



Plazma daldırma iyon implantasyonu ve biriktirme (PIII&D) prosesi gerilimlerinin azot plazmasında ortopedik implant malzemesi Ti6Al4V yüzeyinde oluşturulan Ag kaplamalarının morfolojilerine, faz oluşumlarına ve *E. coli* adezyonuna etkileri

G. Mehmet Gençer^{1*}, Süleyman Karadeniz¹, Fatma Yurt Lambrecht², Hasan Havıtcıoğlu³, Sermin Özkal⁴, Hüseyin Baskın⁵

¹Dokuz Eylül Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Makina Mühendisliği Bölümü, Buca, İzmir, 35397, Türkiye

²Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı, Bornova, İzmir, 35100, Türkiye

³Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Balçova, İzmir, 35340, Türkiye

⁴Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Balçova, İzmir, 35340, Türkiye

⁵Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balçova, İzmir, 35340, Türkiye

Ö N E Ç İ K A N L A R

- N₂ plazması ile gümüş-titanyum nitrid esaslı kompozit kaplama üretimi
- PIII&D prosesi kullanılarak Ti6Al4V yüzeyinin modifikasyonu
- Gümüş-titanyum nitrid esaslı kompozit kaplama yüzeyinde *E. coli* adezyonu

Makale Bilgileri

Geliş: 12.01.2016

Kabul: 04.06.2016

DOI:

10.17341/gazimmfd.300614

Anahtar Kelimeler:

Titanyum nitrid,
gümüş,
plazma daldırma iyon
implantasyonu ve biriktirme,
X-ışını fotoelektron
spektroskopisi

ÖZET

Gümüşün antimikrobiyal etkisini ve titanyum nitridin mekanik ve kimyasal özelliklerini birleştirmek için, ortopedik implant malzemesi olarak kullanılan Ti6Al4V alaşımının yüzeyine N₂ plazmasında plazma daldırma iyon implantasyonu ve biriktirme (PIII&D) yöntemi ile gümüş biriktirilmiştir. Kaplamalar, PIII&D prosenin farklı negatif darbeli yüksek gerilim ve magnetron sıçratma gerilimi değerleri kullanılarak elde edilmiştir. Kaplamaların yüzey morfolojileri atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ve kesit morfolojileri ise alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) kullanılarak tespit edilmiştir. Kaplamaların fazları ve kimyasal kompozisyonları sırasıyla X-ışını difraksiyonu (XRD) ve X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) kullanılarak tespit edilmiştir. Buna ek olarak, numunelerin yüzeyinden içeri Ag⁺ iyonlarının nüfuziyetini belirlemek için XPS derinlik profili (depth profile) analizi yapılmıştır. In vitro anti-bakteriyel etkinlik deneylerinde numunelerin yüzeylerine ^{99m}Tc radyoizotopu ile işaretlenmiş *E. coli* (*Escherichia coli*) mikroorganizmasının adezyonu araştırılmıştır. Çalışmada, 8 kV'luk negatif darbeli gerilimin kullanıldığı deneylerle elde edilen kaplamalarda gümüşün dominant olduğu; bunun yanında, negatif darbeli yüksek gerilimin artmasıyla yüzeyde gümüş miktarının azaldığı gözlemlenmiştir.

The effects of plasma immersion ion implantation and deposition (PIII&D) process voltages on the morphology, phase formation and *E. coli* adhesion of Ag coatings obtained on the surface of Ti6Al4V orthopedic implant material in nitrogen plasma

H I G H L I G H T S

- The production of silver-titanium nitride based composite layer with N₂ plasma
- The modification of Ti6Al4V surface by using PIII&D process
- *E. coli* adhesion on the surface of silver-titanium nitride based composite coating

Article Info

Received: 12.01.2016

Accepted: 04.06.2016

DOI:

10.17341/gazimmfd.300614

Keywords:

Titanium nitride,
silver,
plasma immersion ion
implantation and deposition,
X-ray photoelectron
spectroscopy

ABSTRACT

In order to combine the antimicrobial effect of silver with mechanical and chemical properties of titanium nitride, Ag was deposited on the surface of Ti6Al4V (orthopedic implant material) in N₂ plasma by using plasma immersion ion implantation and deposition (PIII&D) method. The coatings were formed by using varied negative pulsed high voltage and magnetron sputtering voltage values of PIII&D process. Surface morphologies of coatings were determined with atomic force microscopy (AFM), while cross-section morphologies were determined with field emission scanning electron microscopy (FE-SEM). The phases and chemical compositions of coatings were investigated by using X-ray diffraction (XRD) and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), respectively. XPS depth profile analysis were done to reveal the penetration of Ag⁺ ions into the surface of specimen. In vitro anti-bacterial effectiveness experiments, the adhesion of *E. coli* (*Escherichia coli*) microorganism, which were marked with ^{99m}Tc radioisotope, on surfaces of specimens was investigated. It was consequently determined that Ag was dominant in the coatings obtained by applying 8 kV negative pulsed high voltage, while Ag decreased on the surface depending on the increase in the voltage.

* Sorumlu Yazar/Corresponding author: mehmet.gencer@deu.edu.tr / Tel: +90 232 301 9282-47

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Günümüzde, canlı dokuların işlevlerini yerine getirmek veya dokuları desteklemek amacıyla doğal ya da yapay, çoğu metal ve alaşımları, seramikler, kompozitler ve polimerler gibi malzemelerden üretilen tıbbi aletler ve protezler biyomalzeme olarak kullanılmaktadır [1]. Biyomalzeme endüstrisinde metal ve alaşımlarının kullanımı çok yaygındır [2]. Kristal yapıları ve güçlü metalik bağları sayesinde yüksek mekanik özelliklere sahip olan metal ve alaşımları, eklem protezlerinde, kemik yenileme malzemelerinde, diş implantlarında ve kalp damar cerrahisinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar [3]. Bu nedenle, vücut içinde kullanılacak biyomalzemelerin korozyon direnci, mukavemeti, yorulma dayanımı, dokulara karşı toksik olmayan özellikleri ve dolayısıyla biyouyumlulukları önemli araştırma konularıdır [4].

Titanyum ve alaşımları, sahip oldukları yüksek mekanik dayanım, üstün korozyon direnci ve biyouyumluluk gibi önemli kimyasal, fiziksel ve mekanik özellikleri sayesinde havacılık, denizcilik, otomotiv, kimyasal ya da biyomedikal mühendislik alanları gibi korozyon ortamlarında yaygın şekilde kullanılmaktadırlar [5]. Titanyumun sahip olduğu özellikler ile insan vücuduna zararının olmaması, kalça protezleri, kalp kapakçığı implantları, omurga vidaları vb. gibi tıbbi ürünlerde diğer metalik biyomalzemelere göre sıklıkla kullanım bulmasını sağlamıştır [6].

Biyomalzemelerin insan vücudu içinde kullanımına bağlı en önemli komplikasyonlarından biri, biyomalzemenin vücut içinde yerleştirildiği bölgede biyomalzeme kaynaklı enfeksiyondur [7]. Bu durum biyomalzeme-doku arasındaki etkileşim nedeniyle, bakterilerin biyomalzeme yüzeyinde ya da biyomalzemenin yerleştirildiği bölgedeki dokuların hücrelerinde koloni oluşturmak için yüksek adaptasyon yeteneği ile ilişkilendirilir [7].

Biyomalzeme yüzeylerinde bakteriler tarafından kolonilerin oluşması, biyomalzeme yüzeyi fonksiyonlarını olumsuz etkiler [8]. Bu bağlamda, vücut içinde kullanılan medikal implantların yüzeylerinde oluşan bakteri kolonilerini azaltmak ve yüzeyde biyofilm gelişimiyle enfeksiyon oluşumunu azaltmak veya yok etmek için yeni yüzeylerin üretimi ya da var olan antibakteriyel yüzeylerin özelliklerinin geliştirilmeleri üzerine araştırmalar yapılmaktadır [9]. Çeşitli geleneksel ve gelişmiş yüzey modifikasyon yöntemleri, biyomalzemelerin yüzeylerinin biyouyumluluklarını geliştirmek ve yapay antibakteriyel yüzeylerin üretilmeleri için yaygın şekilde kullanılmaktadır [10]. Yüzey modifikasyon tekniklerinin arasında kompleks şekilli parçaların üç boyutlu yüzey iyileştirmesini yapabilen, iyon implantasyonunu ve iyon birikimini birleştiren ve yüzeyde oluşturduğu kaplama ile metal numune arasında atomik olarak birbiriyle karışmış tabaka oluşturan plazma daldırma iyon implantasyonu ve biriktirme (PIII&D) yöntemi melez bir yöntemdir [11]. PIII&D yönteminde, plazma içine daldırılan yüzeyi

iyileştirilecek iletken numunelere negatif potansiyelde tekrarlı ve darbeli yüksek gerilimler uygulanır. Plazmayı oluşturan iyonlar ve hedef malzemeye (kaplama malzemesine) ait iyonlar numuneye uygulanan yüksek gerilim darbelerinin etkisiyle numune yüzeyine doğru hızlanır ve iletken numunenin yüzeyine implante edilirler. Böylece, PIII&D yöntemiyle proses parametrelerinin optimizasyonu ile numune yüzeyinin kimyasal ve fiziksel özellikleri kontrollü ve hassas şekilde değiştirilebilmektedir [12].

Medikal implantların insan vücuduna yerleştirilmeleri sonucunda olası enfeksiyon oluşumunun kontrolü için, hastanın operasyondan sonra antibiyotik kullanımı yerine, alternatif stratejiler araştırılmaktadır. Bu durum göz önüne alındığında, medikal implant yüzeyinde bakteriyel adezyonun azaltılması ve doku uyumunun sağlanması, tıbbi operasyondan sonra enfeksiyon riskini azaltacaktır [7].

Gümüş iyonlarının ve gümüş bileşiklerinin bazı bakteri, virüs, alg ve mantarlar üzerinde toksik etki gösterdiği bilinmektedir [13]. Gümüşün etkin anti-bakteriyel ajan olması (bakteri öldürücü özelliğe sahip olması), gümüş nanopartiküllerinin uzun süredir medikal alanda pansuman malzemeleri, idrar sondaları, vb. gibi tıbbi birçok ürünlerde ve tedavi amaçlı uygulamalarda kullanılmasını sağlamıştır [14]. Günümüzde yeni bir teknoloji olarak, gümüş nanopartiküllerini içeren spreyle çeşitli gribal enfeksiyon tedavilerinde de etkili birer dezenfektan olarak kullanılmaktadır [15].

Çalışmanın amacı, titanyum nitrürün ve gümüşün önemli avantajlarını birleştirerek ortopedik implant malzemesi olan Ti6Al4V numunelerin yüzeyinde tek bir proses ile kompozit kaplama elde etmek ve bu kompozit kaplamanın in vitro davranışını incelemektir. Çoğu kompozit kaplama birçok farklı yöntemin kullanılması ile elde edilirken [16], çalışmamızda gümüş-titanyum nitrür esaslı kompozit kaplamalar PIII&D yöntemi kullanılarak N₂ plazmasında tek bir proses ile elde edilmiştir. Bu nedenle, Ag PIII&D yöntemi ile N₂ plazmasında farklı proses gerilimleri (negatif darbeli yüksek gerilim ve biriktirme gerilimi) ve darbe süreleri kullanılarak sentezlenen kompozit kaplamaların in vitro davranışları araştırılmıştır.

2. DENEYSEL ÇALIŞMALAR (EXPERIMENTAL STUDY)

2.1. Numunelerin Hazırlanması ve PIII&D Proses

Koşulları (Preparation of Samples and PIII&D Process Conditions)

Deneysel çalışmalarda ortopedik implant malzemesi olarak kullanılan Ti6Al4V alaşımından ϕ 18 mm \times 4 mm boyutlarında numuneler hazırlanmıştır. Kullanılan Ti6Al4V alaşımının kimyasal kompozisyonu Tablo 1'de verilmiştir. Deneysel Ti6Al4V alaşımının yüzeyini kaplamak için hedef malzeme (kaplama malzemesi) olarak, magnetron sıçratma kaynağına takılan saf gümüş disk kullanılmıştır.

Tablo 1. Ti6Al4V alaşımının kimyasal kompozisyonu
(Chemical composition of Ti6Al4V alloy)

	%Ti	%Al	%V	%C	%Fe	%O	%N
Değerler	89,263	6,14	4,3	0,004	0,17	0,12	0,003

ϕ 18 mm \times 4 mm boyutlarında disk şeklinde hazırlanan numuneler 80-400-1200-2000 'lık kum büyüklüğüne sahip SiC zımparalar ile zımparalandıktan sonra 0,05 μ m'lik *Alumina Süspansiyon* ile ayna parlaklığında parlatılmıştır. Yüzeyleri parlatılan numuneler, PIII&D prosesinden önce, ultrasonik temizleme cihazında aseton içinde 30 dakika boyunca temizlenmiştir (hazırlanmış numuneler parlatma ve temizleme işlemlerinden sonra "kaplamasız" olarak ifade edilmiştir).

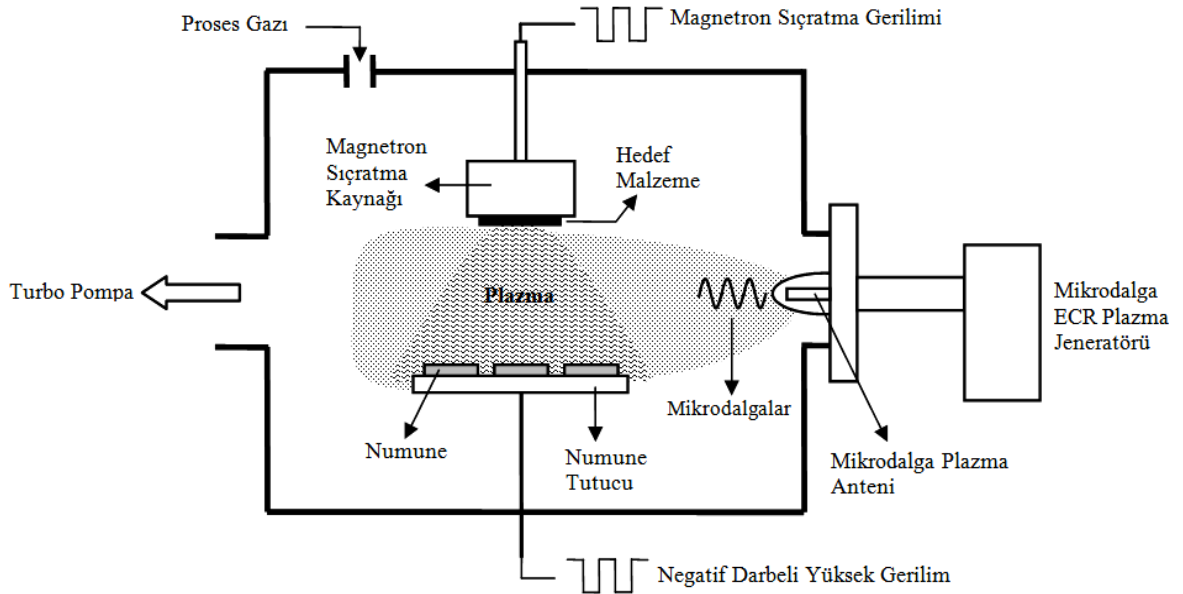
Yüzey hazırlama, tüm vakum kaplama işlemlerinde gerekli bir aşamadır ve kaplama işleminin arayüz ve çekirdeklenme oluşum aşamaları için kritiktir. Bu "hazırlanan" yüzeyler, sırayla, kaplamanın adezyonunu, yüzeyi kaplamasını ve çoğu durumda oluşan kaplamanın yapısını ve özelliklerini belirler. Yüzey hazırlama sadece yüzeyi temizlemeyi kapsamaz. Bazı durumlarda yüzeyin ya da yüzeye yakın bölgenin kimyasal, morfolojik ya da mekanik özelliklerinin modifikasyonunu da içerir.

Bu değişiklikler yüzeye biriken atomların çekirdeklenmelerini ve kaplamanın büyümesini (gelişmesini) etkileyebilir. Temizleme, hem vakum odası dışında ultrasonik temizleme cihazı ile yapılan temizliği (dış temizlemeyi) ve hem de vakum odası içinde numune yüzeyine iyon bombardıman edilmesiyle yapılan temizlemeyi (sıçratma temizliğini) kapsamaktadır [17]. Kaplamasız Ti6Al4V diskler üzerine azot plazmasında gümüş kaplamaların üretimleri PIII&D kullanılarak

gerçekleştirilmiştir. Şekil 1'de deneylerde kullanılan PIII&D sisteminin prensip şeması ve Tablo 2'de PIII&D proses parametreleri gösterilmiştir. Elde edilen kaplamaların faz oluşumları, morfolojileri ve in vitro davranışlarına uygulanan proses gerilimlerinin (negatif darbeli yüksek gerilim ve magnetron sıçratma gerilimi) etkilerini anlayabilmek için belirli aralıkta farklı gerilim değerleri kullanılmıştır. Ag^+ ve N^+ iyonlarının numunelerin yüzeylerine olan implantasyon farklılıklarını ortaya çıkartmak için üç farklı negatif darbeli yüksek gerilim uygulanmıştır.

Buna ek olarak, proseste kullanılan darbe süreleri, frekans dikkate alınarak, darbe periyodunun %10'u ve %15'i olacak şekilde ayarlanmıştır. Kaplamanın elde edilmesi için, vakum odası öncelikle $2,2 \times 10^{-5}$ mbar'lık basınca vakumlanarak oda temizlenmiştir. Vakum işleminden sonra vakum odasına 25 cm^3/dk 'lık debi ile azot gazı verilmiş ve 1×10^{-4} mbar'lık çalışma basıncı elde edilmiştir. Kaplamasız numunelerin yüzeylerindeki oksitlerini ortadan kaldırmak için, kaplama işleminden önce, mikrodalga ECR plazma üreticisi ile üretilmiş azot plazmasında numunelerin yüzeyleri darbe süresi ve frekansı sırasıyla 50 μ s ve 1000 Hz olan -5 kV'luk negatif darbeli yüksek gerilimde sıçratma temizliği (sputtering cleaning) ile temizlenmiştir.

Sıçratma temizliğinden sonra, magnetron sıçratma kaynağı jeneratörü çalıştırılarak PIII&D işleminde kullanılan ikinci azot plazması da elde edilmiştir. Magnetron sıçratma kaynağı jeneratörü ile deney için belirlenen parametreler (negatif darbeli sıçratma kaynağı gerilimi, gerilim darbelerinin süreleri ve frekansları) ayarlandıktan sonra, numune tutucunun bağlı olduğu negatif darbeli yüksek gerilim jeneratörü çalıştırılmıştır.

**Şekil 1.** PIII&D sisteminin prensip şeması (Schematic representation of PIII&D system)

Tablo 2. PIII&D prosesinin parametreleri (Parameters of PIII&D process)

Numune No	Magnetron Sıçratma Gerilimi (V)	Darbe Süresi (μ s)	Frekans (Hz)	Negatif Darbeli Yüksek Gerilim (kV)
C1	850	96,5	1140	8
C2	750	131,5	1140	8
C3	850	131,5	1140	8
C4	750	131,5	1140	12
C5	850	131,5	1140	12
C6	850	131,5	1140	16
C7	750	131,5	1140	5

Deney için belirlenen negatif darbeli yüksek gerilim (implantasyon gerilimi) ayarlanmadan önce, magnetron sıçratma kaynağı jeneratörü ile darbeli negatif yüksek gerilim jeneratörü koaksiyal kablo ile birbirlerine bağlanmıştır. Bunun sebebi, her iki jeneratörü de aynı darbe frekans ve süresinde çalıştırabilmektir. Bu ayarlamadan sonra, implantasyon gerilimi deney için belirlenen değere ayarlanmış ve hemen ardından PIII&D işlemi için kullanılan her iki jeneratörün gerilim darbeleri osiloskop kullanılarak eş zamanlı hale getirilmiştir (iki jeneratörün ürettiği darbeler üst üste çakıştırılmıştır) (Şekil 2).

Böylece darbe anında hedef malzeme yüzeyine çarpan azot iyonları ile gümüş iyonları elde edilmiş ve darbe süresince elde edilen gümüş iyonlarının, elektrik alanı kuvveti ile daha büyük potansiyel negatif gerilimin bulunduğu numunelere doğru hızlandırılarak numunelerin yüzeylerine çarpması sağlanmıştır. Tüm deneylerde PIII&D proses süresi 20 dakikadır ve deneyler süresince numunelere ve numune tutucusuna dışarıdan ısıtma ya da soğutma uygulanmamıştır.

2.2. Yüzey Karakterizasyonu (Surface Characterization)

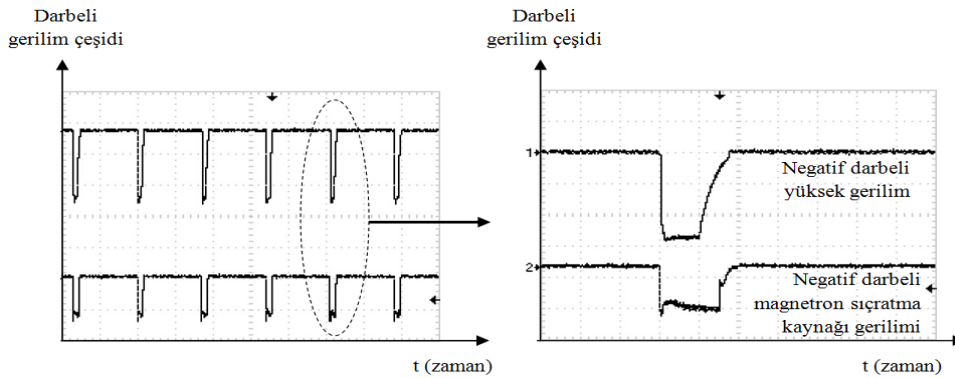
Kaplamalı ve kaplamasız Ti6Al4V numunelerinin yüzey morfolojileri atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile incelenmiştir. Her numunenin yüzeyinden rastgele 3 farklı $32 \times 32 \mu\text{m}^2$ 'lik alan AFM ile incelenmiştir. Kaplanan numunelerin kesit morfolojileri ise alan emisyonlu taramalı

elektron mikroskobu (FESEM) kullanılarak incelenmiştir. Kaplamalı ve kaplamasız numunelerin yüzey faz kompozisyonları ince film X-ışını difraksiyonu (XRD) analizi ile yapılmış ve numune yüzeyinden içeriye doğru kimyasal kompozisyonun değişimi ise X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) ile tespit edilmiştir. Ek olarak, elde edilen filmlerde bulunan fazların ortalama kristal boyutları XRD analizi ($\lambda=0,154 \text{ nm}$) ile ölçülmüş ve Debye-Scherrer denklemi kullanılarak hesaplanmıştır (Eş. 1) [18]. Debye-Scherrer denkleminde D, kristal boyutunu; λ , kullanılan X-ışınının dalga boyunu; β , pik yarı yüksekliğinin genişliğini (rad); θ , difraksiyon açısını ve K, kristal şekil faktörünü göstermektedir [19].

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (1)$$

2.3. In vitro Anti-Bakteriyel Etkinlik Çalışması (In vitro Anti-Bacterial Effectiveness Study)

In vitro anti-bakteriyel etkinlik (in vitro bakteri tutunumu) testlerinde PIII&D prosesi ile elde edilmiş kaplamalı numunelerin yüzeyleri, kaplamasız numune ile kontrol amaçlı karşılaştırılmıştır. In vitro anti-bakteriyel etkinlik deneylerinde numunelerin yüzeylerine $^{99\text{m}}\text{Tc}$ radyoizotopu ile işaretlenmiş *E. coli* (Escherichia coli) mikroorganizmasının adezyonu araştırılmıştır. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ radyoizotopu ile *E. coli* mikroorganizmalarının işaretlenmesi aşağıdaki sırada yapılmıştır [20]:



Şekil 2. Negatif darbeli magnetron sıçratma kaynağı gerilimi ve negatif darbeli yüksek gerilim osiloskop görüntüsü (Oscilloscope images of negative pulsed magnetron sputtering voltage and negative pulsed high voltage)

1. 5×10^6 cfu/ml (cfu: ml içinde oluşan koloni sayısı) *E. coli* (ATCC 35218) bakterisi üzerine 0,5 ml SnCl_2 (1mg/1ml) çözeltisi ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 2. Daha sonra üzerine 5 mCi $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ilave edilmiş ve bu ilave işleminden sonra 20 dakika süresince tüp bekletilmiştir. 3. Tüp 25 dakika boyunca 2500 rpm'de santrifüjlenmiştir. Tüp içinde oluşan alt ve üst fazdan 100'er μl çekilip her bir fazın aktiviteleri Cd (Te) (radyasyon monitor ekipmanlı RAD-501) yarı iletken dedektörde sayılmıştır [21]. Buradan *E. coli* mikroorganizmasının $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ile işaretleme verimi aşağıdaki formüle (Eş. 2) göre hesaplanmıştır (cps: saniye başına sayım) [22].

$$\% \text{ İşaretleme Verimi} = \frac{\text{Alt Kısım (cps)}}{(\text{Alt Kısım (cps)} + \text{Üst Kısım (cps)})} \times 100 \quad (2)$$

4. Standart olarak kabul edilen aktivitesi sayılan (standart sayım) alt faz üzerine 100 μl salina (serum fizyolojik) konularak üst kısımda hiç aktivite kalmayana kadar yıkanmıştır. Tüm yıkamalardan sonra işaretli *E. coli* hacmi 10 ml'e serum fizyolojik ile seyreltilmiştir. Deney tüplerine mikropipetle 500 μl konulmuş ve her tüpün aktivitesi sayılmıştır. 5. Daha sonra bu tüplere kaplanmış ve kaplanmamış numuneler yerleştirilerek 37 °C'de etüvde 25 dakika bekletilmiş ve bu süre sonunda numuneler deney tüplerinden filtre kağıdı yardımıyla süzölmüştür. 6. Kaplanmış ve kaplanmamış numuneler filtre kağıdı üzerine

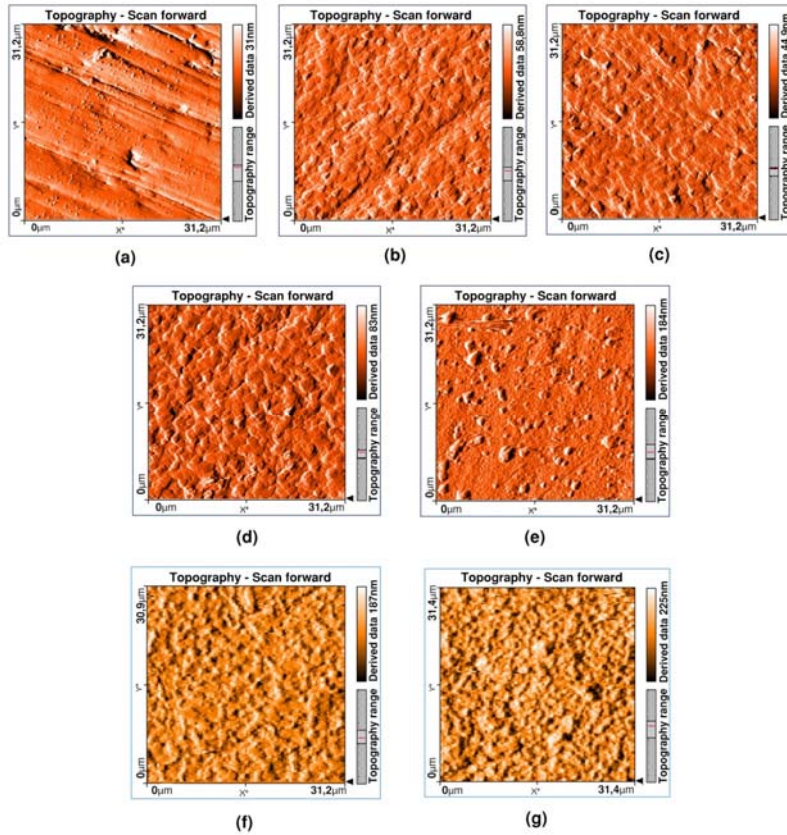
konularak kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan numunelerin aktiviteleri Cd (Te) (radyasyon monitor ekipmanlı RAD-501) yarı iletken dedektöründe sayılmış ve yüzey üzerindeki bakteri tutunumu % tutunum olarak hesaplanmıştır (Eş. 3).

$$\% \text{ Tutunum Miktarı} = \left(\frac{\text{Disk Sayımı (cps)}}{\text{Standart Sayım (cps)}} \right) \times 100 \quad (3)$$

Sayım işlemi yapıldıktan sonra numunelerin yüzeylerindeki radyoaktivite miktarı ortam aktivite değerine ininceye kadar beklenmiş ve sonrasında numunelerin yüzeyleri silinerek temizlenmiştir.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR (RESULTS AND DISCUSSIONS)

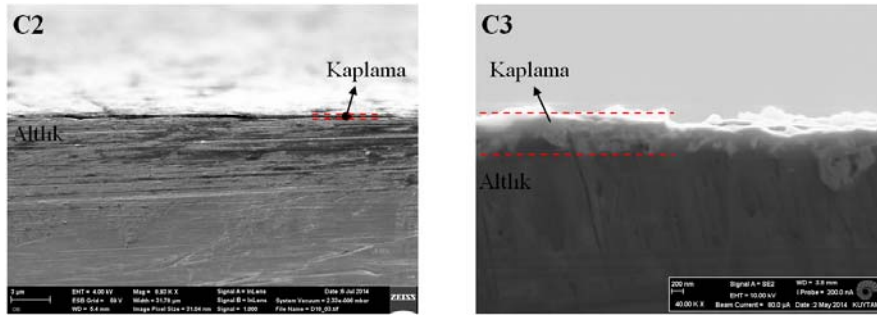
Kaplamaların yüzey morfolojisi biyomalzemelerin mekanik ve anti-bakteriyel özelliklerini etkileyebilen önemli etkindir [23]. PIII&D yöntemi ile azot plazmasında Ag biriktirilerek kaplanmış ve kaplanmamış Ti6Al4V numunelerinin atomik kuvvet mikroskobu ile elde edilmiş yüzey morfolojileri Şekil 3'de gösterilmektedir. Kaplamasız numunenin yüzeyinde tespit edilen mekanik parlatmaya dayalı izler Şekil 3. (a) 'da net şekilde görülmektedir. PIII&D işlemi ile çeşitli parametreler kullanılarak elde edilen numunelerin yüzeylerinde, Sun ve çalışma ekibinin [24] gerçekleştirdiği çalışmaya benzer şekilde, nano boyutlarda tanelerden



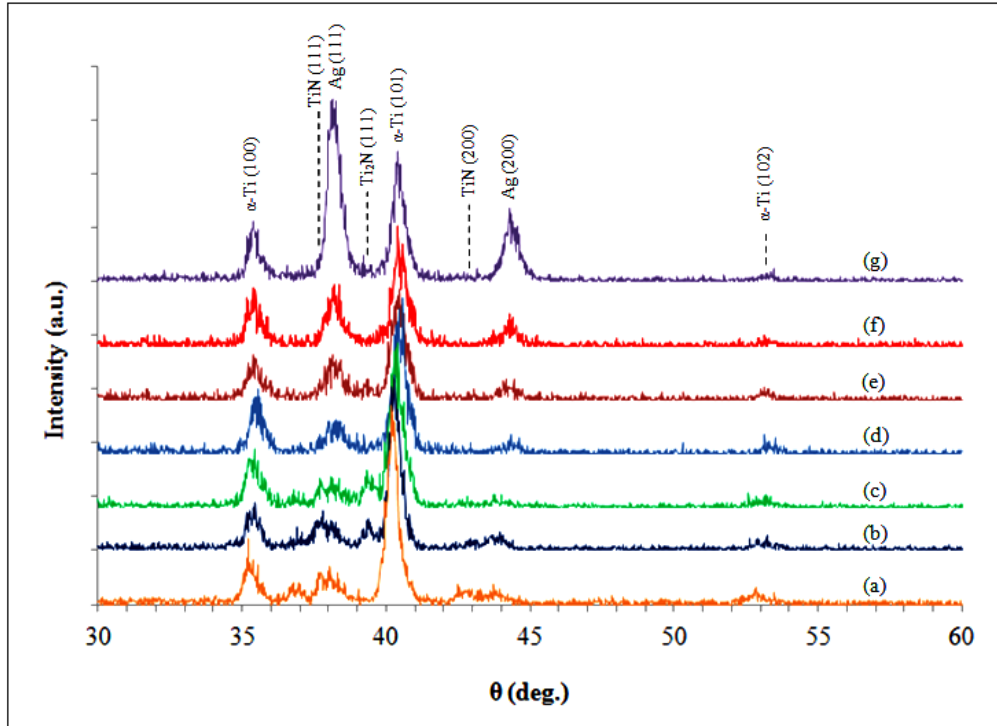
Şekil 3. Numune yüzeylerinin AFM sonuçları (a) Kaplamasız, (b) C1, (c) C2, (d) C3, (e) C4, (f) C5, (g) C6 (AFM results of surfaces of samples (a) Uncoated, (b) C1, (c) C2, (d) C3, (e) C4, (f) C5, (g) C6)

oluşan kaplamalar oluşmuştur. Buna ilaveten kaplamasız numune yüzeylerinde mekanik parlatmadan dolayı oluşan yüzey aşınma çizikleri ve diğer yüzey süreksizlikleri, uygulanan PIII&D işlemi sonrası kaplanmış ve kapanmıştır (Şekil 3.(b)-(g)). Yüzey morfolojileri incelendiğinde, negatif darbeli yüksek gerilimin artışı numunelerin yüzeyinde daha kompakt (sıkışmış, yoğun) morfolojik yapı oluşmasına neden olmuştur. PIII&D işlemi ile elde edilmiş numunelerin yüzey kesit morfolojileri Şekil 4'de gösterilmektedir. PIII&D işlemi süresince numunelere negatif darbeli yüksek gerilim uygulanması nedeniyle numunelerin incelenen yüzeylerinin tüm bölgelerinin homojen şekilde kaplandığı açık şekilde görülmektedir. Hedef malzemeden sıçratılan Ag^+ iyonları ve plazmadaki N^+ iyonları numunelerin yüzeylerine yüksek hızlarda her yönden (tek yöne bağımlı olmadan) implante edilmiştir. Bu durum PIII&D prosesinin temel prensibi ile uyumludur [25]. Şekil 5'de PIII&D ile kaplanmış numunelerin XRD

sonuçları gösterilmektedir. Kaplanmış numunelerde, Ti6Al4V'un α -Ti ve β -Ti fazlarına ait difraksiyon pikleri, yüzeyde elde edilen kaplamalar tarafından bastırılmıştır [26]. Buna ilaveten, kaplanmış numunelerin yüzeylerinde, parametrelerin değişimlerine bağlı olarak, TiN, Ti_2N ve gümüşe ait difraksiyon pikleri tespit edilmiştir [27]. Ti6Al4V numunelerin yüzeylerinde elde edilen belirli kristal yapıya sahip kaplamalarda, implantasyon geriliminin artışıyla (özellikle 8kV'dan 12kV'a) numune yüzeyinde TiN ve Ti_2N fazlarının daha yoğun şekilde oluştuğu gözlemlenmiştir (Şekil 5) [28]. Negatif darbeli yüksek gerilim 12 kV'dan 8 kV'a düşürüldüğünde, numunelerin yüzeylerinde gümüş birikiminin arttığı gözlemlenmiştir [29]. Ancak, 8 kV'luk negatif darbeli yüksek gerilim kullanılarak gerçekleştirilen deneylerde PIII&D prosesinin darbe süresinin azalmasıyla numunelerin yüzeyine biriktirilen Ag'nin yoğunluğunun azaldığı tespit edilmiştir. Aynı darbe süresi ve biriktirme geriliminde, negatif darbeli



Şekil 4. C2 ve C3 numunelerin kesit morfolojileri (Cross-sectional morphology of C2 and C3 samples)



Şekil 5. Kaplanmış numunelerin XRD sonuçları (a) C6, (b) C5, (c) C4, (d) C1, (e) C2, (f) C7, (g) C3 (X-ray diffraction results of coated samples (a) C6, (b) C5, (c) C4, (d) C1, (e) C2, (f) C7, (g) C3)

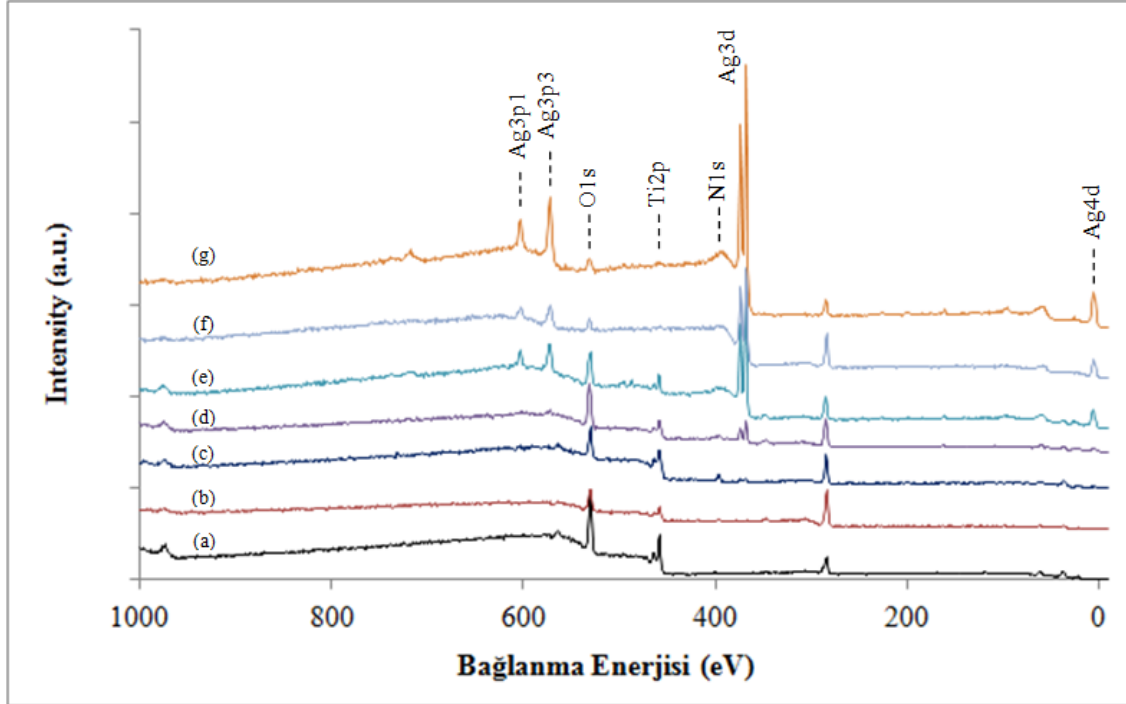
yüksek gerilim 8 kV'dan 5 kV'a düşürüldüğünde numunelerin yüzeylerinde gümüş birikiminin arttığı gözlemlenmiştir. Ancak 8 kV'nin kullanıldığı C3 numunesinin biriktirme gerilimi (850 V), 5 kV'nin kullanıldığı C7 numunesinin biriktirme geriliminden (750 V) fazla olduğu için C3 numunesinin yüzeyinde daha yoğun Ag birikimi elde edilmiştir. Bu numunelerde titanyum nitrüre ait difraksiyon piklerinin yoğun gümüş kaplama ile bastırılmış olduğu da sonuçlarda görülmektedir (Şekil 5) [30]. Elde edilen kaplamalarda Ag, TiN ve Ti₂N 'nin ortalama kristal boyutları Tablo 3'de verilmiş olup, proses parametrelerine bağlı olarak, Ag 'ye ait kristal boyutları 17,10-22,47 nm arasında değişirken, TiN 'e ait kristal boyutlarının 20,06-31,58 nm ve Ti₂N 'e kristal boyutlarının ise 22,60-45,21 nm arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Kaplanmış numunelerin ve kaplanmamış numunenin geniş taramalı XPS spektrumları Şekil 6'da görülmektedir. Elde edilen numunelerin yüzeylerine ait XPS spektrumlarında Ag3p₁, Ag3p₃, Ag3d, Ag4s ve Ag4d 'ye ait pikler, literatürde gümüşe ait XPS pikleri ile uyumlu olarak yaklaşık 604 eV, 574 eV, 368 eV, 97 eV, 4.5 eV

bağlanma enerjilerinde tespit edilmişlerdir [31, 32]. N1s 'e ait pik ise yaklaşık 397 eV bağlanma enerjisinde tespit edilmiştir [33]. Buna göre C1, C2 ve C3 numunelerinin yüzeylerinde Ag'nin dominant olduğu Şekil 6'da görülmektedir. Oksijen, elde edilen kaplamaların tümünde bulunmaktadır. Bu durum, titanyumun oksijene yüksek afinitesi (bağ kurma isteği) sebebiyle oksijenin kaplama içinde bileşik halinde olduğunu gösterir [24]. Buna benzer bir durumu kendi çalışmalarında tespit eden Subramanian ve çalışma arkadaşları [34], argon ve azot gazları kullanarak, magnetron sıçratma ile ürettikleri Ti/TiN çok tabakalı kaplamaların TiN, TiO₂ ve TiO_xN_y 'den oluştuğunu belirtmişlerdir. Aynı şekilde Sun ve çalışma ekibi [24] de şekil hafızalı NiTi alaşımının yüzeyinde elde ettikleri (Ti, N)/Ti kaplamasında O elementini tespit etmişler ve O elementinin kaplama içinde titanyum ile bileşik halde olduğunu belirtmişlerdir. Kaplanmış numunelerin geniş taramalı XPS spektrumlarında V'a ait bir pik yoktur. Bu durum V elementinin insan vücudundaki toksik etkisini önlemede önemlidir [35]. Böylece canlı vücudu için toksik etkisi olan V elementinin numune yüzeyinde bulunmadığı

Tablo 3. Elde edilen filmlerdeki fazların ortalama kristal boyutları (Average crystallite sizes of phases obtained in thin films)

Numune	Ag (111)	TiN (111)	Ti ₂ N (111)
C1	18,52	-	-
C2	17,10	-	45,21
C3	22,47	-	-
C4	22,23	29,48	22,60
C5	21,59	20,06	24,14
C6	19,33	31,58	-
C7	19,36	-	-

* Kristal boyutları nm'dir.



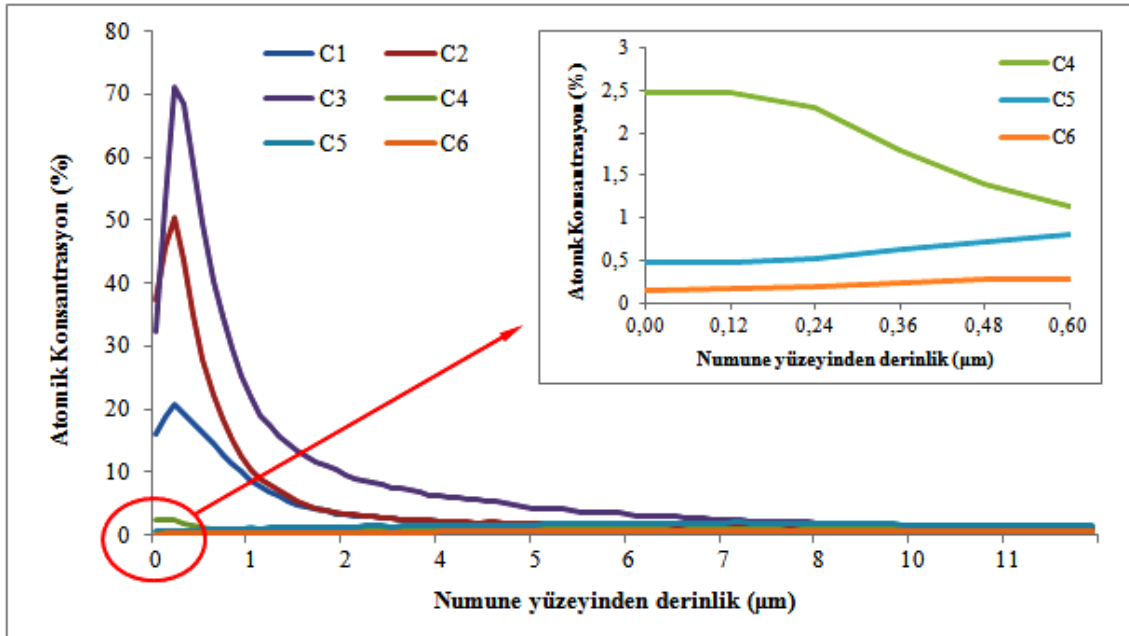
Şekil 6. Numunelerin geniş taramalı XPS yüzey spektrumları (a) Kaplamasız, (b) C6, (c) C5, (d) C4, (e) C1, (f) C3, (g) C2 (XPS wide scan surface spectra of samples (a) uncoated, (b) C6, (c) C5, (d) C4, (e) C1, (f) C3, (g) C2)

kaplamalar PIII&D yöntemi ile Ti6Al4V yüzeyinde elde edilmiştir. Şekil 7'de gümüş iyonunun numunelerin yüzeylerinden içeri nüfuziyetini gösteren XPS derinlik profili (XPS depth profile) analizi sonuçları görülmektedir. XPS derinlik profili sonuçlara göre, özellikle 8 kV'luk negatif darbeleri yüksek gerilimin kullanıldığı deneylerde, darbe süresindeki ve biriktirme gerilimindeki farklılıkların numune yüzeyine Ag^+ iyonu implantasyonunu belirgin şekilde değiştirdiği gözlemlenmiştir. Biriktirme geriliminin artışı ile birim zamanda hedef malzemeden (kaplama malzemesinden) daha fazla Ag^+ iyonu plazmaya ve oradan da daha fazla Ag^+ iyonu numune üzerine gitmektedir. Bu nedenle C3 numunesinin yüzeyine, C2 numunesine kıyasla daha fazla Ag^+ iyonu biriktirilmiştir. Darbe süresinin azaltılması ise, deneysel çalışmalarda eş zamanlı hale getirilmiş ve aynı darbe süreli olan negatif darbeleri yüksek gerilim ve biriktirme geriliminin darbe sürelerinin birlikte azaltılmasıdır. Bu durum, birim zamanda hedef malzemeden (kaplama malzemesinden) daha az Ag^+ iyonu üretilmesine ve aynı zamanda numunelerin yüzeyine birim zamanda daha az Ag^+ iyonu biriktirilmesine sebep olur. Şekil 7'de darbe süresinin azaltılmasına bağlı olarak C3 numunesinin yüzeyine C1 numunesine göre daha fazla Ag^+ iyonunun biriktirildiği belirgin olarak görülmektedir. Buna ilaveten; biriktirme gerilimindeki azalmaya kıyasla, darbe süresindeki azalmanın Ag^+ iyonunun implantasyonunu daha çok düşürdüğü de C2 ve C1 numunelerinin Ag derinlik profillerinden görülebilmektedir (Şekil 7). In vitro deneylerde mikrobiyolojik tutunumun değerlendirilmesinde kullanılmak üzere seçilen *E. coli*'nin ^{99m}Tc radyoizotopu ile

(%) işaretleme verimi sonuçları, ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 4'de verilmiştir. Deneylerde, ^{99m}Tc ile işaretli *E. coli* mikroorganizma gruplarının PIII&D ile elde edilen numune yüzeylerine tutunum miktarı farklılığının belirlenmesi için Tek Yönlü Varyans Analizi (One-way ANOVA) kullanılmıştır (Şekil 8).

E. coli'nin kaplanmamış ve PIII&D işlemi ile kaplanmış numune yüzeylerinde (%) ortalama tutunum miktarları, standart sapmaları ve istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır. Şekil 8'den de görüldüğü gibi, PIII&D ile kaplama yapılmış tüm yüzeylerde ^{99m}Tc -*E. coli* tutunumu kontrol grubuna göre belirgin şekilde düşük çıkmıştır. ^{99m}Tc -*E. coli* tutunumu yönünden en iyi sonuçlar ise C2 (%0.32±0.17) ve C1 (%0.67±0.55) numaralı örneklerde elde edilmiştir.

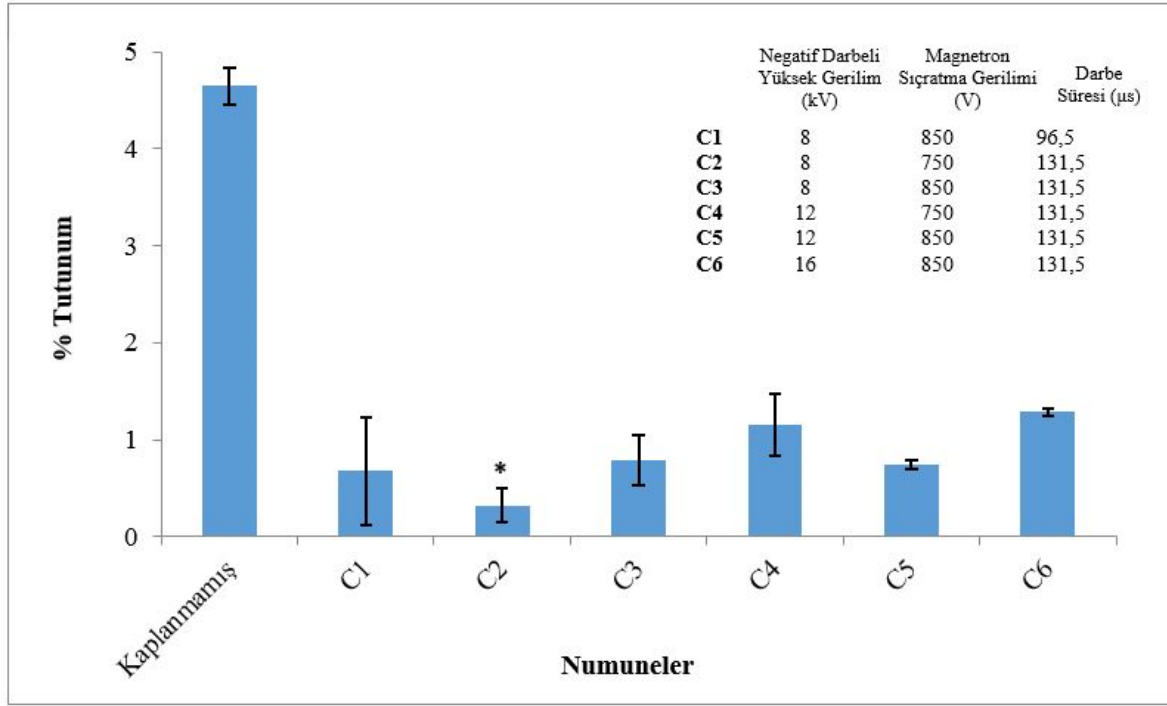
Gümüşün mikrop öldürücü özellikleri iyon formunun (Ag^+) kimyasal özelliklerinden gelmektedir. Metalik gümüş inerttir ve bakteri tarafından az absorbe edilir. Ancak metalik gümüş vücut sıvısı ya da salgılarıyla temas halindeyken gümüş iyonu (Ag^+) formuna geçer. Böylece Ag^+ iyonu bakterinin ihtiyacı olan proteinlerle etkileşime girer ve proteinlerin bakteriler tarafından kullanılmalarını engeller. Buna ilaveten, bakterilerin hücre zarlarındaki önemli enzim sistemlerine de zarar verir [36, 37]. Ag^+ iyonu bakteri zar yapısı ile etkileşime girerek, zar yapısında değişimlere, bozulmalara ve sonuçta bakterilerin ölümüne neden olur [38]. Ayrıca, bakterilerin yüzeye daha az tutunmasında gümüşün sahip olduğu bakteri öldürücü



Şekil 7. Numunelerin Ag derinlik profilleri (Ag depth profiles of samples)

Tablo 4. *E. coli* 'nin ^{99m}Tc ile (%) işaretlenme verimi (The marking efficiency (%) of *E. coli* with ^{99m}Tc)

Mikroorganizma	I.Deney	II.Deney	III.Deney	IV.Deney	Ortalama	SD
<i>E. coli</i>	99,99	99,73	99,60	99,96	99,82	0,18



Şekil 8. Numune yüzeylerine ^{99m}Tc-*E. coli* tutunumu (%) ve standart sapma değerleri (n=3)* p<0,05 (Adhesion amounts (%) and standard deviation value of ^{99m}Tc-*E. coli* on sample surfaces (n=3)* p<0,05)

etkisinin yanında, kaplamalar ile elde edilen yeni yüzeylerin özelliklerinin de etkisi olmaktadır. Kaplamasız numunenin yüzeyinde bulunan mekanik parlatmadan kaynaklı "nm" mertebesindeki çizikler, elde edilen kaplamalar ile kaplanarak "nm" mertebesinde daha pürüzsüz yüzeyler elde edilmiştir. Dolayısıyla bakterilerin tutunabileceği yüzey alanı da "nm²" mertebesinde azaltılmıştır. Böylece *E. coli* bakterilerinin yüzeye tutunumunun, hem gümüşün bakteri öldürücü etkisiyle biyolojik olarak, hem de elde edilen kaplamanın yüzey özellikleri ile mekanik olarak azaltılmaktadır. In vitro antibakteriyel etkinlik deneyleri sonucu elde edilen sonuçlar, literatürdeki gümüş kaplamalı yüzeyler üzerine yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında benzer sonuçların elde edildiği gözlemlenmiştir. Cao ve ekibinin [31] saf titanyum yüzeyini Mg-Ag PIII&D ile modifiye ettikleri çalışmalarında, elde ettikleri numune yüzeylerinde yaklaşık 5,0 at.% gümüş bulunduğunu tespit etmişler ve aynı numunenin yüzeyinde *E. coli* bakterisinin üremesinin kaplamasız titanyuma göre daha az olduğunu belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada, Cao ve ekibinin [39], titanyum alaşımının (grade 2) yüzeyini Ag-PIII ile ıslah etmişler ve elde ettikleri numunelerin yüzeylerinde 2,0-12 at.% aralığında değişen gümüş tespit etmişlerdir. Çalışmada, Ag-PIII ile ıslah edilen yüzeylerde 37 °C'de 24 saat beklettikleri *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerinin üreyemediği ve bu yüzeylerin bakterilere karşı sitostatik (hücre gelişimini durduran) ve sitosidal (hücreye toksik şekilde etki edip hücreyi öldüren) oldukları belirtilmiştir. Godoy-Gallardo ve ekibi [37] saf titanyum yüzeyine elektrokimyasal anodlama prosesi ile gümüş

biriktirmişlerdir. Ekip, gümüş-anodlama ile üretilen numunelerin yüzeylerinde 0,5-2,8 at.% aralığında değişen gümüş birikimi elde etmişler ve bu numunelerin yüzeylerine *S. sanguinis* ve *L. salivarius* bakterilerinin adezyonunun (tutunumunun) saf titanyuma göre daha az olduğunu belirtmişlerdir. Cao ve ekibi [40] yaptıkları başka bir çalışmada ise titanyum alaşımının (grade 2) yüzeyinde plazma püskürtme yöntemi ile titanyum oksit tabakası elde ettikten sonra, gümüşü bu oksit tabakasına PIII yöntemi ile implante etmişlerdir. Elde edilen numunelerin yüzeylerinde 4,0-8,5 at.% aralığında değişen gümüş konsantrasyonu tespit etmişler ve bu yüzeylerin *E. coli* bakterisinin üremesini azalttığını belirtmişlerdir. Gümüş iyonlarının bakteri üzerindeki toksik etki mekanizmalarının araştırıldığı bu çalışmalara göre; araştırmamızda elde ettiğimiz numunelerin yüzeylerindeki at.% gümüş miktarları üç numunede (C4, C5, C6) benzer çıkmıştır. Bu durum azot plazmasında Ag PIII&D ile elde ettiğimiz numunelerin bakterisidal (bakteri öldürücü) özellikte olacağına ışık tutmaktadır. PIII&D işlemi görmüş olan numunelerdeki tutunum değerlerinin birbirine yakın olduğu ve bu numunelerin yüzeylerinde tutunumun çok az olduğu göz önüne alındığında, ^{99m}Tc-*E. coli* tutunumu, dolayısıyla antibakteriyellik yönünden, C4, C5 ve C6 şartlarında PIII&D ile elde edilen kaplamaların canlı vücutunda kullanım için daha uygun olacağı öngörülmektedir.

4. SONUÇLAR (CONCLUSIONS)

Bu çalışmada, ortopedik implant yapımında kullanılan Ti6Al4V alaşımından hazırlanan numunelerin yüzeylerinde,

gümüş hedef malzeme kullanılarak, azot plazmasında PIII&D yöntemi ile kaplamalar elde edilmiştir. Deneylerde kullanılan negatif darbeli yüksek gerilim ve magnetron sıçratma gerilimine bağlı olarak numune yüzeylerinde titanyum nitrid ve gümüş kaplamalar elde edilmiştir. Buna göre;

PIII&D deneyleri için hazırlanan numunelerin yüzeylerinde elde edilen kaplamaların yüzey morfolojileri AFM analizi ile belirlenmiş ve kaplanmamış yüzeylerin PIII&D prosesi sonucunda tamamen homojen şekilde kaplandığı görülmüştür. AFM sonuçlarına göre numunelerin yüzeylerindeki tabakaların homojenliği, FE-SEM analiziyle elde edilen kesit morfolojileri ile de desteklenmiştir. XRD analizi sonuçlarına göre, 8 kV'luk negatif darbeli yüksek gerilimin kullanıldığı deneylerle elde edilen kaplamalarda gümüş dominant iken, 12 kV ve 16 kV'luk negatif darbeli yüksek gerilimin kullanıldığı deneylerle elde edilen kaplamalarda TiN ve Ti₂N dominant haldedir. Geniş taramalı XPS yüzey spektrumlarına göre, 8 kV'luk negatif darbeli yüksek gerilimin kullanıldığı deneylerle elde edilen kaplamalarda gümüşün dominant olduğu ve yüksek gerilimdeki artışa bağlı olarak gümüş miktarının kaplamada azaldığı gözlemlenmiştir. XPS derinlik profili sonuçları da bu durumu desteklemektedir. In vitro anti-bakteriyel etkinlik deneyleri sonucunda, PIII&D ile kaplanmış numunelerde *E. coli* mikroorganizmalarının tutunumu, kaplanmamış numuneye göre daha az çıkmıştır. Bu durum, çalışmada PIII&D prosesi ile elde edilen kaplamaların bakteri tutunumunu azaltması, dolayısıyla anti-bakteriyellik yönünden uygun olduğunu göstermiştir. Çalışmanın amacına uygun olarak PIII&D yöntemi ile ince film kaplamalar üretilmiştir. Buna göre, Ti6Al4V malzemesinin yüzeyinde elde edilen antimikrobiyal özelliğe sahip gümüş kaplamalar, PIII&D prosesinde negatif darbeli yüksek gerilim 12 ve 16 kV olduğunda antibakteriyellik özelliği açısından daha uygun olarak elde edilmiştir.

TEŞEKKÜR (ACKNOWLEDGEMENT)

Bu çalışmanın yapılması için finansal destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK; proje no: 111M184) ve Dokuz Eylül Üniversitesi'ne (proje no: 2012.KB.FEN.037) teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

- Albayrak Ö., Uğurlu M., Preparation and characterization of boron doped hydroxyapatite: Effects of boron content and sintering temperature on structure and mechanical properties, Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University, 31 (3), 749-761, 2016.
- Caralapatti V.K., Narayanswamy S., Effect of high repetition laser shock peening on biocompatibility and corrosion resistance of magnesium, Opt. Laser Technol., 88, 75-84, 2017.
- Gür A.K., Taşkın M., Metalik biyomalzemeler ve biyoyum, Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları, 2 (2), 106-113, 2004.
- Liu J., Chang L., Hairong L., Yongsheng L., Hailin Y., Jianming R., Microstructure, mechanical behavior and biocompatibility of powder metallurgy Nb-Ti-Ta alloys as biomedical material, Mater. Sci. Eng., C, 71, 512-519, 2017.
- Liu H., Xu Q., Zhang X., Wang C., Tang B., Wear and corrosion behaviors of Ti6Al4V alloy biomedical materials by silver plasma immersion ion implantation process, Thin Solid Films, 521, 89-93, 2012.
- Niinomi M., Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications, J. Mech. Behav. Biomed. Mater., 1 (1), 30-42, 2008.
- Bosetti M., Masse A., Tobin E., Cannas M., Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity, Biomaterials, 23 (3), 887-892, 2002.
- Arciola C.R., Campoccia D., Speziale P., Montanaro L., Costerton J.W., Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials, Biomaterials, 33 (26), 5967-5982, 2012.
- Bazaka K., Jacob M.V., Crawford R.J., Ivanova E.P., Efficient surface modification of biomaterial to prevent biofilm formation and the attachment of microorganisms, Appl. Microbiol. Biotechnol., 95 (2), 299-311, 2012.
- Hasan J., Crawford R.J., Ivanova E.P., Antibacterial surfaces: the quest for a new generation of biomaterials, Trends Biotechnol., 31 (5), 295-304, 2013.
- Sun T., Wang L., Yu Y., Wang Y., Wang X., Tang B., TiN/ZrO₂ multilayers synthesized on GCr15 bearing steel using plasma immersion ion implantation and deposition, Surf. Coat. Technol., 201 (15), 6615-6618, 2007.
- Saleem S., Ahmad R., Ayub R., Ikhtlaq U., Jin W., Chu P.K., Investigation of nano-structured zirconium oxide film on Ti6Al4V substrate to improve tribological properties prepared by PIII&D, Appl. Surf. Sci., 394, 586-597, 2017.
- House of Lords Science and Technology Committee, Nanotechnologies and Food, Volume II: Evidence, Authority of the House of Lords, London, 2010.
- Lara H.H., Garza-Trevino E.N., Ixtapan-Turrent L., Singh D.K., Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds, Journal of Nanobiotechnology, 9 (30), 2011.
- Ajita B., Ashok Kumar Reddy Y., Sreedhara Reddy P., Enhanced antimicrobial activity of silver nanoparticles with controlled particle size by pH variation, Powder Technol., 269, 110-117, 2015.
- Wu Z.-J., He L.-P., Chen Z.-Z., Fabrication and characterization of hydroxyapatite/Al₂O₃ biocomposite coating on titanium, Transactions of

- Nonferrous Metals Society of China, 16 (2), 259-266, 2006.
17. Mattox D.M., The foundations of vacuum coating technology, Noyes Publications/William Andrew Publishing, New York, A.B.D., 2003.
 18. Zhou Y.C., Rahaman M.N., Hydrothermal synthesis and sintering of ultrafine CeO₂ powders, *J. Mater. Res.*, 8 (7), 1680-1686, 1993.
 19. Zhou Y., Switzer J.A., Growth of cerium(IV) oxide films by the electrochemical generation of base method, *J. Alloys Compd.*, 237 (1-2), 1-5, 1996.
 20. Sonugelen M., Destan U.I., Lambrecht F.Y., Öztürk B., Karadeniz S., Microbial adherence to a nonprecious alloy after plasma nitriding process, *International Journal of Prosthodontics*, 19 (2), 202–204, 2006.
 21. Sonugelen M., Destan U.I., Lambrecht F.Y., Öztürk B., Investigation of bacterial adherence to a non-precious alloy with radiolabeling method, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 267 (2), 397-400, 2006.
 22. Diniz S.O.F., Resende B.M., Nunan E.A., Simal C.J.R., Cardoso V.N., ^{99m}Tc-labelled Escherichia coli, *Appl. Radiat. Isot.*, 51 (1), 33–36, 1999.
 23. Cheng Y., Zheng Y.F., Effect of N₂/Ar gas flow ratio on the deposition of TiN/Ti coatings on NiTi shape memory alloy by PIIID, *Mater. Lett.*, 60 (17-18), 2243-2247, 2006.
 24. Sun T., Wang L.-P., Wang M., Tong H.-W., Lu W.W., PIIID-formed (Ti, O)/Ti, (Ti, N)/Ti and (Ti, O, N)/Ti coatings on NiTi shape memory alloys for medical applications, *Mater. Sci. Eng., C*, 32 (6), 1469-1479, 2012.
 25. Wood B.P., Rej D.J., Anders A., Brown I.G., Faehl R.J., Malik S.M., Munson C.P., Fundamentals of plasma immersion ion implantation and deposition, *Handbook of Plasma Immersion Ion Implantation and Deposition*, Editör: Anders A., John Wiley&Sons, Kanada, 243-302, 2000.
 26. Galvanetto E., Galliano F.P., Borgioli F., Bardi U., Lavacchi A., XRD and XPS study on reactive plasma sprayed titanium-titanium nitride coatings, *Thin Solid Films*, 384 (2), 223-229, 2001.
 27. Bavadi R., Valedbagi S., Physical properties of titanium nitride thin film prepared by DC magnetron sputtering, *Materials Physics and Mechanics*, 15 (2), 167-172, 2012.
 28. Zhao Y., Guo C., Yang W., Chen Y., Yu B., TiN films deposition inside stainless-steel tubes using magnetic field-enhanced arc ion plating, *Vacuum*, 112, 46-54, 2015.
 29. Theivasanthi T., Alagar M., Electrolytic synthesis and characterizations of silver nanopowder, *Nano Biomedicine and Engineering*, 4 (2), 58-65, 2012.
 30. Liu C., Yang X., Yuan H., Zhou Z., Xiao D., Preparation of silver nanoparticle and its application to the determination of ct-DNA, *Sensors*, 7 (5), 708-718, 2007.
 31. Cao H., Cui T., Jin G., Liu X., Cellular responses to titanium successively treated by magnesium and silver PIIID, *Surf. Coat. Technol.*, 256, 9-14, 2014.
 32. Crist B.V., *Handbook of Monochromatic XPS Spectra: The Elements and Native Oxides*, John Wiley & Sons, A.B.D., 2000.
 33. Cheng Y., Zheng Y.F., Surface characterization and mechanical property of TiN/Ti-coated NiTi alloy by PIIID, *Surf. Coat. Technol.*, 201 (15), 6889-6873, 2007.
 34. Subramanian B., Ananthakumar R., Jayachandran M., Structural and tribological properties of DC reactive magnetron sputtered titanium/titanium nitride (Ti/TiN) multilayered coatings, *Surf. Coat. Technol.*, 205 (11), 3485-3492, 2011.
 35. Cui W., Qin G., Duan J., Wang H., A graded nano-TiN coating on biomedical Ti alloy: Low friction coefficient, good bonding and biocompatibility, *Mater. Sci. Eng., C*, 71, 520-528, 2017.
 36. Lansdown A.B., Silver in health care: Antimicrobial effects and safety in use, *Current Problems in Dermatology*, 33, 17-34, 2006.
 37. Godoy-Gallardo M., Rodriguez-Hernandez A.G., Delgado L.M., Manero J.M., Gil F.J., Rodriguez D., Silver deposition on titanium surface by electrochemical anodizing process reduces bacterial adhesion of Streptococcus sanguinis and Lactobacillus salivarius, *Clinical Oral Implants Research*, 26 (10), 1170-1179, 2015.
 38. Sondi I., Salopek-Sondi B., Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E.coli as a model for Gram-negative bacteria, *J. Colloid Interface Sci.*, 275 (1), 177-182, 2004.
 39. Cao H., Liu X., Meng F., Chu P.K., Biological actions of silver nanoparticles embedded in titanium controlled by micro-galvanic effects, *Biomaterials*, 32 (3), 693-705, 2011.
 40. Cao H., Qiao Y., Liu X., Lu T., Cui T., Meng F., Chu P.K., Electron storage mediated dark antibacterial action of bound silver nanoparticles: Smaller is not always better, *Acta Biomater.*, 9 (2), 5100-5110, 2013.

