

**SU DEZENFEKSİYONUNDA KULLANILAN GÜMÜŞ VE BAKIR
NANOPARTİKÜLLERİN *IN VITRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

Mustafa Ali Noori AL FAYYADH

Yüksek Lisans Tezi

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL

(İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Sevda ER)

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Eylül 2021

ÖZET

SU DEZENFEKSİYONUNDA KULLANILAN GÜMÜŞ VE BAKIR NANOPARTİKÜLLERİN *IN VITRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

Mustafa Ali Noori AL FAYYADH

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Eylül 2021

Danışman: Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL

(İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Sevda ER)

Su canlılığın var olması için hayati öneme sahiptir. Suların artırılarak tüketiciye ulaşması, toplum sağlığını etkileyen bir konudur. Su arıtma işleminin son basamağı olan dezenfeksiyon işlemi, temiz su eldesinin en önemli basamağıdır. İşlemin amacı, içme ve kullanma sularındaki mikroorganizmaların yok edilmesidir. Suyun dezenfeksiyonunda çeşitli kimyasal ve fiziksel yöntemler kullanılmaktadır. Son zamanlarda, su dezenfeksiyonunda daha yenilikçi yöntemler aranmaktadır. Nanopartiküllerinin dezenfektan olarak kullanılmasıyla umut verici bir uygulama olarak nanopartiküller su dezenfeksiyonuyla hayatımıza girmektedir. Literatürde metal içeren nanotozlar ile çalışmalar olmasına rağmen bu çalışmada literatüre katkı olarak biyofilm ve antiadezyon engelleyici olarak metal içeren nanotozların ultrasound ile birlikte uygulaması gerçekleştirilmiştir. Çalışmada su sistemlerinde indikatör bir bakteri olan *Escherichia coli* ATCC 25922 suşuna karşı, metal içeren nano boyutlu partiküllerin ıslak kimyasal sentez yöntemiyle sentezlenen $AgNO_3$ ve $CuCl_2$ içeren nanopartiküllerinin mikrobiyolojik antibakteriyel aktiviteleri, mikrobroth dilüsyon testiyle ortaya konmuştur. Sonrasında, adezyon ve biyofilm inhibisyon testleriyle antibiyofilm aktiviteleri araştırılmıştır. Yeni bir yaklaşım olarak nanotoz maddelerin düşük frekanslı ultrasonik ortamda dalgaların, oluşan biyofilm kirlenmesi üzerindeki önleyici etkisi belirlenmiştir. Su dezenfeksiyonu sonrasında hücre kültürü çalışmalarında HaCaT (insan epidermal deri hücreleri) hücre hattı kullanılmış ve sitotoksik etkileri gösterilmiştir. Sonuç olarak; elde edilen bulgular su dezenfeksiyonu uygulamaları için sentezlenen nanopartiküllerin önemli bir alternatif olabileceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Sözcükler: Antibiyofilm, Ultrasonikasyon, Nanopartikül, Deri epitel hücre hattı (HaCaT), Sitotoksik aktivite.



ABSTRACT

IN VITRO EVALUATION OF SILVER AND COPPER NANOPARTICLES USED IN WATER DISINFECTION

Mustafa Ali Noori AL FAYYADH

Department of Advanced Technologies

Program in Biotechnology

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, September 2021

Supervisor: Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL

(Co-Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Sevda ER)

Water is vital for the existence of life. Purification of water and reaching consumer is an issue that affects public health. Disinfection, which is the last step of the water treatment process, is the most important step in obtaining clean water. The purpose of the process is the destruction of microorganisms in drinking and utility water. Various chemical and physical methods are used in the disinfection of water. Recently, more innovative methods of water disinfection are sought. As a promising application with the use of nanoparticles as disinfectants, nanoparticles enter our lives with water disinfection. Although there are studies with metal-containing nanopowders in the literature, in this study, biofilm and metal-containing nanopowders as an antiadhesion inhibitor were applied together with ultrasound as a contribution to the literature. In the study, microbiological antibacterial activities of AgNO₃ and CuCl₂ nanoparticles synthesized by wet chemical synthesis method of metal-containing nano-sized particles against *Escherichia coli* ATCC 25922 strain, which is an indicator bacterium in water systems, were revealed by microbroth dilution test. Afterwards, antibiofilm activities were investigated by adhesion and biofilm inhibition tests. As a new approach, the inhibitory effect of low-frequency ultrasonic waves of nanopowders on biofilm contamination was determined. After water disinfection, the HaCaT cell line was used in cell culture studies and its cytotoxic effects were demonstrated. As a result; the findings reveal that the synthesized nanoparticles can be an important alternative for water disinfection applications.

Keywords: Antibiofilm, Ultrasonication, Nanoparticle, Skin epithelial (HaCaT) cells, Cytotoxic activity.



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince hem akademik hem de kişisel yaşantımda bana her konuda yardımcı olan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve araştırmacı yönümü geliştirmemde en büyük katkısı olan değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL'a, ve Dr. Öğr. Üyesi Sevda ER'e,

Tez çalışmama göstermiş oldukları emek ve ayırmış oldukları değerli vakit için sayın Prof. Dr. Ali Savaş KOPARAL'a,

Tez çalışmamda değerli önerileri ve katkıları için sayın jüri üyeleri Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU, Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU, Prof. Dr. Berrin AYZ TÜYLÜ ve Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU'na,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her koşulda destek olan, çalışma ortamıma mutluluk katan tüm çalışmalarımdayanım olan hem arkadaşım hem sevgili eşim Elif ERTEN FAYADOĞLU'na,

Tez çalışmamda desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve bu günlere gelmemde en büyük katkısı olan bana her şekilde inanan ve her zaman yanımda olan sevgili ailem annem ve babama,

En içten duygularla teşekkür ediyorum.

Mustafa Ali Noori AL FAYYADH

07/09/2021

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmamın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Mustafa Ali Noori AL FAYYADH

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	viii
İÇİNDEKİLER	ix
TABLOLAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
1.1. Su Dezenfeksiyonu	20
1.1.1. Su dezenfeksiyonunun önemi	21
1.1.2. Su sistemlerinde mikroorganizma standardı	21
1.1.3. Su dezenfeksiyonunda kullanılan dezenfektanlar	22
1.1.4. Su dezenfeksiyonunda kullanılan yöntemler	22
1.1.4.1. Fiziksel yöntemler	22
1.1.4.2. Kimyasal yöntemler	24
1.2. Biyofilm nedir	25
1.2.1. Biyofilm oluşumu	26
1.2.1.1. Biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar ve önemi	27
1.2.2. Su sistemlerinde biyofilm oluşumu	27
1.2.2.1. Su kaynaklı biyofilm oluşturan mikroorganizmalar	28
1.2.2.2. <i>Escherichia coli</i>	29
1.3. Sitotoksosite nedir	29
1.3.1. Sitotoksosite Testleri	30
1.4. Nanoteknoloji	32

1.4.1. Nanopartiküller	32
1.4.1.1. Gümüş nanopartikülleri	32
1.4.1.2. Bakır nanopartiküller	33
2. MATERYAL VE METOD	35
2.1. Materyal	35
2.1.1. Metal içeren nanomalzemelerin sentezi	35
2.1.2. Mikrobiyolojik Çalışmalar	35
2.1.2.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar	35
2.1.2.2. Test maddelerinin hazırlanması	35
2.1.2.3. Mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılan besi ortamları ve kimyasallar	35
2.1.3. Hücre kültürü çalışmaları	37
2.1.3.1. Kullanılan kimyasal maddeler	37
2.1.3.2. Kullanılan sarf malzemeler	37
2.1.3.3. Kullanılan aletler ve cihazlar	38
2.1.3.4. Kullanılan araç ve gereçlerin hazırlanması	38
2.1.3.5. Çalışmada kullanılan hücreler	38
2.1.3.6. Test maddelerinin hazırlanması	38
2.2. Metod	39
2.2.1. Antimikrobiyal duyarlılık testleri	39
2.2.1.1. Minimum inhibisyon konsantrasyon testi	39
2.2.1.2. Minimum bakterisidal konsantrasyon testi	39
2.2.2. Adezyon testi	40
2.2.3. Ultrasonikasyon işlemi ile adezyon testi	40
2.2.4. Biyofilm inhibisyon testi	41
2.2.5. Ultrasonikasyon işlemi ile biyofilm inhibisyon testi	41
2.2.6. Test maddelerinin sitotoksik aktiviteleri	41
2.2.6.1. HaCat hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması ve deneylere hazırlanması	41
2.2.6.2. Test madde dozlarının hazırlanması	42
2.2.6.3. Hücrelerin test için hazırlanması	42
2.2.6.4. Sitotoksikite Testi	43

2.2.6.5. <i>Mikroskobi</i>	44
2.2.6.6. <i>İstatistiksel analiz</i>	44
3. BULGULAR	44
3.1. Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
3.2. Biyofilm inhibisyon testinin değerlendirilmesi	47
3.3. Adezyon testinin değerlendirilmesi	47
3.4. Ultrasonikasyon işlemi ile adezyon testi sonuçları	48
3.5. Ultrasonikasyon işlemi ile biyofilm inhibisyon testi sonuçları	49
3.6. Sitotoksitenin Belirlenmesi	51
4. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER	58
4.1. Sonuç	58
4.2. Tartışma	59
4.3. Öneriler	63
KAYNAKÇA	65
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 3.1. Nanotoz maddelerin hazırlanan süspansiyon halindeki <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 suşuna karşı saptanan MİK ve MBK değerleri (mg/L)	44
Tablo 3.2. Adezyon Aktiviteleri 2 mg/L logaritmik düşüş değerleri	48
Tablo 3.3. Biyofilm inhibisyon aktiviteleri 2 mg/L logaritmik düşüş değerleri	50



ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Yüzeylerde biyofilm oluşum aşamaları	26
Şekil 3.1. MİK testi mikrotitrasyon plaka görüntüsü.	45
Şekil 3.2. MİK testi MTT boyaması mikrotitrasyon plaka görüntüsü.	46
Şekil 3.3. MİK testi MTT boyaması mikrotitrasyon plaka görüntüsü.	46
Şekil 3.4. Ag, Cu nanotoz ve kombinasyonlarının Escherichia coli ATCC 25922 suşu üzerindeki MİK değerleri (mg/L).	47
Şekil 3.5. 2 mg/L nanotoz maddelerin adezyon aktivite değerleri. E. coli ATCC 25922 suşu üzerinde ultrasonikasyonlu ve ultrasonikasyonsuz adezyon aktivite logaritmik düşüş değerleri.	49
Şekil 3.6. 2 mg/L konsantrasyon değerlerine göre nanopartiküllerin biyofilm inhibisyon aktivite değerleri. E. coli ATCC 25922 suşu üzerinde ultrasonikasyonlu ve ultrasonikasyonsuz biyofilm inhibisyon aktivite logaritmik düşüş değerleri.	50
Şekil 3.7. % 100 Ag nanotoz maddenin HaCaT hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.	51
Şekil 3.8. % 90 Ag +% 10 Cu nanotoz maddenin HaCaT hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.	52
Şekil 3.9. %75 Ag + %25 Cu nanotoz maddenin HaCaT hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.	53
Şekil 3.10. %50 Ag + %50 Cu nanotoz maddenin HaCaT hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.	54
Şekil 3.11. %25 Ag + %75 Cu nanotoz maddenin HaCaT hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.	55
Şekil 3.12. %10 Ag + %90 Cu nanotoz maddenin HaCaT hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.	56
Şekil 3.13. %100 Cu nanotoz maddenin HaCaT hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.	57

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AgNP	: Gümüş nanopartikülü
ANOVA	: Analysis of Variance (Varyans Analizi)
BHI	: Brain Heart Infusion Broth
BHI-a	: Brain Heart Infusion Broth–agar (Beyin kalp infüzyon broth- agar
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
CuNP	: Bakır nanopartikülü
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DWDS	: Distiled Water Distribution System (İçme suyu dağıtım sistemleri)
<i>E.coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi
EPS	: Ekzopolisakkarit
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi)
HaCaT	: Anöplöid ölümsüz keratinosit hücre dizisi
IC50	: Maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan konsantrasyon
kHz	: Kiloherertz
KOB	: Koloni Oluşturan Birim
L	: Litre

MBEK	: Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonu
MBK	: Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu
MHB	: Mueller-Hinton Broth
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
mL	: Mililitre
MTS	: (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum)
MTT	: (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür; Thiazolyl blue)
NP	: Nanopartikül
PBS	: Phosphate buffered saline (Fosfat ile tamponlanmış tuz)
RNA	: Ribonükleik asit
WST	: WST'ler (suda çözünür tetrazolyum tuzları)
XTT	: (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid)
µL	: Mikrolitre

1. GİRİŞ

İçme ve kullanma sularına uygulanan dezenfeksiyon işlemleri genellikle bulaşıcı hastalıkların önüne geçilmesi amacıyla oldukça önemli rol oynamaktadır. Yaygın olarak uygulanan klorlama, ozonlama, UV ışınması gibi su dezenfeksiyon tekniklerinin sahip oldukları çeşitli dezavantajlar, patojen mikroorganizma kaynaklı hastalıkların önlenmesinde yetersiz kalmaktadır. Bu amaçla, alternatif dezenfeksiyon teknolojilerinden olan ultrasonik yöntemleri üzerinde yapılan çalışmaların sayısı artmaktadır. Geliştirilmekte olan ultrasonik dezenfeksiyon uygulamalarının su dezenfeksiyonunda kullanılabilmesi için çeşitli patojen mikroorganizmalar üzerindeki etkinliğinin araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

İçme suyu, su kaynakları arasında bir dizi doğal ve antropojenik kirleticiler içerir. İçme suyunun araştırılmasında bakteriler, doku kültüründe üretilen hücreler, bitkiler kullanılmış ve bu amaçla toksisite testlerinden yararlanılmıştır. Bu testler insan sağlığına yönelik riski doğrudan tahmin etmek için kullanılamazlar da, özellikle içme suyu arıtımı araştırmalarında başarıyla kullanılmıştır (Fawell, 1998). Bu bağlamda su dezenfeksiyonunda patojenleri ve diğer kirleticileri barındırmayan, içme suyu kaynaklı insan hücre ve dokularında sağlık tehditi oluşturmayan ve çevre üzerinde olumsuz etkiler yaratmayacak oldukça etkili antimikrobiyal ve daha da önemlisi sitotoksik olmayan ajanlar ve yöntemlerin geliştirilerek araştırılması son derece önemlidir. Dünya çapında özellikle gelişmekte olan çoğu ülkede ve kırsal alanlarda, içme suyu güvenliği önemli bir konudur (Hatami, 2013). Dünyadaki milyonlarca insan güvenli bir içme suyu kaynağına erişememekte ve su kaynaklı enfeksiyonlar tarafından yaşamı tehdit edilmektedir (WHO, 2014). Su arıtım teknolojilerinin geliştirilmesi, özellikle de sudaki patojenik mikroorganizmaların etkisizleştirilmesi, insan sağlığı için büyük öneme sahiptir (Song, 2016).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 'ne göre içme suyu, insan nüfusu için sağlık riski oluşturabilecek herhangi bir organizmadan arındırılmalıdır (WHO, 2002). Suyun mikrobiyal kontaminasyonu halk sağlığı için büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Çoklu antimikrobiyal ajanlara dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkmasıyla gelişmiş dezenfeksiyon yöntemlerine olan talep de artmaktadır (Kolar, 2001). Bunların yanında İçme Suyu Dağıtım Sistemleri'nin (İSDS) sürekli dezenfektan varlığında bile biyofilm barındırdığı bilinmektedir. Bu biyofilmler, herhangi bir tüketicinin musluğundan su verildiğinde mevcut bir planktonik bakteri kaynağıdır. İSDS 'de biyofilmlerin varlığı, ürünün mikrobiyolojik kalitesinde ve dağıtılan suyun kalitesi üzerinde istenmeyen etkiye yol açabilir. Sonuç olarak, biyofilmler çeşitli su kaynaklı

hastalıklardan sorumlu olan kalıcı bir patojenik mikroorganizma rezervuarı oluştururlar (Simoes, 2013). (Arunkumar vd., 2020).

Biyofilmler, çeşitli yüzeylere tutunmuş kendi ürettiği polimerik bir matriste yaşayan organize mikroorganizmaların birikimidir. Bu mikroorganizmalar hem biyotik hem de abiyotik yüzeylere tutunabilirler (Cortés, 2011; Flemming ve Wuertz, 2019). Biyofilmler, hücre dışı polimerik maddelerin bir matrisine (ekzopolisakkarit) gömülü homojen veya heterojen bakteri topluluklarını içerir. Bakteriyel hücreler hücre dışı polimerik maddelerle birbirine bağlanır ve geliştirme sürecinin bir parçası olarak her hücre yüzeyini ve hücre-hücre etkileşimini içeren bir yüzeye (substrat) bağlanır (Davey & O'toole, 2000). Biyofilmler fizyolojik olarak birçok açıdan planktonik eşdeğerlerinden farklıdır; bunlardan biri antimikrobiyal ajanlara karşı dirençli olmalarıdır (Ekundayo vd., 2021). Bununla birlikte, bir biyofilm oluşuktan sonra, bakteriler, klor (Hsiao vd., 2006) ve antibiyotikler dahil olmak üzere dezenfektanlara karşı planktonik popülasyonlardan daha dirençlidir (Gunn, Bakaletz ve Wozniak, 2016; Singh vd., 2017). Bazı biyofilm organizmaları insanlar için bir tehdit oluşturarak, hayatta kalabilir ve çoğalabilirler (Agency, 1992). Ayrıca, dezenfektanların biyofilmlere karşı olan sınırlı difüzyonu ile dezenfektanların etkinliği, birden fazla mikroorganizmanın bir arada oluşturduğu biyofilm içinde yani çoklu biyofilm türleri içinde azalır (Burmölle, 2006; Bridier, 2011). Böylece biyofilm matris polimerleri tarafından sağlanan mikrobiyal koruma, halk sağlığını tehdit eden antibiyotiklere dirençli enfeksiyonlar yaratmaya yatkınlık gösterir. Tıbbi alanda (Donlan, 2001), kirletici su dağıtım sistemleri (Berry, 2006) ve endüstriyel ortamlarda yiyecekleri kirletmektedir (Supraja Puttamreddy, 2008). Biyofilmler protozoan parazitler (örn. *Giardia* sp. ve *Cryptosporidium* sp.), bakteriyel patojenler (örn. *Legionella* sp., *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Helicobacter* sp.) ve enterik virüsler (Lehtola, 2004; Moritz, 2010) gibi istenmeyen mikroorganizmalar, konakçıdaki biyofilmler boşaltıldığında suya salınabilir ve bu da içme suyunun mikrobiyolojik kalitesinin bozulmasına neden olabilir (Wingender ve Flemming, 2011). Biyofilmlerin suyun kalitesini etkileyen diğer bir dezavantajı ise demirli metal yüzeyler üzerinde geliştiğinde, boruların korozyonuna ve ayrıca demir partiküllerinin suya salınmasıyla suyun tadının ve kokusunun bozulmasına neden olabilmektedir (Little ve Lee, 2014; Schaechter, 2009).

Nanoteknolojinin su ve atık su arıtımında sağladığı son gelişmeler ile, yüksek performanslı, çok fonksiyonlu ve uygun fiyatlı çözümler sunması öngörülmektedir (Tom, 2021). Su dezenfeksiyonunda patojenleri öldürmek için klorlama, ultraviyole ışımaya ve ozonlama gibi çeşitli geleneksel yöntemler kullanılmaktadır. Ancak, bu geleneksel yöntemler

yeterli gelmemektedir (Dimapilis, 2018). Su dezenfeksiyon sistemlerinde tüm bu sorunlara çözüm olabilecek nitelikte yüzyıllardır literatürde de etkileri ortaya konulmuş nanoteknoloji ürünü bazı nanopartiküllerin kullanımını akla gelmektedir.

Son zamanlarda nanopartiküller, kronik hastalık teşhisinde (Ma vd., 2020), cilt ve yanık yaralarındaki bakteriyel enfeksiyonları azaltmak için (Han vd., 2020; Rai, 2009), tıbbi cihazlarda, gıda ve giyim endüstrilerinde antimikrobiyal ajan olarak bakteri kolonizasyonunu önlemek için başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Chau, 2007; Vigneshwaran, 2007). Her ne kadar geleneksel tedavide nanoparçacık bazlı dezenfeksiyon işlemleri uygulama açısından zor olsa da, içme suyu arıtma sistemlerinin geliştirilmesinde daha elverişli hal almaktadır (Li, 2008; Mohammed, 2021; Savage, 2005).

Nanoteknolojinin gelişmesiyle birlikte, özellikle gümüş nanopartiküller (Ag NP) son yıllarda su ve atık su dezenfeksiyonunda başarıyla uygulanmaktadır. İyi bir antimikrobiyal ajan olarak Ag NP'ler mikroorganizmalar için oldukça toksiktir ve bu nedenle virüsler, bakteriler ve mantarlar dahil olmak üzere çok çeşitli mikroorganizmalara karşı sidal etki sergilemekte ve suyun dezenfeksiyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır (Ahamed, Alsalhi & Siddiqui, 2010; Khezerlou vd., 2018; Deshmukh vd., 2019).

Biyofilm oluşumunu engelleyen çeşitli mekanizmalar hakkında yayınlanan bazı raporlar, nanomalzemelerin bakterisidal aktivitelerinin biyofilmleri kontrol etmek için bir fırsat sağlar (Fatih Erci, 2020). Özellikle bakır ve gümüş nanoparçacıkları, dikkate değer kimyasal, fiziksel ve biyokimyasal özellikleri ile elektrik, optik, katalitik ve biyolojik sektörlerdeki büyük uygulamalarından dolayı dikkat çekmektedir (Ingle, 2014; Umer, 2014). Gümüş planktonik bakterilere karşı etkilidir (Silvestry-Rodriguez, 2007; Mohamed vd., 2020). Gümüş aynı zamanda Avrupa'da su dezenfeksiyonu için kullanılmaktadır (Kim, 2004). AgNP'lerin çevresel yüzeylerde biyofilm oluşumunu önlediği de bilinmektedir (Stobie, 2008; LewisOscar vd., 2021). Benzer şekilde bakırın, antibakteriyel bir madde olarak yararlılığı uzun yıllardır bilinmektedir. Son zamanlarda, bakır nanopartiküller içme suyu için dezenfektan olarak kullanılmıştır (Ruparelia, 2008; Singh, Kim & Smith, 2020). Bununla birlikte, bakır içeren nano boyutlu malzemelerin antibakteriyel özellikleri hakkında makale ve patentler bulunmaktadır (Longano, 2012).

Literatürde su dezenfeksiyonunda iki veya daha fazla dezenfeksiyon tekniği kombinasyonlarının uygulanmaları mevcuttur (El-Ghizel vd., 2020). Örneğin; mikroorganizmaların inaktivasyonu ve suyun dezenfeksiyonu için ultrasonikasyon ve

ozonlama kombinasyonu uygulanmıştır (Abdurahman & Abdullah, 2020). İçme suyu üretimi için elektrokimyasal dezenfeksiyon ile birleştirilmiş nanofiltrasyon işlemi yapılan çalışmalar arasında yer almaktadır (Waso vd., 2020).

Su arıtma işleminin iyileştirilmesi için kullanılan yenilikçi yöntemlerden biri de ultrasonik ses dalgalarının uygulanmasıdır (Doosti, 2012; Fetyan & Salem Attia, 2020). Bununla birlikte, biyofilm oluşumunun engellenmesinde ultrasonik verimliliğinin açığa çıkarılması kolay bir iş değildir, çünkü ultrasonik ses dalgaları, tek bakteri hücreleri, bağlı hücrelerin çoğalması veya genç su biyofilmlerinde viskoelastik kümelerin oluşumu gibi yumuşak kolloidlerin birikmesini veya bağlanmasını önlemelidir (Mathieu, 2019).

Su dezenfeksiyonu sağlamada kullanılan teknolojinin, araç ve gereçlerin tümünde insan sağlığını olumsuz etkileyebilecek faktörlerin araştırılarak belirlenmesi önemli bir noktadır. Günümüz yaşam biçimiyle insanların nanoparçacıklara maruz kalması kaçınılmazdır; çünkü çeşitli uygulamalarda nanoteknoloji; kozmetikten medikal ürünlere, su arıtma ve güneş enerjisi gibi yenilenebilir enerjiye kadar yer edinmiştir (Staggers, 2008). Gümüş, bakır ve diğer nanopartiküllerin avantajlarından birçok alanda yararlanırken, kullanımı ile ilişkili potansiyel insan ve çevresel tehlikelerini de değerlendirmek oldukça önemlidir. Örneğin; gümüş nanomalzemeleri, üretim noktasında toz veya gümüş nanomalzemeleri içeren dumanların solunması nedeniyle solunum yolundan girebilir, gümüş ile işlenmiş su veya gıda kaplarından alınabilir ya da gümüş içeren tekstil ve kozmetik ürünleri ile cilde nüfuz edebilir (Marambio-Jones, 2010). Diğer yandan nanoparçacıkların bu olumsuz gerçekleri ve riskleri göz ardı edilerek yüksek avantajlı etkinlikleri ile her alanda kullanımları söz konusu olmuştur (Ajdary vd., 2018).

Hücre düzeyinde gümüş nanoparçacıklarının, önemli hücre hasarına neden olabilecek potansiyel sitotoksik etkilere sahip olduğu rapor edilmiştir (Park, 2011). Genel olarak, planktonik bakterilere karşı etkili olan antimikrobiyal ajanların konsantrasyonunun biyofilm ve memeli hücrelerine karşı etkisiz olabileceği gözlenmiştir (Bazaka, 2012).

AgNP 'lerin toksisitesi de akciğer epitel (A549), oküler epitel akciğer fibroblastı (IMR-90), sıçan beyni ve glioblastom (U251) hücreleri dahil olmak üzere farklı hücre hatlarında incelenmiştir (Chairuangkitti, 2013; Grosse, 2013; Manaloto vd., 2020). Ayrıca kullanılacak olan nanoparçacığın boyutu, yüzey alanı, yüzey işlevselliği ve biyokinetiği toksisiteyi etkileyen önemli faktörlerdendir (Nel vd., 2006; Singh & Nalwa, 2007; Sukhanova vd., 2018).

Bu konuda toksik olmayan veya toksisite potansiyeli en az olan nanomalzemelerin araştırılmasıyla, su dezenfeksiyonunda ve diğer birçok uygulama alanında mikroorganizmaların hayatta kalmasını ve çoğalmasını önleyerek mevcut sorunların ve enfeksiyonların bulaşma riski azaltılabilir.

Bu çalışmada kimyasal olarak sentezlenen Ag ve Cu nanopartiküllerinin antibiyofilm aktiviteleri ve su ile sürekli temas halindeki memeli deri epitel hücre hattı (HaCaT) üzerindeki sitotoksik etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır. HaCaT hücre hattı, bilimsel araştırmalarda yaygın olarak kullanılan, yetişkin insan derisinden spontan olarak dönüştürülmüş anöplid ölümsüz keratinosit hücre dizisidir (Ölschläger, Schrader, & Hockertz, 2009).

HaCaT hücrelerinin, *in vitro* olarak farklılaşma ve çoğalma kapasiteleri yüksektir (Colombo vd., 2017). Bu hücreler, deride Vitamin D3 metabolizması için bir model sistem olarak kullanılmaktadır (Lehmann, 1997). Ayrıca, epidermal homeostaz ve bunun patofizyolojisinin araştırıldığı çalışmalarda da sıklıkla kullanılmaktadır (Hofmann vd., 2014; Seo vd., 2012).

Çalışmada su sistemlerinde indikatör bir bakteri olan *E.coli* ATCC 25922 suşuna karşı, sentezlenen Ag ve Cu nanopartiküllerinin antibakteriyel aktiviteleri, mikrobroth dilüsyon testiyle ortaya konmuştur. Sonrasında, adezyon ve biyofilm inhibisyon testleriyle antibiyofilm aktiviteleri araştırılmıştır. Ag ve Cu nanopartiküllerin, MİK ve MBK değerleri kaydedilmiştir.

Yeni bir yaklaşım olarak düşük frekanslı ultrasonik dalgaların, oluşan biyofilm kirlenmesi üzerindeki önleyici etkisini saptamak amacıyla, düşük frekanslı ultrasonik dalgalar 15 dakika uygulanarak Ag ve Cu nanopartikül maddelerinin çalışma etkinliği belirlenmiştir. Ag ve CuNP'ler ile gerçekleştirilen su dezenfeksiyonu sonrasında HaCaT hücre hattı üzerinde sitotoksik etkilere sahip olup olmadığı araştırılmıştır. Kimyasal sentezlenmiş AgNP'ler, su kaynaklı patojen *E. coli* ATCC 25922 standart suşuna karşı sitotoksik olmayan yüksek antibakteriyel ve antibiyofilm etkinliği sergilemiştir. Bu da Ag ve Cu nanopartiküllerinin insan sağlığı üzerinde olumsuz yan etkiler ve hastalıklar oluşturmadan su dezenfeksiyonunda kullanımını potansiyel alternatifler arasına alır. Sonuç olarak; su dezenfeksiyonu uygulamalarında, biyofilm ve adezyon engelleyici olarak metal içeren nanotozların ultrasound ile birlikte kullanılması mevcut ajanlara kıyasla önemli bir alternatif olabileceğini ortaya koymaktadır.

1.1. Su Dezenfeksiyonu

Dezenfeksiyon; patojen mikroorganizmaların ortadan kaldırılmasıdır (Block, S. S. 2001). Sağlığa zararlı mikroorganizmalar ve kimyasal maddeler içermeyen suya "içilebilir su" denir. İnsan tüketimi için güvenli kalitede su elde etmek amacıyla bir su arıtma tesisinde kullanılan başlıca işlemler sedimantasyon, filtrasyon ve dezenfeksiyondur (Kumar, 2012; Zeng, 2017).

Dezenfeksiyon, suyun sağlıklı bir şekilde son tüketiciye kadar ulaşmasının sağlanmasında kullanılan bir arıtma işlemidir. Su arıtma işlemi, suyun sağlıklı olarak nitelendirilen tüm biyotik ve abiyotik kirliliklerden yoksun hale getirilmesi için çok önemlidir. Bu amaçla uygulanan genel arıtma işlemleri kullanılmaktadır.

1.1.1. Su dezenfeksiyonunun önemi

Su insan hayatının devamı için vazgeçilmez bir besin kaynağıdır. Suyun yaşam sistemi için gerekli maddelerden biri olduğu ve yeryüzünde insanın hayatta kalabilmesi için gerekli olduğu açıktır (Tansel, 2008) Suyun kalitesi fiziksel, kimyasal veya biyolojik parametreler olmak üzere birçok faktör tarafından belirlenir (Doosti, 2012).

Suda patojenik mikroorganizmalar hariç az miktarda mikroorganizma bulunmasının bir zararı yoktur. Ancak, bunların fazla olması tad, koku ve filtreleri tıkanması vb. bakımlardan bazı sorunlar ortaya çıkarabilir (Dhanasekaran, 2019; Zhou vd., 2017).

Bu gibi sorunlar suyun dezenfeksiyonunu önemli kılmaktadır. Sularda standart kaliteyi elde edebilmek için bazı arıtma işlemlerinin kullanılması zorunlu hale gelmektedir. Özellikle içme suyunun genel arıtımı; asılı, çözünmüş katı ve mikrobiyal kirlleticilerin uzaklaştırılması veya azaltılması amacıyla birkaç adımdan oluşmaktadır (Doosti, 2012) ve son adımda, mikrobiyal inaktivasyon için genellikle klorlama, ozonlama ve ultraviyole radyasyon (UV) ile yapılan dezenfeksiyon yöntemleri yer almaktadır (Stange vd., 2019; Tansel, 2008).

1.1.2. Su sistemlerinde mikroorganizma standardı

Bu kaynakları, işlenmiş su, boru hattı sistemlerindeki içme suyu ve tedarik tesislerinin düzenli olarak denetlenmesi gerekmektedir (Revetta vd., 2013). İçilebilir suyun mikrobiyal standardının belirlenmesi, insanları hastalık salgınlarına yol açan mikrobiyal patojenleri içerebilen su alımının neden olduğu enfeksiyonlardan koruyabilecektir (Pirsaheb vd., 2017). Bununla birlikte, tatlı su ekosistemlerinde patojenlerin yaygınlığını gösteren optimal mikrobiyal göstergelerin gerekliliğine yönelik çeşitli araştırmalar yapılmıştır (Tran vd., 2015).

İçme suyu için kalite standartları, sağlık departmanı için içme suyu testi belli başlı kriterleri içerir. Pek çok farklı ülkede kullanılan içme suyunun güvenliği konusunda oldukça çeşitli standartlar vardır: (I) USEPA Ulusal İçme Suyu Kriterleri, (II) EC İçme Suyu Kalite Direktifi ve (III) WHO İçme Suyu Kalite Kriterleri, aynı zamanda diğer ulusal su kalitesi standartları için de temel teşkil etmiştir (WHO, 2017; Wen vd., 2020).

Bunlara örnek olarak mikrobiyolojik Standartlar Amerika Birleşik Devletleri Halk Sağlığı Hizmeti (ABDHS) 'ye göre, 5000 kob / 100 mL'yi aşmayan koliformlar içeren ham su kaynağı ile, modern su arıtma prosesleri kullanılarak bakteri standartlarını karşılayan içme suyu üretebilir. Bu şekilde üretilen içme suyu 100 mL 'de 1'den fazla koliform bakteri içermemelidir. Avrupa Ekonomik Topluluğu (AET) yönergelerine (1975) göre, içme suyu için izin verilen maksimum sınır 1000 kob /100 mL'dir ve yüzme suyu için 10.000 kob/100 mL'dir (Rump, 1999). Açık yüzme plajları için seviyeler farklı eyaletlerde 50 ila 3000 kob/100 mL arasında değişir ve yüzme için sınır 200 fekal koliform/100 mL'dir (Kumar, 2012).

İçme Suyu Standartları ve Health Danışmanlıkları'nın 2011 baskısına göre, virüsleri, *Cryptosporidium* sp. ve *Giardia lamblia*'yı temizleyen su dezenfeksiyon sistemleri, mikroorganizmaları %99,9 oranında etkisiz hale getirmelidir. Özellikle *Legionella* sp. için belirtilen bir sınır yoktur, çünkü virüslerin ve *Cryptosporidium* sp. ve *Giardia lamblia*'nın çoğunun başarılı bir şekilde inaktive edilip edilmediğinin kontrol edildiğine inanılmaktadır. Heterotropik plaka sayısı (HPC) mL'de 500 bakteri kolonisinden fazla olmamalıdır. Toplam koliformların maksimum kirletici seviyesi (MCL) hedefi, 100 mL'de sıfır olmalıdır ve maksimum kirletici seviyesi, bir ay içinde toplam koliform pozitif olan örneklerin %5 ' inden fazla olmamalıdır. Toplam koliformu olan her numune, koliformlar açısından analiz edilmeli ve spesifik koliformlar olmamalıdır (Kumar, 2012).

1.1.3. Su dezenfeksiyonunda kullanılan dezenfektanlar

Su dezenfeksiyonu için çeşitli kimyasal ajanlar kullanılmaktadır. Bunlara genel olarak dezenfektan adı verilmektedir. Suların dezenfeksiyonu amacıyla klordioksit, kloramin ve ozon gibi kimyasal maddeler kullanılmaktadır (Karaer, 2014).

1.1.4. Su dezenfeksiyonunda kullanılan yöntemler

Suyun dezenfeksiyonu çeşitli kimyasal ve fiziksel işlemlerle sağlanabilir. Dezenfeksiyon işlemleri, artılacak suyun kalitesi ve miktarına, su kaynağının konumuna, istenilen artırılmış su kalitesine, güvenlik ve ekonomiye bağlıdır (Kumar, 2012). İnsan tüketimi için suyun dezenfeksiyonunda tercih edilen yöntem, çeşitli faktörlere bağlıdır. Su dezenfeksiyonunda

kullanılan başlıca yöntemler; i.) ultrasound ile dezenfeksiyon, ii.) metal iyonları ile dezenfeksiyon, iii.) klor ile dezenfeksiyon, iv.) ozon ile dezenfeksiyon, v.) UV ile dezenfeksiyon ve vi.) elektrokimyasal dezenfeksiyon olarak sıralanabilir (Dung vd., 2019).

1.1.4.1. Fiziksel yöntemler

Ultrasound ile dezenfeksiyon:

Ses dalgaları olarak da bilinen ultrasound (ultrases) 1917’de biyolog Galton tarafından keşfedilmiştir (Mason, 1990). Ultrason, frekansı 20 kHz’in üzerinde olan uzunlamasına bir dalgadır (Leighton, 1994). Bu dalgalar bir ortamdaki moleküllerin hareketleri sırasında oluşturdukları titreşimlerden meydana gelir (Karaer, 2014) ve dalganın yayıldığı ortamdaki moleküllerin titreşimi ile iletilir (Bello, 2005; Shao vd., 2020).

Ultrasound dalgaları sahip oldukları frekansa göre düşük ve yüksek frekanslı ultrases olarak ikiye ayrılır (Mathieu vd., 2019; Wu, 2020).

Yüksek frekanslı ultrases (Diagnostic Ultrasound):

Frekansı; 2- 10 kHz aralığında olan düşük frekanslı ultrases dalgaları düşük enerjilerinden dolayı sağlık alanında kullanılmaktadır (Wu, 2020).

Düşük frekanslı ultrases (Power Ultrasound):

Frekansı; 20- 100 kHz aralığında olan düşük frekanslı ultrases dalgaları 1950’li yılların başlarında keşfedilmiştir. Günümüzde ise geniş çapta ilgi görerek, çeşitli alanlarda uygulama alanı bulmaktadır (Mason, 1990).

Ultrases dalgaları sıvı bir ortamın yüzeyine çarptığında, sıvı içerisindeki moleküller; titreşim, dönme ve iteleme hareketi yaparak sıvının buharı ya da ortamda bulunan hava sayesinde mikro boyutlu baloncuklar oluşturur. Oluşan bu kabarcıklara “kavitasyon” adı verilir. Oluşan kavitasyonlar sönme eğilimindedir ve stabil ve geçici kavitasyonlar olarak ikiye ayrılır. Geçici kavitasyonların sönümlenmesi ise “kollaps” olarak isimlendirilir ve kavitasyonların içine hapsolmuş enerjiyi açığa çıkarır.

Ultrasonik sistemlerde; kollapsların sonucunda ortaya çıkan enerji kullanıldığından, stabil kavitasyonlar yerine geçici kavitasyonların oluşmasına ihtiyaç vardır. Ultrases işlemlerinde kollapslar sonucu ortaya çıkan enerji kullanılmaktadır. Eğer dış basınç fazla ise kavitasyonlar zor oluşur; fakat kollapslar kolay gerçekleşir ve daha şiddetlidir. Bu olaylar lokal ve anlıktır, kavitasyonların periyodu ise 10 - 8 saniyedir (Mason, 1990).

Ultrason teknolojisi, hem içme suyu biyofilminin hem de karbonat birikimlerinin azaltılmasında çok umut vericidir (Mathieu, 2019). Örnek bir çalışmada düşük elektrik gücü (10 ve 25 W) transdüserleri tarafından üretilen düşük frekanslı sürekli güç ultrasonik dalgalarının içme suyu biyo-kirlenmesi üzerindeki önleyici etkisi değerlendirilmiştir (Banas, 2017). Özellikle çevre üzerindeki etkilerini azaltmak için, çevreye daha duyarlı alternatif prosedürler gereklidir. Bu anlamda, ultrasonik tedaviler iyi bir alternatif olarak görülmektedir (Techer, 2018).

Ultraviyole ile dezenfeksiyon:

Sudaki patojenlerin inaktive edilmesi için etkili teknolojik yöntemlerden bir diğeri ise UV ile dezenfeksiyondur. UV radyasyonu, suda var olan çeşitli mikroorganizmaları etkin bir biçimde etkisiz hale getirebilir (Hijnen, 2006) ve su dezenfeksiyonu için giderek daha fazla kullanılmaktadır (Li vd., 2017).

UV radyasyon enerji dalgaları 100 ila 400 nm uzunluğunda elektromanyetik dalga spektrumları arasındadır. UV radyasyonu bölünmesi vakum UV (100-200 nm), UVC (200-280 nm), UVB (280-315 nm) ve UVA (315-400 nm) olarak sınıflandırılabilir. Mikrop öldürücü etkiler açısından, optimum UV aralığı 245 ile 285 nm arasındadır (Kumar, 2012).

UV dezenfeksiyon sistemleri için ana UV kaynakları düşük veya orta basınçtaki cıva lambalarıdır (Chevremont, 2013). Bu lambalar su arıtma sistemlerinde yaygın olarak kullanılmasına rağmen, oluşan en büyük endişe, UV lambalarının kırılma ve çevreye zararlı toksik cıva içermesidir (Chevremont, 2013; Close, 2006).

1.1.4.2. Kimyasal yöntemler

Metal iyonları ile dezenfeksiyon:

Bakır ve gümüş iyonlarının suyun dezenfeksiyonu için yıllardır kullanıldığı bilinmektedir. Bakır ve gümüşün bakteriler, virüsler ve algler gibi bir dizi mikroorganizmayı etkilediği gösterilmiştir (McFeters, 1991). Bu ağır metallerin, antibakteriyel etkileri birbirlerinden farklıdır; fakat antibakteriyel etkilerine göre bir sıraya konulduğunda Hg^{2+} ve Ag^+ bu sıranın en başında yer almaktadır (Karel, 2011).

Klor ile dezenfeksiyon:

Klorlama, uzun yıllardır kullanılan en yaygın su dezenfeksiyon yöntemi olarak bilinir. Klor, sudaki patojenik mikroorganizmaları yok etmek için ve içme suyunun kalitesini artırmada kokunun giderilmesi için kullanılmaktadır (Mazhar, 2020). DSÖ'ne göre; içme suyu klorlamasının başlaması insan sağlığının korunmasındaki en önemli gelişmelerden olmuştur (Kumar, 2012).

Klorlama, atıksu arıtma tesislerinde yaygın kullanılan tekniklerdendir. Yaygın kullanılan klor bileşikleri arasında; klor gazı (Cl_2), klor dioksit (ClO_2) kalsiyum hipoklorit [$Ca(OCl)_2$], ve sodyum hipoklorit ($NaOCl$) vardır. Su ve klor gazı birleştiğinde birbirini takip eden iki reaksiyon görülür. Bu iki reaksiyon hidroliz ve iyonizasyondur (Karel, 2011). Ancak klor dezenfektanlarının ve klorlama sonrası oluşan dezenfeksiyon yan ürünlerinin (DBP) yaygın toksik kalıntılar bıraktığına dair ve bazı mikroorganizmaların öldürülmesinde yetersiz olduğunu ortaya koyan araştırmalar bulunmaktadır (Li ve Mitch, 2018).

Ozon ile dezenfeksiyon:

Bir diğer dezenfektan ajanı olarak kullanılan madde ise ozondur. Günümüzde ozon, su arıtmada: i.) patojen kontrolü; ii.) inorganik bileşiklerin, özellikle indirgenmiş metallerin oksitlenmesi; iii.) sentetik organik bileşiklerin (pestisitler dahil) oksidasyonu; iv.) klorlama DBP öncüleri, toplam organik karbon (TOK) konsantrasyonlarında azalma ve tat ve koku, alg toksinleri ve rengin çıkarılmasını içeren doğal organik bileşiklerin uzaklaştırılması; ve son olarak v.) partikül (bulanıklık) azalması dahil olmak üzere çok çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır (Ding, 2019). Ozonlama bir su arıtma ünitesi işlemi haline gelmiştir (Gray, 2014).

Ozon klor gibi ucuz alternatif bir dezenfektan olmaması nedeniyle ozon ile suyun dekontaminasyon uygulamaları yüksek güç tüketimi ve hacimli ekipman ile sınırlandırılmıştır (Sorlini, 2005; Agency, 2009). Avrupa'da da ozon yıllardır yaygın olarak kabul görmesine rağmen, bahsedildiği gibi yüksek güç tüketimi, hacimli kurulum ve ozon toksisitesi ile kullanımı kısıtlıdır (Agency, 1992; Weschler, 2000).

Elektrokimyasal dezenfeksiyon:

Elektrokimyasal dezenfeksiyon, iki elektrot, bir anot ve bir katot kullanımı ile sisteme doğru akımın (DC) uygulanmasını içeren çok basit bir yöntemdir. Sistemdeki elektrotlar sayesinde dezenfeksiyondan sorumlu genel kimyasal türler üretilir. Bu yöntem suyun arıtımını direkt sağlamaz, arıtım için dezenfektan türlerinin üretilmesini sağlar (Kumar, 2012).

1.2. Biyofilm nedir

Bakteriyel agregasyona atıfta bulunan biyofilm terimi 1981'de ortaya konmuştur (McCoy, 1981). Biyofilm, hücrelerin birbirine ve çoğunlukla bir yüzeye yapışan herhangi bir mikroorganizma topluluğunu içerir (Joshi, Singh & Mijakovic, 2020).

Bu yapışık hücreler, hücre dışı polimerik maddelerden (EPS) oluşan hücre dışı matrisin içine gömülür (Decho, 2017; Karygianni, 2020).

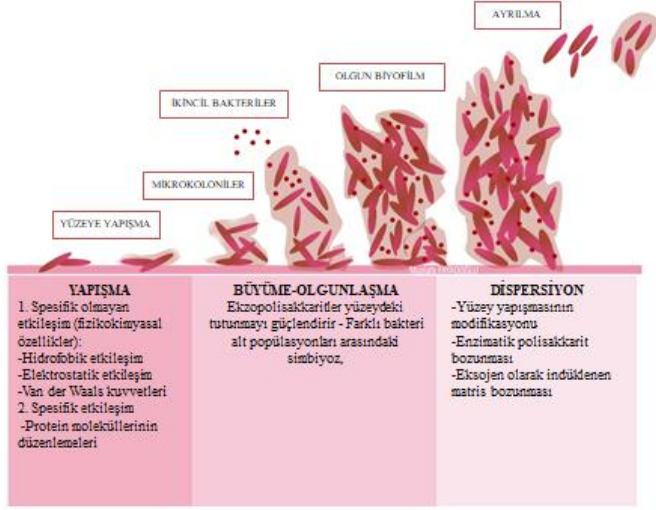
Biyofilm yapısındaki hücreler, hücre dışı polisakkaritleri, proteinleri, lipitleri ve DNA'nın bir araya gelmesiyle EPS bileşenlerini üretir (Siddique vd., 2020). Biyofilmler canlı-cansız yüzeylerde oluşabilmekte ve doğal, endüstriyel ve hastane ortamlarında yaygın olarak karşımıza çıkabilmektedir (Arciola, Campoccia & Montanaro, 2018).

1.2.1. Biyofilm oluşumu

Biyofilm oluşumu genellikle serbest yüzen mikroorganizmaların bir yüzeye yapışmasıyla başlar (Jensen, 2010; Khatoun vd., 2018). Bir biyofilmin ilk mikrokoloni bakterileri, başlangıçta zayıf van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkilerle yüzeye yapışabilmektedir (Palmer, 2010; Zimmerli, 2010; Bjarnsholt vd., 2018).

In vitro biyofilm oluşumu, bakteriler tarafından sentezlenen ekzopolisakkarit (EPS) tarafından kapsüle edilmiş mikrokolonilerden oluşur (Romeo, 2008). Tek hücreler olarak veya biyofilmden kopan küçük mikrokoloniler olarak ortaya çıkar (Joshi, Singh & Mijakovic, 2020; Stapper, 2004). Hücre-hücre etkileşimlerinin çeşitli bakteri türlerinde biyofilm oluşumunda rol oynadığı gösterilmiştir (Klausen, 2003). Bunun yanında biyofilm oluşumunun belirli bir biyofilm programının ifadesine bağlı olduğu da gösterilmiştir (Sauer, K. 2003).

Biyofilmler mikrobiyal gelişim sürecinin bir ürünüdür (Sauer, 2002). *In vitro*, yüzeylerde biyofilm gelişimi, temelde (Sauer, K. 2003) (i) bağlanma, (ii) olgunlaşma ve (iii) dispersiyon adımlarından oluşur (Klausen ve ark. 2003). Başka bir kaynakta ise biyofilm gelişimi beş ana adımda (i) ilk ek, (ii) geri dönüşümsüz ek, (iii) olgunlaşma I, (iv) olgunlaşma II, ve (v) dağılım olarak özetlenmiştir (Maunder, & Welch, 2017; Nakanishi, Palacios, Godbout & Fournel, 2021).



Şekil 1.1. Yüzeylerde biyofilm oluşum aşamaları (Maunder, & Welch, 2017; Nakanishi, Palacios, Godbout & Fournel, 2021)

1.2.1.1. Biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar ve önemi

Biyofilmlerin katıldığı bilinen enfeksiyonların sayısı her yıl artmaktadır ve “biyofilm” teriminin tanımı sürekli olarak yeni bilgileri içerecek şekilde geliştirilmektedir (Bjarnsholt, 2013). Biyofilmlerin, vücutta çok çeşitli mikrobiyal enfeksiyonlarda, tüm enfeksiyonların %80 'inde rol oynadığı tahmin edilmektedir (Alhede, 2009).

Biyofilmlerin dahil olduğu bulaşıcı süreçler arasında bakteriyel vajinoz, idrar yolu enfeksiyonları, kateter enfeksiyonları, orta kulak enfeksiyonları, diş plağı oluşumu, (Chugani, 2007) diş eti iltihabı, kaplama kontakt lensleri (Jacobs vd., 2017) az yaygın olmakla birlikte sorun teşkil etmektedir. Örnekler arasında endokardit gibi ölümcül süreçler, kistik fibrozdaki enfeksiyonlar ve eklem protezleri, kalp kapakçıkları ve intervertebral disk gibi kalıcı cihazların enfeksiyonları yer alır (Fazli, 2009; Khatoun vd., 2018; Kirketerp-Moller, 2008). Son zamanlarda bakteriyel biyofilmlerin deri yara iyileşmesine zarar verebileceği ve enfekte cilt yaralarının iyileşmesinde veya tedavisinde antibakteriyel etkinliği azaltabileceği kaydedilmiştir (Moser, 1997). Bakteriler insan vücudu içinde bir biyofilm oluşturmayı başardığında, enfeksiyon genellikle tedaviye çok dirençli hale gelir ve kronik bir duruma dönüşebilir (Bjarnsholt, 2013). Biyofilm topluluklarında hastalıkların nedeni, özellikle kronik hastalıklar, tıp pratiğinde hala yaygın olarak kabul edilmemesine rağmen, Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri, tüm enfeksiyonların %60-70 'inin biyofilm ile ilişkili olduğunu tahmin etmektedir

(Romeo, 2008). Biyofilmler özellikle diş hekimliği, periodontitis, orta kulak iltihabı, kas-iskelet sistemi enfeksiyonları olmak üzere, nekrotizan fasi-itis, safra yolu enfeksiyonu, osteomyelit, bakteriyel prostatit, doğal ve protezvalf endokardit, kronik idrar yolu enfeksiyonları, kistik fibroz pnömonisi ve kronik rinosinüzit gibi birçok çeşitli hastalıklara sebep olmaktadır.

Biyofilm oluşturan mikroorganizmalara odaklanıldığında ise diğer hastalıkların açıkça biyofilm bağlantılarına sahip olduğu ya da olabileceği ortaya konulacaktır (Romeo, 2008).

1.2.2. Su sistemlerinde biyofilm oluşumu

Belirli bir habitatta yaşayan mikroorganizmaların varlığı mikrobiyal kontaminasyon olarak tanımlanır. Genellikle kontaminasyona sebep olan mikroorganizmalar, bakteriler, mantarlar, küfler ve virüslerdir (Karaer, 2014). Su ve gıdaların bakteriler ile kontaminasyonu, halk sağlığını, yerel ve ulusal ekonomiyi etkileyen yaygın bir sorun olmaya devam etmektedir (Stewart, 2007). Bakterilerin çoğu zararsız veya sıklıkla faydalı olsa da, bazıları patojen özelliğindedir. İnsanlarda bulaşıcı hastalıklara neden olduğu görülen bakteri tür sayısının yüzden az olduğu tahmin edilmektedir (McFall-Ngai, 2007).

Su kaynaklı enfeksiyonlar, dünya çapında morbidite ve mortalitenin başlıca nedenidir. Bunlar arasında, diyare enfeksiyonlarının, çoğunlukla gelişmekte olan ülkelerde her yıl 1.8 milyon ölüme neden olduğu tahmin edilmektedir (Water & WHO, 2004). Gelişmiş su kaynakları ile uygun sanitasyon, gastrointestinal enfeksiyonları azaltabilir. Bununla birlikte, su ve gıda kaynaklı salgınlar, gelişmiş ülkelerde bile hala sıkça görülmektedir (Ishii, 2008).

Çoğu *E. coli* türü zararsız komensal bakteri olmasına rağmen, bazı suşları insanlarda enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) dahil olmak üzere Shiga toksini üreten *E. coli* (STEC), kanlı ishale ve hemolitik üremik sendrom (HUS) ve hemorajik kolit (HC) 75 gibi potansiyel olarak ölümcül insan hastalıklarına neden olabilir. *E. coli* O157:H7, EHEC'nin en tanınmış serotipleri arasındadır ve gıda ve su kaynaklı enfeksiyonların birçok büyük salgınına neden olmuştur. STEC ve EHEC'e ek olarak, en az beş ilave *E. coli* patojen grubu tanımlanmıştır. Enteropatojenik *E. coli* (EPEC) bebeklerde, özellikle gelişmekte olan ülkelerde sulu ishalin en önemli nedenlerinden biridir (Ishii, 2008; Otokunefor, Melex, & Abu, 2020).

Suyun dezenfeksiyonu, su kaynaklı patojenik bakterilerin sebep olduğu bu tür enfeksiyonlar nedeniyle içme ve kullanma suyunun insan sağlığı için ne derece önemli olduğunu ortaya koymaktadır.

1.2.2.1. Su kaynaklı biyofilm oluşturan mikroorganizmalar

Hastalığa neden olabilen bakterilere patojen bakteri denir (Ray, 2010). Su kaynaklı organizmalar, önemli fekal indikatör bakterileri olan *E. coli*, fekal kaynaklı bakteriyel patojen olan *Campylobacter* spp., çevresel kaynaklı fırsatçı bakterilerden *Legionella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, enterik virüsleri (örn. adenovirüsler, rotavirüsler, norovirüsler) ve parazitik protistler (örn., *Cryptosporidium parvum*) gibi mikroorganizmaları içerir (Wingender, 2011; Horton & Melex, 2020).

İçme suyundaki heterotrofik bakterilerin çoğu insan patojenleri olmamakla birlikte *Legionella* sp. ve *Mycobacterium* sp. gibi bazı cinsler, fırsatçı patojenler olan türleri içerir. Örneğin; *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Xanthomonas*, *Moraxella* ve *Aeromonas*, *Candida auris* gibi. Fırsatçı bir patojen, genellikle sadece konakçı bağışıklık sistemi zayıfladığında hastalığa neden olan bir patojen olarak tanımlanır (Azam & Khan, 2019; Lara vd., 2020; Rusin, 1997).

Patojen bakterilerin biyofilm popülasyonlarının bir kısmı, kültüre edilemediğine ve tespit yöntemleriyle fark edilemediğine dair göstergeler vardır. Bu nedenle, içme suyu sistemlerindeki biyofilmler, patojen mikroorganizmalar için çevresel bir rezervuar görevi üstlenerek ve potansiyel bir su kontaminasyonu kaynağı olarak fark edilmeden insanlar için bir sağlık riski oluşturabilirler (Wingender, 2011).

1.2.2.2. *Escherichia coli*

E. coli, Enterobacteriaceae familyasının çubuk şeklinde, Gram negatif ve fekal koliform bir bakteri grubu üyesidir. Patojenik *E. coli* 'nin patogenezi, tanısı ve kaynakları hakkında detaylı çalışmalar bulunmaktadır (Adzitey, 2020; Kaper, 2004; Mainil, 2005; Nataro, 1998; Paton, 1998). *E. coli*, gastrointestinal sistemin fakültatif anaerobik bakterileri arasında baskın bir türdür (Rossi vd., 2018; Fazli M., vd, 2011). Yapılan çalışmalarda, *E. coli* 'nin çevrede uzun süre hayatta kalabileceği ve potansiyel olarak, suda ve tropikal topraklarda yaygın bir şekilde bulunabileceği bildirilmiştir (Galindo-Méndez, 2020). Ayrıca, *E. coli* geniş bir sıcaklık aralığında (7.5 - 49 ° C) gelişim gösterebilir; ancak optimum 37 ° C 'de gelişim sağlamaktadır (Ingraham, 1996; Johnson, 2007).

E. coli içme suyu kirliliğinde bir indikatör bakteri olarak kullanılmaktadır (WHO, 1996) ve hatta enterotoksik ve enterohemorajik formlar suyla ilgili salgınların ana nedenlerinden biri olduğu için büyük öneme sahiptir (Percival, 2000; Otokunefor, Melex, & Abu, 2020;). Su kaynaklı patojen bakteriler kısmında da bahsedildiği üzere, içme suyunda *E. coli* sıklıkla tespit

edilmesine rağmen, kontaminasyon kaynağı tespit edilememektedir. Oysaki bakterilerin çoğunun biyofilm oluşturarak içme suyu dağıtım sistemlerinde boruların iç yüzeylerine tutunma olgusu literatürde bildirilmiştir (Abdulkareem & Mohammed, 2020; Hemdan vd., 2020; Keevil, 2002; (Davey & O'toole, 2000; Parsek, 2003).

1.3. Sitotoksikite nedir

Sitotoksik etkileri ölçmek, hücre zarı bütünlüğünün ve hücre canlılığının değerlendirilmesinde kullanılan en yaygın basamaklardan biridir. Sitotoksik etkileri olan bileşikler sıklıkla hücre zarı bütünlüğünü tehlikeye atar (Adan, Kiraz & Baran, 2016; Wahab vd., 2017).

İnsan hücre ve dokularında sağlık tehditi oluşturmayan ve çevre üzerinde olumsuz etkiler yaratmayacak sitotoksik olmayan ajanlar oldukça önemlidir. Ancak insanların nanoparçacıklara maruz kalması kaçınılmazdır; çünkü insanlığın olduğu tüm yönlerde çeşitli uygulamalarda; kozmetikten medikal ürünlere, su arıtma ve güneş enerjisi gibi yenilenebilir enerjiye kadar tüm alanlarda yerini almıştır (Staggers, 2008). Nanomalzemelerin insan vücudu ile artan etkileşimi ve maruziyeti nedeniyle, insan güvenliğine yönelik olası tehdit önemli bir endişe kaynağı haline gelmiştir ve bu nedenle nanotoksikoloji üzerine araştırmalar artık daha fazla ilgi görmektedir (Klaine, 2008).

Örneğin; gümüş nanopartiküllerinin, atık su arıtma tesislerinden izole edilen aerobik ve anaerobik bakteriler için toksik olduğu kanıtlanmıştır (Choi, 2008). Gümüş, bakır ve diğer nanopartiküllerin avantajlarından birçok alanda yararlanırken, kullanımı ile ilişkili potansiyel insan ve çevresel tehlikelerini de değerlendirmek oldukça önemlidir. Özellikle insan maruziyetinin ana yolları, insan vücudunun iç sistemleri ile dış çevre arasındaki arayüzler olan solunum sistemi, gastrointestinal sistem ve cilt olacaktır (Chen, 2008). Başka bir örnek vermek gerekirse, gümüş nanomalzemeleri, üretim noktasında toz veya gümüş nanomalzemeleri içeren dumanların solunması nedeniyle solunum yolundan girebilir, gümüş ile işlenmiş su veya gıda kaplarından alınabilir ya da gümüş içeren tekstil ve kozmetik ürünleri ile cilde nüfuz edebilir (Marambio-Jones, 2010).

Gümüş nanoparçacıklarının, önemli hücre hasarına neden olabilecek potansiyel sitotoksik etkilere sahip olduğu gösterilmektedir. Bununla birlikte, AgNP'lerin biyofilm oluşturan bakteri ve memeli hücreleri üzerindeki etkisini değerlendirmek için hiçbir çalışma yapılmamıştır. (Park, 2011).

Biyofilm oluşturan bakterilere karşı AgNP'lerin doza bağlı olarak, doğal ve kapaklı AgNP'lerin memeli deri epitel (HaCat) hücreleri üzerindeki etkileri incelenmiştir (Jaiswal, 2015). AgNP 'lerin toksisitesi akciğer epitel (A549), oküler epitel akciğer fibroblastı (IMR-90), sıçan beyni ve glioblastom (U251) hücreleri dahil olmak üzere farklı hücre hatlarında da incelenmiştir (Chairuangkitti, 2013; Grosse, 2013).

Ayrıca kullanılacak olan nanoparçacığın boyutu, yüzey alanı ve yüzey işlevselliği, biyokinetiği toksisiteyi etkileyen önemli faktörlerdendir (Nel vd., 2006; Singh & Nalwa, 2007).

Nanoparçacıkların bu olumsuz gerçekleri ve riskleri göz ardı edilerek yüksek avantajlı etkinlikleri ile her alanda kullanımları söz konusu olmuştur. Bu konuda toksik olmayan toksisite potansiyeli en az olan nanomalzemelerin araştırılmasıyla, birçok uygulama alanında mikroorganizmaların hayatta kalmasını ve çoğalmasını önleyerek mevcut sorunların ortadan kaldırılması ve hastalıkların bulaşma riski azaltılabilir.

1.3.1. Sitotoksosite Testleri

Sitotoksosite testlerini şu şekilde sınıflandırabiliriz:

1. Metabolik aktivitenin ölçülmesine dayalı yöntemler,

- MTT

- XTT

- MTS

- WST

2. Membran geçirgenlik testleri,

- Nötral kırmızısı testi

- Tripan mavisi testi

3. Alamar mavisi yöntemi,

4. Sülfrodamin B (SRB) yöntemi,

5. Laktat dehidrogenaz LDH yöntemi,

6. Kristal viyole yöntemidir.

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür; Thiazolyl blue

Metabolik aktivitenin ölçülmesine dayalı kolorimetrik metodlardan olan, 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT), 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS), 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid (XTT), 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum (WST) gibi testlerde, tetrazolyum tuzları kullanılarak kristal viyole, nötral kırmızısı gibi boya maddeleri ile hücrelerin spesifik boyanması ve renk değişikliği esasına dayalı ölçüm yapılır (Borenfreund & Puerner, 1985; O'Connor vd., 1998; Riss vd., 2006; Feoktistova vd., 2016).

MTT testi, kolorimetrik bir testtir. Yöntemin temeli, canlı hücrelerde tetrazolyum tuzlarının mitokondriyal dehidrogenaz enzimi tarafından suda çözünmeyen koyu mavi/mor renkli formazan kristallerine dönüşmesi esasına dayanmaktadır. Formazan tuzlarının miktarı canlı hücre ile doğru orantılı, sitotoksinite ile ters orantılıdır (Berridge, Herst & Tan, 2005).

MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür; Thiazolyl blue), sarı renkli olup hücrelere aktif olarak absorbe olur ve kültür ortamındaki mitokondriyal aktivitesi devam eden canlı hücrelerin kantasyonunu sağlar (Mosmann, 1983).

Canlı hücrelerin mitokondriyelerinde yer alan mitokondriyal dehidrogenaz enzimi, MTT boyasındaki tetrazolium halkasını parçalar. Bunun sonucunda MTT, suda çözünmeyen mor renkli formazana dönüşür. Oluşan bu formazan, izopropanol veya dimetilsülfoksit (DMSO) gibi başka bir çözücü yardımı ile suda çözünebilir hale getirilir ve oluşan renk reaksiyonu spektrofotometrik olarak okunup kantite edilir. Dolayısıyla bu yöntem sadece canlı hücreleri saptar (Aslantürk, 2018; Freshney, 2005; Oktar, 2009).

1.4. Nanoteknoloji

Nanoteknoloji, 1-100 nm büyüklüğünde nano ölçekli parçacıkların karakterizasyonu, üretimi ve uygulaması için bilimsel bir alandır (Ramsden, 2018). 1 ila 100 nm arasında boyutlandırılmış (Novack, 2007), maddenin atomik, moleküler ve moleküller üstü ölçekteki manipülasyonu olarak tanımlanmaktadır. Tanımlandığı gibi nanoteknoloji, yüzey bilimi, organik kimya, moleküler biyoloji, yarı iletken fiziği, enerji depolama (Hübler, 2010; Shinn, 2013), mikrofabrikasyon (Lyon, 2013), moleküler mühendislik (Saini, 2010), gibi çeşitli alanlarda (Belkin, 2015), nano ölçekteki boyutlara sahip yeni malzemeler geliştirilmesinden, kontrolüne kadar çeşitlilik göstermektedir.

Mikroorganizmaların çoklu antibiyotiklere veya dezenfekte edici ajanlara karşı direnci konusunda büyük bir endişe vardır, bu nedenle patojenik mikroorganizmalara karşı yeni ve

etkili ajanların geliştirilmesi için büyük çaba sarf edilmektedir (Kumar, Curtis & Hoskins, 2018; Malaekheh-Nikouei, 2020; Wagner, 2006). Nanobilim ve nanoteknolojinin gelişimi, gümüş, bakır ve çinko (Kawashita, 2000; Trapalis, 2003) gibi belirgin bir biyoaktiviteye sahip metalleri içeren yenilikçi nanomalzemelerin bakterisidal etkisini araştırmak için daha fazla fırsat sunmaktadır (Longano, 2012). Kendine has özelliklere sahip nanoparçacıkların üretimi ise nanoteknolojinin önemli bir dalını oluşturmaktadır.

1.4.1. Nanopartiküller

Bir nanoparçacık, genellikle 1 ila 100 nanometre (nm) çapında bir madde parçacığı olarak tanımlanmaktadır (Eric Drexler, 1986). Görünür ışık dalga boylarından (400-700 nm) daha küçük olan nanopartiküller, optik mikroskoplarla görüntülenemezler ve elektron mikroskoplarının kullanılması gereklidir (Shinn, 2013). Nanopartiküllerin özellikleri genellikle aynı maddenin daha büyük partiküllerinden belirgin şekilde farklıdır. Bir atomun tipik çapı 0.15 ila 0.6 nm arasında olduğundan, nanoparçacık malzemesinin büyük bir kısmı, yüzeyinden birkaç atomik çapta bulunur. Bu nedenle, bu yüzey tabakasının özellikleri ana malzemenin özelliklerine sahip olabilir. Bu etki, farklı bir bileşim ortamında dağılmış nanoparçacıklar için özellikle güçlüdür (Khan, Saeed & Khan, 2019).

1.4.1.1. Gümüş nanopartikülleri

Eski Mısırlılar, gümüş ve bakır gibi metaller kullanarak su ve yaraları sterilize etmişlerdir (Longano, 2012). Gümüş iyonlarının antimikrobiyal özellikleri eski zamanlardan beri biliniyordu ve gümüş nanopartiküllerinden (AgNP) özellikle sağlık endüstrilerinde çok uygun bir anti-bakteriyel ajan ve bakterisit olarak (Kim, 2007), gümüş iyonları kateterlerde, yanık yaralarında ve diş hekimliği çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Kim, 2007). AgNP'lerin antibakteriyel özelliğini kullanan mevcut uygulamalar arasında, portatif su filtreleri, giysiler, tıbbi cihazlar ve çamaşır makineleri ve gıda kapları için kaplamalar bulunmaktadır (Li, 2008; Rai, 2009; Marambio-Jones, 2010).

Gümüş nanopartiküllerin bakterilere karşı etkili biyositler olduğu gösterilmiştir. Bunlara örnek olarak; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella mobilis* ve *Klebsiella pneumoniae* verilebilir (Benn, 2008; Chen, 2008; Falletta, 2008; Hernández-Sierra, 2008; Raffi, 2008; Ruparelia, 2008; Smetana, 2008; Yoon, 2008; Marambio-Jones, 2010).

Gümüşün farklı mikroorganizma türlerine karşı antimikrobiyal etkisi, yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir (Pareek, Gupta & Panwar, 2018). Gümüş nanoparçacıklar bakterilerle

temas ettiğinde, hücre duvarına ve hücre zarına bağlanırlar (Yin, 2020). Bağlandıktan sonra, gümüşün bir kısmı hücre içine geçerek, DNA (Thurman, 1989) ve RNA gibi fosfat bileşikleri ile etkileşir, bir başka kısım membrandaki kükürt içeren proteinlere bağlanır. Dolayısıyla gümüş nanoparçacıkların eklenmesi replikasyonu inhibe ederek ve hücrelerin ölümüne neden olmaktadır (Akter vd., 2018).

Gümüş nanoparçacıklarının etkilerini daha da arttırmak için, gümüş sıvılarla temas ettiğinde, nanoparçacıkların bakterisidal aktivitesini arttıran iyonize olma eğilimindedir (Eltz vd., 2020; Feng, 2000). Her hücre türü için farklılık gösteren, hücre zarı bileşimleri büyük ölçüde değiştiği için, ortalama 10 nm veya daha küçük boyutlardaki gümüş nanoparçacıkların bakterisidal aktivitelerini büyük ölçüde artıran elektronik etkiler sergilediği görülmüştür (Pal, 2007). Gümüş nanoparçacıkları metaller, plastik ve cam da dahil olmak üzere birçok yüzey tipine dahil edilebilir (Jo, 2014). Nanoteknolojinin hızlı gelişimi ile uygulamalar daha da genişletilmiştir ve gümüş, tüketici ürünlerinde en sık kullanılan mühendislik nano malzemesi haline gelmiştir (Rejeski, 2009).

Bunların yanı sıra gümüş nanopartiküllerinin temiz içme suyu elde etmek için su arıtma yöntemi olarak umut verici bir uygulama olduğu rapor edilmiştir (Jain, 2005; Dung vd., 2019).

1.4.1.2. Bakır nanopartiküller

Bakır nanopartiküller (CuNP), 1 ila 100 nm büyüklüğünde bakır bazlı parçacıklardır (Khan, 2011). Uzun yıllardır çeşitli hastalıkların tedavisinde ve hijyeni korumak için bakır bileşikleri kullanılmıştır (Faúndez, 2004). Çeşitli hastalıklar için bakırın sayısız tıbbi kullanımı derlenmiştir. Orta ve Uzak Doğu 'da bakır, göz enfeksiyonları için, azot ile işlenmiş bakır, boğaz enfeksiyonları için uygulanmıştır (Grace, 2009).

Antibakteriyel bir madde olarak bakırın yararlılığı uzun yıllardır bilinmektedir (Salah, Parkin & Allan, 2021). Bununla birlikte, bakır içeren nano boyutlu malzemelerin antibakteriyel özellikleri hakkında yayınlar mevcuttur (Longano, 2012).

Metal NP'leri arasında, CuNP'lere son zamanlarda ilgi artmaktadır. CuNP'lerin, diğer pahalı metal NP'ler için ucuz bir alternatif olmasının yanı sıra antimikrobiyal ajan olarak kullanılabilirliği CuNP'lere olan ilgiyi artırmıştır (Raffi, 2010; Rispoli, 2010; Morsi vd., 2017). Bakırın, proteinlerin oksidasyonu, DNA ve RNA moleküllerinin parçalanması ve lipit peroksidasyonuna bağlı membran hasarı gibi hasarlara neden olabilecek reaktif hidroksil radikalleri üreterek öldürme etkisini gösterdiği bildirilmiştir (Ameh & Sayes, 2019; Mosa vd., 2018).

CuNP'lerin antimikrobiyal etkisi birkaç faktörün bir kombinasyonu gibi görünmektedir; Cu⁺ iyonlarının serbest bırakılmasıyla, penetrasyon ve hücre zarında bozulma ve hücrel enzimleri şelatlayarak biyokimyasal ve DNA hasarına yol açabildiği rapor edilmiştir (Raffi, 2010; Rispoli, 2010; Ameh & Sayes, 2019; Zhang vd., 2019). Bu tür çalışmalara dayanarak, 1-10 nm aralığındaki NP'lerin, iyonları serbest bırakmak için serbest yüzeye bağlı olarak bakterilerle daha fazla etkileşim gösterme yeteneğiyle (Morones, 2005), küçük NP'lerin sentezlenmesi arzu edilir hale getirmektedir (Bogdanović, 2014).

Bacillus subtilis ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* ve enterik *Salmonella* gibi çeşitli bakteri türlerine ve *Candida albicans* gibi bazı maya türlerine karşı CuNP'lerin antimikrobiyal aktiviteleri bildirilmiştir (Wang, 2017).

CuNP'ler, AgNP'lere göre daha fazla talep edilmektedir. Bunun sebebi ise; fiziksel ve kimyasal kararlılığı, bakırın gümüşten daha düşük maliyeti ve polimerlerle karıştırma kolaylığından kaynaklanmaktadır (Mallik, 2001). Su dezenfeksiyonunda patojen kontaminasyonu ve güvenli içme suyu sağlanması adına son zamanlarda, bakır nanopartikülleri içme suyu için dezenfektan olarak kullanılmıştır (Morsi vd., 2017; Ruparelia, 2008).

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Metal içeren nanomalzemelerin sentezi

Tez çalışmasında, ıslak kimyasal sentez yöntemiyle metal içeren nano boyutlu partiküllerin üretilmesi (Chou, YJ, ve ark. 2020) a göre gerçekleştirilmiştir. Sentezde gümüş nitrat ($AgNO_3$) ve Bakır (II) Klorür ($CuCl_2$), kalsiyum hidroksit $Ca(OH)_2$, alüminyum hidroksit, fosforik asit, distile su eşliğinde pH kontrollü tepkimeye sokulmuştur. Kimyasal tepkimeyi takiben çöktürme gerçekleştirilmiş ve elde edilen çökeleğin Fristch Pulverisette cihazı kullanılarak öğütülmesi yapılmıştır. Böylece birbirinden farklı derişimlerde bir seri gümüş nitrat ve Bakır (II) Klorür içeren nano partiküller elde edilmiştir. Malzemelerin metal içeriğinin %10 olduğu yapılan ICP analizlerinde görülmüştür. Bu nedenle toksisite çalışmaları dışında çalışılan derişimler metal içereğini gösterecek şekilde kullanılmıştır. Toksikite çalışmalarında ise nanoboyutlu tozun da toksisiteye olacak katkısını değerlendirmek amaçlı doğrudan nanotoz derişimleri kullanılmıştır.

2.1.2. Mikrobiyolojik Çalışmalar

2.1.2.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar

Bu çalışmada, Anadolu Üniversitesi Yunus Emre Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda yer alan *E. coli* ATCC 25922 standart suşu, kullanılmıştır. -20 °C'den çıkarılan stok kültür beyin-kalp infüzyon (BHI) agara tek koloni düşürme yöntemi ile 37 °C'de 24 saat inkübe edilip kültüre edilmiştir.

2.1.2.2. Test maddelerinin hazırlanması

Çalışmada kullanılan nanotoz madde ve kombinasyonları mg cinsinden hassas terazi ile tartılıp ependorf içerisinde 1 mL distile su içerisinde çözülmüştür.

2.1.2.3. Mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılan besi ortamları ve kimyasallar

Mueller-hinton broth (MHB) besiyeri

Sığır eti-kalp ekstraktı	4 g
Kazein hidrolizat	17,5 g
Nisasta	1,5 g
Distile su	1000 mL

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH 7,4± 0,2'ye ayarlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Beyin-kalp infüzyon (BHI) agar

Sığır kalbi	5 g
Dana beyni	12,5 g
Di sodyum hidrojen fosfat	2,5 g
D-(+) Glukoz	2 g
Pepton	10 g
Sodyum klorür	5 g
Agar	15 g
Distile su	1000 mL

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH 7,4± 0,2'ye ayarlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Beyin-kalp infüzyon (BHI) broth

Sığır kalbi	5 g
Dana beyni	12,5 g
Di sodyum hidrojen fosfat	2,5 g
D-(+) Glukoz	2 g
Pepton	10 g
Sodyum klorür	5 g
Distile su	1000 mL

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, pH 7,4± 0,2'ye ayarlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

%1 Glukozlu beyin-kalp infüzyon broth BHI)

Sığır kalbi	5 g
Dana beyni	12,5 g
Di sodyum hidrojen fosfat	2,5 g
D-(+) Glukoz	2 g
Pepton	10 g
Sodyum klorür	5 g
Glukoz	% 1
Distile su	1000 mL

Besiyeri içeriği distile suda çözüldükten sonra, 115°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

Fizyolojik tuzlu su

Sodyum klorür	9 g
Distile su	1000 mL

Sodyum klorür distile suda çözüldükten sonra, 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

MTT boyası

MTT (Sigma),	1 g
Steril PBS	200 mL

Steril PBS içerisine eklenen MTT boyası, manyetik karıştırıcıda ısı olmadan 20 dk. karıştırıldıktan sonra 0,22 µL'lik filtreden geçirilmiştir. Steril ependorflara 1 mL olacak şekilde dağıtıldıktan sonra, alüminyum folyoyla sarılarak -20 °C'de saklanmıştır.

2.1.3. Hücre kültürü çalışmaları

2.1.3.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma), Fetal Bovine Serum (Sigma), Penicilin-Streptomycin (Sigma), Trypsin-EDTA Solution (10X) (Sigma), Dimethyl Sulfoxide (Riedel de Haen), Dimethyl Sulfoxide (Sigma), MTT (Sigma), Trypan Blue (Merck), PBS tablet (Sigma), EDTA (Merck), Sıvı Azot

2.1.3.2. Kullanılan sarf malzemeler

25 cm², 75 cm²'lik flasklar, 96 kuyucuklu plakalar (TPP), enjektörler (50 ml hacminde), 500 ve 1000 ml'lik Durham şişeler, 10 ml'lik tek kullanımlık pipetler, steril polipropilen santrifüj tüpleri (15 ve 50' ml hacminde), steril filtreler, Thoma Lamı.

2.1.3.3. Kullanılan aletler ve cihazlar

Soğutmalı ve yüksek devirli santrifüj (Cryste), otoklav, -86 derin dondurucu, buzdolabı (Arçelik), aspiratör (Benchmark Accuris), orbital çalkalayıcı (Benchmark Scientific), hassas terazi (Axis), CO₂ karbondioksit inkübatörü (Panasonic), Steril kabin (Cruma), sıvı azot kabı (Worthington), otomatik pipetler (Eppendorf), su banyosu (Clifton), Eliza cihazı (ELx808-IU, Bio-Tek), Inverted mikroskop (Olympus), 12 kanallı mikropipet (Eppendorf).

2.1.3.4. Kullanılan araç ve gereçlerin hazırlanması

Çalışmalarda kullanılan plastik malzemeler ve sıvı solüsyonlar alüminyum folyolara sarılı olarak otoklavda 121°C, 1,5 atm / Hg basınçta 20 dakika süre ile steril edilerek kullanılmıştır. Kullanılan bazı sıvı kimyasallar 0,2 µm aralıklı selüloz nitrat filtreden geçirilerek kullanılmıştır.

2.1.3.5. Çalışmada kullanılan hücreler

HaCaT hücre hattı

HaCaT (İnsan epidermal deri hücreleri) bilimsel araştırmalarda yaygın olarak kullanılan, yetişkin insan derisinden spontan olarak dönüştürülmüş anöploid ölümsüz keratinosit hücre hattıdır (Boukamp vd., 1988; Schoop, Fusenig & Mirancea, 1999; Ölschläger, Schrader & Hockertz, 2009;). HaCaT hücreleri CLS (Cell Line Services, Eppelheim, Germany) hücre bankasından temin edilmiştir.

Cilt hasarına neden olabilecek kimyasalların toksikolojik potansiyelini *in vitro* olarak değerlendirmek için tanınmış bir model oluşturan insan HaCaT keratinosit hücre hattını kullanarak AgNP'lerin potansiyel cilt toksisitesini değerlendirmeleri üzerine çalışmalar yer almaktadır (Gibbs, 2009).

HaCaT hücre hattı %10'luk Fetal Sığır Serumı, %1 Penisilin streptomisin ve %7,5'lik NaHCO₃ içeren Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) besiyerinde %70 yoğunluğa ulaşana kadar CO₂ inkübatöründe 37°C'de inkübe edilmiştir.

2.1.3.6. Test maddelerinin hazırlanması

Çalışmada kullanılan nanotoz madde ve kombinasyonları mg cinsinden hassas terazi ile tartılıp flakon içerisinde 2 mL %10'luk Fetal Sıgır Serumu, %1 Penisilin streptomisin ve %7,5'lik NaHCO₃ içeren DMEM besiyeri içerisinde çözülmüştür.

2.2. Metod

2.2.1. Antimikrobiyal duyarlılık testleri

2.2.1.1. Minimum inhibisyon konsantrasyon testi

Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK), organizmanın büyümesini tamamen inhibe eden en düşük antimikrobiyal ajan konsantrasyonudur (McKinnon, & Davis, 2004; CLSI, 2012, Diene vd., 2017). MİK uç noktasının belirlenmesi için görüntüleme cihazları, kuyulardaki büyümeyi ayırt etmede yüksek yeteneği ile mikrodilüsyon testlerinin okunmasını ve sonuçların kaydedilmesini kolaylaştırmaktadır. Boya reaktiflerinin kullanımına dayalı çeşitli kolorimetrik yöntemler geliştirilmiştir. Tetrazolyum tuzları, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ve 2,3 bis {2-metoksi-4-nitro-5-[(sülfenilamino)karbonil]-2Htetrazolyum hidroksit} (XTT), hem antifungal hem de antibakteriyel mikrodilüsyon deneyleri için MİK son noktasının belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Kuhn vd., 2003; Al-Bakri & Afifi, 2007; HanQiao vd., 2012; Monteiro vd., 2012).

Nanotoz maddelerin antibakteriyel aktivitesi mikrobroth dilüsyon testiyle sularda indikatör bir bakteri olan *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanılarak test edilmiştir. Ag ve Cu nanopartikül konsantrasyonu arasında seçildi. Antibakteriyel test ortamı olarak kullanılmıştır. Bu amaçla, 100 µL Muller Hilton broth (MHB) besiyeri 96 kuyucuklu mikrotitre plakasının tüm kuyucuklarına eklenmiştir. MHB ortamında süspansiyon haline getirilmiş Nanotoz maddelerin çözeltilerinden 100 µl 0.019-10 mg/L konsantrasyon aralığında 96 kuyucuklu plakaya eklenmiştir ve seri ½'lik dilüsyonlar yapılmıştır. Daha sonra kuyucuklara 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanan *E. coli* ATCC 25922 bakterisinden 100 µl eklenmiştir . Plakalar 37 °C' de 24 saat inkübe edilmiştir (CLSI, 2006). İnkübasyon sonrası herbir kuyucuğa 10 µL MTT boyası eklenmiş ve plakalar 37 °C' de 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki renk değişimine göre MİK değerleri belirlenmiş ve kaydedilmiştir. Her deney, iki paralel halinde olmak üzere üç kez tekrarlanmıştır (Zamani vd., 2017).

2.2.1.2. Minimum bakterisidal konsantrasyon testi

Minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBK), hedef bakterinin %99.9'unu öldüren en düşük antibiyotik konsantrasyonu (mg/mL) olarak tanımlanmaktadır (Ameyes, 1996, s. 25; CLSI, 1998, 2006; French, 2006).

Test maddelerinin MBK değerlerinin belirlenmesi için MİK testinden sonra, MİK kuyucuğundan itibaren üremenin olmadığı tüm kuyucuklardan steril bir kürdan yardımıyla örnek alınıp BHI-agar petri yüzeyine ekim yapılmıştır. Daha sonra petriler 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası üremenin olmadığı kuyucuklar minimum bakterisidal konsantrasyonu olarak kaydedilmiştir (CLSI, 2006).

2.2.2. Adezyon testi

Test maddelerinin adezyon aktivitelerini belirlemek için *E.coli* ATCC 25922 suşu BHI broth besiyerinde 37 °C' de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kültürün yoğunluğu McFarland 0.5'e göre ayarlanmıştır. 24'lü mikrotitrasyon plağında kuyucuklara öncelikle steril diskler yerleştirilmiştir. Sonrasında kuyucuklara 450 µL içerisinde %1 glukoz bulunan BHI broth besiyerindeki 10⁷ kob/mL yoğunluğundaki mikroorganizma kültürü eklenmiş, üzerine ilgili nanotoz madde çözeltilerinden 50 µL eklenerek ekim yapılmıştır. Mikrotitrasyon plağı 37 °C' de 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında kuyucuklardaki süspansiyon uzaklaştırılmıştır. Ardından kuyucuklar steril FTS ile üç defa yıkanmıştır.

Tüm adezyon test çalışmalarında canlı bakteri koloni sayımı yapılmıştır. Koloni sayımı için inkübasyondan sonra steril FTS ile yıkanan diskler steril pens yardımıyla 5 mL FTS bulunan steril cam tüplere alınarak 1 dakika vortekse tabi tutulmuştur. Bu şekilde disklerin yüzeyine yapışan ve biyofilm oluşturan bakterilerin yüzeyden kaldırılması sağlanmıştır. Disklerin bulunduğu tüplerden seri dilüsyonlar yapılmış ve her bir dilüsyondan 100 µL yayma plak yöntemi ile BHI agara ekim yapılmıştır. Sonrasında 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Deneyler çift paralel olarak çalışılmış ve 3 kez tekrar edilmiştir. İnkübasyon sonunda koloni sayımı yapılmıştır ve mL'deki koloni sayısı hesaplanmıştır (Schug vd., 2020).

2.2.3. Ultrasonikasyon işlemi ile adezyon testi

Test maddelerinin ultrasonikasyon işlemi ile adezyon aktivitelerini belirlemek için *E.coli* ATCC 25922 suşu BHI broth besiyerinde 37 °C' de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kültürün yoğunluğu McFarland 0.5'e göre ayarlanmıştır. Daha sonra, steril bir cam tüpe 450 µL içerisinde %1 glukoz bulunan BHI broth besiyerindeki 10⁷ kob/mL

yoğunluğundaki mikroorganizma kültürü eklenmiştir. Üzerine nanotoz madde çözeltilerinden 50 µL eklenerek 1 dakika süreyle vortekslenmiştir. 15 dakika 35 kHz ultrasonik su banyosu sisteminde ultrasonikasyona tabi tutulmuştur. Ultrasonikasyon sonrasında 24'lü mikrotitrasyon plağındaki kuyucuklara steril diskler yerleştirilmiştir. Her bir kuyucuğa 500 µL ekim yapılmıştır. Mikroorganizma kontrolü olarak 10^7 kob/mL mikroorganizma kültürü 15 dakika ultrasonikasyon işlemine tabi tutularak ve ultrasonikasyonsuz olarak 500 µL kuyucuklara eklenmiştir. Mikrotitrasyon plakaları 37 °C' de 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki süspansiyon uzaklaştırılmıştır. Ardından kuyucuklar steril FTS ile üç defa yıkanmıştır. Canlı bakteri koloni sayımı 2.2.2.'de belirtildiği üzere yapılmış ve hesaplanmıştır. Deneyler çift paralel olarak çalışılmış ve 3 kez tekrar edilmiştir (Da Silva vd., 2018).

2.2.4. Biyofilm inhibisyon testi

Biyofilm inhibisyonu aktivite testi için *E.coli* ATCC 25922 suşu BHI broth besiyerinde 37 °C' de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kültürün yoğunluğu McFarland 0.5'e göre ayarlanmıştır. Daha sonra, 24'lü mikrotitrasyon plağına 450 µL %1 glukoz bulunan BHI broth besiyerindeki 10^5 kob/mL yoğunluğundaki mikroorganizma kültürü eklenmiş, üzerine 50 µL nanotoz madde çözeltilerinden ilave edilmiştir. Mikrotitrasyon plakları 37 °C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki süspansiyon uzaklaştırılmıştır. Ardından kuyucuklar steril FTS ile üç defa yıkanmıştır. Sonrasında canlı bakteri koloni sayımı 2.2.2.'de belirtildiği üzere yapılmış ve hesaplanmıştır. Deneyler çift paralel olarak çalışılmış ve 3 kez tekrar edilmiştir (Da Silva vd., 2018).

2.2.5. Ultrasonikasyon işlemi ile biyofilm inhibisyon testi

Ultrasonikasyon işlemi ile biyofilm inhibisyonu aktivite testi için bakteriler BHI broth besiyerinde 37 °C' de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kültürün yoğunluğu McFarland 0.5'e göre ayarlanmıştır. Daha sonra, steril bir cam tüpe 450 µL içerisinde %1 glukoz bulunan BHI broth besiyerindeki 10^5 kob/mL yoğunluğundaki mikroorganizma kültürü eklenmiş ve üzerine nanotoz madde çözeltilerinden 50 µL eklenerek iyice vortekslenmiştir. Sonrasında tüpler ultrasonikasyonlu su banyosuna yerleştirilerek 15 dakika 35 kHz ultrasonik su banyosu sisteminde ultrasonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra 24'lü mikrotitrasyon plağındaki kuyucuklara steril pens yardımıyla steril cam diskler yerleştirilmiştir. Ultrasonikasyon sonrasında 24'lü mikrotitrasyon plağındaki kuyucuklara 500 µL ekim yapılmıştır. Mikroorganizma kontrolü olarak 10^7 kob/mL mikroorganizma kültürü 15 dakika ultrasonikasyon işlemine tabi tutularak ve ultrasonikasyonsuz olarak 500 µL kuyucuklara

eklenmiştir. Sonrasında canlı bakteri koloni sayımı 2.2.2.'de belirtildiği üzere yapılmış ve hesaplanmıştır. Deneysel çift paralel olarak çalışılmış ve 3 kez tekrar edilmiştir (Da Silva vd., 2018).

2.2.6. Test maddelerinin sitotoksik aktiviteleri

2.2.6.1. HaCaT hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması ve deneylere hazırlanması

Stoktan hücre çıkarılması

-86°C'den çıkarılan HaCat hücrelerini içeren vialler, hızla eritildikten sonra, içinde 7 mL soğuk besiyeri bulunan santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Santrifüj tüpleri, 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım dikkatlice çekildikten sonra tüpün dibine birkaç kez elle vurularak peletin dağıtılması sağlanmıştır. Daha sonra pelet üzerine 6 mL besiyeri eklenmiştir. Elde edilen besiyeri-hücre karışımı otomatik pipet yardımıyla, santrifüj tüpünden alınarak, 25 cm²'lik flasklara aktarılmış ve 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde, inkübasyona bırakılmıştır.

HaCaT hücre dizilerinin pasajlanması

Hücre kültür kabında %70-80 oranında hücre çoğalması meydana geldiğinde pasajlama işlemi yapılmıştır. Bunun için flask içindeki kullanılmış hücre besiyeri cam pastör pipeti yardımıyla aspiratör ile çekilip atılmış ve kültür kabına yapışmış olan hücreler, iki kez PBS-EDTA ile yıkanarak beş dakika inkübatörde bekletildikten sonra cam pastör pipeti yardımıyla aspiratör ile çekilmiştir. Hücrenin yoğunluğuna bağlı olarak, 150 cm²'lik hücre kültür kabı için 3 mL, 75 cm²'lik hücre kültür kabı için 1.5 mL, 25 cm²'lik hücre kültür kabı için 750 µL 1x tripsin PBS-EDTA konmuş, beş dakika inkübatörde bekletilerek hücrelerin yapıştıkları flasktan kalkmaları sağlanmıştır. Daha sonra invert mikroskopta hücreler kontrol edilerek kalkmayan hücrelerin, elle flask kenarına birkaç kez vurularak ayrılması sağlanmıştır. Tripsinin etkisini nötralize etmek için, hücrelerin üzerine, hücre kültür kabının büyüklüğüne göre 150 cm²'lik için 30 mL besiyeri, 75 cm²'lik için 15 mL, 25 cm²'lik için 7.5 mL besiyeri eklenmiş ve pipetleme yapılmıştır. Santrifüj tüpünde homojen olarak dağılan hücreler, pipet yardımıyla hücre kültür kaplarına paylaştırılmıştır.

2.2.6.2. Test madde dozlarının hazırlanması

HaCat hücreleri için kullanılacak nanotoz test maddeleri 1000, 500, 200, 100, 50 ve 10 µg/mL dilüsyonlar halinde DMEM besiyeri içerisinde 6 doz şeklinde hazırlanmıştır.

2.2.6.3. Hücrelerin test için hazırlanması

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler flask yüzeyini %70-80 oranında kapladıkları zaman PBS-EDTA ile 2 kez muamele edildikten sonra 1 x tripsin PBS-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırılmıştır. Trypan blue boyası ile boyanan hücreler, Thoma lamı yardımıyla 3 kez sayılarak MTT testi için 96 kuyucuklu hücre kültürü tabakalarının her kuyucuğunda belirlenen sayıda 10×10^3 hücre olacak şekilde % 10 FBS içeren besiyerinde süspansiyon haline getirildikten sonra 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına 0,1 mL hücre süspansiyonu aktarılmıştır. Hücrelerin yapışması ve ortama adaptasyonu için 37°C'de 48 saat inkübe edilmişlerdir. 48 saat inkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerindeki besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin üzerine test maddelerinin sitotoksik etkilerini belirlemek üzere, test maddelerinin istenen konsantrasyonlarını içeren taze besiyerleri ilave edilip 24 saat 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. DMEM besiyeri içerisinde 1000, 500, 200, 100, 50 ve 10 µg/mL'lik dilüsyonlar hazırlanmıştır. Negatif kontrol olarak besiyeri çözeltileri kullanılmıştır.

2.2.6.4. Sitotoksite Testi

Mitokondriyal aktiviteye bağlı MTT testi

MTT testi gibi sitotoksite testleri *in vitro* toksikoloji çalışmalarında, yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Fotakis & Timbrell, 2006). Triazol türevlerinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri MTT yöntemi ile saptanmıştır. MTT testi, ilk olarak Mosmann tarafından tanımlanmış kolorimetrik bir testtir (Mosmann, 1983). MTT testi genellikle yeni ilaçların geliştirilmesinde hücre çoğalmasının ve sitotoksitenin belirlenmesi için kullanılan bir yöntemdir (Akhir vd., 2011). Yöntemin temeli, canlı hücrelerde tetrazolyum tuzlarının mitokondriyal dehidrogenaz enzimi tarafından suda çözülme-yen koyu mavi/mor renkli formazan tuzlarına dönüşmesi esasına dayanmaktadır. Oluşan formazan tuzlarının miktarı canlı hücre ile doğru orantılı, sitotoksite ile ters orantılıdır (Berridge, Herst & Tan, 2005).

MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrozolyum bromür; Thiazolyl blue), sarı renkli olup hücre içine nüfuz ederek absorbe olur ve kültür ortamındaki mitokondriyal aktivitesi devam eden canlı hücrelerin kantitasyonunu sağlar. Canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan mitokondriyal dehidrogenaz enzimi, MTT boyasındaki tetrazolium halkasını parçalar. Bunun sonucunda MTT, suda çözünmeyen mor renkli formazana dönüşür (Mosmann, 1983). Oluşan bu formazan, izopropanol veya DMSO gibi başka bir çözücü yardımı ile suda çözünebilir hale

getirilir ve oluşan renk reaksiyonu spektrofotometrik olarak okunup kantite edilir. Dolayısıyla bu yöntem sadece canlı hücreleri saptar (Freshney, 2005; Oktar, 2009).

Test maddeleri ile 24 saat muamele edilen hücrelerden inkübasyon süresi sonunda besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Hücreler MTT solüsyonu ile canlı hücrelerin mitokondrial metabolik aktiviteleri sonucu MTT boyasının suda çözünmeyen formazan tuzuna dönüştürülmesi için 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası içeren besiyerleri kuyucuklardan uzaklaştırılmıştır. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözünmesi için her bir kuyucuğa 100 µL DMSO ilave edilmiştir. Plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri (OD) çalkalayıcı ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılık oranı %100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Bu test, 8 paralel 3 kez tekrar edilmiştir.

2.2.6.5. Mikroskopi

Hücrele inverted mikroskop (olympus) altında incelenmiştir

2.2.6.6. İstatistiksel analiz

MTT deneylerinin sonuçlarının istatistiksel analizinde (Statistical Package for the Social Sciences) SPSS 21 programı kullanılmış ve elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir

3. BULGULAR

3.1. Minimum İnhibisyon Konsantrasyon ve Minimum Bakterisidal Konsantrasyonun Belirlenmesi

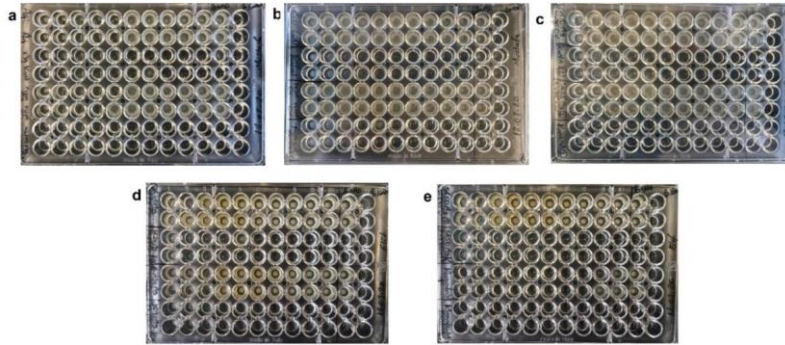
Çalışmada *E.coli* ATCC 25922 suşuna karşı Ag ve Cu nanotoz ve nanotoz kombinasyonlarından; %100 Ag, Ag, %90 Ag + %10 Cu, %75 Ag + %25 Cu, %50 Ag + %50 Cu ve %25 Ag + %75 Cu 10 - 0.019 mg/L aralığında, %100 Cu, CuO, %10 Ag + %90 Cu ise 20 - 0.039 mg/L aralığında çalışılarak MİK değerleri belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 3.1.'de gösterilmiştir. MİK konsantrasyonları %100 Ag > Ag > %90 Ag + %10 Cu > %75 Ag + %25 Cu > %50 Ag + %50 Cu > %25 Ag + %75 Cu > %10 Ag + %90 Cu > %100 Cu > CuO, nanotoz kombinasyonlarının sırasıyla 0,625 > 0,8 > 1,775 > 1,875 > 2,916 > 3,541 > 8,25 > 13,33 > 15 mg/L değerlerinde kaydedilmiştir.

E.coli ATCC 25922 suşuna karşı nanotozların antimikrobiyal aktivite sıralaması en yüksekten düşüğe doğru olacak şekilde; %100 Ag > Ag > %90 Ag + %10 Cu > %75 Ag + %25 Cu > %50 Ag + %50 Cu > %25 Ag + %75 Cu > %10 Ag + %90 Cu > %100 Cu > CuO 'dir.

Çalışmada seri dilüsyon yöntemi esas alınarak, *E.coli* ATCC 25922 suşuna karşı nanotozların MBK değerleri belirlenmiştir. Deneylerde saptanan MBK değerleri Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Nanotoz maddelerin hazırlanan süspansiyon halindeki *Escherichia coli* ATCC 25922 suşuna karşı saptanan MİK ve MBK değerleri (mg/L)

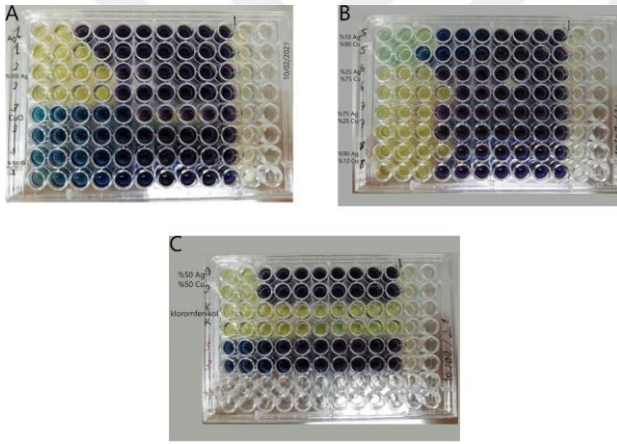
Metal Temelli Nanotoz maddeler	%100 Ag	Ag	%90 Ag+ %10 Cu	%75 Ag + %25 Cu	%50 Ag + %50 Cu	%25 Ag + %75 Cu	%10 Ag + %90 Cu	%100 Cu	CuO
MİK (mg/L)	0,625	0,8	1,775	1,875	2,916	3,541	8,25	13,33	15
MBK (mg/L)	>0,625	>0,8	>1,775	>1,875	>2,916	>3,541	>8,25	>13,33	>15



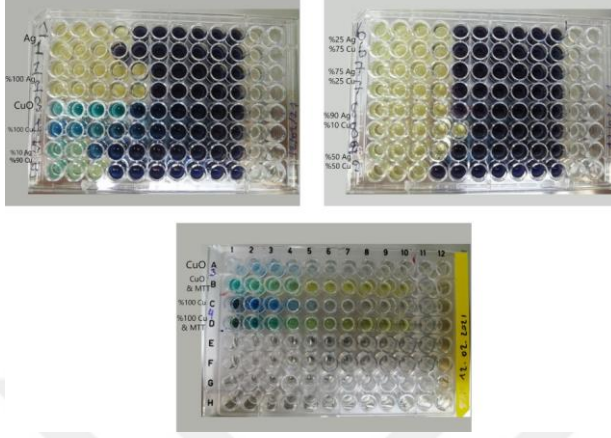
Şekil 3.1. MİK testi mikrotitrasyon plaka görüntüsü.

E.coli ATCC 25922 suşu, Ag, %100Ag, CuO ve %100 Cu, a) A-B(1-10) Ag, C-D(1-10) Ag madde kontrolü, E-F(1-10) %100 Ag, G-H(1-10) %100 Ag madde kontrolü, A-H(11)

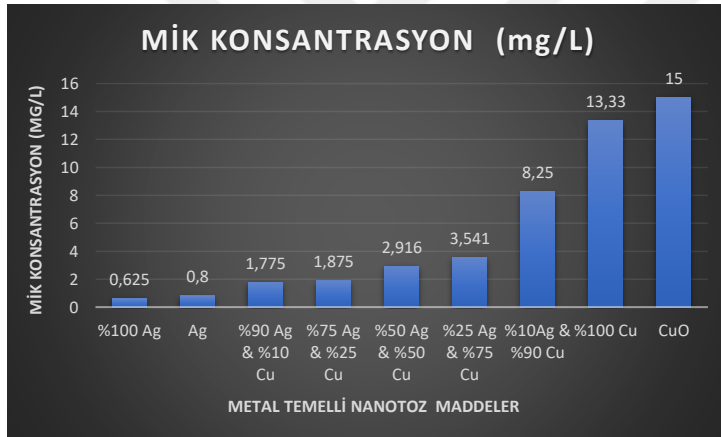
mikroorganizma kontrolü, A-H(12) besiyeri kontrolü. b) A-B(1-10) %100 Cu, C-D(1-10) %100 Cu madde kontrolü, E-F(1-10) CuO, G-H(1-10) CuO madde kontrolü, A-H(11) mikroorganizma kontrolü, A-H(12) besiyeri kontrolü. c) A-B(1-10) %10 Ag+ %90 Cu, C-D(1-10) %10 Ag+ %90 Cu madde kontrolü, E-F(1-10) %25Ag+ %75 Cu, G-H(1-10) %25Ag+ %75 Cu madde kontrolü, A-H(11) mikroorganizma kontrolü, A-H(12) besiyeri kontrolü. d) A-B(1-10) %75 Ag+ %25 Cu, C-D(1-10) %75 Ag+ %25 Cu madde kontrolü, E-F(1-10) %90Ag+ %10 Cu, G-H(1-10) %90Ag+ %10 Cu madde kontrolü, A-H(11) mikroorganizma kontrolü, A-H(12) besiyeri kontrolü. e) A-B(1-10) %50 Ag+ %50 Cu, C-D(1-10) %50 Ag+ %50 Cu madde kontrolü, A-H(11) mikroorganizma kontrolü, A-H(12) besiyeri kontrolü. Test maddeleri doz aralığı 10 – 0.019 mg/L'dir.



Şekil 3.2. MK testi MTT boyaması mikrotitrasyon plaka görüntüsü.



Şekil 3.3. MİK testi MTT boyaması mikrotitrasyon plaka görüntüsü.



Şekil 3.4. Ag, Cu nanotoz ve kombinasyonlarının *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu üzerindeki MİK değerleri (mg/L).

3.2. Biyofilm inhibisyon testinin değerlendirilmesi

Nanotozların, seçilen biyofilm pozitif *E.coli* ATCC 25922 suşu üzerinde biyofilm inhibisyon aktiviteleri incelenmiştir. Tablo 3.3. ve Şekil 3.6.'da *E.coli* ATCC 25922 bakterisinin biyofilm inhibisyon aktiviteleri verilmiştir.

Test maddelerinin biyofilm inhibisyon aktivitelerini belirlemek için seçilen *E.coli* ATCC 25922 suşu üzerinde metod 2.2.2.'de belirtildiği gibi canlı bakteri koloni sayımı yapılmış ve sonuçlar kaydedilmiştir.

Biyofilm inhibisyon aktivite sıralaması ise en yüksekten düşüğe doğru olacak şekilde; %100 Ag > %90 Ag + %10 Cu > %75 Ag + %25 Cu > %50 Ag + %50 Cu > %25 Ag + %75 Cu > %10 Ag + %90 Cu > %100 Cu olarak kaydedilmiştir.

3.3. Adezyon testinin değerlendirilmesi

Nanotozların, seçilen biyofilm pozitif *E.coli* ATCC 25922 suşu üzerinde adezyon aktiviteleri incelenmiştir. Tablo 3.2. ve Şekil 3.5.'te *E.coli* ATCC 25922 bakterisinin adezyon aktiviteleri verilmiştir.

Seçilen *E.coli* ATCC 25922 suşu üzerinde test maddelerinin adezyon aktivitelerini belirlemek için metod 2.2.3'te anlatıldığı şekilde kurulan deneylerde inkübasyon süreleri farklı sürelerde denenmiştir. Yapılan çalışmada 1, 2 ve 4 saatlik inkübasyon süreleri denenmiş ve 1 ve 2 saatlik inkübasyon sonrasında yapılan koloni sayım sonuçları ile 4 saatlik inkübasyon sonrası yapılan koloni sayım sonuçları kıyaslanarak yapılan değerlendirmeye göre 4 saatlik inkübasyon sonuçları tezde sunulmuştur.

E.coli ATCC 25922 suşuna karşı nanotozların adezyon aktivite düzeyleri sırasıyla %100 Ag > %90 Ag + %10 Cu > %75 Ag + %25 Cu > %50 Ag + %50 Cu > %25 Ag + %75 Cu > %10 Ag + %90 Cu > %100 Cu'dur.

3.4. Ultrasonikasyon işlemi ile adezyon testi sonuçları

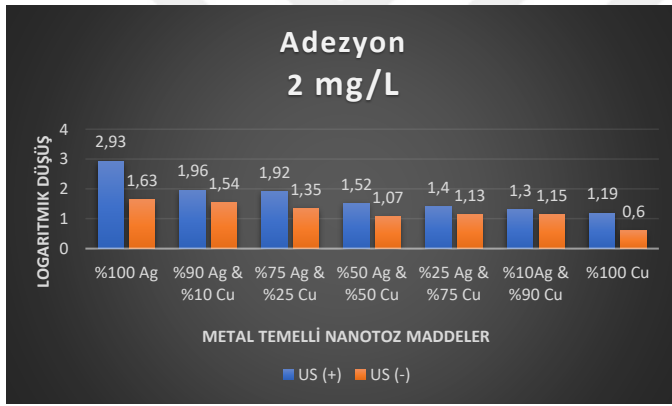
Ultrasonikasyon işlem muamelesinin adezyon testlerindeki kullanımında, ultrasonik titreşimler sayesinde nanotoz test maddelerinin sinerjistik etki yaratarak potansiyel aktivitelerini arttırmak hedeflenmiştir. Bu etki ise 15 dakikalık ultrasonikasyon işlem muamelesine tabi tutulan test maddelerinde ultrasonikasyon muamelesi yapılmaksızın kurulan deneylere kıyasla ortaya çıkan sinerjistik etki sonuçlarda gözlenmiştir.

Ultrasonikasyon işleminde, su banyosunda 5 dakika ortam sıcaklığının eşitlenmesi için bekletilmesi, deney şartlarının optimizasyonu için önemlidir. Çalışmada adezyon testlerinde ultrasonikasyon işlem muamelesi farklı sürelerde denenmiştir. 3-6-9, 5-10-15 ve 10-20-30 dk'lık ultrasonikasyon işlemine tabi tutularak ultrasonikasyon işlem muamele süresi optimize edilmiştir. Bu ultrasonikasyon parametresi 15 dk olarak optimize edilmiştir.

E.coli ATCC 25922 suşuna karşı nanotozların adezyon aktivite düzeyleri sırasıyla %100 Ag > %90 Ag + %10 Cu > %75 Ag + %25 Cu > %50 Ag + %50 Cu > %25 Ag + %75 Cu > %10 Ag + %90 Cu > %100 Cu olarak sonuçlanmıştır.

Tablo 3.2. Adezyon Aktiviteleri 2 mg/L logaritmik düşüş değerleri

Mikroorganizma	Test maddeleri	Madde konsantrasyonu mg/L	Logaritmik düşüş değerleri	
			(+US)	(-US)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (+US) log 7 (-US) log 7.3	%100 Ag	2 mg/L	log 2,93	log 1,63
	%90 Ag + %10 Cu	2 mg/L	log 1,96	log 1,54
	%75 Ag + %25 Cu	2 mg/L	log 1,92	log 1,35
	%50 Ag + %50 Cu	2 mg/L	log 1,52	log 1,07
	%25 Ag + %75 Cu	2 mg/L	log 1,4	log 1,13
	%10 Ag + %90 Cu	2 mg/L	log 1,3	log 1,15
	%100 Cu	2 mg/L	log 1,19	log 0,6
	Ag ₂ NO ₃	0,1 mg/L	log 2,93	log 1,63
	CuCl ₂	0,1 mg/L	log 1,96	log 1,54



Şekil 3.5. 2 mg/L nanotoz maddelerin adezyon aktivite değerleri. *E. coli* ATCC 25922 suşu üzerinde ultrasonikasyonlu ve ultrasonikasyonsuz adezyon aktivite logaritmik düşüş değerleri.

3.5. Ultrasonikasyon işlemi ile biyofilm inhibisyon testi sonuçları

Yapılan çalışmada ultrasonikasyon işlem muamelesinin biyofilm inhibisyon testlerindeki kullanımında ultrasonik titreşimler sayesinde nanotoz test maddelerinin sinerjistik etki yaratarak potansiyel aktivitelerini arttırmak hedeflenmiştir. Bu etki ise 15 dakikalık ultrasonikasyon işlem muamelesine tabi tutulan test maddelerinde ultrasonikasyon muamelesi yapılmaksızın kurulan deneylere kıyasla ortaya çıkan sinerjistik etki sonuçlarda gözlenmiştir.

Ultrasonikasyon işleminde, su banyosunda 5 dakika ortam sıcaklığının eşitlenmesi için bekletilmesi deney şartlarının optimizasyonu için önemlidir. Biyofilm inhibisyon testlerinde ultrasonikasyon işlem muamelesi farklı sürelerde denenmiştir. 3-6-9, 5-10-15 ve 10-20-30

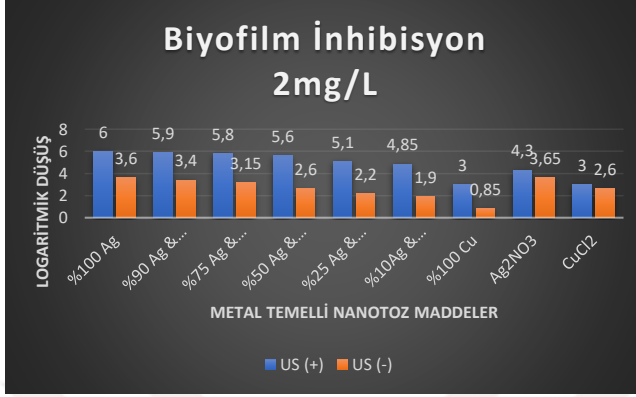
dk'lık ultrasonikasyon işlemine tabi tutularak ultrasonikasyon işlem muamele süresi optimize edilmiştir. Bu ultrasonikasyon parametresi 15 dk olarak optimize edilmiştir.

E.coli ATCC 25922 suşuna karşı nanotozların ultrasonikasyon işlem ile biyofilm inhibisyon aktivite sıralaması ise en yüksekten düşüğe doğru olacak şekilde; %100 Ag > %90 Ag + %10 Cu > %75 Ag + %25 Cu > %50 Ag + %50 Cu > %25 Ag + %75 Cu > %10 Ag + %90 Cu > %100 Cu olarak sonuçlanmıştır.

Tablo 3.3. *Biyofilm inhibisyon aktiviteleri 2 mg/L logaritmik düşüş değerleri*

Mikroorganizma	Test maddeleri	Madde konsantrasyonu mg/L	Logaritmik düşüş değerleri	
			(+US)	(-US)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (+US) log 7) (-US) log 7.3)	%100 Ag	2 mg/L	log 6	log 3,6
	%90 Ag + %10 Cu	2 mg/L	log 5,9	log 3,4
	%75 Ag + %25 Cu	2 mg/L	log 5,8	log 3,15
	%50 Ag + %50 Cu	2 mg/L	log 5,6	log 2,6
	%25 Ag + %75 Cu	2 mg/L	log 5,1	log 2,2
	%10 Ag + %90 Cu	2 mg/L	log 4,85	log 1,9
	%100 Cu	2 mg/L	log 3	log 0,85
	Ag ₂ NO ₃	0,2 mg/L	log 4,3	log 3,65
	CuCl ₂	0,2mg/L	log 3	log 2,6

Maddelerin *E.coli* ATCC25922 suşu üzerinde 15 dakikalık ultrasonikasyon ve ultrasonikasyon işlemi yapılmaksızın 37°C'de 24 saatlik inkübasyon koloni sayım sonuçlarına göre mikroorganizma logaritma değerine kıyasla logaritmik düşüş değerleri verilmiştir. Test maddeleri 2 mg/L, kontrol grubu Ag₂SO₄ ve CuCl₂ ise 0,2 mg/L'dir.

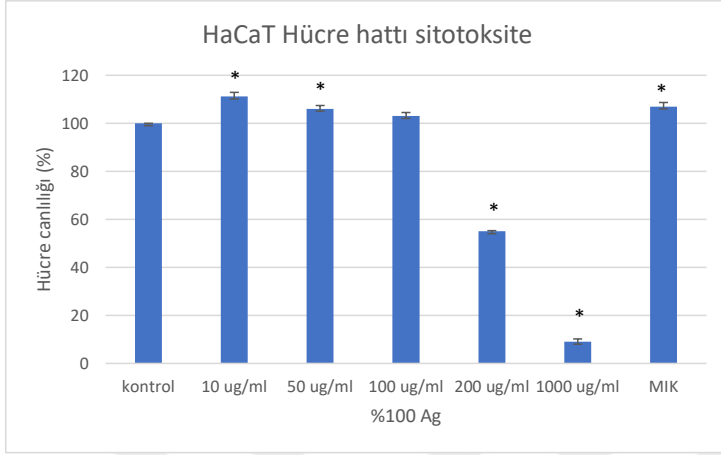


Şekil 3.6. 2 mg/L konsantrasyon değerlerine göre nanopartiküllerin biyofilm inhibisyon aktivite değerleri. *E. coli* ATCC 25922 suşu üzerinde ultrasonikasyonlu ve ultrasonikasyonsuz biyofilm inhibisyon aktivite logaritmik düşüş değerleri.

3.6. Sitotoksitenin Belirlenmesi

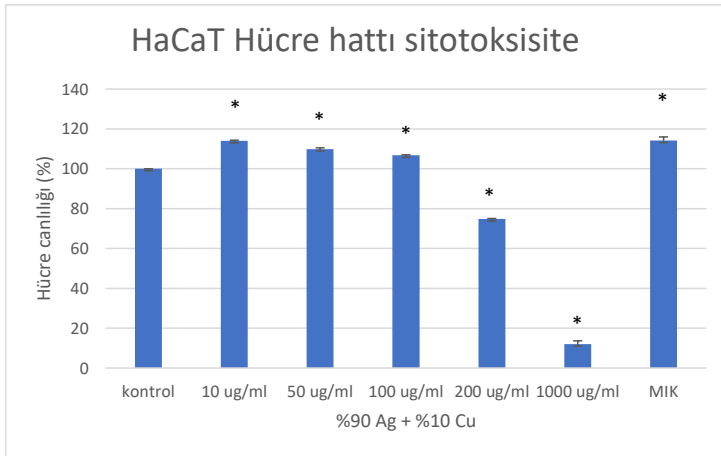
Nanotozların konsantrasyonlarının HaCaT hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik etkileri belirlenmiştir. HaCaT hücreleri için kontrol ve 1000, 500, 200, 100, 50 ve 10 µg/mL; nanotoz konsantrasyonlarına ait MTT sonuçları ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda okutulmuştur. Daha sonra her bir gruba ait 24 saat için kontrole göre % hücre canlılık değerleri hesaplanmıştır. HaCaT hücrelerine uygulanan nanotoz gruplarına ait % hücre canlılık değerleri şekil 3.4'ten 3.10'a verilmiştir.

24. saatteki % hücre canlılık değerleri HaCaT hücrelerinde kontrol grubuna göre 1000, 500, 200, 100, 50 ve 10 µg/mL nanotoz konsantrasyonlarında sırasıyla % olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubuna göre hücre canlılık değerlerinde meydana gelen farklılıklar istatistiksel anlamlılık değerleri $p < 0,05^{**}$



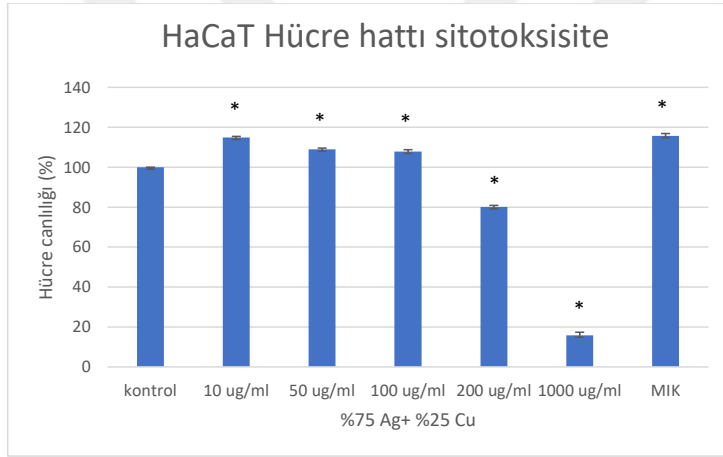
Şekil 3.7. % 100 Ag nanotoz maddenin HaCaT hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.

MTT test sonuçlarına göre; %100 Ag içeren nanotozun, MİK değeri, 10, 50 ve 100 $\mu\text{g/ml}$ 'lik derişimlerinin 24 saat süreyle HaCaT hücrelerine uygulanması sonucunda hücre azalmasına yol açmadığı gibi hücre sayısında az miktarda (%3-10 oranında) artışa neden olduğu belirlenmiştir. 200 $\mu\text{g/ml}$ 'lik derişimin ise 24 saat süreyle HaCaT hücrelerine uygulanması sonucunda hücre canlılığında %45 oranında bir azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Derişimin 1000 $\mu\text{g/ml}$ 'ye çıkması durumunda ise hücre canlılığında yaklaşık %90 oranında bir düşüşe neden olduğu ve toksik etki yaptığı gözlenmiştir.



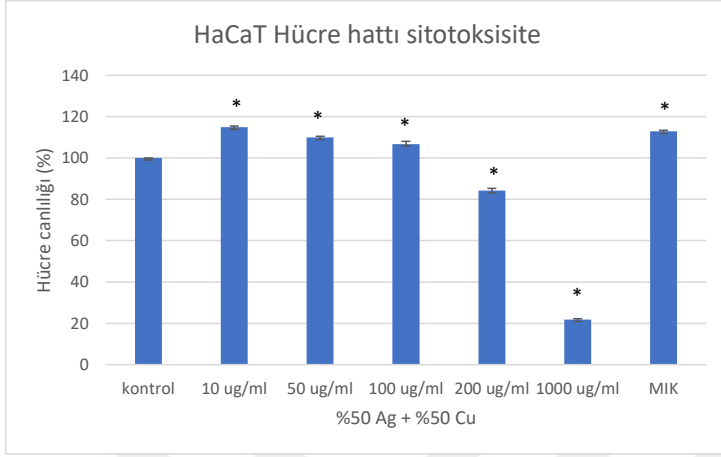
Şekil 3.8. % 90 Ag + % 10 Cu nanotoz maddenin HaCaT hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.

MTT test sonuçlarına göre; %90 Ag +%10 Cu içeren nanotozun, MİK değeri, 10, 50 ve 100 µg/ml'lik derişimlerinin 24 saat süreyle HaCaT hücrelerine uygulanması sonucunda hücre azalmasına yol açmadığı gibi hücre sayısında az miktarda (%6-15 oranında) artışa neden olduğu belirlenmiştir. 200 µg/ml'lik derişimin ise 24 saat süreyle HaCaT hücrelerine uygulanması sonucunda hücre canlılığında %25 oranında bir azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Derişimin 1000 µg/ml'ye çıkması durumunda ise hücre canlılığında yaklaşık %90 oranında bir düşüşe neden olduğu ve toksik etki yaptığı gözlenmiştir.



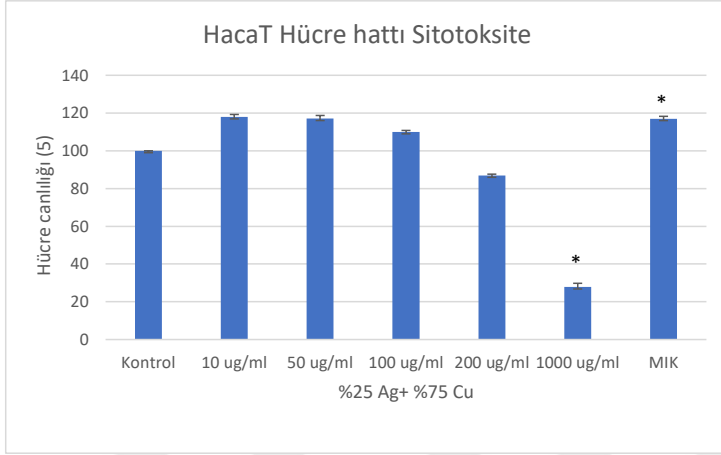
Şekil 3.9. %75 Ag + %25 Cu nanotoz maddenin HaCaT hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.

MTT test sonuçlarına göre; %75 Ag +%25 Cu içeren nanotozun, MİK değeri, 10, 50 ve 100 µg/ml'lik derişimlerinin 24 saat süreyle HaCaT hücrelerine uygulanması sonucunda hücre azalmasına yol açmadığı gibi hücre sayısında az miktarda (%7-15 oranında) artışa neden olduğu belirlenmiştir. 200 µg/ml'lik derişimin ise 24 saat süreyle HaCaT hücrelerine uygulanması sonucunda hücre canlılığında %20 oranında bir azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Derişimin 1000 µg/ml'ye çıkması durumunda ise hücre canlılığında yaklaşık %85 oranında bir düşüşe neden olduğu ve toksik etki yaptığı gözlenmiştir.



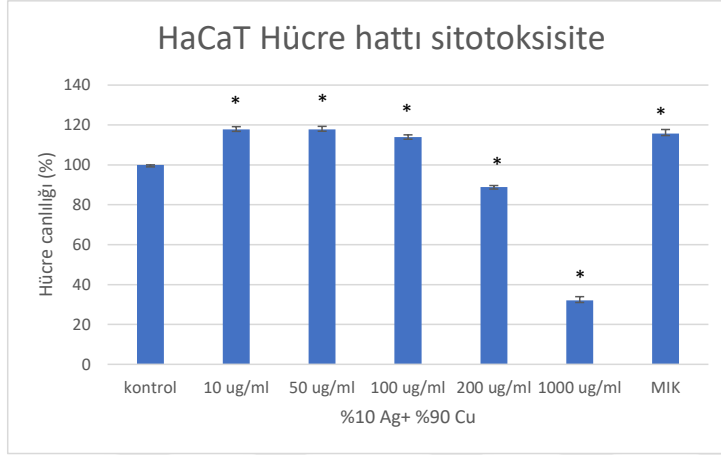
Şekil 3.10. %50 Ag + %50 Cu nanotoz maddenin HaCaT hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.

MTT test sonuçlarına göre; %50 Ag +%50 Cu içeren nanotozun, MİK değeri, 10, 50 ve 100 µg/ml'lik derişimlerinin 24 saat süreyle HaCaT hücrelerine uygulanması sonucunda hücre azalmasına yol açmadığı gibi hücre sayısında az miktarda (%6-15 oranında) artışa neden olduğu belirlenmiştir. 200 µg/ml'lik derişimin ise 24 saat süreyle HaCaT hücrelerine uygulanması sonucunda hücre canlılığında %15 oranında bir azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Derişimin 1000 µg/ml'ye çıkması durumunda ise hücre canlılığında yaklaşık %79 oranında bir düşüşe neden olduğu ve toksik etki yaptığı gözlenmiştir.



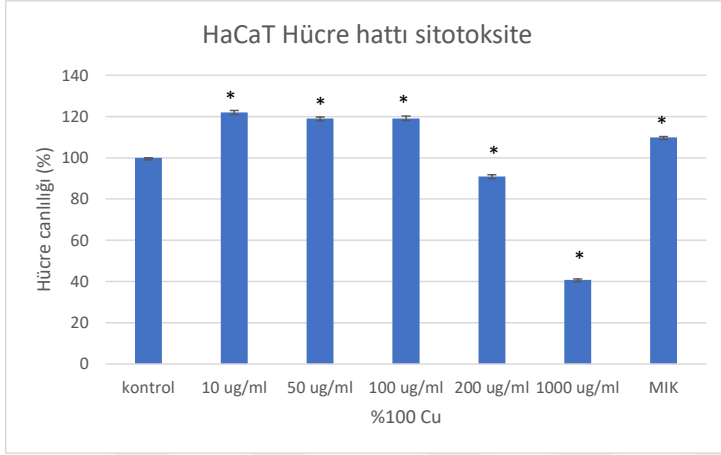
Şekil 3.11. %25 Ag + %75 Cu nanotoz maddenin HaCaT hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.

MTT test sonuçlarına göre; %25 Ag +%75 Cu içeren nanotozun, MİK değeri, 10, 50 ve 100 µg/ml'lik derişimlerinin 24 saat süreyle HaCaT hücrelerine uygulanması sonucunda hücre azalmasına yol açmadığı gibi hücre sayısında az miktarda (%9-18 oranında) artışa neden olduğu belirlenmiştir. 200 µg/ml'lik derişimin ise 24 saat süreyle HaCaT hücrelerine uygulanması sonucunda hücre canlılığında %13 oranında bir azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Derişimin 1000 µg/ml'ye çıkması durumunda ise hücre canlılığında yaklaşık %73 oranında bir düşüşe neden olduğu ve toksik etki yaptığı gözlenmiştir.



Şekil 3.12. %10 Ag + %90 Cu nanotoz maddenin HaCaT hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.

MTT test sonuçlarına göre; %10 Ag +%90 Cu içeren nanotozun, MİK değeri, 10, 50 ve 100 µg/ml'lik derişimlerinin 24 saat süreyle HaCaT hücrelerine uygulanması sonucunda hücre azalmasına yol açmadığı gibi hücre sayısında az miktarda (%13-18 oranında) artışa neden olduğu belirlenmiştir. 200 µg/ml'lik derişimin ise 24 saat süreyle HaCaT hücrelerine uygulanması sonucunda hücre canlılığında %11 oranında bir azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Derişimin 1000 µg/ml'ye çıkması durumunda ise hücre canlılığında yaklaşık %68 oranında bir düşüşe neden olduğu ve toksik etki yaptığı gözlenmiştir.



Şekil 3.13. %100 Cu nanotoz maddenin HaCaT hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi.

MTT test sonuçlarına göre; %100 Cu içeren nanotozun, MİK değeri, 10, 50 ve 100 µg/ml'lik derişimlerinin 24 saat süreyle HaCaT hücrelerine uygulanması sonucunda hücre azalmasına yol açmadığı gibi hücre sayısında az miktarda (%9-21 oranında) artışa neden olduğu belirlenmiştir. 200 µg/ml'lik derişimin ise 24 saat süreyle HaCaT hücrelerine uygulanması sonucunda hücre canlılığında %10 oranında bir azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Derişimin 1000 µg/ml'ye çıkması durumunda ise hücre canlılığında yaklaşık %60 oranında bir düşüşe neden olduğu ve toksik etki yaptığı gözlenmiştir.

4. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

4.1. Sonuç

Metal içeren nano malzemeler elde edilen sonuçlara göre etkinlik açısından %100 Ag > %90 Ag > %75 Ag > %50 Ag > %25 Ag > %10 Ag > %100 Cu şeklinde sıralanmıştır. Gümüşün fazla olduğu durum daha iyi sonuç vermekle beraber pahalı bir metal olmasından dolayı yarı yarıya azaltılarak yerine bakırın bulunduğu durumda da yeterince iyi sonuç alınmıştır. Böylece daha ekonomik dezenfeksiyon gerçekleştirilmiştir. Ayrıca *Legionella* gibi bakırın sinerjik etkisinin de istenebileceği durumlar için kullanılabilir metal bileşimi oluşturulabilir. Yalnız ultrasound uygulanan sistemlerde yapılan deneyler göstermiştir ki bakteri kümelerinin ultrasound etkisi ile dağılması nedeniyle bakteri sayılarında artış olmaktadır. Ultrasoundla yapılan çalışmalarda ise metal içeren nano malzemenin ultrasound uygulanmadan yapılan çalışmaları göre daha iyi sonuçlar verdiği görülmektedir.

Bunun başlıca sebepleri

1. Ultrasoundun bakteri kümelerini dağıtarak bakterilerin birbirlerine kalkan olmaksızın metal içeren nano malzeme ile temas etmesinin sağlanabilmesidir.
2. Ultrasoundun metal içeren nano malzemeyi homojen şekilde dağıtarak bir kütle aktarımı ivmeleyicisi olarak davranması ve bununla beraber nano partikülde bulunan metal iyonlarının metalden bakteriye geçmesini kolaylaştırmasıdır.
3. Bir diğer etki de metali taşıyan partikül maddenin kendisinin ultrasound ile fiziksel sürtünme etkisidir. Buda adezyon ve biyofilm oluşumunda önleyici yönde pozitif katkı sağlamaktadır.

Biyofilm ve adezyon etkili (>log3 azalma görüldüğü) düşüşlerin görülmesinin yanı sıra sitotoksitate deneylerinde bu düşüşlerin sağlandığı derişimlerin de malzemelerin toksik olmadığı görülmüştür. Kısaca toksik etki göstermeksizin bu malzemelerin biyofilm ve adezyon önleyici olarak kullanılabilirliği sonucuna varılmıştır.

Ayrıca bu malzemeler için sitotoksik değerler de tespit edilmiş olup elde edilen sonuçlara göre malzemeler 1000 µg/ml gibi yüksek derişimlere kadar toksik etki göstermemektedir. Gümüş içeriği yüksek olanlarda hücre sayısındaki azalma biraz daha yüksek olmasına karşın tüm malzemeler 1000 µg/ml'in altında toksik etki olmaksızın kullanılabilir. MİK değerleri de 1000 µg/ml'in çok altında olduğundan adezyon ve biyofilm oluşumunda önleyici olarak toksik etki olmaksızın MİK derişimleri kullanılabilir.

4.2. Tartışma

Dünya genelinde içme suyu güvenliği önemli bir konudur (Hatami, 2013). Güvenli bir içme suyu kaynağına ulaşmaktaki sorunlar ve su kaynaklı hastalıklar ise tehdit oluşturmaktadır (WHO, 2014). Bu sebeplerle su arıtım teknolojilerinin geliştirilmesi, özellikle de sudaki patojen mikroorganizmaların etkisizleştirilmesi, insan sağlığı için büyük öneme sahiptir (Song, 2016).

Nanoteknolojinin hızla gelişmesiyle birlikte, özellikle Ag NP'ler son yıllarda su ve atık su dezenfeksiyonunda başarıyla uygulanmaktadır. Benzer şekilde bakırın, antibakteriyel bir madde olarak yararlılığı uzun yıllardır bilinmekle birlikte son zamanlarda, bakır nanopartiküller içme suyu için dezenfektan olarak kullanılmaktadır (Ruparelia, 2008). Gümüş nanopartiküller (Ag NP'ler), bazı konsantrasyon aralıklarında toksisite olmaksızın bakteri ve mantarlara karşı yüksek potansiyelleri nedeniyle sıklıkla katkı maddesi olarak kullanılır (Sotiriou & Pratsinis, 2010; Reidy vd., 2013; Marin vd., 2015).

Su dezenfeksiyonunda, iki veya daha fazla dezenfeksiyon tekniği kombinasyonlarının uygulamaları literatürde uzun yıllardan beri mevcuttur (El-Ghizel vd., 2020). Mikroorganizmaların inaktivasyonu (Burleson, 1975) ve suyun dezenfeksiyonu (Dahl, 1976) için ultrasonikasyon ve ozonlama kombinasyonu uzun süredir uygulanmaktadır (Abdurahman & Abdullah, 2020).. Su arıtma işleminin iyileştirilmesi için kullanılan yenilikçi yöntemlerden biri de ultrasonik dalgalarının uygulanmasıdır (Doosti, 2012).

Son zamanlarda, ultrasonik teknolojinin, su ve atık su arıtma ve dezenfeksiyon amaçlı uygulama da dahil olmak üzere çevresel iyileştirme alanlarında kullanılması geniş bir ilgi görmektedir (Chen, 2012; Han vd., 2013; Cesaro & Belgiorno 2016).

Çalışmamızda, su kaynaklı patojenlerin sebep olduğu biyofilmleri inhibe etme kabiliyeti ve biyofilmlerin oluşabilmeleri için gereken yüzey tutunma özelliklerinin engellenmesi Ag ve Cu içeren nanotozlar kullanılarak gösterilmiştir. Yeni bir yaklaşım olarak, Ag ve Cu nanotoz maddelerin beraberinde düşük frekanslı ultrasonik dalgaları da uygulanmıştır.

Bu bağlamda su dezenfeksiyonunda kimyasal sentezlenen Ag ve Cu nanotoz ve kombinasyonlarının antibakteriyel aktiviteleri, seçilen su kaynaklı patojen biyofilm pozitif *E. coli* ATCC 25922 bakteri suşuna karşı *in vitro* potansiyel biyolojik aktiviteleri (biyofilm oluşumu ve adezyon) ultrasoundlu ve ultrasoundsuz çalışılmıştır. Dezenfeksiyon amaçlı, minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBK) belirlenerek incelenmiştir. Ayrıca etkin gözükten nano malzemenin toksik olup olmadığı HaCaT hücreleri üzerinde MTT sitotoksosite testi ile belirlenmiştir. Literatürdeki benzer çalışmalar

incelendiğinde ağırlıklı olarak metal içeren nano malzemeli dezenfeksiyon ya da ultrasoundun bilinen dezenfeksiyon metodları ile birlikte kullanımını mevcuttur.

Raffi ve ark. (2008) yaptığı çalışmada, gaz yoğunlaştırma ile üretilen 16 nm gümüş nanoparçacıklar, 60 µg/mL'de *E. coli*'nin koloni oluşturan birimler (CFU) yeteneğini tamamen engellediğini gösterilmiştir (Raffi vd., 2008).

Smetana ve ark. (2008) çalışmasına göre 300 µg/mL konsantrasyonda ticari olarak temin edilebilen gümüş nanotozlar ve 30 µg/mL konsantrasyonda SMAD tarafından üretilen gümüş nanoparçacıklar, koloni oluşturan *E. coli* ve *S. aureus* birimlerini (10 dakikalık temas süresinden sonra) 2x10⁴ KOB/mL 'den ile sırasıyla 0 ve <20'ye azaltmıştır (Smetana vd., 2008).

Bogdanović, Una ve ark. (2014) mikroorganizmalar üzerindeki biyolojik aktivite denemelerinin sonuçları, sadece 2 saatlik temastan sonra, yüksek CuNP konsantrasyonunda (32 ppm) test edilen tüm suşların %98'inden fazlasını azaltabildiğini açıkça göstermektedir. *E. coli*'ye karşı mikrobiyal azalma maksimum, ancak sadece 32 ppm konsantrasyonda mikrobiyal büyüme olmamıştır (<10). Ayrıca, aynı konsantrasyonda *C. albicans*'in neredeyse tam büyüme inhibisyonu sağlanmıştır. Sonuçlar ayrıca daha yüksek CuNP konsantrasyonlarının *C. albicans*'a karşı *S. aureus*'tan daha etkili olduğunu göstermektedir. (Bogdanović vd., 2014).

Bir diğer çalışmada Kim ve ark. (2007) gümüş nitratın sodyum borohidrit ile indirgenmesiyle hazırlanan 13.4 nm gümüş nanopartiküllerin, *S. aureus* için *E. coli*'ye karşı 6.6 nM'nin altında ve 33 nM'nin üzerinde MİK gösterdiğini bildirmiştir .

Bizim çalışmamızda ise *E.coli* ATCC 25922 suşuna karşı farklı nanotoz ve nanotoz kombinasyonlarından; %100 Ag, Ag, %90 Ag+%10 Cu, %75 Ag+%25 Cu , %50Ag+%50 Cu ve %25 Ag + %75 Cu 10 - 0.019 mg/L aralığında, %100 Cu, CuO, %10 Ag+%90 Cu ise 20 – 0.039 mg/L aralığında çalışılarak MİK değerleri belirlenmiştir. Nanotozların MİK testi üç tekrar çalışılmıştır. MİK konsantrasyonları %100 Ag> Ag> %90 Ag+%10 Cu> %75 Ag+%25 Cu> %50Ag+%50 Cu> %25 Ag + %75 Cu> %10 Ag+%90 Cu> %100 Cu> CuO, nanotoz kombinasyonlarının sırasıyla 0,625> 0,8> 1,775> 1,875> 2,916> 3,541> 8,25> 13,33> 15 mg/L değerlerinde kaydedilmiştir.

Biyofilm pozitif bakteri suşlarında yapılan çalışmalardan, (Guo, Jingyang, vd., 2019) *Pseudomonas aeruginosa* biyofilm gelişimi üzerindeki AgNP'lerin (30 nm) etkisi konsantrasyona bağlı olarak biyofilm AgNP'lere planktonik hücrelerden daha dirençli olduğunu

gösterirken, düşük AgNP maruziyet dozları, biyofilm büyüme döngüsünü önemli ölçüde geciktirmiş, AgNP'lerin yüksek konsantrasyonunun ise (18 µg/mL) biyofilm oluşumunu tamamen önlediğini göstermiştir (Guo vd., 2019).

Megarajan Sengan ve ark. (2019) yapmış olduğu çalışmada bu sefer CuNP'lerin, su kaynaklı *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhi* ve *Shigella flexneri* gibi biyofilm pozitif patojenlere karşı mükemmel bir anti biyofilm etkinliği sergilemiştir. CuNP'lerin 12.5 µM'lik minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonunda olgun biyofilmi ortadan kaldırdığını ortaya koymuştur. CuNP'lerin antimikrobiyal aktivitesi, rapor edilen CuNP'lerin gerçek antibiyofilm etkisi gösterdiğini belirten minimum 25 µM inhibe edici konsantrasyonda gözlenmiştir (Sengan vd., 2019).

Sonuçlar, *E.coli* ATCC 25922 suşuna karşı nanotozların antiadezyon aktivite düzeyleri sırasıyla; %100 Ag> %90 Ag+%10 Cu> %75 Ag+%25 Cu> %50Ag+%50 Cu> %25 Ag + %75 Cu> %10 Ag+%90 Cu> %100 Cu'dır. Biyofilm inhibisyon aktivite sıralaması ise en yüksekten düşüğe doğru olacak şekilde; %100 Ag> %90 Ag+%10 Cu> %75 Ag+%25 Cu> %50Ag+%50 Cu> %25 Ag + %75 Cu> %10 Ag+%90 Cu> %100 Cu olarak belirlenmiştir.

Literatürde ultrasound ile ilgili yapılan çalışmalarda ise; Vasilyak ve ark. (2011) 10 ila 1000 W cm² arasında bir ses yoğunluğu ve 20–100 kHz ultrason ile uzun süreli su artımı, dezenfeksiyonu sağlayabileceğini rapor etmiştir (Vasilyak, 2011).

Dadjour, Mahmoud Farshbaf, ve ark. (2006) *Legionella pneumophila* TiO₂ ile dezenfeksiyonunda çeşitli süreler boyunca 36 KHz, 300W'de ultrasonik banyoda 30 dakikalık işleme tabi tutulmuş ve tedavi periyodundan sonra 0.2 g/ml TiO₂ varlığında ilk konsantrasyonların %6'sına düşürülürken, TiO₂ yokluğunda sadece %18'lik bir azalma gözlemlenmiştir. Kullanılan TiO₂ miktarı artırılarak dezenfeksiyonun etkisi bir dereceye kadar artırılabilir belirlenmiştir (Dadjour vd., 2006).

Tez kapsamında yapılan çalışmamızda yeni bir yaklaşım olarak, Ag ve Cu nanotoz maddelerin beraberinde düşük frekanslı 35 kHz 'lik ultrasonik dalgalar uygulanarak biyofilm kirlenmesi üzerinde önleyici bir etki gözlenmiş ve Ag ve Cu nanotoz maddelerinin çalışma etkinliğini arttırdığı belirlenmiştir.

Ultrason, düşük yoğunluklarda ve kısa etki sürelerinde mikroorganizmaların aktivitesini ve büyümesini uyarabilirken, daha yüksek yoğunluklarda mikroorganizmaları öldürür ve etkisiz hale getirir (Spiteri vd., 2017). Antiadezyon deneylerinde ultrasonikasyon işlem

muamelesi farklı sürelerde denenmiştir. 3-6-9, 5-10-15 ve 10-20-30 dk'lık ultrasonikasyon işlemine tabi tutularak sonuçları belirlenmiştir. Tez çalışmamızda, ultrasonikasyon işlem muamelesi 15 dk olarak bu parametre optimize edilmiştir. Gerçekten de ultrasonik işlemin kısa süre uygulanması mikroorganizmaların aktivitesini ve büyümesini uyardığı gözlenerek sonuçlar bunu doğrulamaktadır.

Literatürdeki *in vitro* toksikolojik çalışmalarda kültür hücreleri kullanılmaktadır. Yaklaşık %95'i keratinositlerden oluşan epidermis, insan derisinin dış uyararla temas eden ilk tabakasıdır (Gantwerker ve Hom, 2012). İnsan derisi, geniş yüzey alanı ve kozmetik veya çevresel maruziyete erişilebilirliği nedeniyle dış maddeler için ana giriş yollarından biridir. Son raporlar, bazı NM'lerin cilde yalnızca bükülmüş (egzersiz sırasında) veya yaralanmış (akne, egzama, güneş yanığı) cilt yoluyla değil, aynı zamanda sağlam sağlıklı cilt yoluyla da nüfuz ettiğini göstermiştir (Mortensen vd., 2008; Rouse vd., 2007). Ag NP'lerin düşük düzeyde de olsa cilt tarafından emilebildiği ve hasarlı ciltte geçirgenliğin arttığı (Filon Larese vd., 2009) göz önüne alındığında, kimyasal maddelerin toksik etkilerinin araştırılması ve aydınlatılması büyük önem taşımaktadır. Kanıtlar ayrıca NM'lerin stratum corneum'a yer değiştirebileceğini öne sürmektedir (Schulz vd., 2002). Bu nedenle, HaCaT hücre hattı (insan keratinositi), nanotoksikolojik çalışmalarda model olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Kocbek ve diğerleri, 2010; Nabeshi vd., 2011; Rancan vd., 2012). Cilt hasarına neden olabilecek kimyasalların toksikolojik potansiyelini *in vitro* olarak değerlendirmek için tanınmış bir model oluşturan insan HaCaT keratinosit hücre hattını kullanarak Ag NP'lerin potansiyel cilt toksisitesini değerlendirmeleri bulunmaktadır (Gibbs, 2009). Bu nedenle çalışmamızda, suyla ilk ve en çok temas halinde bulunan deri epitel hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerin araştırılması hedeflenmiştir.

Jaiswal, Swarna, ve ark. (2015) 'nın toksisite çalışması, kontrole kıyasla AgNP'lere maruz bırakılan HaCaT hücrelerinde hücre canlılığında önemli bir fark ($P>0.05$) olmadığını gösterirken. Artan Ag konsantrasyonları ve maruz kalma süreleri ile hücre canlılığı yüzdesi, kontrole kıyasla artan Ag konsantrasyonlarının (8-33 ppm) doğal AgNP'lerine maruz kalma ile hücre canlılığı yüzdesinin önemli ölçüde azaldığını ($P<0.05$) göstermiştir. 16 ppm'lik bir [Ag]'de, capped AgNP'lere kıyasla maruz kalan HaCaT hücrelerinde %30 daha düşük bir canlılık vardır ancak bu fark, 33 ppm'lik bir [Ag]'de %63'e yükseldi 8 ppm'nin [Ag] altında, tüm test numuneleri arasında hücre canlılığında önemli bir fark ($P>0.05$) görülmemiştir (Jaiswal vd., 2015).

Zanette, Caterina, ve ark. (2011) çalışmasında, HaCaT hücre hattı modelini kullanarak Ag NP'lerin cilt üzerindeki etkilerini araştırılmış, Ag NP'lerin HaCaT hücreleri üzerindeki sitotoksite çalışmaları, iki farklı canlılık testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir: MTT, SRB Ag NP'lerin artan konsantrasyonlarına (0,006-333 IM) maruz kalma, hücre canlılığında konsantrasyona ve zamana bağlı bir azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. MTT testinde 100 µM Ag NPs solüsyonu, kontrollere göre $-15 \pm \%1$, $-40 \pm \%3$ ve $-66 \pm \%7$ 'ye eşit bir absorbans azalmasına neden olduğu rapor edilmiştir. Ag NP'ler, 7 günlük temastan sonra 6.8 ± 1.3 IM (MTT tahlili) ve 12 ± 1.2 IM (SRB tahlili) IC50 değerleriyle, hücre canlılığında konsantrasyona ve zamana bağlı bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Zanette vd., 2011).

Mukherjee, Sanchali Gupta, ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada; farklı sitotoksite testleri sonucunda Ag nanoparçacıklarının, HaCaT ve HeLa hücreleri için sitotoksite LD50 değerleri, her iki hücre hattında da artan maruz kalma süresi ile canlılığın azaldığını bildirmişlerdir. Klonojenik tahlilde 2.5 mg/l ve 5 mg/l Ag nanopartikül konsantrasyonundaki HaCaT hücrelerinde sırasıyla %83.16 ve %62.5 koloni gözlenirken, HaCaT hücrelerinde oluşan koloniler aynı konsantrasyondaki HeLa hücrelerinden yüzde olarak çok daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu, Ag nanoparçacıklarına maruz kalındığında HeLa hücrelerine kıyasla HaCaT hücrelerinin koloni oluşturma kapasitesinin çok daha yüksek olduğunu saptamışlardır (Mukherjee vd., 2012).

Tez çalışmamızda ise; HaCaT hücreleri yedi farklı nanotoz test maddesi ile 24 saat muamle edilmiş, yapılan MTT testi sonucunda sitotoksik değerler tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre tüm malzemeler 1000 µg/ml gibi yüksek derişimlere kadar toksik etki göstermemektedir. Tüm malzemelerin 200 µg/ml'lik derişimlerde ise hücre canlılığında %10-45 oranında bir azalmaya neden olduğu saptanmıştır. MİK değeri, 10, 50 ve 100 µg/ml'lik derişimlerinin 24 saat süreyle HaCaT hücrelerine uygulanması sonucunda hücre azalmasına yol açmadığı gibi hücre sayısında az miktarda (%3-10 oranında) artışa neden olduğu belirlenmiştir.

4.3. Öneriler

Çalışmamızın sonuçları Ag ve Cu nanotoz maddelerimiz için sitotoksik değerler de tespit edilmiş olup elde edilen sonuçlara göre malzemeler 1000 µg/ml gibi yüksek derişimlere kadar toksik etki göstermemektedir. Gümüş içeriği yüksek olanlarda hücre sayısındaki azalma biraz daha yüksek olmasına karşın tüm malzemeler 1000 µg/ml'in altında toksik etki olmaksızın kullanılabilir. MİK değerleri de 1000 µg/ml'in çok altında olduğundan adezyon ve biyofilm oluşumunda önleyici olarak toksik etki olmaksızın MİK derişimleri kullanılabilir.

Elde edilen sonuçlara göre, tez kapsamında kullanılan metal temelli nanotoz malzemelerin insan sağlığı üzerinde olumsuz yan etkiler oluşturmadan su dezenfeksiyonunda kullanımını potansiyel alternatifler arasına almaktadır.

İlerleyen zamanlarda farklı bakteri ve hücre hatlarında da benzer çalışmalar yapılarak malzemelerin davranışları hakkında daha fazla veri elde edilebilir. Bunlardan farklı olarak kullanılan nano malzemelerdeki metal türleri ve kombinasyonları ayrı çalışma konusu olarak incelenebilir.



KAYNAKÇA

- Abdulkareem, A. F. & Mohammed K. A. K. (2020). Biofilm production by E. Coli Isolated from Filter Water System. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, 14(4).
- Abdurahman, M. H., & Abdullah, A. Z. (2020). Mechanism and reaction kinetic of hybrid ozonation-ultrasonication treatment for intensified degradation of emerging organic contaminants in water: A critical review. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 108047.
- Adan, A., Kiraz, Y., & Baran, Y. (2016). Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Current pharmaceutical biotechnology*, 17(14), 1213-1221.
- Adzitey, F., Asante, J., Kumalo, H. M., Khan, R. B., Somboro, A. M., & Amoako, D. G. (2020). Genomic investigation into the virulome, pathogenicity, stress response factors, clonal lineages, and phylogenetic relationship of Escherichia coli strains isolated from meat sources in Ghana. *Genes*, 11(12), 1504.
- Agency, U. E. (1992). control of biofilm growth in drinking water distribution systems. *Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency* (pp. EPA/625/R-92/001). Washington: DC.
- Agency, U. E. (2009). Drinking Water Treatability Database.
- Ahamed, M., AlSalhi, M. S., & Siddiqui, M. K. J. (2010). Silver nanoparticle applications and human health. *Clinica chimica acta*, 411(23-24), 1841-1848.
- Ajdary, M., Moosavi, M. A., Rahmati, M., Falahati, M., Mahboubi, M., Mandegary, A., ... & Varma, R. S. (2018). Health concerns of various nanoparticles: a review of their in vitro and in vivo toxicity. *Nanomaterials*, 8(9), 634.
- Akhir, N.A.M., Chua, L.S., Majid, F.A.A., Sarmidi, M.R. (2011). Cytotoxicity of aqueous and ethanolic extracts of Ficus deltoideo on human ovarion carcinoma cell line, *British Journal of Medicine & Medical Research*, 1(4), 397-409.

- Akter, M., Sikder, M. T., Rahman, M. M., Ullah, A. A., Hossain, K. F. B., Banik, S., ... & Kurasaki, M. (2018). A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *Journal of advanced research*, 9, 1-16.
- Al-Bakri, A. G., & Afifi, F. U. (2007). Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *Journal of Microbiological Methods*, 68(1), 19-25.
- Alhede, M. e. (2009). Pseudomonas aeruginosa recognizes and responds aggressively to the presence of polymorphonuclear leukocytes. *Microbiology*, 155, 3500–3508.
- Ameh, T., & Sayes, C. M. (2019). The potential exposure and hazards of copper nanoparticles: A review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 71, 103220.
- Amyes S et al. (1996). *Antimicrobial Chemotherapy: Pocketbook*. CRC Press, [ISBN 9781853173899](https://doi.org/10.1080/09595419608645099).
- Arciola, C. R., Campoccia, D., & Montanaro, L. (2018). Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nature Reviews Microbiology*, 16(7), 397-409.
- Arunkumar, M., LewisOscar, F., Thajuddin, N., Pugazhendhi, A., & Nithya, C. (2020). In vitro and in vivo biofilm forming Vibrio spp: A significant threat in aquaculture. *Process Biochemistry*, 94, 213-223.
- Aslantürk, Ö. S. (2018). In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. *Genotoxicity-A predictable risk to our actual world*, 2, 64-80.
- Azam, M. W., & Khan, A. U. (2019). Updates on the pathogenicity status of Pseudomonas aeruginosa. *Drug discovery today*, 24(1), 350-359.
- Banas, D. T. (2017). Contrasted effects of an anti-cyanobacterial ultrasound device on the non-target freshwater invertebrate species Gammarus roeseli.
- Bazaka K, J. M. (2012). Efficient surface modification of biomaterial to prevent biofilm formation and the attachment of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 299–311.
- Belkin, A. H. (2015). Self-assembled wiggling nano-structures and the principle of maximum entropy production. *Scientific reports*, 5, 8323.

- Bello, A. R. (2005). Ultrasound efficiency in relation to sodium hypochlorite and filtration adsorption in microbial elimination in a water treatment plant. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 739-745.
- Benn, T. M. (2008). Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environmental science & technology*, 42(11), 4133-4139.
- Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review*, 11, 127-152.
- Berry D., C. X. (2006). Microbial ecology of drinking water distribution systems. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 297-302.
- Bjarnsholt, T. A.-S. (2013). The in vivo biofilm. *Trends in microbiology*, 466-474.
- Bjarnsholt, T., Buhlin, K., Dufrêne, Y. F., Gomelsky, M., Moroni, A., Ramstedt, M., ... & Römling, U. (2018). Biofilm formation—what we can learn from recent developments.
- Block, Seymour Stanton, ed. Disinfection, sterilization, and preservation. Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- Bogdanović, U., Lazić, V., Vodnik, V., Budimir, M., Marković, Z., & Dimitrijević, S. (2014). Copper nanoparticles with high antimicrobial activity. *Materials Letters*, 128, 75-78.
- Borenfreund, E., & Puerner, J. A. (1985). Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology letters*, 24(2-3), 119-124.
- Boukamp, Petra, et al. "Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line." *Journal of Cell Biology* 106.3 (1988): 761-771.
- Bridier A., F. D.-B. (2011). Dynamics of the action of biocides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2648-2654.
- Burleson, G. R. (1975). Inactivation of viruses and bacteria by ozone, with and without sonication. *Appl. Environ. Microbiol.*, 340-344.
- Burmølle M., J. W. (2006). Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 3916-3923.

- Cesaro, A., & Belgiorno, V. (2016). Removal of endocrine disruptors from urban wastewater by advanced oxidation processes (AOPs): a review. *The Open Biotechnology Journal*, 10(1), 151-172.
- Chairuangkitti P, L. S. (2013). Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways. *Toxicol In Vitro*, 330-8.
- Chau CF, W. S. (2007). The development of regulations for food nanotechnology. *Trend Food Sci Technol*, 269-280.
- Chen, C. Y. (2008). Preparation of cotton fibers with antibacterial silver nanoparticles. *Materials Letters*, 62(21-22), 3607-3609.
- Chen, X. (2008). Nanosilver: a nanoproduct in medical application. *Toxicology letters*, 1-12.
- Chen, Y. (2012). *Listeria monocytogenes*. In *Bad bug book - Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins*, 2nd ed. FDA. eds. Lampel, K.A., Al-Khalidi, S. and Cahill, S.M. pp. 100-104.
- Chevremont, J. B. (2013). Impact of watering with UV-LED-treated wastewater on microbial and physico-chemical parameters of soil. *Water Research*, 1971-1982.
- Choi, O. &. (2008). Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environmental science & technology*, 4583-4588.
- Chou, Yu-Jen, Henni Setia Ningsih, and Shao-Ju Shih. "Preparation, characterization and investigation of antibacterial silver-zinc co-doped β -tricalcium phosphate by spray pyrolysis." *Ceramics International* 46.10 (2020): 16708-16715.
- Chugani, S. a. (2007). The influence of human respiratory epithelia on *Pseudomonas aeruginosa* gene expression. *Microb. Pathog*, 42, 29-35.
- Close, J. I. (2006). Water recycling with PV-powered UV-LED disinfection. *Renew. Energy*, 1657-1664.
- CLSI, (1998). *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents. Approved Guideline*, CLSI document M26-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Roadn Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA.
- CLSI, (2006). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*: 7. ed. Approved Standard M7-A7. Wayne, PA, USA.

- CLSI, (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, Approved Standard, 9th ed., CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012
- Colombo, I., Sangiovanni, E., Maggio, R., Mattozzi, C., Zava, S., Corbett, Y., ... & Dell'Agli, M. (2017). HaCaT cells as a reliable in vitro differentiation model to dissect the inflammatory/repair response of human keratinocytes. *Mediators of inflammation*, 2017.
- Cortés, M. E. (2011). Biofilm formation, control and novel strategies for eradication. *Sci Against Microbial Pathog Commun Curr Res Technol Adv*, 2, 896-905.
- Dadjour, M. F., Ogino, C., Matsumura, S., Nakamura, S., & Shimizu, N. (2006). Disinfection of *Legionella pneumophila* by ultrasonic treatment with TiO₂. *Water research*, 40(6), 1137-1142.
- Dahl, E. (1976). Physicochemical aspects of disinfection of water by means of ultrasound and ozone. *Water Research*, 677-684.
- Da Silva, N., Taniwaki, M. H., Junqueira, V. C. A., de Arruda Silveira, N. F., Okazaki, M. M., & Gomes, R. A. R. (2018). *Microbiological examination methods of food and water: a laboratory manual*. CRC Press.
- Davey, M. E., & O'toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64(4), 847-867.
- Decho, A. W., & Gutierrez, T. (2017). Microbial extracellular polymeric substances (EPSs) in ocean systems. *Frontiers in microbiology*, 8, 922.
- Deshmukh, S. P., Patil, S. M., Mullani, S. B., & Delekar, S. D. (2019). Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review. *Materials Science and Engineering*, 97, 954-965.
- Dhanasekaran, D., Chandraleka, S., Sivaranjani, G., & Latha, S. (2019). Microbial Organic Compounds Generating Taste and Odor in Water. In *Nanoscience and Biotechnology for Environmental Applications* (pp. 225-248). Springer: Cham.
- Ding, W., Jin, W., Cao, S., Zhou, X., Wang, C., Jiang, Q., ... & Wang, Q. (2019). Ozone disinfection of chlorine-resistant bacteria in drinking water. *Water research*, 160, 339-349.

- Diene, S. M., Abat, C., Rolain, J. M., & Raoult, D. (2017). How artificial is the antibiotic resistance definition?. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(7), 690.
- Dimapilis, E. A. (2018). Zinc oxide nanoparticles for water disinfection. *Sustainable Environment Research*, 47-56.
- Donlan, R. M. (2001). Biofilms and device-associated infections. *Emerging infectious diseases*, 7(2), 277.
- Doosti, M. R. (2012). Water treatment using ultrasonic assistance: A review. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 2(2), 96.
- Dung, T. T. N., Thi, L. A. P., Nam, V. N., Nhan, T. T., & Quang, D. V. (2019). Preparation of silver nanoparticle-containing ceramic filter by in-situ reduction and application for water disinfection. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(3), 103176.
- Ekundayo, T. C., Igwaran, A., Oluwafemi, Y. D., & Okoh, A. I. (2021). Global bibliometric meta-analytic assessment of research trends on microbial chlorine resistance in drinking water/water treatment systems. *Journal of Environmental Management*, 278, 111641.
- El-Ghizel, S., Zeggar, H., Tahaikt, M., Tiyal, F., Elmidaoui, A., & Taky, M. (2020). Nanofiltration process combined with electrochemical disinfection for drinking water production: Feasibility study and optimization. *Journal of Water Process Engineering*, 36, 101225.
- Eltz, F. Z., Vebber, M. C., Aguzzoli, C., Machado, G., da Silva Crespo, J., & Giovanela, M. (2020). Preparation, characterization and application of polymeric thin films containing silver and copper nanoparticles with bactericidal activity. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(3), 103745.
- Eric Drexler, K. (1986). *Engines of creation: the coming era of nanotechnology*. New York: Doubleday .
- Falletta, E. B. (2008). Clusters of poly (acrylates) and silver nanoparticles: structure and applications for antimicrobial fabrics. *he Journal of Physical Chemistry C*, 112(31), 11758-11766.
- Fatih Erci, Cakir-Koc, R., Yontem, M., & Torlak, E. (2020). Synthesis of biologically active copper oxide nanoparticles as promising novel antibacterial-antibiofilm agents. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 1-11.

- Faúndez, G. T. (2004). Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni*. *BMC microbiology*, 4(1), 19.
- Fawell, J. K. (1998). Toxicity tests for assessing drinking water quality. *Springer, Berlin, Heidelberg*, 17-32.
- Fazli, M. et al. (2009). Non-random distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in chronic wounds. *J. Clin. J. Clin. Microbiol*, 4084 – 4089.
- Fazli, M., Bjarnsholt, T., et al. "Quantitative analysis of the cellular inflammatory response against biofilm bacteria in chronic wounds." *Wound repair and regeneration* 19.3 (2011): 387-391.
- Feng, Q. L. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of biomedical materials research.*, 52(4), 662-668.
- Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M, (2016). *Crystal violet assay for determining viability of cultured cells*. Cold Spring Harbor Protocol, DOI:10.1101/pdb.prot087379
- Fetyan, N. A., & Salem Attia, T. M. (2020). Water purification using ultrasound waves: application and challenges. *Arab Journal of Basic and Applied Sciences*, 27(1), 194-207.
- Filon Larese, F., D'Agostin, F., Crosera, M., Adami, G., Renzi, N., Bovenzi, M., Maina, G., (2009). Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology*, 255, 33–37.
- Flemming, H. C., & Wuertz, S. (2019). Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 247–260. doi: 10.1038/s41579-019-0158-9
- Fotakis, G. & Timbrell, J. A. (2006). *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride," *Toxicol. Lett.*, 160, 171–177.
- French, G. L. (2006). Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections—the potential role of daptomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(6), 1107-1117.
- Freshney, R.I. (2005). *Culture of animal cells: a manual of basic techniques*. 5th Ed. New York: Wiley-Liss

- Galindo-Méndez, M. (2020). Antimicrobial Resistance in Escherichia coli. *E. Coli Infections-Importance of Early Diagnosis and Efficient Treatment*, 1-20.
- Gantwerker, E. A., & Hom, D. B. (2012). Skin: histology and physiology of wound healing. *Clinics in plastic surgery*, 39(1), 85-97.
- Gibbs, S. (2009). *In vitro* irritation models and immune reactions. *Skin pharmacology and physiology*, 22(2), 103-113.
- Grace, M. C. (2009). Copper alginate-cotton cellulose (CACC) fibers with excellent antibacterial properties. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 4(3),155892500900400303.
- Gray, N.F. (2014). Ozone disinfection. In *Microbiology of Waterborne Diseases* (pp. 599-615). Academic press.
- Grosse S, E. L. (2013). Silver nanoparticle-induced cytotoxicity in rat brain endothelial cell culture. *Toxicol In Vitro*, 305–13.
- Gunn, J. S., Bakaletz, L. O., & Wozniak, D. J. (2016). What's on the outside matters: the role of the extracellular polymeric substance of Gram-negative biofilms in evading host immunity and as a target for therapeutic intervention. *Journal of Biological Chemistry*, 291(24), 12538-12546.
- Guo, J., Qin, S., Wei, Y., Liu, S., Peng, H., Li, Q., ... & Lv, M. (2019). Silver nanoparticles exert concentration-dependent influences on biofilm development and architecture. *Cell proliferation*, 52(4), e12616.
- Han, C., Andersen, J., Pillai, S. C., Fagan, R., Falaras, P., Byrne, J. A., ... & Dionysiou, D. D. (2013). Chapter green nanotechnology: development of nanomaterials for environmental and energy applications. In *Sustainable nanotechnology and the environment: Advances and achievements* (pp. 201-229). American Chemical Society.
- Han, B., Fang, W. H., Zhao, S., Yang, Z., & Hoang, B. X. (2020). Zinc sulfide nanoparticles improve skin regeneration. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 29, 102263.
- HanQiao, L., YongMei, X., Juan, C., DaWei, Z., ShunXing, G., & ChunLan, W. (2012). Antimicrobial activities of endophytic fungi isolated from *Ophiopogon japonicus* (Liliaceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(238).

- Hatami, H. (2013). Importance of water and water-borne diseases: on the occasion of the world. *water day*, 243.
- Hemdan, A., Azab B., El-Liethy, M., & El-Taweel, G. E. (2020). The destruction of *Escherichia coli* adhered to pipe surfaces in a model drinking water distribution system via various antibiofilm agents. *Water Environment Research*, 92(12), 2155-2167.
- Hernández-Sierra, J. F.-G. (2008). The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 4(3), 237-240.
- Hijnen W.A.M., E. B. (2006). Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. *Water Research*, 3-22.
- Hofmann, U., Priem, M., Bartsch, C., Winckler, T., Feller, K.H. (2014). A sensitive sensor cell line for the detection of oxidative stress responses in cultured human keratinocytes. *Sensors*, 14, 11293-11307.
- Horton, M. V., & Nett, J. E. (2020). *Candida auris* infection and biofilm formation: going beyond the surface. *Current clinical microbiology reports*, 7, 51-56.
- Hsiao, M.-T., Chen, S.-F., Shieh, D.-B., & Yeh, C.-S. (2006). One-Pot Synthesis of Hollow Au₃Cu₁ Spherical-like and Biomineral Botallackite Cu₂ (OH)₃Cl Flowerlike Architectures Exhibiting Antimicrobial Activity. *J. Phys. Chem. B.*, 110, 205–210.
- Hübler, A. W. (2010). Digital quantum batteries: Energy and information storage in nanovacuum tube arrays. *Complexity*, 48-55.
- Ingle, A. D. (2014). Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: a review. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 1001-1009.
- Ingraham, J. a. (1996). *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology 2nd ed.* Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Ishii, S. &. (2008). *Escherichia coli* in the environment: implications for water quality and human health. *Microbes and Environments*, 101-108.
- Jacobs, J. C., Troxel, A., Ehrlich, Y., Spolnik, K., Bringas, J. S., Gregory, R. L., & Yassen, G. H. (2017). Antibacterial effects of antimicrobials used in regenerative endodontics

against biofilm bacteria obtained from mature and immature teeth with necrotic pulps. *Journal of endodontics*, 43(4), 575-579.

Jain, P. (2005). Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter. *Biotechnology and bioengineering*, 90(1), 59-63.

Jaiswal, S., Bhattacharya, K., McHale, P., & Duffy, B. (2015). Dual effects of β -cyclodextrin-stabilised silver nanoparticles: enhanced biofilm inhibition and reduced cytotoxicity. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26(1), 52.

Jensen, P. e. (2010). The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*, 292–305.

Jo, Y. K. (2014). Surface-independent antibacterial coating using silver nanoparticle-generating engineered mussel glue. *ACS applied materials & interfaces*, 6(22), 20242-20253.

Johnson, T. S. (2007). The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *J. Bacteriol*, 189:3228-3236.

Joshi, A. S., Singh, P., & Mijakovic, I. (2020). Interactions of gold and silver nanoparticles with bacterial biofilms: Molecular interactions behind inhibition and resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7658.

Kaper, J. J. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbio*, 2:123-140.

Karaer, F. (2014). *Ultrasonik sistemlerle suda klebsiella pneumonia dezenfeksiyonu*. Eskişehir: Tez YÖK.

Karel, F. B. (2011). *Ultrasonik sistemler ile suda Staphylococcus aureus dezenfeksiyonu*. Eskişehir: TEZ YÖK.

Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H., & Thurnheer, T. (2020). Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities. *Trends in Microbiology*, 28(8), 668-681.

Kawashita, M. T. (2000). Antibacterial silver-containing silica glass prepared by sol-gel method. *Biomaterials*, 21(4), 393-398.

Keevil, C. W. (2002). Pathogens in environmental biofilms. *Encyclopedia of environmental microbiology*, 2339–2356.

- Khan, F. A. (2011). *Biotechnology fundamentals*. CRC Press.
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian journal of chemistry*, 12(7), 908-931.
- Khatoon, Z., McTiernan, C. D., Suuronen, E. J., Mah, T. F., & Alarcon, E. I. (2018). Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon*, 4(12), e01067.
- Khezerlou, A., Alizadeh-Sani, M., Azizi-Lalabadi, M., & Ehsani, A. (2018). Nanoparticles and their antimicrobial properties against pathogens including bacteria, fungi, parasites and viruses. *Microbial pathogenesis*, 123, 505-526.
- Kim, J. C. (2004). Control of bacterial growth in water using synthesized inorganic disinfectant. *Chemosphere*, 775-780.
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J., ... & Cho, M. H. (2007). Nanomed.: Nanotechnol. *Biol. Med*, 3, 95-101.
- Kim, J. S. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(1), 95-101.
- Kirketerp-Moller, K. e. (2008). Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. *J. Clin. Microbiol.* , 2717–2722.
- Klaine, S. J. (2008). Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1825–1851.
- Klausen, M. e. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol. Microbiol.*, 1511–1524.
- Kocbek, P., Teskač, K., Kreft, M. E., & Kristl, J. (2010). Toxicological aspects of long-term treatment of keratinocytes with ZnO and TiO₂ nanoparticles. *Small*, 6(17), 1908-1917.
- Kolar M., K. U. (2001). Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. *Int J Antimicrob Ag*, 357-363.
- Kuhn, D. M., Balkis, M., Chandra, J., Mukherjee, P. K., & Ghannoum, M. A. (2003). Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *Journal of clinical microbiology*, 41(1), 506-508.
- Kumar, A. B. (2012). *Drinking Water disinfection Techniques*. CRC Press .

- Kumar, M., Curtis, A., & Hoskins, C. (2018). Application of nanoparticle technologies in the combat against anti-microbial resistance. *Pharmaceutics*, 10(1), 11.
- Lara, H. H., Ixtepan-Turrent, L., Jose Yacaman, M., & Lopez-Ribot, J. (2020). Inhibition of *Candida auris* biofilm formation on medical and environmental surfaces by silver nanoparticles. *ACS applied materials & interfaces*, 12(19), 21183-21191.
- Lehmann, B. (1997). HaCaT cell line as a model system for vitamin D3 metabolism in human skin. *Journal of investigative dermatology*, 108(1), 78-82.
- Lehtola M.J., K. M. (2004). Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes. *Water Research*, 3769-3779.
- Leighton. (1994). *The Acoustic Bubble*. San Diego, USA: Academic Press.
- LewisOscar, F., Nithya, C., Vismaya, S., Arunkumar, M., Pugazhendhi, A., Nguyen-Tri, P., ... & Thajuddin, N. (2021). *In vitro* analysis of green fabricated silver nanoparticles (AgNPs) against *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilm formation, their application on urinary catheter. *Progress in Organic Coatings*, 151, 106058.
- Li, Q. M. (2008). Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. *Water research*, 4591-4602.
- Li, X. F., & Mitch, W. A. (2018). Drinking water disinfection byproducts (DBPs) and human health effects: multidisciplinary challenges and opportunities. *Environmental Science & Technology*, 52(4), 1681-1689.
- Li, G. Q., Wang, W. L., Huo, Z. Y., Lu, Y., & Hu, H. Y. (2017). Comparison of UV-LED and low pressure UV for water disinfection: Photoreactivation and dark repair of *Escherichia coli*. *Water Research*, 126, 134-143.
- Little, B. J., & Lee, J. S. (2014). Microbiologically influenced corrosion: an update. *International Materials Reviews*, 59(7), 384-393.
- Longano, D. D. (2012). *Synthesis and antimicrobial activity of copper nanomaterials*. Berlin, Heidelberg.: Springer In Nano-Antimicrobials (pp. 85-117).
- Lyon, D. &. (2013). Gap size dependence of the dielectric strength in nano vacuum gaps. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, 1467-1471.

- M. Moritz, H. F. (2010). Integration of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 190-197.
- Ma, Y, et al. (2020). A review of the application of nanoparticles in the diagnosis and treatment of chronic kidney disease. *Bioactive Materials* 5(3), 732-743
- Mainil, J. a. (2005). Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *J. Appl. Microbiol*, 98:1332-1344.
- Malaekheh-Nikouei, B., Bazzaz, B. S. F., Mirhadi, E., Tajani, A. S., & Khameneh, B. (2020). The role of nanotechnology in combating biofilm-based antibiotic resistance. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 101880.
- Mallik, K. M. (2001). Seed mediated formation of bimetallic nanoparticles by UV irradiation: a photochemical approach for the preparation of coreshell type structures. *Nano Lett*, 1 (6): 319-322.
- Manaloto, E., Gowen, A. A., Lesniak, A., He, Z., Casey, A., Cullen, P. J., & Curtin, J. F. (2020). Cold atmospheric plasma induces silver nanoparticle uptake, oxidative dissolution and enhanced cytotoxicity in glioblastoma multiforme cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 689, 108462.
- Marambio-Jones, C. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(5), 1531-1551.
- Marin, S., Mihail Vlasceanu, G., Elena Tiplea, R., Raluca Bucur, I., Lemnaru, M., Minodora Marin, M., & Mihai Grumezescu, A. (2015). Applications and toxicity of silver nanoparticles: a recent review. *Current topics in medicinal chemistry*, 15(16), 1596-1604.
- Mason, T. (1990). *Chemistry with Ultrasound*. England: Elsevier.
- Mathieu, L., Keraval, A., Declercq, N. F., & Block, J. C. (2019). Assessment of a low-frequency ultrasound device on prevention of biofilm formation and carbonate deposition in drinking water systems. *Ultrasonics sonochemistry*, 52, 41-49.
- Maunder, E., & Welch, M. (2017). Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, 364(13).

- Mazhar, M. A., Khan, N. A., Ahmed, S., Khan, A. H., Hussain, A., Changani, F., ... & Vambol, V. (2020). Chlorination disinfection by-products in Municipal drinking water—A review. *Journal of Cleaner Production*, 123159.
- McFall-Ngai, M. (2007). Care for the community. *Nature*, 153-153.
- McFeters, G. A. (1991). Effects of aquatic environmental stress on enteric bacterial pathogens. *Journal of applied bacteriology*, 115S-120s.
- McKinnon, P. S., & Davis, S. L. (2004). Pharmacokinetic and pharmacodynamic issues in the treatment of bacterial infectious diseases. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 23(4), 271-288.
- Mohamed, M. S., Mostafa, H. M., Mohamed, S. H., Abd El-Moez, S. I., & Kamel, Z. (2020). Combination of silver nanoparticles and vancomycin to overcome antibiotic resistance in planktonic/biofilm cell from clinical and animal source. *Microbial Drug Resistance*, 26(11), 1410-1420.
- Mohammed, A. N. (2021). Implementation of Novel Nanosilver Composites in Drinking Water Treatment. *Polymer Nanocomposites Based on Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Applications*, 267-286.
- Monteiro, M. C., de la Cruz, M., Cantizani, J., Moreno, C., Tormo, J. R., Mellado, E., ... & Vicente, F. (2012). A new approach to drug discovery: high-throughput screening of microbial natural extracts against *Aspergillus fumigatus* using resazurin. *Journal of biomolecular screening*, 17(4), 542-549.
- Morones, J. R. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346.
- Morsi, R. E., Alsabagh, A. M., Nasr, S. A., & Zaki, M. M. (2017). Multifunctional nanocomposites of chitosan, silver nanoparticles, copper nanoparticles and carbon nanotubes for water treatment: antimicrobial characteristics. *International journal of biological macromolecules*, 97, 264-269.

- Mortensen, L. J., Oberdörster, G., Pentland, A. P., & DeLouise, L. A. (2008). In vivo skin penetration of quantum dot nanoparticles in the murine model: the effect of UVR. *Nano letters*, 8(9), 2779-2787.
- Mosa, K. A., El-Naggar, M., Ramamoorthy, K., Alawadhi, H., Elnaggar, A., Wartanian, S., ... & Hani, H. (2018). Copper nanoparticles induced genotoxicity, oxidative stress, and changes in superoxide dismutase (SOD) gene expression in cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *Frontiers in plant science*, 9, 872.
- Moser, C. e. (1997). Chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection is more severe in Th2 responding BALB/c mice compared to Th1responding C3H/HeN mice. *APMIS*, 838–842.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," *J. Immunol. Methods*, 16:65(1-2), 55-63.
- Mukherjee, Sanchali Gupta, et al. (2012). "Comparative *in vitro* cytotoxicity study of silver nanoparticle on two mammalian cell lines." *Toxicology in vitro*, 26(2), 238-251.
- Nabeshi, H., Yoshikawa, T., Matsuyama, K., Nakazato, Y., Matsuo, K., Arimori, A., ... & Tsutsumi, Y. (2011). Systemic distribution, nuclear entry and cytotoxicity of amorphous nanosilica following topical application. *Biomaterials*, 32(11), 2713-2724.
- Nakanishi, E. Y., Palacios, J. H., Godbout, S., & Fournel, S. (2021). Interaction between Biofilm Formation, Surface Material and Cleanability Considering Different Materials Used in Pig Facilities—An Overview. *Sustainability*, 13(11), 5836.
- Nataro, J. a. (1998). Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev*, 11:142-201.
- Nel, A., Xia, T., Madler, L., & Li, N. (2006). Toxic Potential of Materials at the Nanoleve. *Science*, 622–627.
- Novack, B. a. (2007). Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ. Pollut*, 150: 5-22.
- O'Connor, R., Heenan, M., Duffy, C., & Clynes, M. (1998). Miniaturized In Vitro Methods in Toxicity Testing. In *Animal cell culture techniques* (pp. 423-433). Springer, Berlin, Heidelberg.

- Oktar, N. (2009). *K562 hücre dizisinde fosfin bileşiklerinin sitotoksik etkisinin mtt (3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue) ile araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Otokunefor, K., Melex, D., & Abu, G. (2020). Biofilm forming potential of *Escherichia coli* from various sources. *Journal of Life and Bio Sciences Research*, 1(2), 26-29.
- Ölschläger, V., Schrader, A., & Hockertz, S. (2009). Comparison of primary human fibroblasts and keratinocytes with immortalized cell lines regarding their sensitivity to sodium dodecyl sulfate in a neutral red uptake cytotoxicity assay. *Arzneimittelforschung*, 59(03), 146-152.
- Pal, S. T. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(6), 1712-1720.
- Palmer, R. J. (2010). Human oral bacterial biofilms: composition, dynamics, and pathogenesis In *Biofilm Infections*. Bjarnsholt, T. et al., eds, 35–60, Springer.
- Pareek, V., Gupta, R., & Panwar, J. (2018). Do physico-chemical properties of silver nanoparticles decide their interaction with biological media and bactericidal action? A review. *Materials Science and Engineering: C*, 90, 739-749.
- Park, M. N. (2011). The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials*, 9810-7.
- Parsek, M. a. (2003). Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol*, 57:677–701.
- Paton, J. a. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11:450-479.
- Percival, S. J. (2000). *Microbiological aspects of biofilms and drinking water*. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc.
- Pirsaheb, M., Sharafi, K., Ahmadi, E., & Moradi, M. (2017). Prevalence of the waterborne diseases (diarrhea, dysentery, typhoid, and hepatitis A) in West of Iran during 5 years (2006-2010). *Annals of Tropical Medicine and Public Health*, 10(6).

- Raffi, M., Hussain, F., Bhatti, T. M., Akhter, J. I., Hameed, A., & Hasan, M. M. (2008). Antibacterial characterization of silver nanoparticles against *E. coli* ATCC-15224. *Journal of materials science and technology*, 24(2), 192-196.
- Raffi, M. M. (2010). Investigations into the antibacterial behavior of copper nanoparticles against *Escherichia coli*. *Annals of microbiology*, 60(1), 75-80.
- Rai, M. Y. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances*, 27(1), 76-83.
- Ramsden, J. (2018). *Applied nanotechnology: the conversion of research results to products*. Cambridge: Matthew Deans.
- Rancan, F., Gao, Q., Graf, C., Troppens, S., Hadam, S., Hackbarth, S., ... & Vogt, A. (2012). Skin penetration and cellular uptake of amorphous silica nanoparticles with variable size, surface functionalization, and colloidal stability. *ACS nano*, 6(8), 6829-6842.
- Ray, C. G. (2010). *Sherris medical microbiology*. McGraw-Hill.
- Reidy, B., Haase, A., Luch, A., Dawson, K. A., & Lynch, I. (2013). Mechanisms of silver nanoparticle release, transformation and toxicity: a critical review of current knowledge and recommendations for future studies and applications. *Materials*, 6(6), 2295-2350.
- Rejeski, D. (2009). *Nanotechnology and consumer products. CPSC FY2010 Agenda and Priorities*. Testimony before the Consumer Products Safety Commission.
- Revetta, R. P., Gomez-Alvarez, V., Gerke, T. L., Curioso, C., Santo Domingo, J. W., & Ashbolt, N. J. (2013). Establishment and early succession of bacterial communities in monochloramine-treated drinking water biofilms. *FEMS microbiology ecology*, 86(3), 404-414.
- Rispoli, F. A. (2010). Understanding the toxicity of aggregated zero valent copper nanoparticles against *Escherichia coli*. *Journal of Hazardous Materials*, 180(1-3), 212-216.
- Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellmann S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L, (2016). *Assay guidance manual: cell viability assays*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/?report=reader#!po=1.16279>, Erişim tarihi; 21.12.2016.
- Romeo, T. (2008). *Bacterial Infection*. Berlin: Springer Verlag.

- Rossi, E., et al. (2018). It's a gut feeling—*Escherichia coli* biofilm formation in the gastrointestinal tract environment." *Critical reviews in microbiology*, 44(1), 1-30..
- Rouse, J. G., Yang, J., Ryman-Rasmussen, J. P., Barron, A. R., & Monteiro-Riviere, N. A. (2007). Effects of mechanical flexion on the penetration of fullerene amino acid-derivatized peptide nanoparticles through skin. *Nano letters*, 7(1), 155-160.
- Rump, H. H. (1999). Laboratory manual for the examination of water, waste water and soil (No. Ed. 3). Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Ruparelia, J. P. (2008). Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta biomaterialia*, 4(3), 707-716.
- Rusin, P. A. (1997). Risk assessment of opportunistic bacterial pathogens in drinking water. *In Reviews of environmental contamination and toxicology*, 57-83.
- Saini, R. S. (2010). Nanotechnology: the future medicine. *Journal of cutaneous and aesthetic surgery*, 3(1), 32.
- Salah, I., Parkin, I. P., & Allan, E. (2021). Copper as an antimicrobial agent: recent advances. *RSC Advances*, 11(30), 18179-18186.
- Sauer, K. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol*, 1140–1154.
- Sauer, K. (2003). The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome biology*, 4(6), 1-5.
- Savage N., M. D. (2005). Nanomaterials and water purification: opportunities and challenges. *Journal of Nanoparticle Research*, 331-342.
- Schaechter, M. (2009). Encyclopedia of microbiology. *Academic Press*.
- Schoop, Veronika M., Norbert E. Fusenig, and Nicolae Mirancea. "Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts." *Journal of investigative dermatology* 112.3 (1999): 343-353..
- Schug, A. R., Bartel, A., Meurer, M., Scholtzek, A. D., Brombach, J., Hensel, V., ... & Feßler, A. T. (2020). Comparison of two methods for cell count determination in the course of biocide susceptibility testing. *Veterinary microbiology*, 251, 108831.

- Schulz, M., Wacker, J., & Bastert, G. (2002). Glutathione levels and antioxidative status in pre-eclampsia. *International journal of gynaecology and obstetrics*, 78(2), 157-158.
- Sengan, M., Subramaniyan, S. B., Prakash, S. A., Kamlekar, R., & Veerappan, A. (2019). Effective elimination of biofilm formed with waterborne pathogens using copper nanoparticles. *Microbial pathogenesis*, 127, 341-346.
- Seo, M.D., Kang, T.J., Lee, C.H., Lee, A.Y., Noh, M. (2012). HaCaT keratinocytes and primary epidermal keratinocytes have different transcriptional profiles of cornified envelope-associated genes to T helper cell cytokines. *Biomolecules & Therapeutics*, 20 (2), 171-176.
- Shao, L., Dong, Y., Chen, X., Xu, X., & Wang, H. (2020). Modeling the elimination of mature biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. Using combined ultrasound and disinfectants. *Ultrasonics Sonochemistry*, 69, 105269.
- Shinn, E. H. (2013). Nuclear energy conversion with stacks of graphene nanocapacitors. *Complexity*, 18(3), 24-27.
- Siddique, M. H., Aslam, B., Imran, M., Ashraf, A., Nadeem, H., Hayat, S., ... & Muzammil, S. (2020). Effect of silver nanoparticles on biofilm formation and EPS production of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *BioMed research international*, 2020.
- Silvestry-Rodriguez, N. B. (2007). Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas hydrophila* by silver in tap water. *Journal of Environmental Science and Health*, 1579-1584.
- Simoës, L. C. (2013). Biofilms in drinking water: problems and solutions. *Rsc Advances*, 2520-2533.
- Singh, S., & Nalwa, H. S. (2007). . Nanotechnology and Health Safety Toxicity and Risk Assessments of Nanostructured Materials on Human Health. *J. Nanosci. Nanotechno*, 3048-3070.
- Singh, S., Singh, S. K., Chowdhury, I., & Singh, R. (2017). Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *The open microbiology journal*, 11, 53.

- Singh, R., Kim, W., & Smith, J. A. (2020). Effect of Chloride Ions on the Point-of-Use Drinking Water Disinfection Performance of Porous Ceramic Media Embedded with Metallic Silver and Copper. *Water*, 12(6), 1625.
- Smetana, A. B., Klabunde, K. J., Marchin, G. R., & Sorensen, C. M. (2008). Biocidal activity of nanocrystalline silver powders and particles. *Langmuir*, 24(14), 7457-7464.
- Smetana, A. B. (2008). Biocidal activity of nanocrystalline silver powders and particles. *Langmuir*, 24(14), 7457-7464.
- Song, K. M. (2016). Application of ultraviolet light-emitting diodes (UV-LEDs) for water disinfection. *Water Research*, 94, 341-349.
- Sorlini, S. &. (2005). Trihalomethane formation during chemical oxidation with chlorine, chlorine dioxide and ozone of ten Italian natural waters. *Desalination*, 103-111.
- Sotiriou, G. A., & Pratsinis, S. E. (2010). Antibacterial activity of nanosilver ions and particles. *Environmental science & technology*, 44(14), 5649-5654.
- Stange, C., Sidhu, J. P. S., Toze, S., & Tiehm, A. (2019). Comparative removal of antibiotic resistance genes during chlorination, ozonation, and UV treatment. *International journal of hygiene and environmental health*, 222(3), 541-548.
- Spiteri, D., Chot-Plassot, C., Scler, J., Karatzas, K. A., Scerri, C., & Valdramidis, V. P. (2017). Ultrasound processing of liquid system (s) and its antimicrobial mechanism of action. *Letters in applied microbiology*, 65(4), 313-318.
- Staggers, N. M. (2008). Nanotechnology: the coming revolution and its implications for consumers,. *Nursing Outlook*, 268-274.
- Stapper AP, N. G. (2004). Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. *J Med Microbiol*, 679-690.
- Stewart, J. R. (2007). Fecal pollution, public health, and microbial source tracking. In *Microbial source tracking. American Society of Microbiology*, 1-32.
- Stobie N, D. B. (2008). revention of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation using a low-temperature processed silver-doped phenyltriethoxysilane sol-gel coating. *Biomaterials*, 963-9.

- Sukhanova, A., Bozrova, S., Sokolov, P., Berestovoy, M., Karaulov, A., & Nabiev, I. (2018). Dependence of nanoparticle toxicity on their physical and chemical properties. *Nanoscale research letters*, 13(1), 1-21.
- Supraja Puttamreddy, M. D. (2008). Transcriptome Analysis of Organisms with Food Safety Relevance. *Foodborne Pathogens and Disease*, 517-529.
- Tansel, B. (2008). New technologies for water and wastewater treatment: a survey of recent patents. *Recent patents on chemical engineering*, 17-26.
- Techer, D. &. (2018). Contrasted effects of an anti-cyanobacterial ultrasound device on the non-target freshwater invertebrate species *Gammarus roeseli*. *Environmental Science and Pollution Research*, 1998-2004.
- Thurman, R. B. (1989). The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses. *Crit. Rev. Environment Control* , 18:295–315.
- Tom, A. P. (2021). Nanotechnology for sustainable water treatment—A review. *Materials Today: Proceedings*.
- Tran, N. H., Gin, K. Y. H., & Ngo, H. H. (2015). Fecal pollution source tracking toolbox for identification, evaluation and characterization of fecal contamination in receiving urban surface waters and groundwater. *Science of the Total Environment*, 538, 38-57.
- Trapalis, C. C. (2003). Study of antibacterial composite Cu/SiO₂ thin coatings. *Journal of sol-gel science and technology*, 26(1-3), 1213-1218.
- Umer, A. N. (2014). A green method for the synthesis of copper nanoparticles using L-ascorbic acid. *Rev Matér.*, 197-203.
- Vasilyak, L.M. (2011) Ultrasound application in systems for the disinfection of water. *Surf Eng Appl Electrochem*, 46, 489–493.
- Vigneshwaran N, K. A. (2007). Functional finishing of cotton fabrics using silver nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*, 1893-1897.
- Wagner, A. B. (2006). SciFinder Scholar 2006: an empirical analysis of research topic query processing. *Journal of chemical information and modeling*, 46(2), 767-774.
- Wahab, A. C., Nur, F., et al. (2017). Methods in Cytotoxicity Testing: A Review. *Recent Patents on Materials Science*, 10(1), 50-59.

- Wang, L. H. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int. J. Nanomed*, 12: 1227-1249.
- Waso, M., Khan, S., Singh, A., McMichael, S., Ahmed, W., Fernandez-Ibanez, P., ... & Khan, W. (2020). Predatory bacteria in combination with solar disinfection and solar photocatalysis for the treatment of rainwater. *Water research*, 169, 115281.
- Water, S., & World Health Organization. (2004). *Water, sanitation and hygiene links to health: facts and figures*.
- Wen, X., Chen, F., Lin, Y., Zhu, H., Yuan, F., Kuang, D., ... & Yuan, Z. (2020). Microbial Indicators and Their Use for Monitoring Drinking Water Quality—A Review. *Sustainability*, 12(6), 2249.
- Weschler, C. J. (2000). Ozone in indoor environments: concentration and chemistry. *Indoor air*, 269–288.
- WHO. (1996). *Guidelines for drinking-water quality*. Geneva, Switzerland.: World Health Organization.
- WHO. (2002). *Global Meeting on the Revision of WHO Guidelines for Drinking-water Quality*. Tokyo, Japan.
- WHO, U. (2014). Progress on drinking water and sanitation. Joint Monitoring Programme for water supply and sanitation. (*JMP*).
- WHO (World Health Organization) - regional office for Europe (2017) Drinking water parameter cooperation project—support to the revision of Annex I Council Directive 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption (drinking water directive), recommendations. 1–240.
- Wingender, J., & Flemming, H. C. (2011). Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International journal of hygiene and environmental health*, 214(6), 417-423.
- Wu, H. (2020). Assessment of Using Low-frequency Ultrasound Device for Domestic Drinking Water Disinfection.

- Yin, I. X., Zhang, J., Zhao, I. S., Mei, M. L., Li, Q., & Chu, C. H. (2020). The antibacterial mechanism of silver nanoparticles and its application in dentistry. *International journal of nanomedicine*, 15, 2555.
- Yoon, K. Y. (2008). Antimicrobial effect of silver particles on bacterial contamination of activated carbon fibers. *Environmental science & technology*, 42(4), 1251-1255.
- Zamani, H., Rahbar, S., Garakoui, S. R., Afsah Sahebi, A., & Jafari, H. (2017). Antibiofilm potential of *Lactobacillus plantarum* spp. cell free supernatant (CFS) against multidrug resistant bacterial pathogens. *Pharmaceutical and Biomedical Research*, 3(2), 39-44.
- Zanette, C., Pelin, M., Crosera, M., Adami, G., Bovenzi, M., Larese, F. F., & Florio, C. (2011). Silver nanoparticles exert a long-lasting antiproliferative effect on human keratinocyte HaCaT cell line. *Toxicology in vitro*, 25(5), 1053-1060.
- Zeng, X., Wang, G., Liu, Y., & Zhang, X. (2017). Graphene-based antimicrobial nanomaterials: rational design and applications for water disinfection and microbial control. *Environmental Science: Nano*, 4(12), 2248-2266.
- Zhang, S., Wang, Y., Song, H., Lu, J., Yuan, Z., & Guo, J. (2019). Copper nanoparticles and copper ions promote horizontal transfer of plasmid-mediated multi-antibiotic resistance genes across bacterial genera. *Environment international*, 129, 478-487.
- Zhou, X., Zhang, K., Zhang, T., Li, C., & Mao, X. (2017). An ignored and potential source of taste and odor (T&O) issues-biofilms in drinking water distribution system (DWDS). *Applied Microbiology & Biotechnology*, 101(9).
- Zimmerli, W. a. (2010). Implant-associated infection. In *Biofilm Infections* (Bjarnsholt, T. et al., eds), pp. Springer, 91–110