoloji çağının başlangıç noktası olarak kabul edilmiştir. Feynman’ın bu konuşmasında gelecek yıllarda atomların istenen boyutlarda ve özelliklerde sentezlenebilmesi ile tüm malzemelerin küçültülebileceğini iddia etmiştir. 1981 yılında Heinrich Rohrer ve Gerd Karl Binnig, elektron mikroskobu ile görüntülenemeyen parçacıkları 2.000 kez büyütebilen tarama tünel mikroskobunu keşfetmişlerdir. 1986 yılında atomik kuvvet mikroskobu bulunması ile nanoteknoloji ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. İlk karbon nanotüpler 1991 yılında Japon bilim adamı Sumio Iijima tarafından üretilmiştir. Askeri alanda ürünler üretmek için 2002 yılında Massachusetts Teknoloji Enstitüsü bünyesinde Askeri Nanoteknoloji Enstitüsü kurulmuştur (Özer, 2008).

Nanobilim ve nanoteknoloji kavramları hayatımızda yeni olmalarına rağmen, nano malzemelerin yüzyıllardır kullanıldığı bilinmektedir. Örnek olarak alternatif ölçekli gümüş ve altın parçacıkların yüzlerce yıl öncesinde vitray pencerelere renk kattığı görülmektedir (Zor 2016). 4. yüzyılda Roma döneminde cam ustalarının şaheserlerinden olan “Lycurgus cup” British Museum’da bulunmakta olup kupa yüzeyinde Homeros destanındaki Kral Lycurgus’un efsanesini canlandırılmıştır. Bu kupanın ünlü olma sebebi, camın erimiş haline katılmış olan nanoparçacıklarla ışığı

yansıtma ve geçirme durumuna göre farklı renkler almasından kaynaklanan optik özelliğidir (Benli, 2008). Şekil 2.1’de görseli verilmiş olan Lycurgus cup, ışığı geçirdiğinde kırmızı, yansıttığında ise yeşil rengini almaktadır (Crerar, 2014).



Şekil 2.1: Lycurgus kupası

2.3.2 Nanoparçacık Üretim Yöntemleri

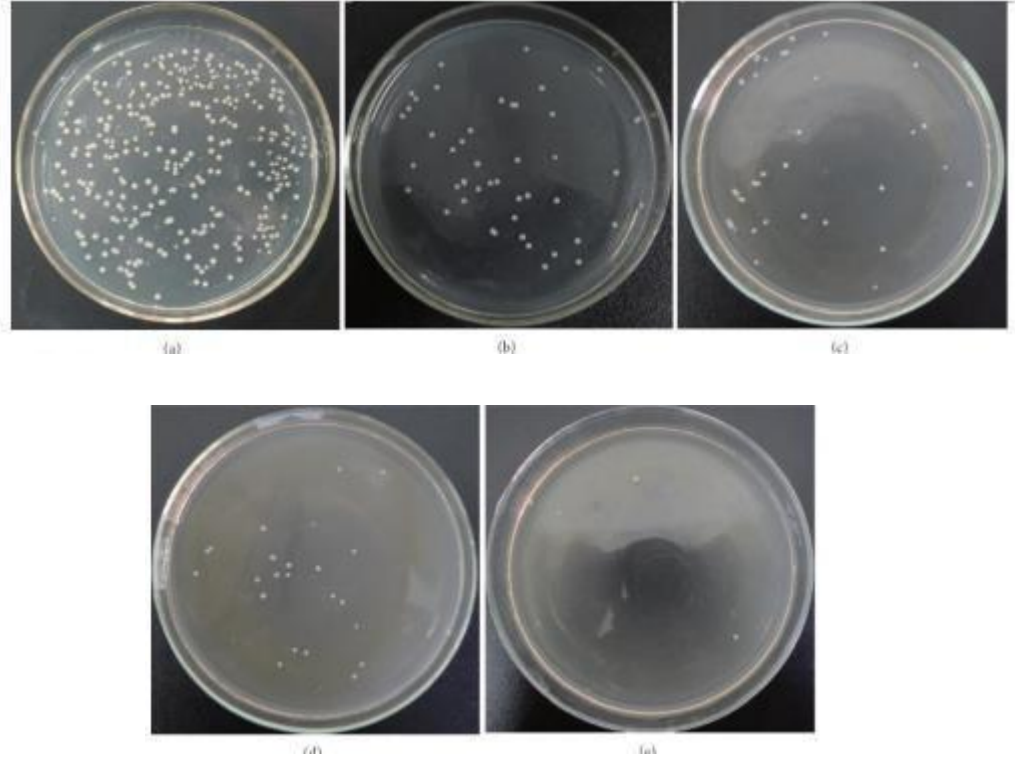
Nanomalzemelerin üretiminde, aşağıdan yukarı “Bottom Up” ve yukarıdan aşağı “Top Down” olarak iki farklı üretim yöntemi kullanılmaktadır. Yukarıdan aşağıya üretim yöntemlerinde, malzemeye dışardan mekanik veya kimyasal bir enerji verilmesi ile parçacığın nano boyutlarına kadar parçalanması yöntemine dayanmaktadır. Aşağıdan yukarıya üretim yönteminde ise atomların kimyasal yöntemler ile birleşerek nanoboyutlara ulaşması yöntemine dayanmaktadır. Aşağıdan yukarı üretim yöntemleri, yukardan aşağıya üretim yöntemlerine göre daha az zahmetli ve daha ekonomiktir. (Wolfgang 2007).

2.4 Nanogümüş

Nano gümüşün antibakteriyel özelliğinin olması, insan sağlığı ile ilgili alanlarda gıda ve tekstil sektörlerinde kullanılmasını sağlamıştır. Antibakteriyelliğin sağlanması sırasında nano gümüşten Ag⁺ iyonları serbest bırakılır. Bu iyonların mikroorganizmalara karşı toksik etkisi ile ilgili birçok tartışma sebebi olmuştur. (Erdoğan , 2011).

2.5 Nanogümüşün Yüzey Kimyası ve Antibakteriyel Etkisi

Staphylococcus aureus oluşumunu değerlendirmek için Zhang ve arkadaşları gümüş katkılı mikro ark oksidasyon kaplı saf titanyumu inceledi (Zhang ve diğ. 2010). In-vitro deney, Şekil 2.2'de gösterildiği gibi gümüş miktarı artırıldığında *S. aureus* bakteri oluşumunun azalmasıyla sonuçlanmıştır.



Şekil 2.2: *S. aureus*'a karşı in vitro antibakteriyel testin görüntüleri: (a) kontrol numunesi Ti-MAO, (b) Ti-MAO-Ag1.0, (c) Ti-MAO-Ag5.0, (d) Ti-MAO-Ag10.0 ve (e) Ti-MAO-Ag20.0.

Gümüş nanoparçacıklar bakteri hücre duvarına bağlanıp hücrenin içine sızar. Bu durum bakteri zarında fiziksel değişikliklere neden olur. Örneğin, zarın bozulması, hücre zarı sızıntısına ve bakterilerin ölümüne neden olur. Ayrıca, fosfat, karboksil ve amino gruplarının varlığından dolayı bakterilerin hücre zarının negatif yüklü olduğu bilinmektedir. Gümüşün pozitif yükü olduğundan, hücresel zar ile gümüş arasındaki elektrostatik çekim karşı konulamaz. Bu andan itibaren gümüş bakteri hücrelerine de nüfuz edebilir (Romero-Urbina ve diğ. 2015). Gümüş nanopartiküller hücre tarafından absorbe edildikten sonra proteinler, lipidler, DNA ve gümüş arasındaki etkileşim

gözlemlenebilir ve bu da bakteriyel fonksiyon bozukluğu ve ölümle sonuçlanır. Gümüş ribozomlarla etkileşime girdiğinde, durum translasyonun ve protein sentezinin denatürasyonu ve inhibisyonu ile sonuçlanabilir.

Enzimlerde ve proteinlerde sülfhidril grupları görülebilir. Ag⁺ hücre zarında bulunan proteinlere bağlanarak stabil bağlar oluşturur ve protein deaktivasyonu ile sonuçlanır. Son olarak, Ag⁺'nin nükleik asitleri ve nükleositleri ile kompleks oluşturma ve etkileşim yeteneği tespit edilmiştir (Râpa ve diğ. 2013).

Gümüş mikroorganizmanın hücre zarından geçerek proteinlerin içerisindeki amino asit gruplarının aktivitesini engeller ve hücreyi inaktif hale getirir. Böylece hücrenin kendi kendini replike edebilme özelliğini kaybeder. (Sygnatowicz ve diğ. 2010).

Clement ve Jarrett tarafından yapılan çalışmalarda gümüşün *E. coli* solunum zincirini denatüre ettiği, metabolit sızıntısına neden olduğu ve buna bağlı olarak DNA replikasyonunun engellendiği bildirilmiştir (Clement ve Jarrett 1994). Chappell ve Greville tarafından yapılan çalışmalarda ise düşük Ag⁺ seviyelerinde bakteri membranlarındaki proton itici kuvvetin çöktüğü bildirilmiştir (Chopra 2007). Dibrov ve arkadaşları tarafından düşük gümüş konsantrasyonlarının bakteriyel membrandan proton sızmasına neden olduğu bildirilmiştir. Gümüş iyonlarının antibakteriyel mekanizmasını incelemek amacı ile yapılan bir çalışmada *E. coli* ve *S. aureus* gümüş nitrat ile etkileşime girmiştir. Sonuç olarak *E. coli* ve *S. aureus*'un her ikisinde de benzer denatürasyonların meydana geldiği gözlemlenmiş olup DNA'nın replikasyon yeteneğini kaybettiği bildirilmiştir. (Feng ve diğ. 2000).

3. PATOJENİK MİKROORGANİZMALAR

3.1 Giriş

Bakteriler canlılarda sağlığı ciddi etkileyebilir hatta hayatı tehdit eden hastalıklara sebebiyet verebilir. Bakteriler enfeksiyon hastalıklarının çoğunluğuna sebep olmaktadır. Bulunduğu ortama kolay adapte olabilmelerinden dolayı buldukları her ortamda yaşayabilir ve üreyebilirler. Yaşamları için uygun olmayan koşullar altında ise spor oluşturarak çok uzun süre hatta yıllar boyunca hatta hayatta kalabilirler. Bakteri türlerinden bazıları sadece insan metabolizmasında, bazı türleri ise hayvan metabolizmasında yaşamlarını sürdürebilmektedir. Kronik enfeksiyonlara sebep olan bakteriler yavaş hızlarda üreyebilen bakterilerdir. Bakterilerin plazmit DNA'sı aynı tür bireyler ya da farklı türden bireyler arasında oluşan genetik madde alışverişini sağlarlar. Bu yüzden genetik uyumları vardır ve antimikrobiyal maddelere karşı güçlü direnç gösterirler. (Hart ve Shears 2001)

3.2 Escherichia Coli

Çeşitli mikroorganizmalar bakteriyemilere sebebiyet vermektedir. Bakteriyemilerin toplum kökenli olanlarında *Escherichia coli* sıklıkla görülen bir bakteri türüdür. Ökaryotik canlılarda gastrointestinal sistem florasının üyelerinden biri olan *E. coli*, hem bağırsaklarda hem de bağırsak dışında metabolizmada çeşitli enfeksiyonlara neden olabilir. (Tanyel ve diğ. 2008) *E. coli*, insan ve hayvanlarda doğuma müteakip 1-2 saatlik zaman dilimi içerisinde veya aynı gün içinde vücuda alınan su veya besinlerden vücuda alınmaktadır. Vücutta ince bağırsağın son kısmında veya kalın bağırsağın mukozasına tutunmaktadır. Bir suş, aylar boyunca hatta bazı zamanlarda seneler boyunca florada tutunabilme özelliğine sahiptir. Böylelikle zararlı mikroorganizmaların üremesine çoğalmasına engel olmaktadır (Hoş 2010). İçme suyuna mikrobiyallerin bulaşması, bulaşıcı hastalıkların salgılaşmasına neden olmaktadır (Ekici ve diğ. 2010).

3.2.1 Morfolojisi

E. coli, *Enterobacteriaceae* familyasındaki diğer bakterilere morfolojik yapı olarak benzerlik göstermektedir. Gram negatif bir bakteridir, çomak şekline sahip ve spor yapma özelliği yoktur (Bilgin 2006). *E. coli* 2- 6 µm boyunda, 1-1.5 µm eninde, düz ve uçları yuvarlak olan bir bakteridir. Şekil olarak bazen koka benzeyen küçük ve kısa olabileceği gibi, bazende normalden daha uzun, Y harfine benzer bir biçimde flamanlı olabilmektedir. Hareket kabiliyeti vardır ancak hareketsiz olarak görünebilecek kadar yavaş bir hıza sahiptir (Hoş 2010).

3.3 Staphylococcus Aureus

İnsan ve hayvanlar üzerinde çeşitli enfeksiyonlara sebep olan ve çok yaygın olarak bulunan bir bakteri türüdür. Doğada çok yaygın olmasının yanı sıra *S. aureus* insan vücudu içerisinde de normal flora üyesi olarak yaşayabilmektedir. Bazen hafif bir enfeksiyona sebebiyet verirken bazen hayati tehlikeye sebebiyet veren hastalıklara neden olabilirler. Son zamanlarda dirençli kökenler olduğu gözlemlenmektedir ve bu dirençli kökenlerin minimum inhibitör konsantrasyonlarında (MİK) yükselmesine neden olduğu tespit edilmiştir. Bu durumdan dolayı yeni tedavi yöntemleri gündeme gelmektedir (Yılmaz ve diğ. 2010). *S. aureus* genellikle burun içi mukozasında bulunmaktadır. Bulunma oranı ise günlük yaşamın içinde bulunan insan ve hastanede çalışan veya tedavi gören hastalar arasında değişiklik göstermektedir. Günlük yaşam içerisindeki insanların % 10-40'ının, hastanelerde ve kliniklerde çalışanlarının ve yatarak tedavi gören hastaların %70'inin burun içi mukozasında bulunmaktadır. *S. aureus* kemoterapötik maddelere karşı hızlı bir şekilde dayanıklılığını arttırabilme yeteneğine sahiptir. *S. aureus*'un yaklaşık olarak %50'si toksin üretebilmektedir. (Bilge ve Karaboz 2005)

3.3.1 Morfolojisi

S. aureus, ortalama 1 µm büyüklüğünde, yuvarlak ve sporsuz bir bakteri türüdür. Gram pozitif bir bakteri olan *S. aureus* tek tek olarak, ikili olarak veya dörtlü gruplar şeklinde görülmektedir. Fakat hücre bölünmesinin farklı düzlemlerde

gerçekleşmesinden dolayı preparatlarda genellikle üzüm salkımına benzer bir şekilleri vardır. Hücre bölünmelerinin farklı düzlemlerde gerçekleşmesinden dolayı genellikle şekilleri üzüm salkımlarına benzemektedir (Kayser ve diğ. 1997).

3.4 Bacillus Subtilis

Bacillus subtilis topraklarda bulunan bir bakteri çeşididir. 20. Yy. sonlarına doğru ABD' nin Kaliforniya Eyaletinden alınan toprak örneklerinden tespit edilmiştir. Son zamanlarda *Bacillus Amyloliquefaciens* olarak bilinen *Bacillus subtilis*, botrytis ve küllemelere karşı kullanılan bir bakterisit ve fungusittir (Gwynn ve diğ. 2014). *Bacillus subtilis*, gram pozitif olan, oksijenli solunum yapan ve uygun üreme sıcaklığı 25-35°C olan bir bakteri çeşididir. Hareketli bir yapıya sahiptir. Oluşturduğu sporları oval ve subterminal olup, kapsülsüz şeklindedir. Bu özelliği sayesinde ön zenginleştirme yapılmamış olan besiyerinde kolaylıkla üreyebilmektedir. Toprakta sıklıkla bulunur ve mezofildir. Bulaşma kaynağı; toz, toprak, su gibi temel alanlar olduğu için gıdalara karşı kolaylıkla bulaşabilirler. Asimetrik olarak bölünmekte olup oluşturduğu endosporlar sıcaklık, asit, tuz vb. dış faktörlere karşı direnç gösterir. İnsanlarakarı düşük seviyede patojeniteye sahip olan *Bacillus subtilis*, “subtilisin” olarak adlandırılan proteolitik enzim üretmektedir. *B. Subtilisin*, düşük toksijenik özelliği vardır. Devamlı olarak maruz kalınması durumunda, alerjik reaksiyonlar oluşabilmektedir (Fritze ve Pukall 2001).

3.4.1 Morfolojisi

B. subtilis Genelde toprakta yaşarlar ve optimum sıcaklık dereceleri 25-35 °C'dir (John 2009). Bazı türleri gram değişken olsa da genellikle gram pozitif bir bakteridir. *B. Subtilis* bakterisi değişiklik gösteren şartlar altında vejetatif büyüebilmesi için endospor oluşturur. Aerob veya fakültatif anaerob olabilirler. Genellikle katalaz pozitif, oksidaz pozitif veya negatif olabilirler. Şekil olarak çubuk şeklinde düz veya düze benzerlik gösteren bakterilerdir. Vejetatif olan hücrelerin büyüklüğü 0.5x1.2 µm ile 2.5x10 µm arasında değişiklik göstermektedir. Genellikle

kolonileri beyaz ya da krem renklere sahiptir ancak istisnai olarak bazı türlerde sarı, pembe, turuncu ve siyah renkli pigmentlere sahip koloniler gözlemlenmiştir (Buchanan ve Gibbons 1974).

3.5 Pseudomonas Aeruginosa

1850 yılında Sedillot cerrahi yara pansumanları üzerine yaptığı çalışmalarda mavi renk değişikliğine sebep olan bir ajan olarak *P. Aeruginosa*'yı tanımlanmıştır. Başlarda *Bacillus Pyocyaneus* olarak adlandırılmış ilerleyen yıllarda *Pseudomonas Pyocyanea* olarak yeniden adlandırılmıştır.

Pseudomonadaceae familyası içerisinde yer alan *Pseudomonas* cinsi bakteriler genellikle doğada toprak ve sularda bulunur. Bazı türleri insan, hayvan ve bitkiler için patojen olarak farklılık göstermektedir. Bu cinsin türlerinin bazıları oksidaz pozitif, bazıları oksidaz negatif olarak farklılık göstermektedir. Bu bakteriler glikoz fermantasyonu yapamaz ancak oksidasyon yoluyla parçalayabilir. Türlerin tamamı polar flagellası sayesinde hareket edebilme özelliğine sahip çubuk şekilli aerobik, katalaz pozitif, Gram negatif bakterilerdir. Bazı türleri proteolitik ve lipolitik aktivite gösterebilmektedir. Aerobik olmalarından dolayı gıdaların yüzey kısmında gelişebilmeleri sonucu olarak okside ürünler ve mukoz madde oluşturabilirler. Gerekli gelişme faktörleri ve vitaminleri sentezleme yeteneğine sahip olmaları sayesinde kendi gelişmelerini sürdürebilmekteledir (Ayhan 2000).

P. aeruginosa, Gram-negatif ve her yerde bulunabilen bir bakteri olmasından dolayı bağışıklık sistemi zayıf olan insanlar için hayatı tehdit eden çok çeşitli akut ve kronik enfeksiyonlara sebep olabilen fırsatçı bir insan patojenidir (Moradali ve diğ. 2017). Fırsatçı bir patojen olan *P. aeruginosa*, konağını enfekte edebilmesi için konakçı hücrenin zayıf olması gereklidir (Pier ve Ramphal 2005). Kistik fibrozis (CF) hastalığına sahip kişilerde morbidite ve mortalitenin ana nedeni olduğu için özellikle önemlidir. Çeşitli antibiyotiklere kendinden dirençli iken hastaneye yatırılan hastaları etkileyen nozokomiyal patojenlerden biri olduğu için özellikle önemlidir (Moradali ve diğ. 2017).

3.5.1 Morfolojisi

Pseudomonas aeruginosa değişik uzunluklara sahip 1,5-3 µm genişliğinde, bazen ikili, bazen de kısa zincirler şekiinde görülen spor yapmayan, kapsülü olmayan, çubuk şekilli, kolay boyanabilen, Gram negatif ve aerob bakteridir. Genellikle bir ucundan bir, nadiren iki-üç tane kirpiğe sahiptir ve çok hareketli bir yapısı vardır. Uzun zamandır beklemiş kültürler ve antiseptik maddelerin olduğu ortam içerisinde kısa veya çok uzun deforme şekilleri, hareketsiz ve pigmentsiz olanlarının, R (rough) tipinde üreyenlerin bulunduğu gözlemlenmiştir (Davis ve diğ. 1968).

4. YÖNTEM

Bu tez konusu kapsamında, gram pozitif ve gram negatif bakterilerden alacağımız 4 farklı bakteri türünün (*Bacillus Subtilis*, *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia Coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*) uygun kültür koşullarında hazırlanacak ve bu bakteri türlerinin sitrik asit, gallik asit ve tannik asit kaplı gümüş nanoparçacıklara olan dirençlerini incelenecektir. Gallik asit, tannik asit ve sitrik asit grupları ile donatılmış parçacıkların sentezi AgNO_3 'ün NaBH_4 varlığında indirgemesi ile gerçekleştirilecektir. Ortam pH'nın kontrolü ile farklı boyutlarda parçacıklar sentezlenecektir (7-30 nm aralığında). Sentezlenmiş olan parçacıklar TEM, UV-Vis ve ZETA ile karakterize edilip saflaştırıldıktan sonra, antibakteriyel etkilerinin incelenmesi için konsantrasyonu bilinen çözeltiler haline getirilecektir. Bu çözeltilerden elde edeceğimiz farklı konsantrasyondaki çözeltileri kullanarak, bakteri suşları üzerindeki etkileri incelenecek ve bu inceleme işlemi sonucunda minimum indigeyici konsantrasyonlar belirlenecektir. Bu ön çalışmalar sonrasında, farklı yüzey ligand gruplarına sahip gümüş nanoparçacıkların sentezlenmesine geçilecek ve bu yeni parçacıkların antibiyotiğe karşı direnci olan bakteri türeri üzerindeki etkileri incelenecektir.

4.1 Gümüş Nanoparçacıkların Sentezi

4.1.1 7 nm Gallik Asit (GA) kaplı AgNP sentezi

0.001 M AgNO_3 , 100 mL saf su içerisinde hazırlanır ve bu çözelti içerisine 10 mL saf suda çözdürülmüş olan 0.01 g gallik asit içeren çözelti eklenir. Bu iki çözelti karıştırıldıktan hemen sonra, pH 1.0 M'lik NaOH çözeltisi kullanılarak 11'e getirilir. Kısa bir süre manyetik karıştırıcı ile karışım karıştırıldıktan sonra alınarak, 10000 rpm'de 30 dk santrifüjlenerek, nanoparçacıkların saflaştırılması tamamlanmış olur. Dibe çökmüş olan çözeltiler, 2 mL saf suda çözdürülerek, +4 °C'de analiz öncesine kadar saklanır (Castano'n ve diğ.).

4.1.2 29 nm Gallik Asit (GA) kaplı AgNP sentezi

7 nm Gallik asit kaplı AgNP sentezine benzer şekilde, 29 nm boyutlu parçacığın sentezi için, 0.0169 g AgNO₃, 100 mL saf su içerisinde çözündürülür. 0.01 g gallik asit, 10 mL saf su içerisine koyulup, daha sonra gümüş nitrat çözeltisinin içerisine eklenir. Karışımın pH'ı, 7.7M NH₄OH çözeltisi kullanılarak, 10'a getirilir ve bir süre manyetik karıştırmaya bırakılır. Kısa bir süre manyetik karıştırıcı ile karışım karıştırıldıktan sonra alınarak, 10000 rpm'de 30 dk santrifüjlenerek, nanoparçacıkların saflaştırılması tamamlanmış olur. Dibe çökmüş olan çözeltiler, 2 mL saf suda çözündürülerek, +4 °C'de analiz öncesine kadar saklanır. (Castano'n ve diğ.)

4.1.3 8 nm Sitrik Asit (SA) kaplı AgNP sentezi

220 mL saf su içerisinde 0.20 mmol AgNO₃ ve 0.62 mmol Trisodyumsitrat(TSC) çözündürülür. Daha sonra bu karışımın içerisindeki gümüşün indirgenerek nanoparçacıkları oluşturması adına, 0.2M NaBH₄ çözeltisi hazırlanıp bu çözelti içerisinde her seferinde 20 mikrolitre hacimde porsiyonlar alınarak, 10 sn aralıklarla çözeltisinin içerisinde toplamda 72 mikromol olacak şekilde, manyetik karıştırma altında eklenir. Son porsiyonda eklendikten sonra, karışım 5 dk oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra 12,000 rpmde 15 dakika santrifüjlenerek parçacıklar elde edilir. Santifirüj kabı dibine çöken nano gümüş parçacıkları 2 mL destile su yardımı ile mikro santifirüj tüplerine alınıp analize kadar +4 °C buzdolabında saklanır. (Agnihotri ve diğ. 2014)

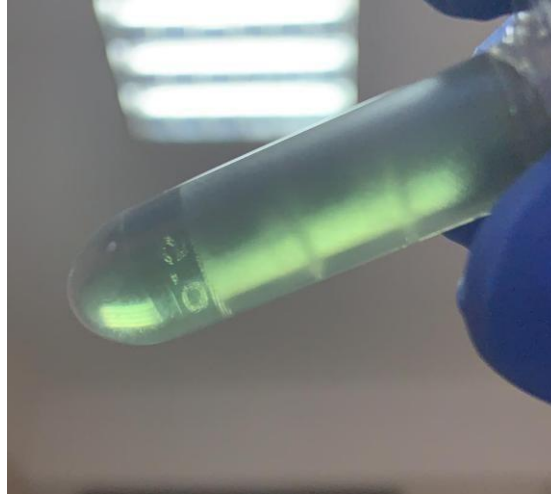
4.1.4 30 nm Sitrik Asit (SA) kaplı AgNP sentezi

30 nm sitrik asit kaplı nano gümüş parçacıklar elde etmek için öncelikle 4x10⁻³ M AgNO₃ çözeltisi hazırlanır. Eş zamanlı olarak bir beher içerisinde, 1x10⁻³ M NaBH₄ ve 3.55x10⁻³ M Trisodyumsitrat içeren bir çözelti hazırlanır. Beher içerisindeki karışım, sıcaklığı 60 °C'de sabit olacak şekilde ısıtılmaya başlanır ve bu sıcaklıkta karışım 30 dk tutulur. 30 dk'nın sonunda, 5:45 oranında AgNO₃:(TSC-NaBH₄) olacak şekilde AgNO₃ çözeltisi damla damla karışım içerisine aktarılır. Son

damla da eklendikten sonra, karışımın sıcaklığı, 90 °C'ye çıkarılır. Karışımın sıcaklığı 90 °C 'ye geldikten sonra, karışımın pH'ı 0.1 M'lık NaOH çözeltisi kullanılarak 10.5'e getirilir ve renk değişimi gözlenene kadar 90 °C sıcaklıkta 20 dk boyunca ısıtılmaya devam edilir. Renk değişiminin gözlemlenmesi ile elde edilmiş olan parçacıklar, çözeltinin oda sıcaklığına kadar soğutulması sonrasında, santrifüjlenere çöktürülür. Santifirüj kabı dibine çöken nano gümüş parçacıkları 2 mL destile su yardımı ile mikro santifirüj tüplerine alınıp analize kadar +4 °C buzdolabında saklanır (Agnihotri ve diğ. 2014).

Partikül Boyutu	Gümüş Nitrat (mol dm ⁻³)	Sodyum Borohidrid (mol dm ⁻³)	Trisodyum sitrat (mol dm ⁻³)	Reaktanların hacmi (ml)	pH	Sıcaklık (T ⁻ -T ⁰) (°C)	Verim (%)	Parçacık Konsantrasyonu (ml başına)
7	1.00 × 10 ⁻⁰³	2.00 × 10 ⁻⁰³	3.55 × 10 ⁻⁰³	x48y2	10.5	60-90	67.4	3.31 × 10 ¹⁴
30	4.00 × 10 ⁻⁰³	1.00 × 10 ⁻⁰³	3.55 × 10 ⁻⁰³	x45y5	10.5	60-90	70.5	1.71 × 10 ¹³

Şekil 4.1: Farklı büyüklükteki gümüş nanoparçacıkların sentezi için tasarım koşulları



Şekil 4.2: 30 nm Sitrik Asit Kaplı Nanogümüş Çözeltisi

4.1.5 7 nm Tannik Asit(TA) kaplı AgNP sentezi

19.5 mL, 0.05 mmol TA çözeltisi, 0.5 M K₂CO₃ ile pH'ı 8 olacak şekilde ayarlanır. Daha sonra bu çözelti içerisine, 0.5 mL 0.1 M AgNO₃ çözeltisi eklenerek 30 °C sıcaklıkta rengi değişene kadar ısıtılır. Renk değişimi gözlemlendikten sonra çözelti oda sıcaklığına kadar soğutulup, santrifüjlenir. Elde edilen katı, 1 mL saf su içerisine alınarak, +4 C'de saklanır (Yanzhen ve diğ. 2014).

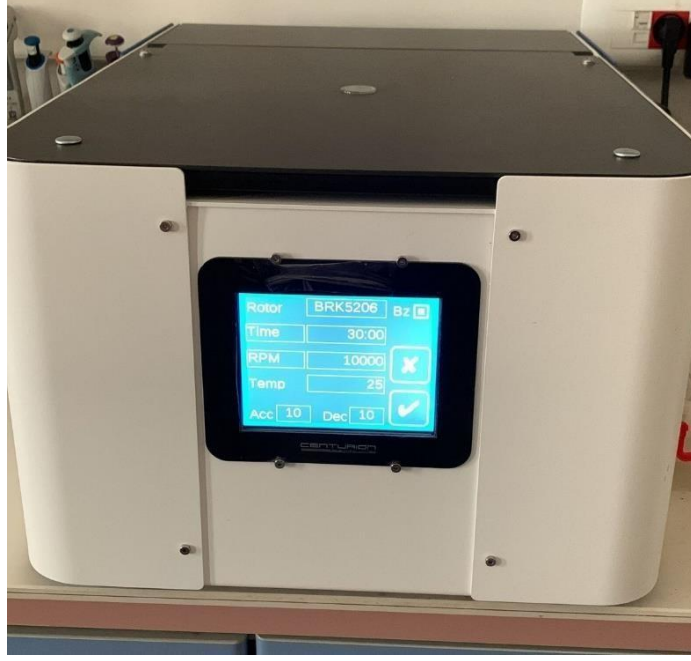
4.1.6 30 nm Tannik Asit(TA) kaplı AgNP sentezi

7 nm parçacığın sentezine benzer şekilde yine, 19.5 mL, 0.05 mmol TA çözeltisi hazırlanarak, 0.5 M K₂CO₃ ile pH'ı 6 olacak şekilde ayarlanır. 0.5 mL 0.1 M AgNO₃ çözeltisi eklenerek 30 °C sıcaklıkta rengi değişene kadar ısıtılır. Renk değişimi gözlemlendikten sonra çözelti oda sıcaklığına kadar soğutulup, santrifüjlenir. Elde edilen katı, 1 mL saf su içerisine alınarak, +4 C'de saklanır (Yanzhen ve diğ. 2014)

4.2 Nanogümüşün Antibakteriyel Ölçümü

Saflaştırılma işlemi sonrasında elde edilmiş olan çözeltilerden elde edeceğimiz farklı konsantrasyondaki çözeltileri kullanarak (0-1000 ppm aralığında), bakteri suşları üzerindeki etkileri incelenecek ve bu inceleme işlemi sonucunda minimum indigeyici konsantrasyonlar (MİK) belirlenecektir. Bu işlem için bakteriler uygun besi ortamında petri kaplarında çoğaltılacak ve bu petri kabında kuyucuklar açılarak, kuyucuklar içerisine farklı konsantrasyonlara sahip çözeltilere eklenerek zon oluşumlarına bakılarak, MİK değerleri elde edilecektir.

Antibakteriyel testler disk difüzyon metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *Escherichia Coli*, *Bacillus Subtilis*, *Staphylococcus Aureus* ve *Pseudomonas Aeruginosa* bakteri suşları antibakteriyel testler için seçilmiştir. Her bir bakterinin petri kabından büyütülmesi için gerekli kültür koşulları, Clinical Laboratory Institute standardına (Anonymous 2020, M100 | Performance Standards for Antimicrobial Suceptibility Testing, 31st Edition, Clinical Laboratory Institute) göre yapılmış ve iki gram negatif ve iki gram pozitif bakteri üzerinde tanımlanmıştır.



Şekil 4.3: Nano gümüş çözeltilerini santifirülemek amacıyla kullanılan santifirüj cihazı



Şekil 4.4: Sentezlenmiş nanogümüş çözeltileri. Soldan sağa sırasıyla 7 nm (GA) AgNP , 29 nm (GA) AgNP , 8 nm (SA) AgNP , 30 nm (SA) AgNP , 8 nm (TA) AgNP , 30 nm (TA) AgNP

4.3 Nanoparçacıkların Karakterizasyonu

Nanoparçacıkların boyut karakterizasyon işlemleri sırasında, UV-Vis spektrofotometre ölçümleri ve TEM görüntülemesi kullanılmıştır. Parçacıkların yüzeyinde yer alan yüklerin bulunabilmesi için de zeta potansiyel ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümler ile birlikte parçacıkların antibakteriyel etkilerinin incelenebilmesi adına, parçacıkların konsantrasyonlarının belirlenmesi ICP-MS ölçümleri ile yapılmıştır.

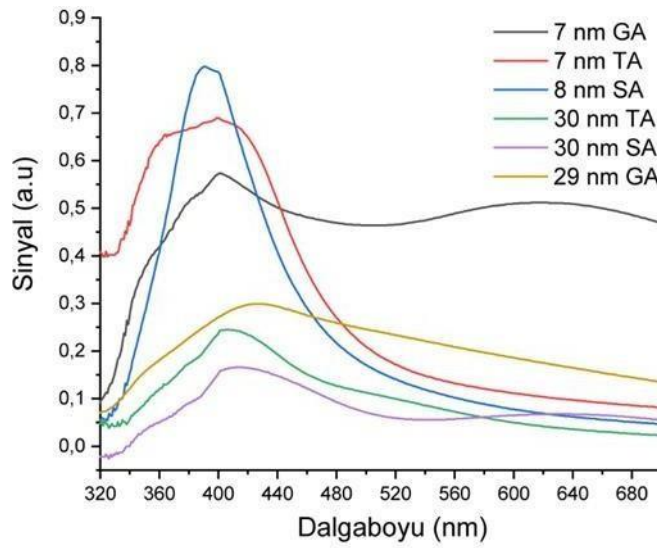
5. BULGULAR

Sentezlemiş olduğumuz gümüş nanoparçacıkların boyutlarının anlaşılması ve karakterizasyonlarının yapılabilmesi adına, sırası ile UV-Vis spektrofotometre ve TEM görüntüleme teknikleri kullanılmıştır. Parçacık yüzeylerindeki yükün anlaşılabilmesi adına Zeta potansiyel ölçümleri yapılmıştır.

5.1 UV-Vis Ölçümü

Üretilen nano gümüşlerin UV-Vis analizleri neticesinde elde edilen dalga boyları ve absorbans değerleri aşağıda gösterilmiş olup Şekil 5.1, Şekil 5.2’de verilmiştir.

İlk olarak parçacıkların boyutlarından emin olabilmek adına, UV-Vis cihazında ölçümler yapılmıştır. Bu ölçümlere ait sonuçlar Şekil 5.1’de verilmiştir.

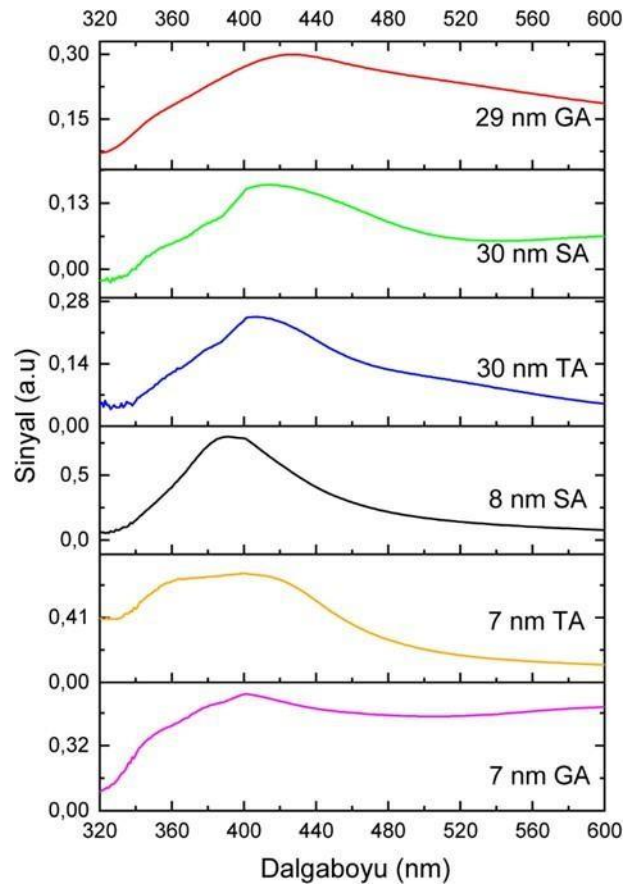


Şekil 5.1: Farklı boyuttaki ve 3 farklı yüzey gruplu parçacıkların UV-Vis spektrumlarının karşılaştırılması (GA: gallik asit, TA: tannik asit, SA: sitrik asit)

Elde edilen sonuçlar tek tek incelendiğinde (Şekil 5.2), 7 ve 8 nm boyutlarına sahip olan parçacıklara ait tepe noktasının yaklaşık olarak 390-400 nm aralığında olduğu, 29 ve 30 nm boyutların sahip olan parçacıkların ise boyutlarının 410-420 nm aralığında olduğu görülmektedir. Bu değerler literatür ile karşılaştırıldığında, 8 nm

boyutlu SA kaplı parçacığın dalgaboyununun 396 olduğu, 30 nm boyutlu parçacığın dalga boyunun da 413 olduğu göz önünde bulundurulduğunda, elde edilen sonuçların literatürde yer alan veriler ile uyumlu oluşu görülmüştür.

Yüzey kaplamalarını kendi aralarında karşılatırdığımızda ise küçük boyutlarda (7,8 nm) absorbans değeri küçükten büyüğe sırasıyla gallik asit, tannik asit, sitrik asit olduğu gözlenmiştir. Büyük boyutlarda (29,30 nm) absorbans değeri küçükten büyüğe sırayla sitrik asit, tannik asit , gallik asit olduğu gözlenmiştir.



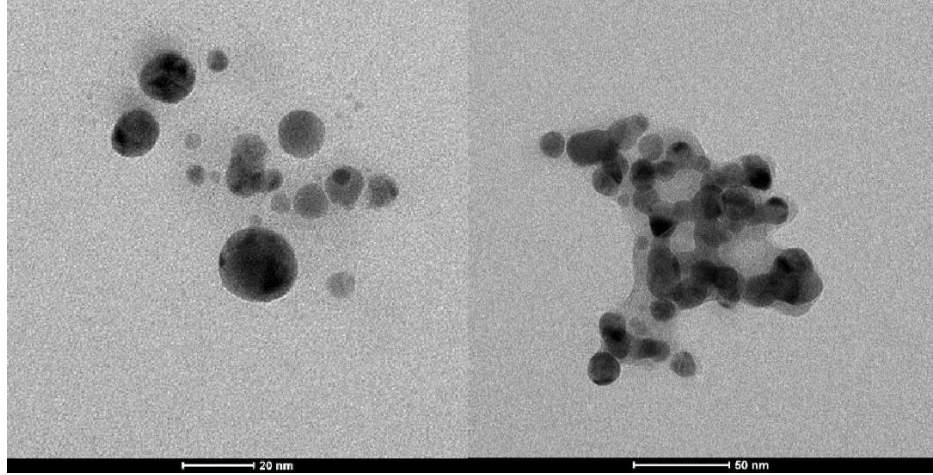
Şekil 5.2: Sentezlenen nano gümüş parçacıklarına ait spektrumların boyutlara göre karşılaştırılması

Şekil 5.1 ve Şekil 5.2’de nanoparçacıkların boyutu arttıkça absorbans değerlerinin düştüğü ve dalga boylarının yükseldiği gözlemlenmiştir.

5.2 TEM Görüntülemesi

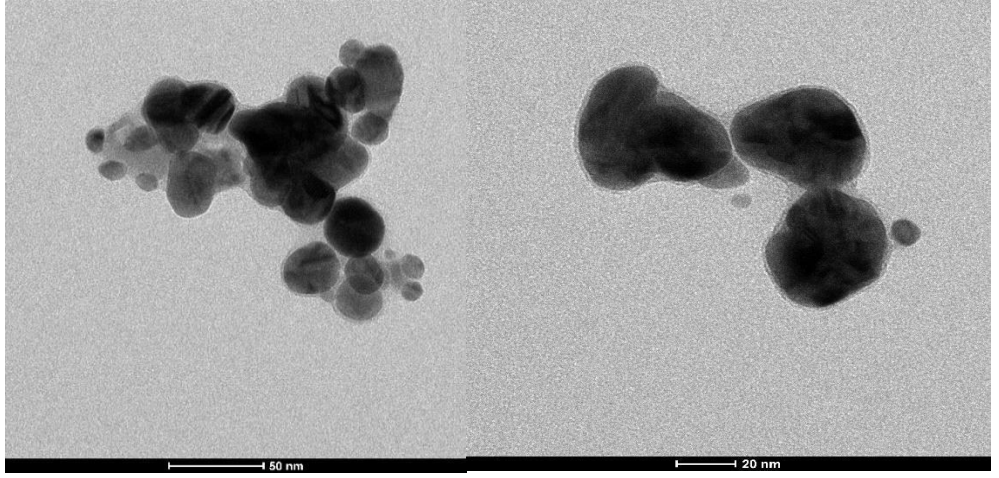
Parçacıkların boyutlarının daha net bir şekilde belirlenebilmesi adına, TEM görüntüleri ODTÜ merkez laboratuvarında gerçekleştirilmiş olup elde edilen sonuçlar, parçacık boyutlarının belirtilen değerlerde olduğunun anlaşılmasını sağlamıştır. Şekil 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8’de görülebileceği üzere, 7 ve 8 nm olan parçacıkların ve 29 ve 30 nm olan parçacıkların boyutlarının bu değerlere yaklaşık olarak uyum göstermekte olduğu görülmüştür. Ayrıca, TEM ile elde edilmiş olan görüntülerde, parçacıkların morfolojik olarak benzer olduğu (yuvarlak şekilli oldukları) görülmüştür. Parçacıkların boyutsal olarak dağılımlarının da homojen bir şekilde yer aldığı yine bu görüntülerde gözlemlenmiştir.

Üretilen nano gümüşlerin TEM analizleri neticesinde elde edilen görüntüler Şekil 5.3 , Şekil 5.4 , Şekil 5.5 , Şekil 5.6 , Şekil 5.7 ve Şekil 5.8’da verilmiştir.



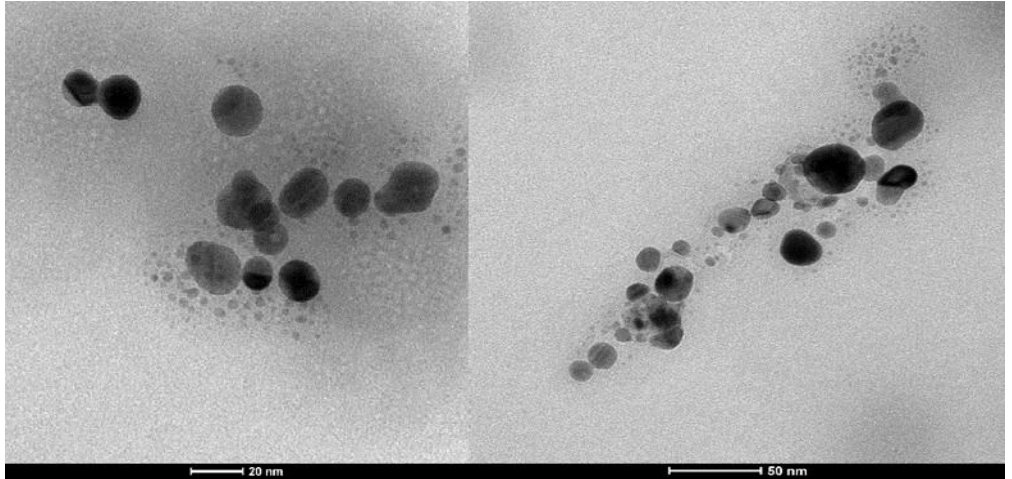
Şekil 5.3: Gallik Asit kaplı nano gümüş parçacıklarının TEM görüntüleri

(7 nm)



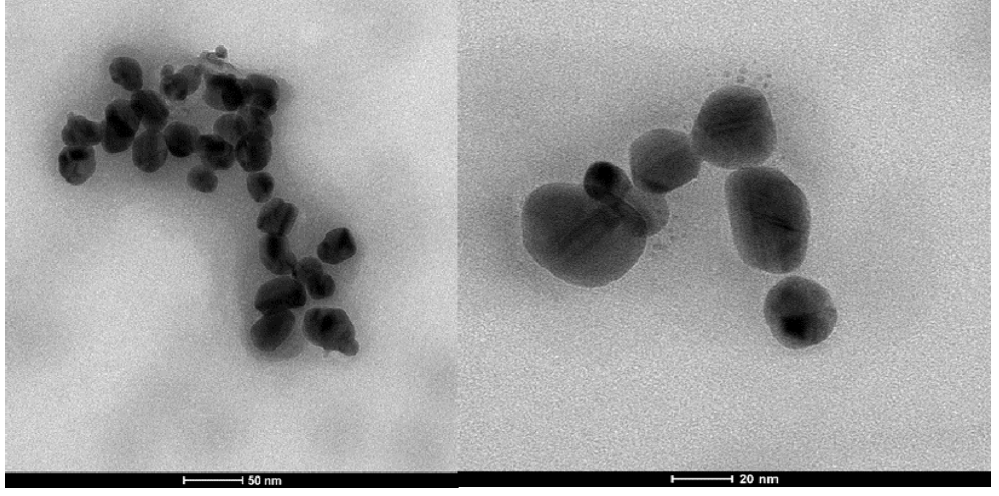
Şekil 5.4: Gallik Asit kaplı nano gümüş parçacıklarının TEM görüntüleri

(29 nm)



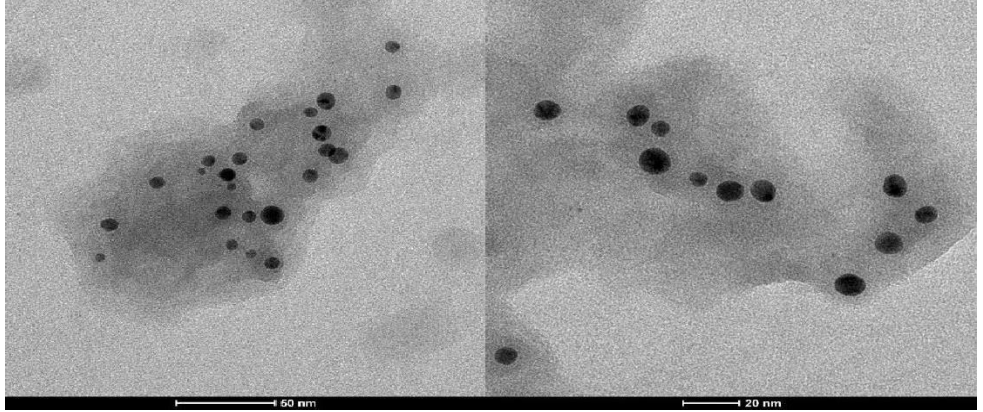
Şekil 5.5: Sitrik Asit kaplı nano gümüş parçacıklarının TEM görüntüleri

(8 nm)



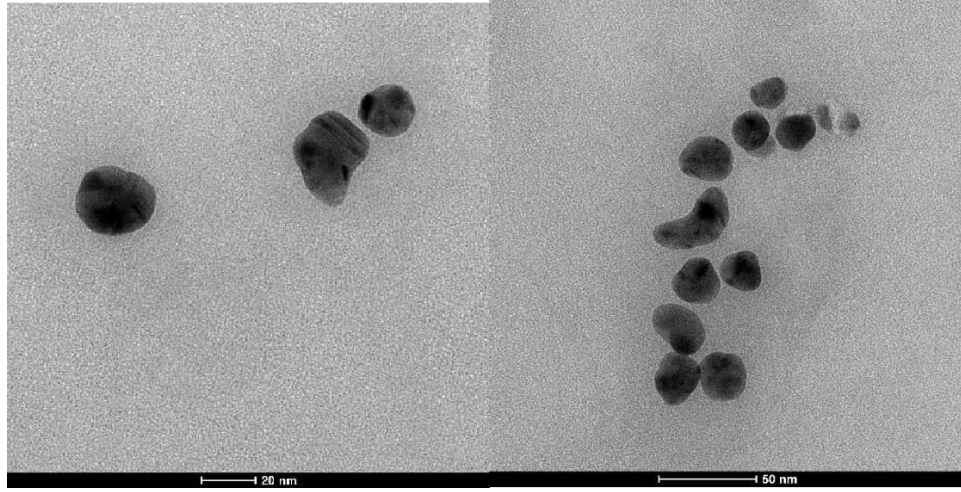
Şekil 5.6: Sitrik Asit kaplı nano gümüş parçacıklarının TEM görüntüleri

(30 nm)



Şekil 5.7: Tannik Asit kaplı nano gümüş parçacıklarının TEM görüntüleri

(8 nm)



Şekil 5.8: Tannik Asit kaplı nano gümüş parçacıklarının TEM görüntüleri

(30 nm)

5.3 Antibakteriyel Aktivite Ölçümü

TEM ve UV-Vis sonuçları ile parçacıkların boyutlarının doğrulanmasının ardından ICP-MS kullanılarak, parçacık çözeltilerinin konsantrasyonları ppm düzeyinde belirlenmiş ve bu stok çözeltiler kullanılarak 500 ppm-0 ppm aralığında, tabloda belirtilen konsantrasyonlarda parçacıklar hazırlanarak antibakteriyel etkileri incelenmiştir. Bu farklı konsantrasyonlardaki parçacıklar kullanılarak gerçekleştirmiş olduğumuz antibakteriyel sonuçlar parçacık boyutunun yanında, parçacıkların sahip oldukları yüzey kaplamalarının da antibakteriyel etkinin belirlenmesinde rol oynadığını göstermiştir. Oluşan zon miktarları mm cinsinde ölçülerek Tablo 5.1 , 5.2, 5.3, 5.4'te belirtilmiştir. Her bir bakteri türünde gözlemlenmiş olan farklılıklar tabloların altında belirtilmiştir.

Tablo 5.1'de *Escherichia coli* bakteri türüne karşı gerçekleştirilmiş olan antibakteriyel testlerdeki zon oluşum miktarları görülmektedir. Zon oluşumları Tang ve Zheng'in yaptığı çalışmalar ile kıyaslandığında, 8 mm ve altında ölçüm aldığımız değerlerdeki konsantrasyonların, antibakteriyel etki göstermediği kabul edilmektedir. Bu nedenler, 7-8 nm boyutlu parçacıklar için sırası ile, 50 ppm SA, 25 ppm TA ve

100 ppm GA kaplamalarını içeren parçacık çözeltileri antibakteriyel etki gösterebilirken, 29-30 nm'lik parçacıklar kıyaslandığında, 50 ppm SA, 250 ppm TA ve 50 ppm GA kaplamalarını içeren parçacık çözeltilerinin antibakteriyel etki gösterdiği sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar kendi içerisinde incelendiğinde parçacık boyutunun küçülmesi ile, TA kaplı parçacığının antibakteriyel etkisinde artış gözlenirken, SA kaplı parçacıkların antibakteriyel etkisinin değişmediği ve GA kaplı olan parçacıklarda ise azaldığı gözlemlenmiştir.

Tablo 5.2'de *Bacillus subtilis* bakteri türüne karşı gerçekleştirilmiş olan antibakteriyel testlerdeki zon oluşum miktarları görülmektedir. Zon oluşumları Tang ve Zheng'in yaptığı çalışmalar ile kıyaslandığında, 8 mm ve altında ölçüm aldığımız değerlerdeki konsantrasyonların, antibakteriyel etki göstermediği kabul edilmektedir. Bu nedenler, 7-8 nm boyutlu parçacıklar için sırası ile, 10 ppm SA, 50 ppm TA ve 50 ppm GA kaplamalarını içeren parçacık çözeltileri antibakteriyel etki gösterebilirken, 29-30 nm'lik parçacıklar kıyaslandığında, 100 ppm SA, 25 ppm TA ve 25 ppm GA kaplamalarını içeren parçacık çözeltilerinin antibakteriyel etki gösterdiği sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar kendi içerisinde incelendiğinde parçacık boyutunun küçülmesi ile, SA kaplı parçacığının antibakteriyel etkisinde artış gözlenirken, TA ve GA kaplı parçacıkların antibakteriyel etkisinin azaldığı gözlemlenmiştir.

Tablo 5.3'te *Staphylococcus aureus* bakteri türüne karşı gerçekleştirilmiş olan antibakteriyel testlerdeki zon oluşum miktarları görülmektedir. Zon oluşumları Tang ve Zheng'in yaptığı çalışmalar ile kıyaslandığında, 8 mm ve altında ölçüm aldığımız değerlerdeki konsantrasyonların, antibakteriyel etki göstermediği kabul edilmektedir. Bu nedenler, 7-8 nm boyutlu parçacıklar için sırası ile, 50 ppm SA, 50 ppm TA ve 50 ppm GA kaplamalarını içeren parçacık çözeltileri antibakteriyel etki gösterebilirken, 29-30 nm'lik parçacıklar kıyaslandığında, 50 ppm SA, 50 ppm TA ve 25 ppm GA kaplamalarını içeren parçacık çözeltilerinin antibakteriyel etki gösterdiği sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar kendi içerisinde incelendiğinde parçacık boyutunun küçülmesi ile, TA ve SA kaplı parçacıklarda antibakteriyel etkide herhangi bir değişimin olmadığını gözlemlenirken, GA kaplı parçacıkların antibakteriyel etkisinin parçacık boyutu küçüldüğünde azaldığı görülmüştür.

Tablo 5.4'te *Pseudomonas aeruginosa* bakteri türüne karşı gerçekleştirilmiş olan antibakteriyel testlerdeki zone oluşum miktarları görülmektedir. Zon oluşumları

Tang ve Zheng'in yaptığı çalışmalar ile kıyaslandığında, 8 mm ve altında ölçüm aldığımız değerlerdeki konsantrasyonların, antibakteriyel etki göstermediği kabul edilmektedir. Bu nedenler, 7-8 nm boyutlu parçacıklar için sırası ile, 25 ppm SA, 25 ppm TA ve 100 ppm GA kaplamalarını içeren parçacık çözeltileri antibakteriyel etki gösterebilirken, 29-30 nm'lik parçacıklar kıyaslandığında, 100 ppm SA, 100 ppm TA ve 25 ppm GA kaplamalarını içeren parçacık çözeltilerinin antibakteriyel etki gösterdiği sonucuna varılmıştır. Bu sonuçlar kendi içerisinde incelendiğinde parçacık boyutunun küçülmesi ile, SA ve TA kaplı parçacığının antibakteriyel etkisinde artış gözlenirken, GA kaplı parçacıkların antibakteriyel etkisinin parçacık boyutunun küçülmesi ile azaldığı gözlemlenmiştir.

Tablo 5.1: *Escherichia coli* bakterisine karşı nanoparçacıkların oluşturduğu zonların ölçümleri

Parçacık Boyutu	500 ppm		250 ppm		100 ppm		50 ppm		25 ppm		10 ppm		5 ppm		1 ppm		0 ppm	
8 nm SA	2	2	1	1	1	1	1	1	8	4	N	N	N	N	N	N	N	N
	6	4	8	6	8	4	1	0			D	D	D	D	D	D	D	D
30 nm SA	1	1	1	1	8	8	8	6	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	4	4	4	1					D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
7 nm GA	1	1	1	9	1	7	6	2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	5	4	1		0				D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
29 nm GA	2	2	1	1	1	1	1	8	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	6	1	8	8	4	1	1		D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
7 nm TA	2	2	1	1	1	1	1	1	1	9	4	6	2	4	N	N	N	N
	4	3	9	5	6	8	1	0	4						D	D	D	D
30 nm TA	1	8	8	4	2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	2					D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

7-8 nm'lik parçacıklar kıyaslandığında, SA 50 ppm, TA 25 ppm, GA 100 ppm

29-30 nm'lik parçacıklar kıyaslandığında, SA 50 ppm, TA 250 ppm, GA 50 ppm

Tablo 5.2: *Bacillus subtilis* bakterisine karşı nanoparçacıkların oluşturduğu zonların ölçümleri

Parçacık Boyutu	500 ppm		250 ppm		100 ppm		50 ppm		25 ppm		10 ppm		5 ppm		1 ppm		0 ppm	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
8 nm SA	2	2	2	2	1	1	1	1	8	8	8	7	N	N	N	N	N	N
	8	6	2	9	7	3	5	4					D	D	D	D	D	D
30 nm SA	2	1	1	1	1	8	6	6	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	1	6	8	4	2				D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
7 nm GA	1	1	1	1	1	1	8	6	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	7	4	1	3	1	0			D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
29 nm GA	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	6	4	N	N	N	N	N	N
	6	4	0	0	8	6	4	6	1	2			D	D	D	D	D	D
7 nm TA	2	2	1	1	1	1	8	1	6	4	N	N	N	N	N	N	N	N
	8	6	9	4	6	2		0			D	D	D	D	D	D	D	D
30 nm TA	2	2	1	1	1	1	1	1	8	8	6	4	N	N	N	N	N	N
	1	1	5	6	2	4	2	1					D	D	D	D	D	D

7-8 nm'lik parçacıklar kıyaslandığında, SA 10 ppm, TA 50 ppm, GA 50 ppm

29-30 nm'lik parçacıklar kıyaslandığında, SA 100 ppm, TA 25 ppm, GA 25 ppm

Tablo 5.3: *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı nanoparçacıkların oluşturduğu zonların ölçümleri

Parçacık Boyutu	500 ppm		250 ppm		100 ppm		50 ppm		25 ppm		10 ppm		5 ppm		1 ppm		0 ppm	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
8 nm SA	2	2	2	1	1	1	9	8	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	8	3	1	8	6	4			D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
30 nm SA	2	2	1	1	1	1	1	8	6	4	N	N	N	N	N	N	N	N
	4	1	9	8	4	1	0				D	D	D	D	D	D	D	D
7 nm GA	1	1	1	9	1	7	1	8	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	7	6	4		0		0		D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
29 nm GA	2	2	1	1	1	1	1	1	6	8	2	4	N	N	N	N	N	N
	6	1	8	6	4	3	1	2					D	D	D	D	D	D
7 nm TA	2	2	1	1	1	1	8	6	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	8	9	6	4	0	1			D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
30 nm TA	2	2	1	1	1	1	1	8	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	4	1	4	6	4	1	0		D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

7-8 nm'lik parçacıklar kıyaslandığında, SA 50 ppm, TA 50 ppm, GA 50 ppm

29-30 nm'lik parçacıklar kıyaslandığında, SA 50 ppm, TA 50 ppm, GA 25 ppm

Tablo 5.4: Pseudomonas aeruginosa bakterisine karşı nanoparçacıkların oluşturduğu zonların ölçümleri

Parçacık Boyutu	500 ppm		250 ppm		100 ppm		50 ppm		25 ppm		10 ppm		5 ppm		1 ppm		0 ppm	
8 nm SA	2	2	2	1	1	1	8	6	4	8	N	N	N	N	N	N	N	N
	4	3	0	8	6	4					D	D	D	D	D	D	D	D
30 nm SA	1	1	1	1	1	8	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	6	4	2	0	0		D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
7 nm GA	1	1	1	1	8	6	4	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	4	6	3	1			D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
29 nm GA	1	2	1	1	1	1	1	1	6	8	N	N	N	N	N	N	N	N
	8	1	7	9	5	6	1	4			D	D	D	D	D	D	D	D
7 nm TA	2	2	1	1	1	1	1	1	8	8	N	N	N	N	N	N	N	N
	2	0	8	4	8	6	0	2			D	D	D	D	D	D	D	D
30 nm TA	1	1	1	1	8	1	6	6	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	8	6	4	1		1			D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

7-8 nm'lik parçacıklar kıyaslandığında, SA 25 ppm, TA 25 ppm, GA 100 ppm

29-30 nm'lik parçacıklar kıyaslandığında, SA 100 ppm, TA 100 ppm, GA 25 ppm

Tablo 5.5: Parçacık yükleri ile bakteri türlerine karşı oluşan antibakteriyel etkilerin karşılaştırılması

Parçacıkların yük durumu (negatiflik seviyesi)	<i>Escherichia coli</i> (Gram negatif)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gram negatif)	<i>Bacillus subtilis</i> (Gram pozitif)	<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram pozitif)
7 nm TA (düşük)	25 ppm	25 ppm	50 ppm	50 ppm
8 nm SA (orta)	50 ppm	25 ppm	10 ppm	50 ppm
7 nm GA (yüksek)	100 ppm	100 ppm	50 ppm	50 ppm
30 nm TA (düşük)	250 ppm	100 ppm	25 ppm	50 ppm
30 nm SA (orta)	50 ppm	100 ppm	100 ppm	50 ppm
29 nm GA (yüksek)	50 ppm	25 ppm	25 ppm	25 ppm

Tablo 5.5'teki sonuçlar iki sınıfta değerlendirilmektedir. İlk olarak her bir bakterinin kendi içerisinde parçacıkların yükünün etkisini incelediğimiz zaman, genel eğilimin küçük boyutlu parçacıklar için (7-8 nm) negatif yük azaldıkça, parçacıkların

göstermiş olduğu antibakteriyel etkinin arttığı görülmektedir. Büyük parçacıklar için ise (29-30 nm), parçacık yüzeyindeki negatif yükün artması ile, antibakteriyel etkinin arttığı gözlemlenmektedir. Bakterilerin gram negatif veya gram pozitif olmalarının yaratmış olduğu etkiye bakıldığında ise, gram negatif bakterilerde parçacık boyutunun küçülmesi ve negatif yükün azalması ile antibakteriyel etkide artış sağlanırken, gram pozitif bakterilerde parçacık boyutu ve yükten bağımsız bir şekilde antibakteriyel yanıt verdikleri gözlemlenmektedir.

4 farklı bakteriye karşı bu 6 farklı nanoparçacığın göstermiş olduğu antibakteriyel etkiye bakıldığında, genel eğilimin parçacık boyutunun küçülmesi ile artış gösterdiğini söyleyebilmek mümkündür. Daha da ayrıntılı olarak, parçacıkların antibakteriyel etkilerindeki eğilimin nasıl gerçekleştiğini anlamak adına, parçacıklara ait, zeta potansiyel ölçümleri gerçekleştirilerek, parçacıkların yüzeyin yer alan yüklerin belirlenmesi sağlanmıştır. Bu sonuçlardan elde edilen veriler Tablo 5.6 'da gösterilmektedir.

5.4 ZETA Potansiyeli Ölçümü

Tablo 5.6: Sentezlenmiş nanoparçacıkların zeta potansiyel değerleri (n=3, tüm değerler mV cinsindedir)

7 nm GA	7 nm TA	8 nm SA	29 nm GA	30 nm TA	30 nm SA
-34.33 ± 0.97	-0.63 ± 0.1	-22.7 ± 2.82	-26.83 ± 0.72	-0.38 ± 0.33	-13.1 ± 2.13

Tablo 5.6 'da gösterildiği üzere, GA kaplı parçacıkların en yüksek negative yüke sahip olduğu ve bunu sırası ile SA ve TA kaplı parçacıkların takip ettiği görülmektedir. TA kaplı olan nanoparçacıkların zeta potansiyellerine bakılarak, yüksüz (nötr) bir parçacık olduğu bile söylenebilir. Bu veriler ile antibakteriyel testler ilişkilendirildiğinde, parçacık yükü ile bakterilerde görülen antibakteriyel davranışlar Tablo 5.5 'te gösterilmiştir.

6. SONUÇ

Bu tez çalışmasında, gümüş nanoparçacıkların antibakteriyel mekanizmalarını göstermekte ve ayrıca yüzey kimyası, boyut ve şekil dahil olmak üzere farklı yapısal faktörlerin, daha güçlü gümüş nanoparçacık bazlı antibakteriyel ajanların gelecekteki gelişimini desteklemesi beklenen antibakteriyel aktivitelerini nasıl etkilediğini açıklamaktadır.

Sonuç olarak bu çalışma kapsamında 6 adet gümüş nanoparçacık 2 farklı boyutta ve üç farklı yüzey kaplaması ile sentezlenmiş ve bu parçacıkların antibakteriyel etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında genel eğilimin parçacık boyutunun küçülmesi ile antibakteriyel etkinin arttığı yönünde olduğu görülmüş ve bu sonuç literatür ile kıyaslandığında benzer olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak, bakteri türünün gram negatif veya gram pozitif olmasının getirdiği farklılık nedeniyle, parçacıkların antibakteriyel etkilerinin değiştiği ve gram negatif türler için parçacık boyutunun küçültülmesinin etkinin arttığı yönünde sonuca varılabilirken, aynı sonucun gram pozitif bakterilerde çıkmadığı gözlemlenmiştir. Literatürde böyle bir sonuca rastlanmamış olup, bu sonuçların literatüre kazandırılması sağlanacaktır.

Bir başka farklı elde edilmiş sonuç ise, çoğu çalışmada negatif yüklü parçacıklar ile pozitif yüklü parçacıklar karşılaştırıldığında, pozitif yüklü parçacıkların daha etkili bir antibakteriyel etkisi olduğundan söz edilirken, bu çalışmada özellikle gram pozitif bakterilerde nötr ve yüksek negatif yüke sahip parçacıkların antibakteriyel etki göstermesi şaşırtıcıdır. Bu anlamda da literatürde görülmemiş bir etki görüldüğü gibi, yine gram negatif bakteri türleri için literatürde görülen parçacık yüzeyindeki pozitif yükün artması ile parçacığın göstermiş olduğu antibakteriyel etkideki artışında görülmesi mümkündür.

7. TARTIŞMA

Yapılan ölçümlerde nanoparçacıkların yüzey kaplamasının ve boyutunun antibakteriyel etkisini değiştirdiği gözlemlenmiştir. Daha küçük nanoboyutların antibakteriyel etkisi daha büyük nanogümüşlere göre daha iyi antibakteriyel etki gösterdiği kanıtlanmıştır.

Nanogümüşü diğer metalik nanoparçacıklardan ayıran özelliği toksik olmamasıdır. Bu sayede sağlık, tekstil ve gıda endüstrisinde geliştirilerek kullanılabilir. Bu tezde yapılmış olan nanoparçacıkların antibakteriyel etkisi ile ilgili çalışmalar ileride yapılacak çalışmalara ışık tutacaktır. Bu bilgiler ışığında, nano gümüşün çeşitli etki mekanizmalarına ve hedef mikroorganizmaya yönelik uygun antibiyotik kombinasyon çalışmaları yapılarak, kombinasyondaki ajanların uygun dozları bulunup geliştirilerek, bakteri dirençli mikroorganizmaların tedavisine olanak sağlanabilir.

Antibakteriyel aktivite dağılım ve kimyasal kararlılığa ek olarak, nanoparçacığın boyutu ve şekli ile de yüksek ilişkilidir. Baker ve arkadaşları tarafından ortalama 15 ve 75 nm iki farklı AgNP'lerin E.coli bakterisi üzerinde antibakteriyel etki çalışmaları yapılmıştır. Sonuçların daha küçük boyutlu (15 nm) AgNP'lerin E. coli hücrelerine karşı daha yüksek antibakteriyel aktivite sergilediğini ortaya koyması yaptığımız çalışmadaki boyut farkından kaynaklanan antibakteriyel değişimi destekler niteliktedir (Baker ve diğ. 2005).

Helmlinger tarafından yapılan çalışmalarda da nanoküre , nanoplatelet i nanoçubuk ve nanoküp çalışmalarında nanoküreler nanoplateletlerden sonra en yüksek antibakteriyel etki gösteren şekil olması da çalışmamızda elde edilen küresel nanoparçacıkların antibakteriyel kalitesini destekler niteliktedir (Helmlinger 2016).

Özetle, gümüş nanomalzemelerin geniş spektrumlu antimikrobiyal özellikleri iyi bilinmektedir ve bir çok mikrobiyal tedavide kullanılmaktadır. AgNP'ler boyut, şekil ve yüzey kimyası bakımından oldukça çeşitli olduğundan, bu yapısal faktörlerin antibakteriyel aktivitelerini nasıl etkilediğine dair kapsamlı anlayışlar, biyomedikal uygulamalarını daha da genişletmeye yardımcı olacaktır.

8. KAYNAKÇA

Abbaszadegan, A., Ghahramani, Y., et al., “The Effect of Charge at the Surface of Silver Nanoparticles on Antimicrobial Activity against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria: A Preliminary Study” , *J. Nanomater.*, 8, (2015).

Acharya D., Singha K. M., Pandey P., Mohanta B., Rajkumari J., Singha L.P., “Shape dependent physical mutilation and lethal effects of silver nanoparticles on bacteria” *Sci Rep.*, 8(1), 201 ,(2018).

Agnihotri, S., Mukherji, S., Mukherji, S., “Size-controlled silvernanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy” , *RSC Adv.* , 4, 3974, (2014).

Akter, S.; Huq, MA ., “Biologically rapid synthesis of silver nanoparticles by *Sphingobium* sp. MAH-11T and their antibacterial activity and mechanisms investigation against drug-resistant pathogenic microbes” , *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 48, 672–682, (2020).

Aminov, R I., “Front. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future” , *Microbiol.*, 1, 134,(2010).

Ayhan K., “Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları” , *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü* 37-81. Ankara , (2000).

Baker, C., Pradhan, A., Pakstis, L., Pochan, D. J., Shah, S. I., “Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles” *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 5, 244, (2005).

Benli, B., “Nanoteknoloji ve antik çağlara uzanan killi nanoyapılar” , *Kil Bilimi ve Teknolojisi Dergisi (Kibited)*, 1(3), 143–162, (2008).

Bilge, F., Karaboz, İ., “İzmir’de Piyasada Açıkta Satışa Sunulan Bazı Gıdaların *Staphylococcus aureus* ve Enterotoksinleri Bakımından İncelenmesi” , *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 6(3) , Sayı: 06, 6, (2005).

Bilgin, Y., “Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii ve Staphylococcus aureus suşlarında çeşitli aminoglikozidlerin duyarlılıklarının araştırılması” Uzmanlık Tezi, Haseki eğitim ve araştırma hastanesi, enfeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyoloji kliniği, (2006).

Bragg, P. D., Rainnie, D. J., “The effect of silver ions on the respiratory chain of Escherichia coli”, *Can. J. Microbiol.*, 20, 883, (1974).

Buchanan, R., E., AND Gibbons, N., E., “Bergeys manual of determinative bacteriology”, *The Williams Company*, 8, 12146, Baltimore, (1974).

Chen, X., Schluesener, H.J., “Nanosilver: a nanoparticle in medical application”, *Toxicology Letters*, 176, 1-12, (2008).

Choi, O., Hu, Z., “Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria”, *Environ. Sci. Technol.*, 42, 4583, (2008).

CHOPRA, I., “The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: A useful development or a cause for concern”, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 587-590, (2007).

CLEMENT, J.L., JARRETT, P.S., “Antibacterial silver”, *Met Based Drugs*, 1(5-6):467-482, (1994).

Creighton, J. A., Blatchford, C. G., Albrecht, M. G., “Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength” *Journal of the Chemical Society*, 75, 790, (1979)

Crerar, B. “The lycurgus cup: Transformation in glass” [online], (2014).

Crofts T. S., Gasparini A. J., Dantas G., “Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome”, *Nat Rev Microbiol*, 15(7), 422-434 (2017).

Davis D.B., Dulbecco R., Eisen H., Ginsberg H.S., Wood W.B., “Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie”, *Microbiology*, 774, 756-757, (1968).

Dibrov, P., Dzioba, J., Gosink, K. K., Häse, C. C., "Chemiosmotic Mechanism of Antimicrobial Activity of Ag⁺ in *Vibrio cholerae*" , *Antimicrob. Agents Chemothe*, 46, 2668, (2002).

Dos Santos, C.A., Seckler, M.M., Ingle, A.P., Gupta, Í., Galdiero, S., Galdiero, M., Gade, A., Rai, M., "Silver nanoparticles: therapeutical uses, toxicity, and safety issues", *J. Pharm. Sci.* , 103 , 1931–1944, (2014).

Duncan, T.V., "Applications Of Nanotechnology In Food Packaging And Food Safety: Barrier Materials, Antimicrobials And Sensors", *J Colloid Interface Sci* 363(1),1-24, (2011).

Durán, N., Marcato, PD., Alves, OL., De Souza,GIH. ve Esposito, E., "Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains", *Journal of Nanobiotechnology* , 3 (8), 2005

Durán, N., Nakazato, G., and Seabra, A. B., "Antimicrobial activity of biogenic silver nanoparticles, and silver chloride nanoparticles: an overview and comments", *Journal of Nanobiotechnology*, 100 (15), 6555-6570, (2016).

El-Naggar, NE., Hussein, MH., El-Sawah, AA., "Bio-fabrication of silver nanoparticles by phycocyanin, characterization, in vitro anticancer activity against breast cancer cell line and in vivo cytotoxicity", *Science* , 7 , (2017).

Erdoğan, E., "Fonksiyonel Nano Metal ve Komplekslerin Sentezi", Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,(2011).

Fayaz, A. M., Balaji, K., Girilal, M., Yadav, R., Kalaichelvan, P. T., & Venketesan, R., "Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria", *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(1), 103-109, (2010).

Feng, Q.L., Wu, J., Chen, G.Q., Cui, F.Z., Kim, T.N., Kim, J.O., "A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*," , *J Biomed Mater Res*, 52,662-668, (2000).

Fleming, Br., “On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. Influenza”, *Exp. Pathol* , 10, 226 ,(1929).

Walker, B., Barrett, S., Polasky, S., Galaz, V., et al., “Environment” , *Science*, 325, 1345–1346,(2009).

Frens, G.; Overbeek, J. T. “Carey Leas colloidal silver”, *Kolloid Z. Polym.* ,233 (1-2), 922, (1969).

FRITZE, D., and PUKALL, R., “Reclassification of Bioindicator Strains Bacillus subtilis DSM 675 and Bacillus subtilis DSM 2277 as Bacillus atrophaeus”, *Int J Syst Evol Microbiol*, 51, 35–37, (2001).

Fung, M. C.; Bowen, D. L., “Silver Products for Medical Indications: Risk-Benefit Assessment “ *Clin. Toxicol.*, 34 (1),119–126, (1996).

Gabriel-Alejandro M., Nereyda N., “Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes”, *Journal of Nanoparticle Research* 10(8),1343-1348, (2008).

Gottschalk, F.; Scholz, R. W.; Nowack, B. “Probabilistic material flow modeling for assessing the environmental exposure to compounds: Methodology and an application to engineered nano-TiO₂ particles” , *Environ Modeling Software* ,25, 320–332, (2010)

Gurunathan, S., Kalishwaralal, K., Vaidyanathan ,R., et al., " Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using Escherichia coli", *Colloids Surf B Biointerfaces*,74 (1), 328–335, (2009).

Gwynn, R.L., “A World Compendium. The Manual of Biocontrol Agents.”, BCPC(British Crop Production Council), , UK. 278, (2014).

Hamouda, R.A., Hüseyin, M.H., Abo-Elmagd, R.A., Bawazir, S.S., “Synthesis and biological characterization of silver nanoparticles derived from the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*” , *Scientific Reports* , 9 , 13071, (2019).

Hart, T., Shears, P., “Tıp Mikrobiyolojisi Renkli Atlas”, Nobel Tıp Kitabevleri, (10), İstanbul, 71, (2001).

Hebeish, A., El-Rafie, M. H., . El-Sheikh, M. A., Seleem, A., and El-Naggar, M. E., "Antimicrobial wound dressing and anti-inflammatory efficacy of silver nanoparticles", *Int J Biol Macromol*, 65, 509-15, (2014).

Helmlinger, J., Sengstock C., et. al., “Silver nanoparticles with different size and shape: equal cytotoxicity, but different antibacterial effects”, *RSC Adv.* , 6, 18490, (2016).

Holt, K. B., Bard, A. J., “Interaction of silver(I) ions with the respiratory chain of Escherichia coli: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag⁺”, *Biochemistry* , 44, 13214 , (2005).

Hoş, A., “Antibakteriyel Nano Gümüş Katkılı Polimer Filmler” Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya Üniversitesi, (2010).

Ivask, A., ElBadawy, A., Kaweeteerawat, C., Boren, D., Fischer, H., Ji, Z., Chang, C. H., Liu, R., Tolaymat, T., Telesca, D., Zink, J. I., Cohen, Y., Holden, P. A., Godwin, H. A., “Toxicity mechanisms in Escherichia coli vary for silver nanoparticles and differ from ionic silver”, *ACS Nano* , 8, 374, (2014).

Jamkhande, P.G., Ghule, K.B., Bamer, A.H;., Kalaskar, M.G., “Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, 53, (2019).

John, E. S. *Biotechnology* ,5, University of Strathclyde, 661-672 , (2009).

Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J., Lindenmann, Tıbbi Mikrobiyoloji, 8 , 153, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, (1997).

Kulkarni, N.; Muddapur, U., “Biosynthesis of Metal Nanoparticles”, *J. Nanotechnology*, 510246, (2014).

Kvítek, L., Panáčěk, A., et al., “Effect of Surfactants and Polymers on Stability and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles (NPs)”, *J. Phys. Chem.*, 112, 5825, (2008).

Liu, X.; Yin, Y.; Gao, C. “Size-Tailored Synthesis of Silver Quasi-Nanospheres by Kinetically Controlled Seeded Growth”, *American Chemical Society*, 29, 10559, (2013).

Lok C.-N., Ho C.M., Chen R., et. al.,” Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles”, *J. Proteome Res.*, 5, (4), 916–924, (2006).

Long, Y.M., Hu, L.-G., et. al.,” Surface ligand controls silver ion release of nanosilver and its antibacterial activity against *Escherichia coli*”, *Int. J. Nanomed.*, 12, 3193, (2017).

Mahenda R., Alka Y., “Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials”, *Biotechnology Advances*, 27 (1), 76-82, (2009).

Miotto, M., et al., "Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolated from mollusks in Brazil and the United States, ", *Microbiology Open*, 8, (5), 738-739, (2019).

Moradali, M. F., Ghods, S. ve Rehm, B. H., “*Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence”, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 39, (2017).

Morones, J. R. et al., "The bactericidal effect of silver nanoparticles," *Nanotechnology*, 16 10, 2346-53, (2005).

Mulfinger, L., Solomon, S. D., Bahadory, M., Jeyarajasingam, A. V., Rutkowsky, S. A., and Boritz, C., "Synthesis and Study of Silver Nanoparticles," *Journal of Chemical Education*, 84(2), 322, (2007).

Nalwa, H. S., “Physical Properties of Nanomaterials”, *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, 10:1–46, (2007).

Natan M., Banin E., “From Nano to Micro: using nanotechnology to combat microorganisms and their multidrug resistance”, *FEMS Microbiol*, 41(3), 302-322, (2017).

Özer, Y., “Nanobilim ve Nanoteknoloji: Ülke Güvenliği / Etkinliği Açısından Doğru Modelin Belirlenmesi” Yüksek Lisans Tezi, T.C. Kara Harp Okulu, Savunma Bilimleri Enstitüsü, (2008).

Pal, S., ve et. al., “Effect of Iron Nanoparticles Synthesized by a Sol-Gel Process on *Rhodococcus erythropolis* T902.1 for Biphenyl Degradation” , *Applied and Environmental Microbiology* , 73 (6),1712-1720, (2007) .

Pelgrift R.Y, Friedman A. J, “Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1803(15), 13-14, 1803-15, (2013).

Percival, S.L., Bowler, P.G., Russel , D., “Bacterial Resistance to Silver in Wound Care” *Journal of Hospital Infection*, 60, 1-7, (2005).

Pier, G. B. ve Ramphal, R., “*Pseudomonas aeruginosa*” *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6 (2), 2587-2615 , (2005).

Putheti, S., “Application of Nanotechnology in Food, Nutraceuticals and Pharmaceuticals”[online], *e-Journal of Science & Technology (e-JST)*, 2(10):17-23, (2015).

Râpă, M., Stoica, P., Tănase, E. E., Grosu, E.ve Vlad, G., “Preparation of medical devices with antimicrobial properties”, *Journal Of Optoelectronics And Advanced Materials*, 15(7-8), 807-816, (2013).

Rai, M., Yadav, A., and Gade, A. "Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials", *Biotechnology Advances*, 27(1), 76-83, (2009).

Ramalingam, B., Parandhaman, T., Das, S. K., “Antibacterial Effects of Biosynthesized Silver Nanoparticles on Surface Ultrastructure and Nanomechanical Properties of Gram-Negative Bacteria viz. *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*”, *ACS Appl. Mater. Interfaces* , 8, 4963 ,(2016).

Reidy, B., Haase, A., Luch, A., Dawson, K. A., Lynch, I., “Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity: A Critical Review of Current Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications”, *Metaterials* , 6, 2295, (2013).

Romero-Urbina, D. G., Lara, H. H., Velázquez-Salazar, J. J., ArellanoJiménez, M. J., Larios, E., Srinivasan, A., ve Yacamán, M. J., “Ultrastructural changes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* induced by positively charged silver nanoparticles”, *Beilstein journal of nanotechnology*, 6(1), 2396-2405, (2015).

Selwal, M. K., Sarsar, V., and Selwal, K., "Biogenic synthesis, optimisation and antibacterial efficacy of extracellular silver nanoparticles using novel fungal isolate *Aspergillus fumigatus* MA", *IET Nanobiotechnology*, 10, (2016).

Sondi, B., Salopek, S., “Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria” , *J. Colloid Interface Sci.* ,275, 177 , (2004).

Soo-Hwan, K., Lee, H.S., Ryu, D.S., Choi, S.J., Lee, D.S., “Antibacterial activity of silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*” *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, 39(1), 77-85, (2011).

Sygnatowicz, M., Keyshar, K., Tiwari, A., “Antimicrobial Properties of Silverdoped Hydroxyapatite Nano-powders and Thin Films”, *Biological and Biomedical Materials*, 62, No. 7, 65-70, (2010).

Tang S., Zheng J., “Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: Structural Effects”, *Adv Healthc Mater.* 7(13) ,(2018).

Tyavambiza, C., Elbagory, A. M., Madiehe, A. M., Meyer, M., and Meyer, S., "The Antimicrobial and Anti-Inflammatory Effects of Silver Nanoparticles Synthesised from *Cotyledon orbiculata* Aqueous Extract", *Nanomaterials*, 11 (5), (2021).

Wang L., Hu C., Shao L., “The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future” *Int J Nanomedicine* 12, 1227-1249, (2017).

Wijnhoven S. W., et al., "Nano-silver—a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment," *Nanotoxicology*, 3 (2), 109-138, (2009).

Wolfgang, L., "Bottom-Up Methods for Making Nanotechnology Products" [online], (2007).

Wright, P. M., Seiple, I. B., Myers, A. G., "The Evolving Role of Chemical Synthesis in Antibacterial Drug Discovery", *German Chemical Society*, 53, 8840, (2014).

Wu M., Guo H., Liu L., Liu Y., Xie L., "Size-dependent cellular uptake and localization profiles of silver nanoparticles", *Int J Nanomedicine*, 14, 4247-4259, (2019).

Yadav, B.C., "Structure, Properties and Applications of Fullerenes", *International Journal of Nanotechnology and Applications*, 2(1):15-24, (2005).

Yang, X., Gondikas, A. P., et al., "Mechanism of silver nanoparticle toxicity is dependent on dissolved silver and surface coating in *Caenorhabditis elegans*", *Environ. Sci. Technol.*, 46, 1119, (2012).

Yanzhen, C., Rongfeng, Z., Xiaohui, J., Hong, L., Renguo, X., and Wensheng, Y., "Syntheses and characterization of nearly monodispersed, size-tunable silver nanoparticles over a wide size range of 7-200 nm by tannic acid reduction", *Langmuir* 30 (13), 3876–3882, (2014).

Yılmaz B., G., Kutlu, H., Arslan, A., Memikoğlu, O., "Yeni Bir Antibakteriyel Ajan: Daptomisin" *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 63(3), (2010).

Yula, E., ve Deveci, Ö., "Nanotıp, Mikrodizilimler Ve Klinik Mikrobiyolojide Kullanımları", *Dicle Tıp Dergisi*, 37(4):422-428, (2007).

Yun'an Q., Lin C., "Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification Technologies", *International Journal of Nanomedicine*, 13, 3311-3327, (2018).

Zeng, J.; Zheng, Y.; Rycenga, M.; Tao, J.; Li, Z.-Y.; Zhang, Q.; Zhu, Y.; Xia, Y., “Controlling the Shapes of Silver Nanocrystals with Different Capping Agents”, *American Chemical Society*, 132, 8552, (2010).