



T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

**GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİNİN *Kribbella turkmenica*  
16K104 İLE EKSTRASELÜLER SENTEZİ,  
KARAKTERİZASYONU, ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ  
VE GENOTOKSİSİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

**Tuğba ÇELİK**

Danışman  
**Dr. Öğretim Üyesi Ali Osman ADIGÜZEL**

SAMSUN  
2022

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI



GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİNİN *Kribbella turkmenica*  
16K104 İLE EKSTRASELÜLER SENTEZİ,  
KARAKTERİZASYONU, ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ  
VE GENOTOKSİSİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Yüksek Lisans Tezi

Tuğba ÇELİK

Danışman

Dr. Öğretim Üyesi Ali Osman ADIGÜZEL

Yüksek lisans tez çalışması Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

SAMSUN  
2022

## TEZ KABUL VE ONAYI

Tuğba ÇELİK tarafından, Dr. Öğretim Üyesi Ali Osman ADIGÜZEL danışmanlığında hazırlanan “Gümüş nanopartiküllerinin *Kribbella turkmenica* 16K104 ile ekstraselüler sentezi, karakterizasyonu, antimikrobiyal aktivitesi ve genotoksitesinin araştırılması” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 14.2.2022 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	İmza	Sonuç
Başkan	Dr. Öğr. Üyesi Ümit KARAKAŞ		<input checked="" type="checkbox"/>
	Bayburt Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu- Eczane Hizmetleri Bölümü		Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Tuğrul DORUK		<input checked="" type="checkbox"/>
	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı		Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Ali Osman ADIGÜZEL		<input checked="" type="checkbox"/>
	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı		Kabul <input type="checkbox"/> Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

ONAY

... / ... / ...

Prof. Dr. Ali BOLAT  
Enstitü Müdürü

## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Yüksek Lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet  (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır

İmza

14 /01 / 2022

Tuğba ÇELİK

## TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

**Tez Başlığı :** “Gümüş Nanopartiküllerinin *Kribbella turkmenica* 16K104 İle Ekstraselüler Sentezi, Karakterizasyonu, Antimikrobiyal Aktivitesi Ve Genotoksisitesinin Araştırılması.

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 14.01.2022 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 10

Tek kaynak oranı : % 4 çıkmıştır.

İmza

14 /01 / 2022

Dr. Öğretim Üyesi ALİ Osman ADIGÜZEL

## ÖZET

### GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİNİN *Kribbella turkmenica* 16K104 İLE EKSTRASELÜLER SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU, ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ VE GENOTOKSİSİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Tuğba ÇELİK

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans, Ocak/2022

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Ali Osman ADIGÜZEL

Boyutları genellikle 100 nm'den küçük olan nanopartiküller geniş yüzey alanına sahip olmaları, biyolojik özellikleri ve yığın halindeki formlarından farklı özellikler göstermiş olmalarından dolayı son yıllarda oldukça önemli hale gelmişlerdir. Tıp alanında teşhis ve tedavide, atıksu arıtımında, gıdaların bozulmasının önlenmesinde ve geniş antimikrobiyal etkileri sayesinde gümüş nanopartiküller (AgNP'ler) nanomalzemeler arasında en dikkat çeken metal nanopartiküllerdir. Bu tez çalışmasında gümüş nanopartiküller *Kribbella turkmenica* 16K104 tarafından ekstraselüler olarak sentezlenmiştir. Reaksiyon koşullarının ve besi yeri içeriklerinin gümüş nanopartikül sentezi üzerine etkilerini öğrenmek amacıyla optimizasyon deneyleri yapılmıştır. Optimum koşullarda sentezlenen gümüş nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları için bazı analizler yapılmıştır. Sentezlenen gümüş nanopartiküllerin küresel formda oldukları Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi ile belirlenmiştir. Gümüş nanopartiküllerin 4-20 nm boyutları aralığında homojen dağılım gösterdikleri ve ortalama parçacık boyutunun 6 nm olduğu Dinamik Işık Saçılımı (DLS) analizi ile belirlenmiş, zeta potansiyelinin negatif değerinde  $-30.6 \pm 10.1$  olduğu bulunmuştur. Biyolojik yöntemler kullanılarak sentezlenen gümüş nanopartiküllerin patojen bakteriyel suşlara karşı önemli derecede inhibe edici ve bakteriyosidal etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda, gümüş nanopartiküllerin Hep G2 hücrelerine karşı genotoksik potansiyeli araştırılmış ve 24 saatlik maruziyet sonrasında gümüş nanopartiküllerin  $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'ye kadar ciddi bir genotoksitesite bulunmamıştır. Yapılan bu çalışma ile gümüş nanopartiküllerin sentezi zararlı kimyasallar, yüksek enerji ve yüksek maliyet gerektirmeden *Kribbella turkmenica* 16K104 bakterisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen gümüş nanopartiküllerin küçük boyutlu olması, homojen dağılım göstermesi ve kararlılığı endüstriyel uygulamalarda kullanılabilmesini göstermektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Gümüş Nanopartikül, Yeşil Sentez, Antimikrobiyal Aktivite, Genotoksitesite.

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF EXTRACELLULAR SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES BY *Kribbella turkmenica* 16K104 AND CHARACTERIZATION, ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND GENOTOXICITY OF SYNTHESIZED NANOPARTICLES

Tuğba ÇELİK

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Molecular Biology and Genetics

Master, January/2022

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Ali Osman ADIGÜZEL

Nanoparticles, which are generally smaller than 100 nm in size, have become very important in recent years due to their large surface area, biological properties and different properties from their bulk forms. Silver nanoparticles (AgNPs) are the most remarkable metal nanoparticles among nanomaterials, thanks to their wide antimicrobial effects in diagnosis and treatment, in wastewater treatment, in the prevention of food spoilage and in medicine. In this thesis study, silver nanoparticles were synthesized extracellularly by *Kribbella turkmenica* 16K104. Optimization experiments were carried out to learn the effects of reaction conditions and media contents on silver nanoparticle synthesis. Some analyzes were carried out for the characterization studies of silver nanoparticles synthesized under optimum conditions. The spherical form of the synthesized silver nanoparticles was determined by Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis. It was determined by Dynamic Light Scattering (DLS) analysis that silver nanoparticles showed homogeneous distribution in the range of 4-20 nm sizes and the average particle size was 6 nm, and the zeta potential was found to be  $-30.6 \pm 10.1$  at negative value. It has been determined that silver nanoparticles synthesized using biological methods have significant inhibitory and bacteriocidal effects against pathogenic bacterial strains. At the same time, the genotoxic potential of silver nanoparticles against Hep G2 cells was investigated and no serious genotoxicity of silver nanoparticles up to  $16 \mu\text{g mL}^{-1}$  was found after 24 hours of exposure. With this study, the synthesis of silver nanoparticles was carried out using *Kribbella turkmenica* 16K104 bacteria without requiring harmful chemicals, high energy and high cost. The small size, homogeneous distribution and stability of the synthesized silver nanoparticles show that they can be used in industrial applications.

**Keywords:** Silver Nanoparticle, Green Synthesis, Antimicrobial Activity, Genotoxicity.

## ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisansım ve tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, ilgisini ve anlayışını benden esirgemeyen, tezimin planlanmasında ve gerçekleştirilmesinde çok büyük emeği olan tez danışmanım değerli hocam Dr. Öğretim Üyesi Ali Osman ADIGÜZEL' e ve eş danışmanım Dr. Öğretim Üyesi Serpil KÖNEN ADIGÜZEL' e,

*Kribbella turkmenica* 16K104'ü Karakum çölünden izole ederek yeni tür olarak literatüre kazandırıp, çalışmamız amacıyla kullanımımıza sunan Prof. Dr. Nevzat ŞAHİN ve Dr. Öğretim Üyesi Hayrettin SAYGIN'a,

Tüm hayatım boyunca bana destek olan sevgilerini esirgemeyen, bugünlere gelebilmemi sağlayan sevgili annem Şerife ÇELİK, babam Kadir ÇELİK, her zaman her koşulda bana destek olan manevi ablam Sabriye AKYÖN ve hayatın tüm güzellik ve zorluklarını benimle birlikte paylaşan sevgili arkadaşım Rûveyda GERİŞ' e

Yüksek lisans esnasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, hayat tecrübeleriyle bana yol gösteren değerli hocam Arş. Gör. Cengiz NİGİZ' e,

Lisans ve yüksek lisansta birlikte olduğumuz, deneylerimde ve tüm bu sürecin zorluklarında yanımda olan sevgili arkadaşlarım Nurayan AYDIN ve Nergiz ÇAĞLAR' a teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından "PYO.-FEN.1904.20.006 proje numarası ile desteklenmiştir.

Tuğba ÇELİK

# İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI .....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI.....	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLOLAR DİZİNİ.....	xi
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1. Tezin amacı .....	2
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....</b>	<b>4</b>
2.1. Nanoteknoloji .....	4
2.2. Metalik Nanopartiküller .....	5
2.2.1 Gümüş Nanopartiküller.....	6
2.3. Nanopartiküllerin Sentez Yöntemleri.....	7
2.3.1. Kimyasal Yöntemler .....	8
2.3.2. Fiziksel Yöntemler.....	9
2.3.3. Biyolojik Yöntemler .....	9
2.3.3.1 Gümüş Nanopartiküllerin Bakteri Aracılı Biyolojik Sentezi .....	10
2.3.3.2. Gümüş Nanopartiküllerin Mantar Aracılı Biyolojik Sentezi .....	10
2.3.3.3. Gümüş Nanopartiküllerin Bitki Aracılı Biyolojik Sentezi.....	11
2.4. Gümüş Nanopartiküllerin Sentez Mekanizması.....	11
2.5. Nanopartiküllerin Kullanım Alanları .....	13
2.6. Gümüş Nanopartikülün Antimikrobiyal Etki Mekanizması .....	17
2.7. Gümüş Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	19
2.8. Gümüş Nanopartiküllerin Genotoksitesitesi .....	21
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>23</b>
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar .....	23
3.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri.....	23
3.3. Aktinobakteri İzolatlarının Çoğaltılması Ve Saklanması.....	24
3.4. <i>Kribbella turkmenica</i> 16K104'ün İnkübasyonu ve Gümüş Nanopartikül Sentezi .....	25
3.5. Gümüş Nanopartiküllerin Kararlılığı .....	25
3.6. Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu.....	25
3.7. Besi Yeri Bileşenlerinin Optimizasyonu .....	26
3.8. Gümüş Nanopartikül Sentezi İçin Kültür Besiyerinin Yüzey Yanıt Yöntemi (Response Surface Methodology: RSM)- Merkezi Kompozit Tasarım (Central Composite Design: CCD) İle Optimizasyonu .....	27

3.9. Gümüş Nanopartikülün Biyoreaktör Kullanılarak Üretilmesi .....	28
3.10. Gümüş Nanopartiküllerin Karakterizasyonu .....	28
3.11. Disk Difüzyon Metodu İle Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi .....	29
3.12. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) ve Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBK) Değerlerinin Belirlenmesi.....	29
3.13. Gümüş Nanopartiküllerin Genotoksisite Potansiyelinin Araştırılması .....	30
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>31</b>
4.1. Gümüş Nanopartiküllerin Sentezinde Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu .....	31
4.1.1. AgNO <sub>3</sub> Konsantrasyonunun Gümüş Nanopartiküllerin Sentezi Üzerine Etkileri	31
4.1.2. Reaksiyon Sıcaklığının Gümüş Nanopartiküllerin Sentezine Etkileri .....	33
4.1.3. pH Derecesinin AgNP Sentezine Etkileri .....	34
4.2. Gümüş Nanopartikül Sentezinde Kültür Besiyerinin Optimizasyonu .....	34
4.2.1. OFAT Yöntemi ile Optimizasyon.....	35
4.2.1.1. Peptonun Gümüş Nanopartikül Sentezine Etkileri .....	35
4.2.1.2. Maya Özütünün Gümüş Nanopartikül Sentezine Etkileri.....	36
4.2.1.3. Malt Özütünün Gümüş Nanopartikül Sentezine Etkileri .....	37
4.2.1.4. Glukozun Gümüş Nanopartikül Sentezine Etkileri.....	38
4.2.2. RSM-CCD ile Optimizasyon .....	41
4.2.3. Optimizasyon Sonucunun Doğrulanması.....	45
4.3. Gümüş Nanopartiküllerin Kararlılığı .....	46
4.4. AgNP Karakterizasyonu .....	47
4.4.1. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ve EDS verileri .....	47
4.4.2. Parçacık Boyut Dağılım Analizi .....	49
4.4.3. Zeta Potansiyeli Analizi .....	50
4.4.4. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR).....	51
4.4.5. X - Işını Difraksiyon (X-RD).....	52
4.5. Gümüş Nanopartiküllerin Bakteriler Üzerindeki Etkileri .....	53
4.5.1. Gümüş Nanopartiküllerin Disk Difüzyon Tekniği İle Belirlenen Bakteriler Üzerindeki Etkileri.....	53
4.5.2. AgNP'lerin Bakteri Suşları Karşısındaki Minimum İnhibe Edici Konsantrasyonları (MİK).....	54
4.5.3. Gümüş Nanopartiküllerin Bakteri Suşları Karşısındaki Minimum Bakterisidal Konsantrasyonları (MBK) .....	56
4.6. Gümüş Nanopartiküllerin Genotoksik Potansiyelleri.....	58
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>61</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>62</b>
<b>ÖZ GEÇMİŞ.....</b>	<b>69</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

AgNP	: Gümüş Nanopartikül
Nm	: Nanometre
XRD	: X-ışını difraksiyonu
Ag	: Gümüş
EM	: Elektron Mikroskobu
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
DC	: Doğru Akım
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit
AgNO <sub>3</sub>	: Gümüş Nitrat
CSC	: Ciba Specialty Chemicals
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
DLS	: Dinamik Işık Saçılımı
CCD	: Merkezi Kompozit Tasarım
RSM	: Yüzey Yanıt Yöntemi
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskobu
EDS	: Enerji Dağılım Spektrometresi
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MBK	: Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
SPR	: Yüzey Plazmon Rezonanslarını
OFAT	: Tek Zamanda Tek Faktör
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GHI	: Genetik Hasar İndeksi
PDI	: Polidispersite İndisi

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Nanomateryallerin logaritmik uzunluk skalası .....	4
Şekil 2.2. Nanopartikülü aşağıdan yukarıya ve yukarıdan aşağıya sentezi .....	8
Şekil 2.3. Gümüş nanopartiküllerin bakteriler aracılığıyla hücre içi ve hücre dışı sentezi.....	13
Şekil 2.4. Nanopartiküllerin uygulama alanları.....	14
Şekil 2.5. Nanopartiküllerin etki mekanizması .....	18
Şekil 4.1. AgNO <sub>3</sub> konsantrasyonunun etkisini gösteren UV-vis spektrumları .....	32
Şekil 4.2. Gümüş nanopartiküllere farklı sıcaklıkların etkisini gösteren UV-vis spektrumları.....	33
Şekil 4.3. Gümüş nanopartiküllere pH derecesinin etkisini gösteren UV-vis spektrumları .....	34
Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda pepton ile hazırlanan besiyerlerindeki renk değişimleri .....	35
Şekil 4.5. Pepton konsantrasyonunun gümüş nanopartikül sentezine etkisi.....	36
Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda maya özütü ile hazırlanan renk değişimleri .....	36
Şekil 4.7. Maya özütü konsantrasyonunun gümüş nanopartikül sentezine etkisi.....	37
Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda malt özütü olan besiyerlerinde renk değişimleri .....	38
Şekil 4.9. Malt özütü konsantrasyonunun gümüş nanopartikül sentezine etkisi .....	38
Şekil 4.10. Farklı konsantrasyonlarda glukoz olan besiyerlerindeki renk değişimleri .....	39
Şekil 4.11. Glukoz konsantrasyonunun gümüş nanopartikül sentezine etkisi .....	40
Şekil 4.12. RSM-CCD tasarımı deneyleri sonucunda elde edilen spektrumlar .....	42
Şekil 4.13. Besiyerindeki maya özütü ve glukoz konsantrasyonlarının sentez üzerine etkisi üç boyutlu (a) ve iki boyutlu (b) grafikler.....	43
Şekil 4.14. Besiyerindeki malt özütü ve glukoz konsantrasyonlarının sentez üzerine etkileri üç boyutlu (a) ve iki boyutlu (b) grafikler.....	44
Şekil 4.15. Besiyerindeki pepton ve malt özütü konsantrasyonlarının sentez üzerine etkileri üç boyutlu (a) ve iki boyutlu (b) grafikler.....	45
Şekil 4.16. RSM-CCD ile optimize edilmiş nanopartiküllerin absorpsiyon spektrumları .....	46
Şekil 4.17. AgNP'lerin sentezden hemen sonra (a) ve bir yıl sonra (b) çizilen absorbans spektrumları .....	47
Şekil 4.18. Optimum koşullarda sentezlenen Gümüş nanopartiküllerin SEM mikrografi .....	48
Şekil 4.19. Elemental analiz sonuçlarını gösteren EDS grafiği.....	48
Şekil 4.20. Gümüş nanopartiküllerin DLS analizi ile boyut dağılımı .....	49
Şekil 4.21. Gümüş nanopartiküllerin zeta büyüklüğü ve dağılımı .....	50
Şekil 4.22. AgNP'ün FTIR spektrumu .....	51

Şekil 4.23. MGYP besi yerinin FTIR spektrumu .....	52
Şekil 4.24. AgNO <sub>3</sub> çözeltisinin (2mM) FTIR spektrumu.....	52
Şekil 4.25. AgNP'lerin XRD grafiği .....	53
Şekil 4.26. Gümüş nanopatiküllerin patojen mikroorganizmalara inhibisyon zonları .....	54
Şekil 4.27. AgNP'lerin MİK deneylerine ilişkin plaka görüntülerinden örnek .....	56
Şekil 4.28. AgNP'lerin MBK deneylerine ilişkin petri görüntülerinden örnek .....	58
Şekil 4.29. Gümüş nanopatiküllerin genotoksik potansiyelini gösteren komet analiz görüntüleri .....	59



## TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. Bazı metal nanopartiküllerin kullanım alanları (Gündoğan, 2021).....	6
Tablo 3.1. GYM Agar Besiyerinin bileşenleri .....	24
Tablo 3.1. MGYP besiyerinin bileşenleri.....	24
Tablo 3.2. Mueller Hinton Broth besiyerinin bileşenleri.....	24
Tablo 3.3. Mueller Hinton Agar besiyerinin bileşenleri.....	24
Tablo 3.5. RSM-CCD tasarımının inşası için kodlar ve her bir değişken için kodlara karşılık gelen seviyeler.....	27
Tablo 3.6. RSM-CCD optimizasyonu için besi yeri bileşenleri .....	28
Tablo 4.1. RSM-CCD tasarımı deney yanıtları ve tahminleri. ....	41
Tablo 4.2. <i>Kribbella turkmenica</i> 16K104 tarafında sentezlenen gümüş nanopartiküllerin çalışılan patojenlere karşı MİK değerleri .....	55
Tablo 4.3. <i>Kribbella turkmenica</i> 16K104 tarafında sentezlenen gümüş nanopartiküllerin çalışılan patojenlere karşı MBK değerleri.....	57

# 1. GİRİŞ

Gümüşün bütün çeşitleri tarihsel olarak tek başına veya diğer teknolojilerle birlikte bir antimikrobiyal ürün olarak kullanılmıştır. Günümüzde ise bu metalin gümüş nitrat veya gümüş sülfadiazin olarak yanıkları ve ülserleri tedavi etmek için krem ve pansumanlara, kontaminasyonu önlemek amacıyla gıda ambalajlarına, buzdolabı ve çamaşır makinesi ve endüstriyel alanda çeşitli uygulamalar gibi ev aletlerine dahil edilerek bakteri üremesini engelleme yeteneğinden yararlanmak için çalışılmaktadır. Gümüş nanopartiküller (AgNP'ler) boyutları 1-100 nm aralığında olan bir nanomalzeme olarak tanımlanmaktadır ve dökme biçimindeki gümüşe kıyasla daha büyük kapasite ve daha yüksek yüzeye (alan-hacim oranı) sahiptirler. Nano ölçekteki gümüşün sahip olduğu elektriksel ve optik özellikleri bu materyallerin hedeflenen ilaçların dağıtımında, bir takım hastalıkların ya da moleküllerin teşhisinde ve biyosensörlerin üretiminde kullanılmalarına olanak sağlamaktadır. AgNP'lerin fotokatalitik özellikleri antioksidant ve remediasyon ajanı olarak kullanılabilmelerini olanaklı kılmaktadır.

Günümüzde karşılaşılan önemli sorunlardan bir tanesi ise mutasyon, kirlilik ve değişen çevre koşulları nedeniyle çok sayıda antibiyotiğe karşı direnç mekanizması geliştiren viral, bakteriyel ve fungal suşların sayısında artış meydana gelmesidir. Bu durum, enfeksiyon hastalıklarında morbite ve mortalite artışına, hastanede yatış ve ilaç maruziyet sürelerinin artmasına, tedavi maliyetlerinin yükselmesine neden olduğu için hastalar ve devletler için sosyoekonomik bir yük yaratmaktadır. Bu nedenle, AgNP'ler gibi yenilikçi ve etkili antiviral ve antimikrobiyal reaktiflerin farklı kaynaklardan ekonomik ve sürdürülebilir yöntemlerle üretimini ve tıpta kullanımını temel alan antibiyotik sonrası bir çağın kapıları halihazırda aralanmıştır.

AgNP'ler fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemlerle sentezlenebilmektedirler. Kimyasal yöntemlerde sentez için genellikle toksik bileşikler kullanılmakla birlikte sentez sonrasında hem doğaya hem de insan sağlığına zararlı yan ürünler açığa çıkmaktadır. Fiziksel yöntemlerde ise yüksek sıcaklık, basınç ve pH gerekliliği prosesin maliyeti ile birlikte iş sağlığı ve güvenliği açısından riskleri de arttırmaktadır. Fiziksel ve kimyasal yöntemlerin bu temel dezavantajlarını ortadan kaldırmak için çoğunlukla bitkileri ve mikroorganizmaları kullanan biyosentez yöntemi çevre dostu bir yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır (Yousaf, et al., 2020). Biyolojik yöntemlerle gerçekleştirilen sentezde ise yığın ya da mikron haldeki gümüş bileşikler

hücreler içerisindeki ya da hücreler tarafından dışarıya salınan bileşiklerin aracılığıyla gümüş nanopartiküllerine indirgenmektedir.

Mikroorganizmalar kısa sürede büyük hacimlerde üreyebilmeleri, üretilmeleri sırasında çoğu durumda pahalı ve spesifik besin maddelerine ihtiyaç duymamaları, kapalı suni ortamlarda çevre şartlarından etkilenmeksizin geliştirilebilmeleri, gelişimleri sırasında geniş arazi gereksinim olmaması gibi özelliklerinden dolayı endüstriyel birçok biyolojik ürünün üretiminde bitki ve hayvanlara kıyasla daha çok tercih edilmektedir. Endüstriyel üretimde sıklıkla kullanımı tercih edilen mikroorganizma gruplarından biri aktinobakterilerdir. Aktinobakteriler doğada oldukça fazla bulunmaları, farklı jeolojik özelliklere sahip ortamlarda yayılış gösterebilmeleri ve genomlarında birçok biyokimyasal yolakla ilişkili genlere sahip olmaları ile çeşitli biyoaktif molekülleri sentezleyerek hücre dışına salgılayabilmektedirler. Bu sebeplerden dolayı aktinobakterilerin kültür süpernatantının gümüş nanopartiküllerinin sentezinde indirgeyici ve stabilize edici ajan olarak kullanılması prosesin sürdürülebilirliği ve maliyeti açısından oldukça önemlidir.

### **1.1. Tezin amacı**

Sunulan bilgiler ışığında gerçekleştirilen bu tezin temel amacı yeni bir aktinobakteri türü olan *Kribbella turkmenica* 16K104'ün kültür sıvısı kullanılarak gümüş nanopartiküllerinin sentezlenmesidir. Bu kapsamda;

i. *Kribbella turkmenica* 16K104'ün kültür sıvısı ile AgNP'lerin üretimi için reaksiyon koşullarının optimize edilmesi,

ii. AgNP'lerin sentezi için gerekli *Kribbella turkmenica* 16K104 kültürünün hazırlanması sırasında kullanılacak besiyeri bileşenleri konsantrasyonlarının geleneksel ve istatistiksel yöntemlerle optimizasyonu,

iii. Optimum koşullar altında sentezlenen AgNP'lerin optik özellikleri, boyutları, şekilleri, boyut dağılımları, zeta potansiyelleri ve kristalin yapıları gibi fiziko-kimyasal özelliklerinin açığa çıkarılması,

vi. Sentezlenen AgNP'lerin hastaneden temin edilen bakteri suşları karşısındaki inhibe edici ve öldürücü dozlarının belirlenmesi,

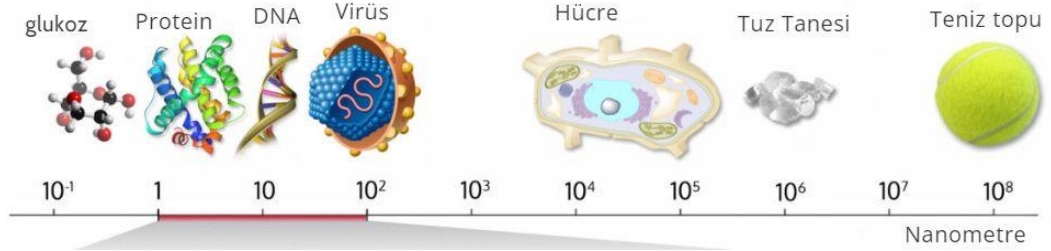
v. Sentezlenen AgNP'lerin Hep G2 hücrelerindeki genotoksik etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir.



## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Nanoteknoloji

Nano terimi, "cüce" anlamına gelen Yunanca kelimedenden köken almaktadır. Ön ek olarak kullanıldığında,  $10^{-9}$  şeklinde ifade edilmektedir. Nano ölçekli materyaller dünyadaki yaşamın başlangıcından bu yana doğada var olmuştur (Erci, 2018). Bir nanometre (nm), metrenin milyarda biri veya kabaca yan yana üç atomun uzunluğuna tekabül etmektedir. Bir DNA molekülü ~ 2.5 nm, bir protein ~ 50 nm ve bir grip virüsü ise ~ 100 nm genişliğindedir (Thakkar, 2010). Nanomateryallere ait uzunluk skalası Şekil 2.1’ de gösterilmektedir. Nanoteknoloji, yaklaşık 1 ila 100 nm’lik nano ölçekte yürütülen bilimsel faaliyetleri ifade etmekle birlikte mühendislik ve doğa bilimleri ile iç içe geçmiş bir disiplindir. Bazı durumlarda ise 0,1 ila 1000 nm arasında ölçülen atomların ve moleküllerin özelliklerinin ve kullanım potansiyellerinin araştırıldığı bir disiplini ifade etmektedir (Kumarasmy, 2015).



Şekil 2.1. Nanomateryallerin logaritmik uzunluk skalası (Erci, 2018)

Nanoteknoloji, geleneksel kimyasal tekniklerden tıbbi ve çevresel teknolojilere kadar etkili uygulamalara sahip alanlar sunmaktadır (Ahmad, et al., 2019). Nanoteknoloji, nanopartiküllerin eşsiz fizikokimyasal özelliklere yani yüksek yüzey alanı, yüksek reaktivite, ayarlanabilir gözenek boyutu ve parçacık morfolojisine sahip olduğu için biyoteknoloji ve diğer endüstriler için yeni bir uygulama alanı açmaktadır (Erci, 2018).

Nanoteknoloji alanı, atomlar veya moleküller arasında çok küçük boyutlara sahip kimyasal, fiziksel ve biyolojik sistemlerin üretilmesini sağlar ve oluşturulan nano boyuttaki maddelerin daha büyük sistemlere entegre olmasını sağlamaktadır. Nanoteknoloji, yeni ürünler yaratmak için kullanılan yenilikçi yöntemlerin yaygınlaştırılmasında, yüksek performanslı üretim ekipmanlarının geliştirilmesinde, aynı işi daha az enerji ile yapabilen cihazların üretiminde, daha dayanıklı kompozit materyallerin oluşturulmasında, çevreye verilen zararın azaltılmasında önemli bir rol

oyunmaktadır. Böylece, nanoteknoloji madde ve enerji tüketiminin azalmasına katkıda bulunarak aşırı tüketimden kaynaklı çevresel sorunların sürdürülebilir bir yolla düzeltilmesi için heyecan verici bir olasılık sunmaktadır (Nasrollahzadeh, et al., 2019).

Nanoteknoloji; maddenin temelindeki boşlukları doldurması, daha iyi özellikte uygulamalar için ümit vermesi ve endüstriyel ölçeklerde üretiminin mümkün olmasıyla maliyetlerin azalması gibi sebeplerden dolayı fizik, elektronik, enerji üretimi, giyilebilir teknoloji, ilaç, gıda, tedavi ve teşhis gibi birçok bilim alanlarında en gözde çalışma konularından bir tanesi olmaktadır (Beykaya, 2016).

Nanoteknolojik çalışmalar neticesinde elde edilen nanomalzemeler (1-100 nm), yığın formlarına kıyasla benzersiz fizikokimyasal özelliklerinden dolayı farmasötik, kozmetik, gıda, tekstil, makine ve elektronik sanayi sektörlerinde son birkaç yıldır çok fazla ilgi görmektedir (Xu, 2020).

## **2.2. Metalik Nanopartiküller**

Nanoteknoloji hayatın her evresinde kullanım imkanı bulabileceği düşünüldüğünden ve malzeme özelliklerini önemli ölçüde iyileştirme ve geliştirme imkanı sağladığından, bilimsel ve teknolojik olarak çok fazla ilgi çeken bir alandır. Nanopartiküller en temel şekilde organik ve inorganik esaslı olmak üzere iki temel grup altında incelenmektedir. Organik partiküller karbon içerirken, inorganik nano partiküller manyetik nanopartiküller, asil metal nanopartiküller (altın ve gümüş gibi) ve yarı iletken nanopartiküller (titanyum oksit ve çinko oksit gibi) şeklinde farklı malzemeleri içermektedir. En önemli biyomedikal nano malzemeler metalik nanopartiküller olarak kabul edilmektedir (Kalemtaş, 2019).

Nano ölçekte kuantum mekaniğinin kuralları geçerlidir. Öyle ki, maddenin normal boyutlarda sergilediği davranışlar ile nano boyutlarda sergilediği davranışları birbirinden değişiklik göstermektedir. Nano ölçekte erime noktası, çözünürlük, manyetik ve optik özellikler değişmektedir. Örneğin gümüş nanopartikülün erime sıcaklığı gümüşün erime sıcaklığından çok daha düşüktür. Titanyum beyazlatma aracı olarak kullanılmaktadır. Nano titanyum ise şeffaftır. Normalde sarı renkteki altın elementi nano boyutlara indiğinde kırmızı renkte olmaktadır. Aslında bir soy metal olan altın nano boyutlarda katalitik özellikler sergilemektedir. Normal koşullarda erime noktası 1064 °C dir ancak nanometre boyutunda 600 °C civarlarına kadar düşmektedir. Nanopartiküllerin bu değişimini sağlayan şey yüksek yüzey/hacim

oranlarıdır. Özellikle metal nanopartiküllerin, düşük erime noktaları, geniş yüzey alanları ve değişik optik ve manyetik özelliklerinden dolayı endüstriyel alanda birçok uygulama yeri bulunmaktadır (Gündoğan, 2021).

Tablo 2.1. Bazı metal nanopartiküllerin kullanım alanları (Gündoğan, 2021)

<b>Metal Nanopartikül</b>	<b>Kullanım Alanı</b>
Altın	DNA Etiketleme, Biyosensör, Kanser, Antimikrobiyal
Gümüş	Antikanserojen, Biyosensör, Antibakteriyel, Antiviral
Palladyum	Biyokataliz
Bakır	Antimikrobiyal
Demir	Moleküler Görüntüleme, Kanser
Çinko	Kozmetik
Platin	Antikanserojen, Kozmetik
Selenyum	Antikanserojen, Antimikrobiyal

Metalik NP'ler, saf metallere veya bunların bileşiklerinden üretilmiş mikron-altı boyutlarında maddelerdir. Metalik nanopartiküller uzun yıllar boyunca bilim insanlarının ilgisini çekmektedir. Nanoteknoloji, alanındaki önemli gücü sebebiyle son zamanlarda biyoteknolojik alanlarda yoğun olarak çalışılmaktadır. Metalik nano yapıların şekil ve boyutları; mekanik, fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini etkilediğinden nano yapıların üretiminde şeklinin ve boyutunun kontrol edilmesine yönelik çalışmalar her geçen gün artmaktadır (Uyanıkgil ve Salmanoğlu, 2020).

### 2.2.1 Gümüş Nanopartiküller

Ayurveda'ya (eski bir Hint Tıbbı incelemesi) göre nano gümüş, bulaşıcı hastalıklarla savaşma konusundaki benzersiz yeteneğinden dolayı birçok Hint sağlık ürünlerinde yaygın bir katkı maddesidir (Dhand, et al., 2016).

Hem ısı hem de elektrik iletkenliği yüksek, yumuşak beyaz ve parlak bir metal olan gümüş, yüksek antimikrobiyal etkisi ve düşük toksisitesi nedeniyle öne çıkmaktadır. Gümüş ve tuzları insanlarda düşük toksik etki gösterdiği için tıpta uzun yıllardır yaygın olarak kullanılmaktadır. Kolloidal gümüş insan metabolizması için gerekli enzimlere zarar vermeden yalnızca tek hücreli mikroorganizmaların enzimlerini yok etmektedir. Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) 1938 yılında kolloidal gümüşü ilaç olarak tanımlamıştır. Bununla birlikte, kolloidal gümüşün atılımı böbreklerden kısa sürede gerçekleşmektedir (Gündoğan, 2021).

Gümüşün insan vücuduna zarar veren 650 mikrobiyal mikrobu öldürme yeteneğine sahip olduğuna literatürde yer verilmiştir (Almalah, et al., 2019). Gümüş (Ag) iyi bilinen bir metaldir ve benzersiz özellikleri nedeniyle tıbbi amaçlar için kullanılmaktadır. Gümüş bazlı topikal kremlerin yara iyileşmesinde patojenlere karşı etkili bir antimikrobiyal tedavi aracı olduğu halihazırda kanıtlanmıştır. Gümüş nanopartikülleri gümüşten daha geniş yüzey alanına sahiptir (Kumar, et al., 2018). Bu durum, gümüş iyonlarının mikroorganizmalarla daha iyi temas halinde olmalarına neden olmakta ve böylece mikroorganizmaların üreme ve gelişimini çok düşük konsantrasyonlarda dahi engellemektedirler. AgNP'ler bir patojenin içine girdiğinde, parçacıktan salınan Ag iyonları canlılığın ölümüne neden olur. Ag iyonu veya AgNP'lerin bakteriler üzerindeki aktivitesini açıklamak için çeşitli mekanizmalar önerilmiştir. Bunlar;

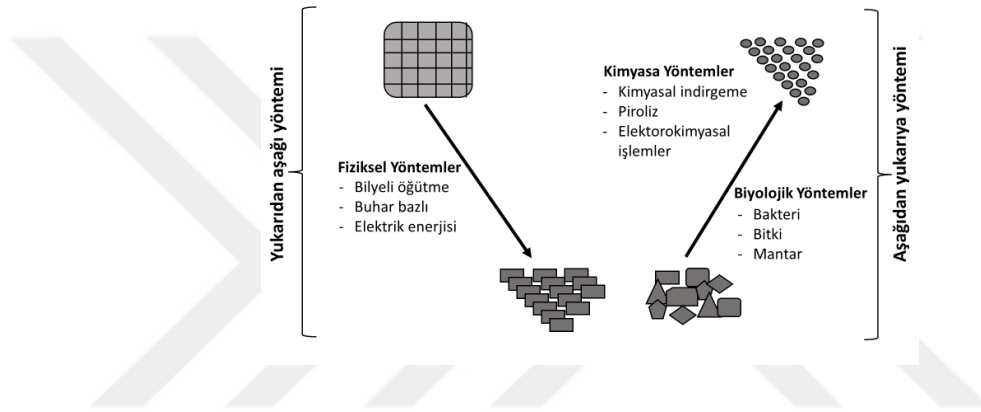
- i) Solunum zincirinin inaktivasyonu,
- ii) Hücre zarının bozulması ve hücre içi içeriğinin sızması,
- iii) Protein denatürasyonuna neden olan fonksiyonel protein grubuna bağlanma ve hücre ölümü,
- iv) DNA replikasyonunun bloke edilmesi,
- v) Besinleri bakteri hücre zarı boyunca taşıyan enzimlerin denatürasyonudur.

Bu özelliklerinden dolayı nanogümüş, antibiyotiğe dirençli suşlar da dahil olmak üzere geniş bir bakteri yelpazesine karşı etkili bir öldürücü olarak hareket edebilmektedir (Dhand, et al., 2016).

### **2.3. Nanopartiküllerin Sentez Yöntemleri**

Nanopartiküllerin (NP'lerin) sentezi “yukarıdan aşağıya” ve “aşağıdan yukarıya” olmak üzere iki yaklaşımda gerçekleştirilebilmektedir (Şekil 2.2). Yukarıdan aşağıya yaklaşım, bilyeli öğütme, kırma ve öğütmede kullanılan mekanik enerji, elektrik ark-deşarj yöntemi ve lazer ablasyon yönteminde kullanılan elektrik enerjisi ve buhar yoğunlaşma yönteminde kullanılan termal enerji gibi NP'leri sentezlemek için çeşitli fiziksel kuvvetler kullanarak dökme malzemelerden metal NP'lerin oluşumunu ifade etmektedir. Esas olarak fiziksel yöntemleri kapsayan yukarıdan aşağıya yaklaşımı ile kimyasal katkı maddeleri kullanılmaksızın 10 ile 100 nm arasında parçacık boyutuna sahip saf nanopartiküller elde edilebilmektedir. Fiziksel yöntemle sentezlenen NP'ler,

düzgün parçacık boyutu dağılımı ve yüksek saflık sergileyebilmektedir. Fiziksel yaklaşım, insana ve çevreye zarar verebilecek kimyasal reaktifler içermemektedir. Ancak, bu yöntemin temel dez-avantajı stabilizatör veya kapatma ajanlarının yokluğundan dolayı aglomerasyonun önlemindeki zorluktur. Bu yöntemin diğer önemli dez-avantajları ise karmaşık ekipman ve maliyeti önemli oranda arttıran harici enerji kullanımını gerektirmektedir. Aşağıdan yukarıya yaklaşım ise çekirdeklenme ve büyüme süreçleri kullanılarak moleküler bileşenlerden NP'ler elde etmek için karmaşık kümelerin oluşturulmasını içermektedir. Yaygın olarak kullanılan aşağıdan yukarıya yaklaşımlar öncü bir tuzun indirgenme ile NP'lere dönüştürüldüğü kimyasal ve biyolojik sentez yöntemlerini içermektedir.



Şekil 2.2. Nanopartikülü aşağıdan yukarıya ve yukarıdan aşağıya sentezi

### 2.3.1. Kimyasal Yöntemler

Gümüş nanopartiküllerin sentezi için kimyasal yöntemler; kimyasal indirgeme, elektrokimyasal teknikler, ışınlama destekli kimyasal yöntemler ve piroliz olarak alt bölümlere ayrılabilir. Gümüş nanopartiküllerinin kimyasal yöntemle sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı genellikle üç ana bileşen içermektedir. Bunlar; metal öncüleri, indirgeyici ve stabilize edici ajanlardır. Yaygın olarak kullanılan indirgeyici ajanlar arasında borohidrit, sodyum sitrat, askorbik asit, alkol ve hidrazin bileşikleri bulunmaktadır. Kimyasal yöntemlerin en temel avantajı nanopartiküllerin diğer yöntemlere göre daha hızlı sentezlenebilmesi ve fiziksel yöntemlerle kolayca kombine edilebilmesidir.

Birçok farklı tipte nanopartikülün sentezi için hali hazırda var olan kimyasal yöntemler fazla miktarda enerjiye, sentezlenen nanopartiküllerin kararlı bir yapıda kalmasını sağlayan ajanlara ve zararlı kimyasallara gereksinimi olan maliyetli ve statik olmayan yöntemlerdir. Ayrıca, sentezlenen nanopartiküllerin canlılar üzerinde

kullanımında olası yan etkilere sahip olabileceğinin belirtilmesi, kimyasal yöntemlerin başta tıp, gıda ve kozmetik sanayi olmak üzere bir çok endüstri dalında kullanımlarını kısıtlamaktadır (Akçay ve Avcı, 2018).

### **2.3.2. Fiziksel Yöntemler**

AgNP'lerin fiziksel yöntemle sentezi mekanik süreçleri ve buhar bazlı süreçleri içermektedir. Fiziksel yöntemler nanopartiküllerin sentezi için mekanik enerjiyi (bilyeli öğütme yöntemi), elektrik enerjisini (elektrik arkı boşaltma yöntemi), ışık enerjisini (lazer ablasyon yöntemi) ve termal enerjiyi (fiziksel buhar biriktirme) kullanmaktadır (Xu, et al., 2020).

Bilyeli öğütme işlemi sırasında seramik, çakmaktaşı çakılları ve paslanmaz çelikler gibi sert bilyeler arasındaki yüksek hızlı çarpışmalar, metali çok ince tozlar halinde öğüten yerel yüksek basınçlar üretmektedir. Elektrik ark deşarj yöntemi ile, doğru akım (DC) gücü altında ark deşarj cihazı aracılığıyla NP'ler elde edilebilmektedir. Cihaz, anot olarak toz reaktif tabakasını kullanır ve elektrotlar hidrokarbonlar, sıvı atıl gaz ve deiyonize su gibi dielektrik sıvılara daldırılır. Lazer ablasyon yöntemi, bir metal plakanın yüksek güçlü bir lazer ile ablasyonunu ifade eder, metal hedef lazer ışını enerjisini ve fotoiyonları emer, ardından plazma tüyü soğutma işlemi sırasında metal parçacıklarının çekirdeklenmesi ve büyümesi sonunda NP'ler sentezlenmektedir. Püskürtme, substrat üzerinde birikebilen atom veya molekülü püskürtmek için hedef kaplama malzemesinin yüksek enerjili bir elektrik yüküyle bombardımana tutulmasını ifade etmektedir. Buharlaştırma, kaplama malzemesinin vakum ortamında kaynama noktasına kadar ısıtılması ve buharlaşması anlamına gelirken, buharlaşan malzeme vakum odasında yükselir ve alt tabaka üzerinde yoğunlaşır. Bahsedilen tüm bu fiziksel yöntemler büyük ölçekte AgNP'ler üretebilse de AgNP'ler bir araya gelerek kümeleşebilir ve sonraki uygulamaları etkileyecek büyük boyutlu parçacıklar oluşturabilir (Xu, et al., 2020).

Fiziksel yöntemlerin çoğu yüksek enerji ve daha fazla maliyet isterler çünkü sentezlenen NP'leri kümelenmeye karşı korumak için bir stabilizatör gerekmektedir (Kratošová, et al., 2018).

### **2.3.3. Biyolojik Yöntemler**

Kimyasal ve fiziksel yöntemlerin çok maliyetli, çalışanların iş sağlığı açısından birtakım tehlikeler içermesi ve gerek sentez sırasında kullanılan kimyasalların gerekse

de sentez sonrasında açığa çıkan yan ürünlerin çevre dostu olmamasından dolayı biyolojik sentezin önemi giderek daha fazla vurgulanmaktadır (Taha, vd., 2019).

Son birkaç yılda bakteri, aktinomisetler, mantarlar, maya, virüsler ve deniz yosunları gibi mikrobiyal ajanlar kullanılarak nanopartiküllerin biyosentezi yeşil nanoteknoloji alanında büyük ilgi görmüştür. Mikroorganizmalar, gümüş, altın, paladyum ve bakır gibi farklı metalik nanopartiküllerin ve çinko oksit, titanyum oksit gibi metal oksitlerin çevre dostu ve ucuz sentezi için potansiyel nanofabrikalar olarak görev üstlenmektedirler (Gahlawat and Choudhury, 2019).

### **2.3.3.1 Gümüş Nanopartiküllerin Bakteri Aracılı Biyolojik Sentezi**

Bakterilerin gümüş açısından zengin bir ortamda hayatta kalma özelliği, AgNP'lerin birikmesine yol açabilir. Nanopartikül dağılımının konumuna bağlı olarak, AgNP'ler hücre içi veya hücre dışı olarak biyokütle, süpernatant, hücre içermeyen ekstraktlar ve bakterilerin hücre içinden dışarı salgılanan bileşenleri kullanılarak sentezlenebilir. Bu iki yöntem arasında, hücre dışı yöntem, AgNP'lerin geri kazanılmasının rahatlığı nedeniyle hücre içi yöntemle göre avantajlıdır. Ekzopolisakkarit, peptitler, proteinler, enzimler, kofaktörler, c-tipi sitokromlar ve gümüşe dirençli genler gibi bakterilerdeki çeşitli organik maddeler indirgeyici ajan olarak kullanılabilir. Bunlar arasında özellikle nitrat redüktaz ve laktat dehidrojenaz gibi enzimler nanopartikül sentezinde başta rol oynayabilmektedir. Ayrıca, metionin, sistein, lisin ve arginin gibi özel amino asitli peptitler, atom çekirdeği yüzeyine yapışabilir ve indirgeyici ajanlar olarak işlev görebilmektedir. Bir tür NADH'ye bağımlı enzim olan nitrat redüktaz, AgNP'lerin bakteri aracılı sentezinde daha fazla dikkat çekmektedir. Nitrat redüktaz elektron taşıma zincirine katılmakta ve daha sonra hidrojen atomlarını aktararak minyatür bir indirgeme ortamı yaratmaktadır. Enzim, NADH'den bir elektron alarak onu NAD<sup>+</sup>'a oksitler ve gümüş iyonlarını AgNP'lere indirgemek için oksidasyona uğratar. Bakterilerce sentezlenen bazı organik maddeler ise nanopartiküllerin agregasyonunu önlemek için stabilizatör ve kapatma maddesi olarak da işlev görmektedir. Sonuç olarak, AgNP'lerin bakteri aracılı sentezi basit, etkili ve çevre dostu bir yöntemdir (Xu, et al., 2020).

### **2.3.3.2. Gümüş Nanopartiküllerin Mantar Aracılı Biyolojik Sentezi**

AgNP'lerin mantar aracılı sentezi, etkili ve basit bir yaklaşımdır. Nanopartiküllerin konumuna göre, mantar aracılı sentez, sırasıyla misel ve mantar

hücre içi ve hücre dışı AgNP'ler elde edebilir. Hücre içi sentez ile karşılaştırıldığında, mantarlar kullanılarak AgNP'lerin hücre dışı sentezi, uygun toplama ve akış aşağı işleme avantajları nedeniyle tercih edilmektedir. Mantar özütü kullanılarak hücre dışı yöntemle sentezlenen AgNP'ler, gereksiz mantar bileşenlerini yıkayarak veya çökelterek saflaştırılabilmektedir. Mantarların çeşitli organik bileşenleri, nitrat bağımlı redüktaz, ksilanazlar, naftokinonlar ve antrakinonlar gibi AgNP'lerin sentezinde önemli bir rol oynamaktadır. Çeşitli inkübasyon koşulları, karbon ve nitrojen kaynaklarının türleri, sıcaklık ve ışık kaynağı gibi etmenler AgNP'lerin özelliklerini etkileyebilir. Sonuç olarak, AgNP'lerin mantar aracılı sentezi düşük maliyetli ve enerji tasarrufu sağlayan bir biyolojik yöntemdir (Xu, et al., 2020).

### **2.3.3.3. Gümüş Nanopartiküllerin Bitki Aracılı Biyolojik Sentezi**

Nanopartiküllerin sentezi için bitkilerin yaprak, yumru, ağaç kabuğu, tomurcuk gibi çeşitli kısımlarından elde edilen özler kullanılabilir. Bitki özlerini kullanan yöntemler, terpenoidler, flavonoidler, fenol türevleri, bitki enzimleri (hidrojenazlar, redüktazlar, kinonlar) ve bunların türevleri, dihidrik fenoller ve benzeri gibi fitokimyasalları içerir ve bu moleküller metal tuzlarının varlığında indirgeyici görevi görmektedir. Bitki özlerinde bulunan bazı polifenoller, partikül boyutunu kontrol etmek için doğal kapaklama ajanları olarak da işlev görmektedir. Yapraklar genel olarak alkaloidler, fenilpropanoidler, terpenoidler ve çok çeşitli bakteri ve mantar enfeksiyonlarına karşı iyileştirici güçleri ile tanınan diğer polifenollerini içermektedir (Rao and Paria, 2013). Bitkiler kullanılarak NP sentezinin dez-avantajları ise bu amaçla kullanılacak bitkilerin doğada yetiştirilmeleri için geniş araziye ihtiyaç olması, geliştirilmeleri sırasında pahalı gübrelerin ve pestisitlerin kullanılması, bakımının yüksek işgücü gerektirmesi ve toplanmalarının maliyetli olmasıdır. Bu nedenle büyük ölçekli NP üretimi için kullanım potansiyelinin düşük olduğu görülmektedir. (Iravani, et al., 2014).

### **2.4. Gümüş Nanopartiküllerin Sentez Mekanizması**

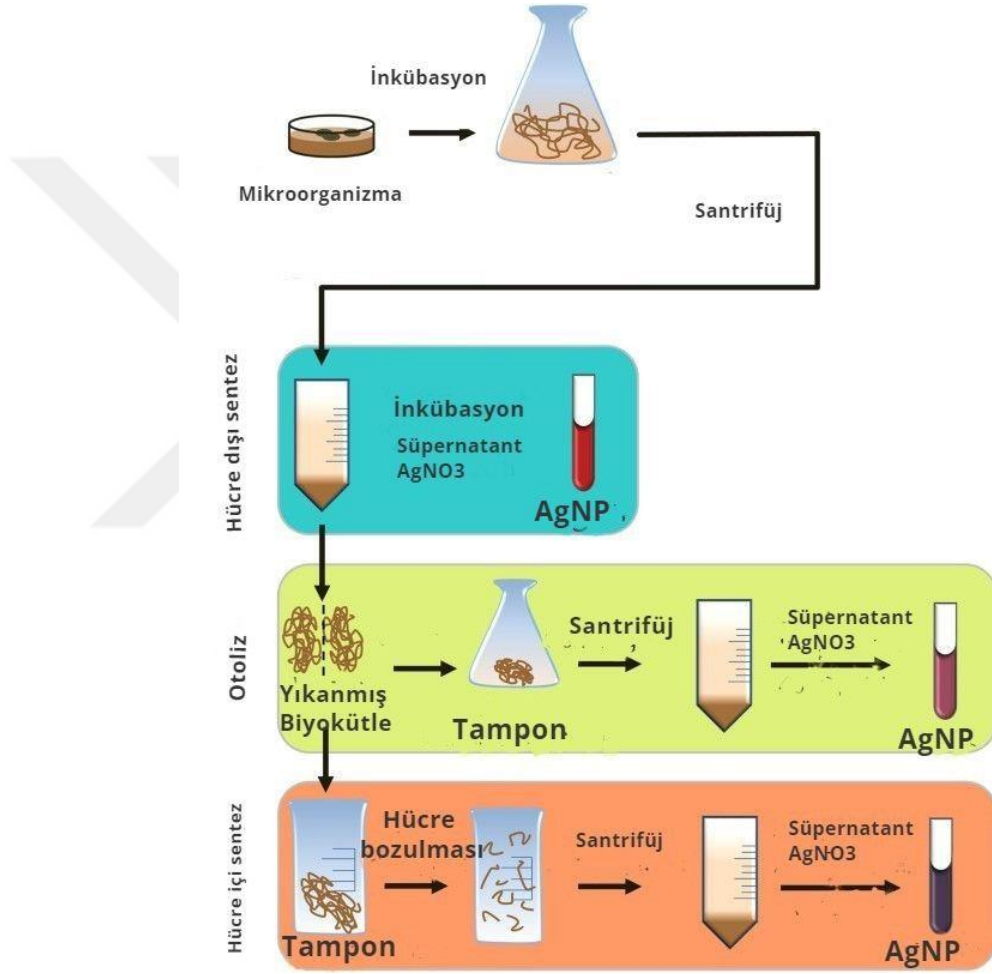
AgNP'lerin biyosentezi, AgNO<sub>3</sub>'ün (gümüş nitratın) mantarlar, bakteri ve algler gibi canlılarla veya indirgeyici/stabilize edici ajanlar olarak görev yapan hücre içi ya da hücre dışı salgıladıkları biyoaktif moleküller ile karıştırılmasıyla elde edilen basit ve kolay bir yöntemdir (Akintelu, et al., 2020).

Mikroorganizmalar, çevrede çeşitli türlerde metaller ve metaloidlerle karşılaşır ve hayatta kalabilmek için belirli genetik ve biyokimyasal metal direnç mekanizmalarına kavuşurlar. Bu mekanizmalardan bazıları hücre dışı çökelme, hücre dışı bağlanma ve kompleksleşme, tiyol içeren moleküller tarafından karmaşık bileşiklere ayırma, hücre içi biriktirme, metal iyonunun redoks durumunu değiştirme, hücre dışı akış pompalama sistemi ve bir özel metal taşıma sistemidir. Metallerin çoğu için bu direncin ve dengenin sağlanması, yukarıda bahsedilen mekanizmaların kombinasyonlarını içermektedir. Bu olay, hücre makinesi aracılığıyla metal iyonlarının temel metale indirgenmesini içermektedir. Nanopartikül sentezinin mekanik yönü hala tam olarak anlaşılmamış olsa da AgNP'lerin sentezinde bakteri genlerinin ve proteinlerin rolünü aydınlatmak için çeşitli hipotezler önerilmiştir (Singh, et al., 2015).

Bakteriler boyutu 0,2 ila 2  $\mu\text{m}$  (çap) arasında değişen prokaryotlardır ve bazı suşlarının metalik iyonları nanopartiküllere indirgeme yeteneğine sahip olduğu bir kısım araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. Bakteriler metal bulunan bir ortamda tutulduğunda elektrostatik etkileşimlerle metal iyonlarını hücre duvarı ve zarına doğru çekerek buradaki enzimler yardımıyla nanopartiküllerine indirgerler. Prabhu ve Poulouse (2012) bakteriyel AgNP sentezinin çoğu fungusda olduğu gibi nitrat redüktaz enziminin aktivitesinden kaynaklandığını vurgulamışlardır. Bakteriler yaygın olarak nitratı ana nitrojen kaynağı olarak kullanırlar. Nitratın kullanımı indirgenmiş bir nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) formunun indirgeme gücünden yararlanılarak nitrat redüktaz tarafından nitrite dönüştürülmesiyle gerçekleştirilir. Araştırmacılar, nitrat redüktaz gibi indirgenme reaksiyonlarında yer alan katalizörlerin  $\text{AgNO}_3$  gibi bileşikleri  $\text{Ag}^+$  iyonlarına biyo-indirgenmesinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Kumar ve arkadaşları *Fusarium oxysporum*'dan saflaştırdıkları nitrat redüktaz enziminin in-vitro olarak  $\alpha$ -NADPH yardımıyla  $\text{AgNO}_3$ 'ü AgNP'lere indirgediğini belirlemişlerdir. Bazı araştırmacılar ise nanopartiküllerin sentezinde bakteriler tarafından salgılanan pigmentlerin ya da fenolik sekonder metabolitlerin de etkili olabileceğini belirtmişlerdir.

Bakterilerin aracılık ettiği sentez mekanizmaları hücrenin doğrudan kendisinin kullanıldığı "hücre içi (intraselüler) sentez" ve hücrenin salgıladığı moleküllerin kullanıldığı "hücre dışı (ekstraselüler) sentez" olarak ikiye ayrılmaktadır. Nanopartiküllerin bakteriler aracılığıyla sentezinde ekstraselüler sentez daha çok tercih

edilmektedir. Çünkü, hücre dışı sentezde nanopartiküllerin geri kazanılması kolaydır, oysa hücre içi sentezde sonikasyon, otoklavlama, deterjan ve tuz kullanımı ve otoliz gibi ek işlemler gerektiren hücre parçalanması nanopartiküllerin geri kazanılması için tek seçenektir. (Garg, et al., 2020). Nanopartiküllerin ekstraselüler sentez prosesinin birinci basamağında bakteriler uygun bir besiyerinde geliştirildikten sonra hücreler santrifüjle kültür sıvısından uzaklaştırılmaktadır (Şekil 2.3). Daha sonra kültür sıvısı ve belirli konsantrasyonda  $AgNO_3$  çözeltisi karıştırılarak belirli bir süre için uygun koşullarda inkübe edilmektedir.

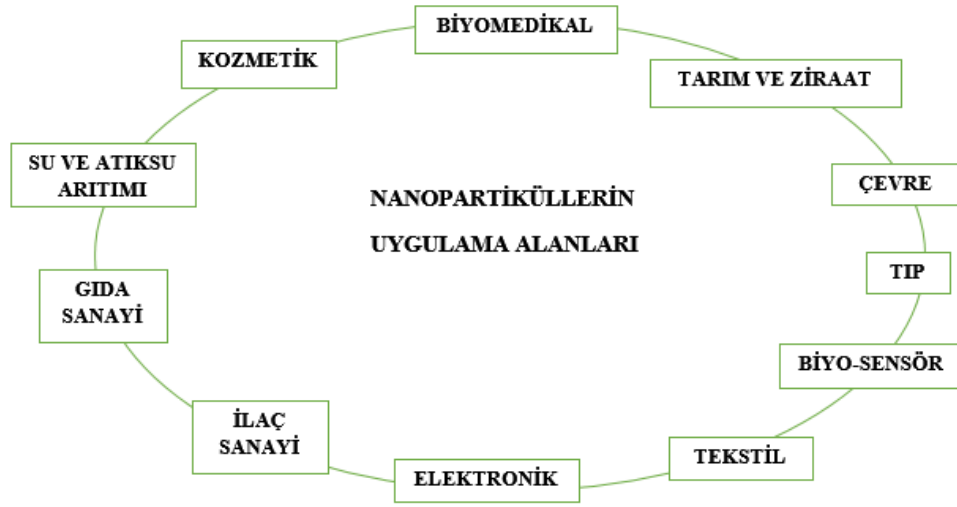


Şekil 2.3. Gümüş nanopartiküllerin bakteriler aracılığıyla hücre içi ve hücre dışı sentezi (Molnár, et al., 2018).

## 2.5. Nanopartiküllerin Kullanım Alanları

Farkında olmaksızın toplumlar tarafından binlerce yıldır kullanılmakta olan nanopartiküllerin günümüzde ortaya çıkan ileri teknikler sayesinde şekle ve boyuta bağlı fizyokimyasal özelliklerinin detaylıca karakterize edilebilmesi bu materyallerin tekstil, elektronik, medikal, gıda gibi birçok sanayi dalında mevcut ürünlerin

geliştirilmesi ya da inovatif yeni ürünlerin üretimi için kullanılabilmesini sağlamıştır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Nanopartiküllerin uygulama alanları

Günümüzde insanlar kaliteli, işlem görmemiş, koruyucu katkı maddesi içermeyen, daha uzun süre saklanabilen ürünlere ulaşmayı arzu etmektedirler. Bu yüzden ürünlerin daha uzun süre saklanabilmesi ve istenen özelliklerde olmasını sağlamak için nanoteknoloji alanındaki çalışmalar önem kazanmıştır. Nanoteknoloji uygulamaları kullanılarak sentezlenen nanopartiküller ile gıda maddelerine uzun raf ömrü ve tat gibi istenilen özelliklerde üretilebilmesi gerçekleştirilebilmektedir. Özellikle çabuk bozunabilen maddelerin antimikrobiyal özellikte bir ambalajla kaplanabilmesi, gıdaların uzun süre saklanabilmesini sağlamaktadır. Gıdaların akıllı paketlerle ve nanosensörlerle kaplanması bozulan gıdalardaki tat, renk, koku gibi değişikliklerin algılanması sağlanarak gıda ile ilgili zehirlenmelerin önüne geçilebilmektedir. Özetle nanoteknolojinin gıda alanındaki uygulama alanları dört ana başlık altında toplanmaktadır. Bunlar:

- i. Gıdaların işlenmesi ve daha üstün özellikteki ürünlerin geliştirilmesi,
- ii. Biyoaktif maddelerin taşınması ve kontrollü salınımı,
- iii. Bozulan ürünlerin tespiti ve gıda güvenliğinin artırılması,
- iv. Paketleme sistemlerinin geliştirilerek gıdaların raf ömrünün uzatılması (Saka ve Gülel, 2015).

Tarımda ve özellikle bitkisel üretimde nanoteknoloji uygulamalarına yönelik araştırmalar, genel olarak tarımsal kimyasallar veya sensörler için dağıtım sistemlerinin geliştirilmesi yoluyla kaynakların daha verimli kullanılmasını sağlamak amacıyla son zamanlarda büyük ilgi görmektedir. Şimdiye kadar önerilen nanopestisitler ve nanogübreler olarak adlandırılanların çoğu, mevcut aktif bileşenlere kıyasla daha iyi performans elde etmek ve tarımda kullanılan mevcut kimyasal ürünlere ait dezavantajlara karşı koymak amacıyla kayıtlı aktif bileşenlerin yeniden formüle edilmesini içermektedir. Aktif bileşenin zararlıya hedeflenen teslimi ve/veya gübre etkinliğinin artırılması, önemli ölçüde azaltılmış uygulama oranlarıyla verimi korumaya ve hatta artırmaya yardımcı olmak ve eş zamanlı olarak tarımın ekosistemler ve insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerini en aza indirmek için tasarlanmış stratejiler arasındadır. Nano agrokimyasalların konvansiyonel ürünlere göre daha üstün olabileceği öne sürülmekte ve sektördeki nanoteknoloji uygulamalarında büyük beklentiler oluşturulmaktadır. Geliştirilmekte olan ve bazıları halihazırda piyasada bulunan nanopestisit türleri, böcek öldürücü, mantar öldürücü veya herbisit özelliklere sahip tescilli aktif içeriklerin yeniden düzenlenmesinden oluşmaktadır (Kah, et al., 2018).

Nanopartiküllerin çevreyi koruma alanında uygulamaları bulunmaktadır. Çevre mühendisliğinde içme suyu ve atık su arıtımında demir, gümüş, manganez, magnezyum, alüminyum ve titanyum gibi nano malzemeler oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. İçme suyunun arıtılması işleminde dezenfeksiyon amacıyla bu nanomalzemelerden genellikle gümüş nanopartiküller kullanılırken, ağır metallerin içme suyundan giderilmesi amacı ile demir oksit nanopartiküllerin tercih edildiği bilinmektedir (Esmeray ve Özata, 2019).

Nanopartiküller terapötik ilaçların kontrollü olarak hedef dokulara daha hassas bir şekilde iletilebilmesinde kullanılabilir. Uygulama sırasında terapötik ilaçlar nanopartiküller tarafından sıkıca çevrelenmekte ya da nanopartiküllere kimyasal olarak bağlanmaktadır. Ayrıca, nanopartiküller tıp alanında hastalıkların teşhis ve tedavisinde de oldukça yaygın olarak kullanılabilir. Örneğin; sinirsel iletimin düzenlenmesi ile duyuların arttırılmasında nanopartiküllerin canlı hücrelerdeki bazı molekülleri harekete geçirebilme yeteneğinden faydalanılmaktadır. Bazı nanopartiküllerin ise kanser tedavisinde kullanılabileceğine dair literatürde çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Patra, et al., 2018). (Aydın ve Pehlivanoglu, 2019). Güçlü

antimikrobiyal etkileri nanopartiküllerin yara sargıları, idrar sondaları, cerrahi aletler, diş implantları ve kemik protezleri gibi tıbbi üründe kaplama materyali yada materyal bileşeni olarak kullanılmalarını sağlamıştır (Zhang, et al., 2014). Zika, sıtma ve diğer ciddi hastalıkların bulaşmasından sorumlu sivrisinek larvalarını kontrol etmek için gümüş nanopartiküllerin kullanıldığını bildiren çalışmalar mevcuttur (Marsili and Das, 2016).

Elektrik ve elektronik alanında, geleneksel muadilleri ile kıyaslandığında nanopartiküller kullanılarak üretilen yeni cihaz ve aletlerin daha büyük kapasiteli ve daha hızlı işlemcili olduğu görülmektedir. Ayrıca nanopartiküllerle üretilen elektronik aletler daha az enerji tüketimine de olanak sağlamaktadır (Saygılı, 2021). Nanopartiküller kullanılarak yüksek hassasiyet ve çözünürlükte analiz yapabilen biyo/nano-sensörler geliştirilmiştir. Şimdiye kadar geliştirilen nano-sensörlerden büyük bir kısmı (i) içme suyunda bulunan alg toksinlerinin, mikobakterilerin ve cıvanın tespit edilmesinde, (ii) topraktaki mikrobiyal zararlıların ve besinlerin analizinde, (iii), tarımsal ve hayvansal ürünlerdeki hormon ya da ilaç kalıntılarının belirlenmesinde kullanılmaktadır.

Nanoteknoloji fosil yakıtlar ile çalışan sistemlerde verimlilik artışını sağlamaktadır. Ayrıca, taşımacılık sektöründe dayanıklılığı arttırmak için başta motor ve kaporta olmak üzere bir kısım araç parçalarının üretiminde belirli oranlarda kullanılmaktadır. Böylece geleneksel muadilleri ile karşılaştırıldığında daha hafif ürünler elde edilmekte ve hafif olmasından ötürü de maliyet ve enerji tasarrufu sağlanmaktadır (Saygılı, 2021).

Bazı nanopartiküllerin sentetik lifler içine ilave edilmesiyle lifler fotokatalitik etkiye, UV absorblamaya, kumaşlarda dekontaminasyon amaçlı kimyasal veya biyolojik maddelere karşı koruyucu özelliklere sahip olabilmektedirler. Metal nanopartiküllerin askeri ve insan sağlığının korunması üzerine çalışmaları bulunmaktadır ve bu çalışmalar kumaşların antimikrobiyal özellikte üretilmesine, kendi kendini temizleme yeteğine sahip olmasına yönelik çalışmalardır. Katkı maddesi olarak ZnO kullanılan naylon liflerinin etkili bir UV koruma yanında antistatik özellik de kazanarak kumaşların kir itici özellikte olmasını sağlamaktadır. TiO<sub>2</sub>/MgO nanopartikülleri ile üretilen kumaşlar kendi kendini temizleme özeliğine sahiptir. Ciba Specialty Chemicals (CSC) antimikrobiyal nanokapsüller ile lifleri birleştirerek bakteri gelişimini önleyebilen kumaşlar üretebilmektedir. Kore'de "Mipan Nano-

Magic Silver” üretimi gerçekleştirilen life, gümüş metali nanopartikül olarak ilave edilmektedir. (Özdoğan, vd., 2006).

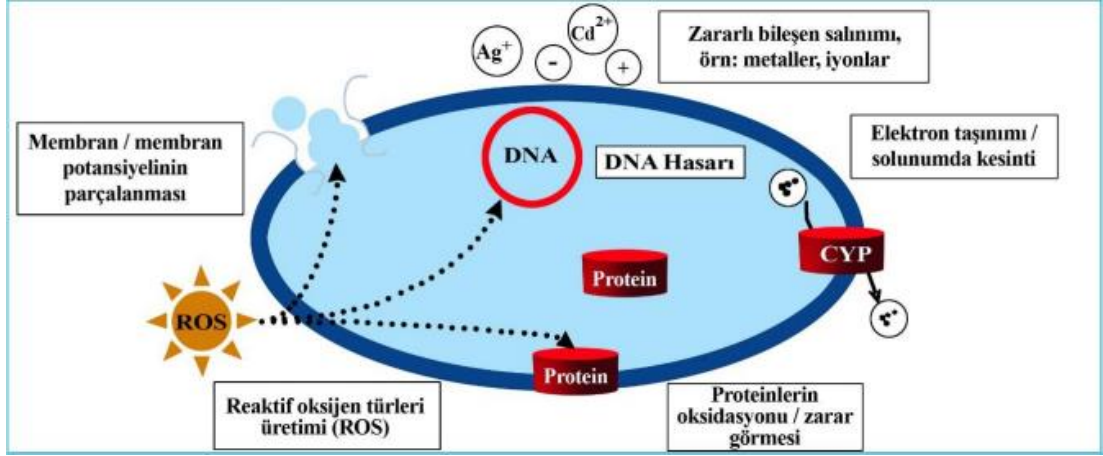
Nanopartiküller, özellikle de AgNP’ler günlük yaşamda sıkça kullanılan ürünlerde ana bileşenlerden biri olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Örneğin, AgNP bazlı ürünler çamaşır makinelerinin, su arıtma cihazlarının, oyuncakların ve ambalaj malzemelerinin yüzey kaplamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca tekstil ürünlerine ve güneş kremi başta olmak üzere bazı kozmetik ürünlere dahil edilmiştir.

## **2.6. Gümüş Nanopartikülün Antimikrobiyal Etki Mekanizması**

Antibiyotiklerin keşfi ve geliştirilmesi, bir zamanlar insan sağlığı ve yaşamı için ciddi tehdit oluşturan patojenlerin insidansını ve mortalitesini büyük ölçüde azaltmıştır. Ancak son 20 yılda antibiyotik kullanımının yaygınlaşması, özellikle de antibiyotiklerin kötüye kullanılmasıyla birlikte ilaca dirençli bakterilerin sayısının artması antibiyotik etkinliğinin azalmasına, özellikle yeni tehditleri ve insan sağlığına yönelik zorlukları beraberinde getiren “süperbakterilerin” ortaya çıkmasına neden olmuştur. Şu anda, bakteri direncinin ortaya çıkması en önemli küresel endişelerden biri haline gelmiştir. Nanoteknoloji, nanopartiküllerin geleneksel antimikrobiyal ajanlara göre üstün antibakteriyel özelliklere sahip olması bakteri direnci sorununu çözmek için yeni fırsatların ortaya çıkarmasını sağlamıştır.

Nanopartiküllerin AgNP’lerin antimikrobiyal aktivitesinin arkasındaki kesin mekanizma hala çok iyi bilinemese de genel kabul gören mekanizmalar şu şekilde özetlenebilmektedirler (Şekil 2.5.);

- i) Nanopartiküller elektrostatik etkileşimlerle mikroorganizma yüzeyinde adsorbe edilmesi ve mikroorganizmaların membran yapısını tahrip ederek protein sızıntısına ve bakterilerin inaktivasyonuna neden olabilirler,
- ii) Nanopartiküller hücre içerisine girerek oksidatif stres mekanizmasını tetikleyerek hücre içindeki DNA ve proteinler gibi makromoleküllerin yapısını tahrip edebilen reaktif oksijen radikalleri türlerinin (ROS) oluşumuna neden olabilirler,
- iii) Nanopartiküller hücre zarındaki enerji üretimi ile ilgili enzimlerin yapısını bozarak mikroorganizmaların gelişiminin sınırlanmasına sebep olabilirler.



Şekil 2.5. Nanopartiküllerin etki mekanizması (CYP: Sitokrom P enzim grubu) (Ünşar & Perendeci, 2016)

AgNP'lerin antimikrobiyal aktivitesinin yaygın olarak kabul edilen mekanizması, AgNP'lerde bulunan pozitif yüklü gümüş iyonlarının, proteinler ve nükleik asit gibi farklı negatif yüklü fosfor veya kükürt içeren biyo-makromoleküllere müdahale edebilmesidir. Bu durum bakteri hücrelerinde yapısal değişikliklere, hücre duvarında ve hücre zarında metabolik süreçlerin kesintiye uğramasına neden olan deformasyon ve hasarlara ve nihayetinde hücre ölümüne neden olmaktadır. Örneğin, nanopartiküller tarafından gümüş iyonlarının salınması, potasyum iyonlarının ( $K^+$ ) taşınmasını ve salınmasını değiştirecek ve böylece hücrelerin taşıma aktivitesini etkilemektedir. Hücre zarı geçirgenliğinin artması, mikroorganizmaların hayalet hücre etkisini indükleyebilen sitoplazma, proteinler, iyonlar ve hücresel enerji deposu ATP gibi hücresel içeriklerin kaybolmasına veya sızmasına da neden olabilmektedir (Salleh, ve diğerleri, 2020). Ayrıca, hücre yüzeyindeki nanopartiküllerden türetilen farklı serbest radikallerin membran geçirgenliğini artırarak hücre zarındaki hasardan sorumlu olduğunu da ileri süren araştırmalar bulunmaktadır (Huq, 2020).

AgNP'ler mikrobiyal membranın yüzeyine bağlandığında dış zarındaki porin adı verilen su dolu bir kanal yoluyla bakteri hücrelerine girebilirler. Hücre içine nüfuz eden AgNP'ler negatif yüklü proteinlere bağlanabilir. Böylece proteini yapısal olarak değiştirerek deaktivasyonuna neden olabilir. Li ve arkadaşları 2010 yılında yaptıkları çalışmada, AgNP'nin *Staphylococcus aureus*'ta (Gram-pozitif bakteri) gliserol-3-fosfat dehidrojenaz gibi çeşitli enzimleri dihidroksiaseton'a dönüştürerek solunum zinciri dehidrojenazını inhibe ettiğini ve böylece bakteri hücrelerinin normal büyümesine ve metabolizmasına müdahale ettiğini kanıtlamıştır. Ek olarak, AgNP'ler

bakteriyel DNA ile etkileşime girerek DNA'nın denatürasyonuna neden olabilir ve mikropların hücre büyümesini kesintiye uğratabilir. AgNP'ler, aynı polar yüke sahip DNA ve AgNP'ler nedeniyle elektrostatik itme ile DNA yapısının stabilitesini azaltabilir. Sadoon ve arkadaşları 2020 yılında yaptıkları çalışmada, gümüş iyonlarının DNA ile etkileşime girebileceğini ve böylece DNA ipliklerinin H-bağlarını bozarak çift ipliklerin tek ipliklere ayrılmasını içeren çift iplikli DNA'nın hibridizasyonuna neden olabileceğini göstermiştir (Salleh, et al., 2020).

ROS, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi çeşitli hücrel biyolojik olaylarda yer alan oksijenli bileşikler için genel bir terimdir. AgNP'lerin antibakteriyel potansiyeline ilişkin güçlü mekanizmalardan biri nanopartiküllerin ROS ve serbest radikaller üretme ve nihayetinde hücrelerde oksidatif stresi artırma yeteneği ile ilgilidir. Hücreler arası ROS üretimi lipid hasarını, hücrel biyomoleküllerin sızıntısını indükleyebileceği ve nihayetinde hücre apoptozisine yol açabileceği için nanopartiküllerle ilgili toksisiteye yönelik en önemli göstergelerden biri haline gelmiştir.

## **2.7. Gümüş Nanopartiküllerin Karakterizasyonu**

Nanopartiküllerin boyut dağılımı ve verimleri üzerinde hassas kontrol, nanobilimin birincil amacıdır. Metal nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerinin karakterize edilmesi, hedef uygulamalar için istenen özelliklere sahip nanopartiküllerin tasarımı ve sentezi açısından oldukça önemlidir (Ghodake, et al., 2020). Nanopartiküllerin karakterizasyonu, moleküler ağırlık, boyut, yüzey bileşimi, yüzey enerjisi, yüzey yükü, şekil, stabilite ve çözünürlük gibi fizikokimyasal özelliklerin değerlendirilmesine dayanmaktadır (Lin, et al., 2014).

Nanopartiküllerin karakterizasyonunda en sık kullanılan teknik elektron mikroskopisidir. Tekniğin uygulaması için kullanılan elektron mikroskobu (EM) nanomalzemelerin atomik boyutlar (1 nm) seviyesine kadar uzaysal çözünürlükte doğrudan görüntülerini ve kimyasal bilgilerini sağlar. Elektron mikroskopisinde, gelen elektron demeti çok ince bir folyo numunesi aracılığıyla iletilir, bu sırada numune ile etkileşime giren gelen elektronlar saçılmamış elektronlara, elastik olarak saçılmış elektronlara veya elastik olmayan şekilde saçılmış elektronlara dönüştürülür. Örneğin büyütülmesi esas olarak objektif lens ile numune arasındaki mesafenin ve objektif lens ile görüntü düzlemi arasındaki mesafenin oranı ile belirlenir. Saçılan veya saçılmayan elektronlar bir dizi elektromanyetik mercekle tarafından odaklanır ve daha sonra bir

elektron kırınımı, genlik-kontrast görüntüsü, bir faz-kontrast görüntüsü veya saçılmamış elektronların yoğunluğuna göre değişen karanlıkta bir gölge görüntüsü oluşturmak için bir ekrana yansıtılır (Lin, et al., 2014).

Hidrodinamik boyut, şekil, yapı, kümelenme durumu ve biyomoleküler konformasyon dahil olmak üzere nanomalzemelerin çeşitli fizikokimyasal özellikleri radyasyon saçılım tekniği kullanılarak keşfedilebilmektedir. En popüler ışık saçılım modalitelerinden biri dinamik ışık saçılmasıdır (DLS). DLS'nin ilkesi, sabit bir saçılma açısıyla kendi dalga boyundan çok daha küçük boyuttaki parçacıkların/moleküllerin üzerine gelen ışığın Brownian hareketinden kaynaklanan elastik saçılma yoğunluğunun, Rayleigh saçılmasının zamansal dalgalanmasını izlemektir. DLS; farklı konsantrasyonlardaki nanopartikül popülasyonundaki farklı boyutlara sahip partiküllerin dağılımlarının belirlenmesini düşük maliyetli ve yüksek hassasiyetli olarak kısa sürede gerçekleştiren bir tekniktir. DLS, küresel olmayan nanomalzemelerin boyutlarını doğru bir şekilde ölçmek için uygun değildir, çünkü analizde parçacıkların zaten küresel olduğu varsayılmaktadır (Lin, et al., 2014).

Fourier transform kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, nanomateryal-biyomolekül konjugasyonunun belirlenmesinde kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin yüzeyindeki biyoaktif bileşenlerin türleri üzerinde yorum yapmamıza olanak sağlamaktadır. FTIR analizi sonucunda elde edilen spektrumdaki bantlar referans spektral bantların pozisyonları ile karşılaştırılır ve böylece sentezlenen nanopartikül yüzeyindeki fonksiyonel gruplar belirlenmektedir. Ayrıca FTIR, karbon nanotüpler üzerine kovalent olarak aşılınmış fonksiyonel moleküllerin doğrulanması gibi nano ölçekli malzemeleri incelemek için de oldukça kullanışlıdır (Lin, et al., 2014).

İyonik bir çözeltide, yüklü bir parçacığın yüzeyi zıt yüklü iyonlara sıkıca bağlanmakta ve Stern tabakası adı verilen ince bir sıvı tabaka oluşturmaktadır. Bu tabaka gevşek bir şekilde ilişkili iyonlardan oluşan bir dış dağılık tabaka tarafından çevrelenmektedir. Bu iki katman, sözde elektriksel çift katmanı oluşturmaktadır. Yüklü parçacığın bir dış kuvvet veya Brown hareketi tarafından meydana gelen teğetsel hareketi göz önüne alındığında, yüklü parçacığın hareketi dağılık katmandaki yüklü parçacıkla taşınan iyonları katmanın dışında toplu dağıtıcı ile kalan iyonlardan ayırmaktadır. Kesme yüzeyindeki elektrik potansiyeli zeta potansiyeli olarak adlandırılmakta ve genellikle numune çözeltisi boyunca bir harici elektrik alanının varlığında yüklü türlerin elektrota doğru hızının ölçülmesiyle belirlenmektedir.  $\pm 30$

mV değerindeki zeta potansiyeli, genellikle, 30 mV'den büyük bir mutlak değerin kararlı bir durumu gösterdiği, 30 mV'den küçük bir düşük zeta potansiyeli değerinin ise kararsızlığa, agregasyona, pıhtılaşmaya yönelik bir durumu gösterdiği partikül kararlılığını ortaya çıkarmak için kullanılmaktadır (Lin, et al.,2014).

Çeşitli X-ışını spektroskopik modalitelerinde, X-ışını difraksiyonu (XRD), kristal malzemelerin üçüncül yapılarını atomik ölçekte tamamen çözmek için birincil bir araçtır. X-ışınlarının kırınımı, Bragg yasasına göre incelenen bir numunenin kristal düzlemleri üzerine gelen paralelleştirilmiş bir X-ışınları demetinin yansıması olarak basitçe tanımlanabilmektedir. Tipik olarak, X-ışınlarının geniş açılı elastik saçılımına dayanan XRD; kristal boyutu, şekil ve kafes distorsiyonunu uzun menzilli sıra ile karakterize etmek için kullanılan bir araçtır. Ancak, kullanımı düzensiz malzemelerle sınırlıdır. XRD, köklü bir teknik olmasına ve atomik ölçekte malzeme yapısını belirlemek için yaygın olarak kullanılmasına rağmen, kristallerin büyütülmesinin zorluğu ve örneğin sadece tek konformasyon/bağlanma durumundan sonuç alınabilmesi, XRD tekniğinin uygulamalarını kısıtlandırmaktadır (Lin, et al., 2014).

## **2.8. Gümüş Nanopartiküllerin Genotoksitesisi**

Nanopartiküller eşsiz özelliklerinden dolayı günümüzde tıp, mühendislik ve teknoloji gibi bir çok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılmasına rağmen nanopartiküllerin insan sağlığı ve diğer biyolojik sistemlerdeki olası zararlı etkileri hakkında yetersiz bilgi bulunmaktadır. Bu nedenle son yıllarda nanopartiküllerin neden olduğu toksisite çalışmalarına ait *in vivo* ve *in vitro* çalışmaların sayısında artış meydana gelmiştir (Magdolenova, et al., 2014). Nanopartiküllerin toksisitesinin anlaşılmasını sağlayan mekanizmalar; oksidatif stres, inflamasyon, immünotoksisite ve genotoksisitedir. Nanopartiküllerin güvenli kullanımını sağlamak için genotoksisite mekanizmasının açıklanması gerekmektedir. Çünkü biyolojik sistemlerde kalıtım materyalinin korunması gerekmektedir. Kalıtım materyalinde meydana gelen değişiklikler istenmeyen sonuçlara neden olabilmektedir ( kanser, üretkenlik kaybı vb.).

Nanopartiküller son yıllarda özellikle yeşil sentez ile farklı modeller kullanılarak sentezlenmektedir. En çok sentezlenen ve araştırmalara en çok konu olan nanopartiküller TiO<sub>2</sub>, demir ve gümüş nanopartikülleri olmuştur. Metalik nanopartiküller sınıfında yer alan AgNP'ler bir çok üründe yaygın olarak kullanılmaktadır. Yoğun tüketim sırasında insanlar ve diğer canlılar solunum, deri ve

besin zinciri gibi farklı yollardan AgNP'lerine maruz kalmaktadırlar (Rodriguez-Garraus, et al., 2020). İnsanların günlük AgNP maruziyeti farklılık göstermekle birlikte bu maruziyetlerin neden olabileceği risklerin değerlendirmelerinin gerekli olduğu bilinmektedir. Anahtar güvenlik değerlendirmelerinden biri de genotoksisite değerlendirmesidir (Rodriguez-Garraus, et al., 2020). Farklı metotlar tarafından sentezlenen AgNP'lerin genotoksisite araştırmasına ait bir çok çalışma bulunmaktadır.

Örneğin, Kumari ve ark. (2009), AgNP'lerin *Allium cepa* kök hücrelerindeki etkilerini incelemiştir. Yaptıkları çalışmada, nanopartikülün dört farklı konsantrasyonunu kullanmışlardır. Yükselen dozlarda mitotik indeksin düştüğünü gözlemişlerdir.

Demir ve ark. (2011), gümüş nanopartiküllerinin genotoksik etkisini *Drosophila* kullanarak değerlendirmişlerdir. Nanopartiküllerin genotoksik etkiye neden olduğunu belirtmişlerdir.

Li ve ark. (2014), gümüş nanopartiküllerinin sitotoksisite ve genotoksisitesini farelerde araştırmışlardır. Araştırma sonunda sitotoksisite ve oksidatif DNA hasarı meydana geldiğini belirtmişlerdir.

Mecwan ve ark. (2021), Cinnamon ekstraktı kullanarak sentezledikleri AgNP'lerinin in vitro genotoksisite değerlendirmesini insan periferik kanında kromozom aberasyon testi ile değerlendirmişlerdir. Maruziyet sonrasında doza bağlı olarak kromozom aberasyon sıklığında yükselme olduğunu belirtmişlerdir. Yeşil sentez AgNP'lerin, düşük dozda genotoksisitesinin azalabileceğini bildirmişlerdir.

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar**

Tez çalışması sırasında kullanılan kimyasal maddeler Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) ve Sigma (Sigma Chemical Co., Louis, ABD) markalarından kullanılmıştır.

Çalışma esnasında bakterilerin katı ortamda geliştirilmesi için Ecocell marka etüv; sıvı ortamda geliştirilmesi için Miprolab marka çalkalamalı inkübatör kullanılmıştır.

Sterilizasyon işlemlerinde Tuttnauer marka otoklav cihazı kullanılmıştır. Otoklavlama işlemi malzemelerin cihaz içerisinde 121 °C ve 1 atm basınçta 15 dakika süresince bekletilmesi ile gerçekleştirilmiştir.

Santrifüj işlemleri için MPW soğutmalı santrifüj cihazı kullanılmıştır. Santrifüjlenecek malzemenin miktarına bağlı olarak 1,5 mL, 15 mL, ve 50 mL'lik falkon tüplere uygun rötörler kullanılmıştır.

Reaksiyon ortamında gümüş nanopartikül oluşumun belirlenmesinde dalga boyu ölçümü için Thermo Multiskan Go spektrofotometre cihazı kullanılmıştır.

Besiyerleri ve diğer çözeltileri hazırlarken pH derecesini ayarlamak için Mettler Toledo SevenCompact pH metre cihazı kullanılmıştır.

AgNP'lerin şekil ve boyut analizini belirlemek için JEOL JSM-7001F Field Emission Scanning Electron Microscope taramalı elektron mikroskobu cihazı kullanılmıştır.

Gümüş nanopartiküllerin kristal yapısının ve element dağılımının belirlenmesi için SmartLab X-Ray Diffractometer cihazı ile X-ışını kırınımını (XRD) tekniği uygulanmıştır.

AgNP'lerin büyük ölçekte üretilmesi için Electrolab marka biyoreaktör kullanılmıştır.

#### **3.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri**

Tez çalışması kapsamında bakterilerin izolasyonu, saflaştırılması, çoğaltılması ve saklanması aşağıda yer alan tablolardaki besiyerleri kullanılmıştır. Besiyerlerinin hazırlanmasında distile su kullanılmıştır.

Tablo 3.1. GYM Agar Besiyerinin bileşenleri

<b>Bileşen</b>	<b>Miktar</b>
Glukoz	4 g/L
Maya özütü	4 g/L
Malt özütü	10 g/L
Agar	20 g/L

Tablo 3.1. MGYP besiyerinin bileşenleri

<b>Bileşen</b>	<b>Miktar</b>
Malt özütü	3 g/L
Glukoz	10 g/L
Maya özütü	3 g/L
Pepton	2,5 g/L

Tablo 3.2. Mueller Hinton Broth besiyerinin bileşenleri

<b>Bileşen</b>	<b>Miktar</b>
Sığır infüzyon katısı	2 g/L
Kazein hidrolizat	17,5 g/L
Nişasta	1,5 g/L

Tablo 3.3. Mueller Hinton Agar besiyerinin bileşenleri

<b>Bileşen</b>	<b>Miktar</b>
Sığır infüzyon katısı	2 g/L
Kazein hidrolizat	17,5 g/L
Nişasta	1,5 g/L
Agar	17 g/L

### 3.3. Aktinobakteri İzolatlarının Çoğaltılması Ve Saklanması

Tez çalışmasında kullanılan mikroorganizmanın Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü aracılığıyla kullanımı sağlanılmıştır. İzolatlar 4 g/L maya özütü, 4 g/L glukoz, 10 g/L malt özütü, 20 g/L agar ile yapılan GYM besi yerinde çoğaltılmıştır. Kullanılincaya kadar +4 °C’de saklanmış ve tez çalışması bitene kadar 3 ayda bir düzenli olarak pasajlanmıştır.

### **3.4. *Kribbella turkmenica* 16K104'ün İnkübasyonu ve Gümüş Nanopartikül Sentezi**

GYM besi yerinde çoğaltılan *Kribbella turkmenica* 3 g/L malt özütü, 10 g/L glukoz, 3 g/L maya özütü ve 2,5 g/L pepton içeren MGYB besi yerinde 32 °C'de 120 rpm'de 5 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kültür sıvısı 13.000 g'de 10 dakika santrifüjlenerek berrak kültür sıvısı elde edilmiştir. Gümüş nanopartikül (AgNP) üretimi için berrak kültür sıvısına son konsantrasyonu 1,5 mM olacak şekilde gümüş nitrat (AgNO<sub>3</sub>) eklenmiştir. Hazırlanan reaksiyon karışımı 30 °C'de 120 rpm'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda örneklerin UV-Vis spektrofotometre ile 300-800 nm dalga boyları arasındaki absorbans değerleri ölçülmüştür. Açık sarı reaksiyon karışımının inkübasyon sonunda koyu kahverengine dönmesi ve 400-450 nm dalga boyları arasında belirgin pik görülmesi AgNP sentezini göstermektedir.

### **3.5. Gümüş Nanopartiküllerin Kararlılığı**

*K. turkmenica* 16K104 tarafından biyolojik yöntemlerle sentezlenen AgNP'lerin endüstriyel amaçlı kullanıldığında raf ömrünün uzun olması rakipleriyle yarışabilmesi açısından önemli bir özelliktir. Optimum koşullar altında sentezlenen AgNP bir yıl boyunca oda şartlarında muhafaza edilmiş ve bir yılın sonunda UV-Vis spektrofotometrik analizi yapılmıştır.

### **3.6. Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu**

Reaksiyon karışımının en uygun inkübasyon süresinin bulunması için, reaksiyon karışımı 30 °C'de 120 rpm 'de inkübe edilmiştir. 24-48-72 saat aralıklarıyla alınan örneklerin 300-800 nm dalga boyları arasındaki absorbans spektrumları ölçülmüş ve sonuçları not edilmiştir.

Reaksiyon ortamının en iyi olduğu sıcaklığı bulmak amacıyla; reaksiyon karışımı oda sıcaklığında, 30 °C, 40 °C ve 50 °C'lerde 48 saat boyunca 120 rpm' de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra alınan örneklerin 300-800 nm dalga boyları arasındaki absorbans spektrumları ölçülmüş ve sonuçları not edilmiştir.

Reaksiyon karışımındaki en iyi AgNO<sub>3</sub> konsantrasyonunu bulmak için kültür sıvılarına farklı konsantrasyonlarda ( 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2mM, 2,5 mM ve 3 mM ) AgNO<sub>3</sub> eklendi. Reaksiyon karışımları 50 °C'de 120 rpm'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda örneklerin 300-800 nm dalga boyları arasındaki absorbans spektrumları ölçülmüş ve sonuçları not edilmiştir.

Reaksiyon karışımının hangi pH derecesinde en iyi olduğunu belirlemek için kültür sıvıları NaOH ve HCl ile farklı pH derecelerine( 4-5-6-7-8-9-10) ayarlanmıştır. AgNO<sub>3</sub> 'ın son konsantrasyonu 2 mM olacak şekilde ayarlanmış ve 50 °C'de 120 rpm'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda örneklerin 300-800 nm dalga boyları arasındaki absorbands spektrumları ölçülmüş ve sonuçları not edilmiştir.

### **3.7. Besi Yeri Bileşenlerinin Optimizasyonu**

Besi yerinde bulunan malt özütü, glukoz, maya özütü ve peptonun gümüş nanopartikül sentezine etkilerini öğrenmek amacıyla optimizasyon deneyleri yapılmıştır. MGYP besi yerinde 3 g/L malt özütü, 10 g/L glukoz, 3 g/L maya özütü ve 2,5 g/L pepton bulunmaktadır.

Glukozun AgNP üretimine etkisi için glukoz konsantrasyonu litrede 0-1-2-3-4-5-6-7-8-9-10 gr olacak ve diğer besi yeri bileşenleri aynı kalacak şekilde besi yerleri hazırlanmıştır. Besi yerleri 5 gün 30 °C'de 120 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 13.000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek üstteki berrak sıvı alınmıştır. Son konsantrasyon 2mM olacak şekilde AgNO<sub>3</sub> eklenip, pH 10'a ayarlanarak 48 saat 50 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra her besi yerinin 300-800 nm dalga boyları arasındaki absorbands spektrumları ölçülmüş ve sonuçlar not edilmiştir.

Maya özütünün AgNP üretimine etkisi için maya özütü konsantrasyonu litrede 0-0,5-1-1,5-2-2,5-3 gr olacak ve diğer besi yeri bileşenleri aynı kalacak şekilde besi yerleri hazırlanmıştır. Besi yerleri 5 gün 30 °C'de 120 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 13.000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek üstteki berrak sıvı alınmıştır. Son konsantrasyon 2mM olacak şekilde AgNO<sub>3</sub> eklenip, pH 10'a ayarlanarak 48 saat 50 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra her besi yerinin 300-800 nm dalga boyları arasındaki absorbands spektrumları ölçülmüş ve sonuçlar not edilmiştir.

Malt özütünün AgNP üretimine etkisi için malt özütü konsantrasyonu litrede 0-0,5-1-1,5-2-2,5-3 gr olacak ve diğer besi yeri bileşenleri aynı kalacak şekilde besi yerleri hazırlanmıştır. Besi yerleri 5 gün 30 °C'de 120 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 13.000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek üstteki berrak sıvı alınmıştır. Son konsantrasyon 2mM olacak şekilde AgNO<sub>3</sub> eklenip, pH

10'a ayarlanarak 48 saat 50 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra her besi yerinin 300-800 nm dalga boyları arasındaki absorban spektrumları ölçülmüş ve sonuçlar not edilmiştir.

Peptonun AgNP üretimine etkisi için pepton konsantrasyonu litrede 0-0,5-1-1,5-2-2,5 gr olacak ve diğer besi yeri bileşenleri aynı kalacak şekilde besi yerleri hazırlanmıştır. Besi yerleri 5 gün 30 °C'de 120 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 13.000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek üstteki berrak sıvı alınmıştır. Son konsantrasyon 2mM olacak şekilde AgNO<sub>3</sub> eklenip, pH 10'a ayarlanarak 48 saat 50 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra her besi yerinin 300-800 nm dalga boyları arasındaki absorban spektrumları ölçülmüş ve sonuçlar not edilmiştir.

### 3.8. Gümüş Nanopartikül Sentezi İçin Kültür Besiyerinin Yüzey Yanıt Yöntemi (Response Surface Methodology: RSM)- Merkezi Kompozit Tasarım (Central Composite Design: CCD) İle Optimizasyonu

Gümüş nanopartiküllerinin sentezinde kullanılacak *K. turkmenica* 16K104 kültür besiyerinin RSM-CCD ile optimizasyonuna yönelik deneylerde bağımsız değişkenler glukoz (X1), maya özütü (X2), malt özütü (X3) ve pepton (X4) olarak belirlenmiştir. RSM-CCD tasarımının inşası için kodlar ve her bir değişken için kodlara karşılık gelen seviyeler Tablo 3.5'de gösterilmiştir.

Tablo 3.5. RSM-CCD tasarımının inşası için kodlar ve her bir değişken için kodlara karşılık gelen seviyeler

Besiyeri bileşenleri	Semboller	Kod seviyeleri				
		- $\alpha$	-1	0	+1	+ $\alpha$
Glukoz	X1	0	2,5	5	7,5	10
Maya Özütü	X2	0	0,75	1,5	2,25	3
Malt Özütü	X3	0	0,75	1,5	2,25	3
Pepton	X4	0	0,63	1,25	1,88	2,5

Tasarım Stat-Ease Design Expert programı yardımıyla yapılmıştır (Tablo 3.5). Buna göre; gümüş nanopartiküllerinin sentezinde kullanılmak üzere MGYP besi yeri kültürü Tablo 3.6'de belirtildiği gibi farklı oranlarda glukoz, maya özütü, malt özütü ve peptonunun kullanıldığı 30 farklı besiyerinde üçer tekrarlı şekilde hazırlanmıştır. *K. turkmenica* 16K104'ün bu besiyerlerinde kültivasyonu gerçekleştirildikten sonra kültür süpernatantları santrifügasyonla geri kazanılmış ve gümüş nanopartiküllerinin sentezi için kullanılmıştır. Sentezler reaksiyonlarının optimum koşullar altında

gerçekleştirilmesinden sonra reaksiyon karışımının 300-800 nm dalgaboyları arasındaki absorpsiyon spektrumları çizilerek elde edilen SPR piklerinin tepe noktasına karşılık gelen absorbans değerleri yanıt olarak kaydedilmiştir.

Tablo 3.6. RSM-CCD optimizasyonu için besi yeri bileşenleri

No	X <sub>1</sub> (g/L)	X <sub>2</sub> (g/L)	X <sub>3</sub> (g/L)	X <sub>4</sub> (g/L)	No	X <sub>1</sub> (g/L)	X <sub>2</sub> (g/L)	X <sub>3</sub> (g/L)	X <sub>4</sub> (g/L)
1	5	1.5	1.5	1.25	16	7.5	0.75	2.25	0.625
2	5	1.5	1.5	1.25	17	2.5	0.75	2.25	1.875
3	2.5	2.25	0.75	0.625	18	7.5	2.25	0.75	1.875
4	2.5	0.75	0.75	1.875	19	5	0	1.5	1.25
5	5	1.5	1.5	1.25	20	5	1.5	1.5	1.25
6	2.5	0.75	2.25	0.625	21	5	1.5	1.5	1.25
7	7.5	2.25	2.25	1.875	22	5	1.5	3	1.25
8	2.5	2.25	2.25	0.625	23	5	1.5	0	1.25
9	0	1.5	1.5	1.25	24	7.5	0.75	2.25	1.875
10	5	3	1.5	1.25	25	7.5	2.25	2.25	0.625
11	2.5	2.25	0.75	1.875	26	5	1.5	1.5	1.25
12	7.5	0.75	0.75	1.875	27	5	1.5	1.5	2.5
13	10	1.5	1.5	1.25	28	7.5	0.75	0.75	0.625
14	2.5	2.25	2.25	1.875	29	5	1.5	1.5	0
15	2.5	0.75	0.75	0.625	30	7.5	2.25	0.75	0.625

### 3.9. Gümüş Nanopartikülün Biyoreaktör Kullanılarak Üretilmesi

Mikroorganizmaların üretiminde ortam koşullarının kontrol edilerek büyük ölçekte üretilmesi amacıyla biyoreaktör kullanılmıştır. 5 litrelik biyoreaktörün 3 litresi MGYP besiyeri ile doldurulmuş; pH, sıcaklık ve çözünmüş oksijen problemleri yerleştirilmiştir. Asit ve baz girişlerine, oksijen girişine filtreler yerleştirilip alüminyum folyoya sarılarak otoklavlanmıştır. Otoklav işleminden sonra pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen, karıştırıcı hızı ayarlanmış ve besiyerinin %20'si oranında aşı kültür eklenerek mikroorganizmaların üremesi sağlanmıştır. Normal koşullar altında beş günde üreyerek istenen yoğunluğa ulaşan mikroorganizmalar biyoreaktör kullanılarak üretildiğinde istenen yoğunluğa ulaşma süresi iki güne düşürülmüştür.

### 3.10. Gümüş Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Karakterizasyon çalışmalarında kullanılacak gümüş nanopartiküller 13,000 g'de 20 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüş ve distile su ile 3 kere yıkandıktan sonra hacminin iki katı kadar saf su içerisinde +4 C'de saklanmıştır. Üretilen gümüş nanopartiküllerin şeklini ve boyutunu analiz edebilmek için geçirimli elektron

mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Gümüş nanopartiküller 2 mm<sup>2</sup>'lik lam parçaları üzerinde kurutulduktan sonra altınla kaplanarak Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile görüntülenmiştir. Nanopartiküllerin Enerji Dağılım Spektrometresi (EDS) ile elemental analizi gerçekleştirilmiştir. Dinamik Işık Saçılımı (DLS) analizi ile boyut dağılımları belirlenmiş, zeta potansiyeli ölçümü ile yüzey yükleri analiz edilmiştir. X-ışını kırınımını (XRD) analizi için gümüş nanopartiküller 13.000 g'de 20 dakika çöktürülmüş ve 60 °C'de kurutularak kullanılmıştır. FTIR analizi için sentezlenen AgNP'lerin, MGYP besiyerinin ve 2 Mm AgNO<sub>3</sub> çözeltisinin analizleri 500-4000 cm<sup>-1</sup> aralığında 4 cm<sup>-1</sup> çözünürlükte yapılmıştır.

### **3.11. Disk Difüzyon Metodu İle Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi**

Tahmini hücre sayısı McFarland standartlarına göre 5.10<sup>5</sup>/mL'e göre ayarlandıktan sonra 100 µL alınarak Mueller Hinton Agar besiyerine ekilmiştir. Steril dört disk petri üzerine eşit aralıklarla yerleştirilmiştir. Steril disklerden birincisine besiyeri, diğerlerine sırasıyla 32, 64, 128 µL/mL olacak şekilde AgNP çözeltisi 15'er µL eklenerek 24 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra disklerin çevresinde oluşan zonlara göre antimikrobiyal aktiviteler belirlenmiştir. Negatif kontrol amacıyla diskler üzerine 15 µL distile su eklenmiştir.

### **3.12. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) ve Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBK) Değerlerinin Belirlenmesi**

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından temin edilen ondört patojen mikroorganizma Mueller Hinton Agar besi yerinde 30 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra Mueller Hinton Broth besiyerine ekim yapılarak McFarland standartlarına göre bakteri yoğunluğu 5.10<sup>5</sup>/mL olacak şekilde bakterilerin gelişmesi sağlanmıştır.

Tahmini hücre sayısı McFarland standartlarına göre belirlendikten sonra AgNP'ler Mueller Hinton Broth besiyerinde çözülerek azalan konsantrasyonlarda (256-0,0312 µg/mL) AgNP çözeltileri elde edilmiştir. AgNP çözeltilerinin homojen bir şekilde çözünmesi için vorteks ve sonikatör kullanılmıştır.

MİK değerlerinin ölçülmesi için 96'lık plakalara her bir kuyucuğa 140 µL Mueller Hinton Broth besiyeri, 150 µL artan konsantrasyonlarda (0,0312-256 µg/mL) olacak şekilde AgNP çözeltisi ve 10 µL patojen mikroorganizma eklenerek 24 saat 30 °C'de de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kuyucuklardaki bulanıklığa göre her bir patojen mikroorganizma için MİK değerleri belirlenmiştir.

MBK değerlerinin belirlenmesi amacıyla her bakteri için Mueller Hinton agar besi yeri hazırlanmıştır. MİK deneyinin yapıldığı plakalarda bulunan artan konsantrasyonlarda AgNP bulunan kuyucuklardan 10 µL alınarak petri üzerine belirli aralıklarla ekim yapılmıştır. 24 saat 30 °C’de inkübasyondan sonra bakteri gelişimi göstermeyen konsantrasyon MBK değeri olarak belirlenmiştir.

### 3.13. Gümüş Nanopartiküllerin Genotoksisite Potansiyelinin Araştırılması

Tez alışmasında *Kribbella turkmenica* 16K104 tarafından sentezlenen gümüş nanopartiküllerin genotoksisitesinin belirlenebilmesi için Hep G2 hücre hattı kullanılmıştır. Hep G2 hücre hattı besi yeri ortamında (% 10 dana serumu, % 1 penisilin – streptomisin içeren Eagle’s Minimum Essential medium) 37 °C’de % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde çoğaltılmıştır. Hücreler istenen yoğunluğa ulaştığında iki kez fosfat tamponu ile yıkanıp, tripsin-EDTA ile hücreler kaldırılmıştır. Hücre canlılığı ve sayısı Cedex Smart Slide kullanılarak belirlenmiştir. Hücre sayısı istenen yoğunluğa ulaştığında hücreler 24 kuyucuklu plakalara ekilip, 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler *Kribbella turkmenica* 16K104 tarafından sentezlenen gümüş nanopartiküllerin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Deneyler birbirinden bağımsız 3 tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir. Deneyde hidrojen peroksit pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Gümüş nanopartiküllerin farklı konsantrasyonlarına 24 saat boyunca maruz kalan hücreler tripsin-EDTA ile kaldırılmıştır. Hücre canlılığını belirlemek için tripan mavisi kullanılmıştır. Lamlar normal erime noktalı agarla kaplanmıştır. Hücreler de düşük erime noktalı agarla karıştırılmış, lamlara yayılması sağlanmış ve lamlar lamel ile kapatılarak 20 dakika süre ile 4 °C’de bekletilmiştir. Bekletilen süre sonunda lameller dikkatlice alınmış ve lamlar 60 dakika soğuk lizis çözeltisinde bekletilmiştir. Lizis uygulaması ve bundan sonraki uygulamalar karanlıkta gerçekleştirilmiştir. lizisten çıkan lamlar elektroforez solüsyonunda 20 dakika bekletilip, 20 dakika boyunca 300 mA, 25 V yürütme işlemi yapılmıştır. Elektorforezden sonra lamlar nötralizasyon solüsyonunda bekletilmiştir. Hava yardımıyla kurutulan lamlar üzerine etidyum bromid boyası (10 µg mL<sup>-1</sup>) damlatılmış ve floresan mikroskop ile hücrelerde meydana gelen DNA hasarları kuyruk uzunluklarının boyutuna göre değerlendirilmiştir.

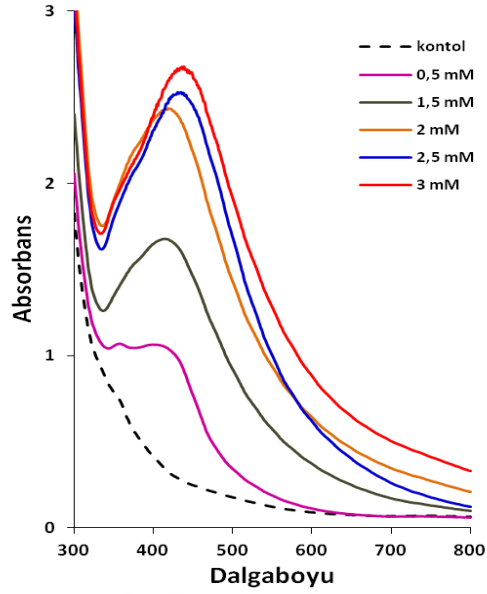
## **4. BULGULAR ve TARTIŞMA**

### **4.1. Gümüş Nanopartiküllerin Sentezinde Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu**

AgNP'lerin sentezi reaksiyon karışımının açık sarı renkten koyu kahverengiye dönüşümüyle ve UV-Vis spektrofotometrik analizlerle değerlendirilmiştir. UV-Vis spektrofotometrik analizlerle sentez sonrası reaksiyon karışımının 300-800 nm dalga boyları arasındaki absorpsiyon spektrumları çizilmiş ve böylece AgNP'lere ait yüzey plazmon rezonanslarını (surface plasmon resonance: SPR) gösteren pikler belirlenmiştir. Reaksiyon koşullarının sentez üzerine etkisi SPR piklerinin tepe noktalarına karşılık gelen absorpsiyon ve dalgaboylarının karşılaştırılması temelinde değerlendirilmiştir.

#### **4.1.1. AgNO<sub>3</sub> Konsantrasyonunun Gümüş Nanopartiküllerin Sentezi Üzerine Etkileri**

Farklı konsantrasyonlarda AgNO<sub>3</sub> içeren reaksiyon karışımları 40 °C'de 2 gün inkübe edildikten sonra sentezlenen AgNP'lere ait SPR pikleri Şekil 4.1.'de gösterilmektedir. Buna göre; AgNO<sub>3</sub> konsantrasyonunun artırılmasıyla AgNP'lerin sentezinde artış gözlemlenmiştir. Ancak konsantrasyonun 2 mM dan daha yüksek seviyede tutulması SPR piklerinde kaymalara neden olmuştur. SPR pik tepe noktasının 416 nm'den 438'nm dalga boyuna kayması sentezlenen nanopartiküllerin boyutunda da artış meydana geldiğini ifade ettiği için sentez için en uygun AgNO<sub>3</sub> konsantrasyonu 2 mM olarak belirlenmiştir.



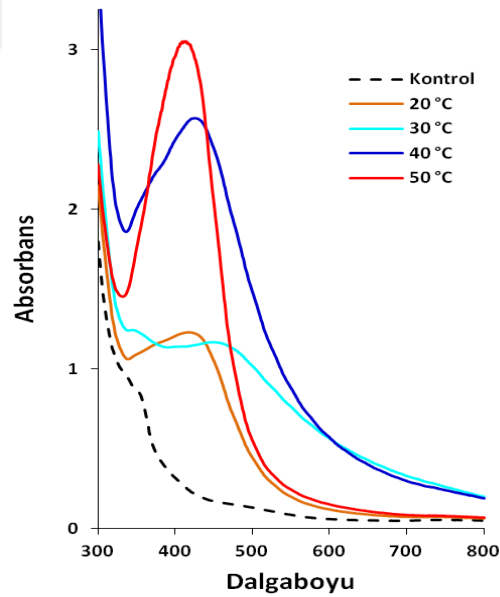
Şekil 4.1. AgNO<sub>3</sub> konsantrasyonunun etkisini gösteren UV-vis spektrumları

Literatür çalışması neticesinde nanopartiküllerin bakteri aracılı sentezi sırasında reaksiyon karışımında bulunması gereken AgNO<sub>3</sub> miktarının indirgeyici ve stabilize edici ajan olarak kullanılan bileşenin kaynağına göre değişiklik gösterdiği görülmektedir. *Bacillus* sp. AW1-2'in kullanıldığı bir çalışmada nanopartikül sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımına son konsantrasyonu 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 ve 4 mM olacak şekilde AgNO<sub>3</sub> ilave edilmiştir. Reaksiyon sonrasında maksimum nanopartikül sentezine 3 mM AgNO<sub>3</sub> ile ulaşıldığı rapor edilmiştir. Aynı çalışmada, sentezlenen nanopartiküle ait SPR pikinin tepe noktasının ise 447 nm dalga boyunda görüldüğü belirtilmiştir (Ajaz, et al., 2021). AgNP'lerin sentezi için Gram pozitif ve endofitik bir bakteri türü olan *Rothia endophytica*'ya ait kültür sıvısının kullanıldığı başka bir çalışmada ise sentez için 1 mM AgNO<sub>3</sub> kullanılmıştır. Ancak bu şekilde sentezlenen AgNP'lerin SPR pikinin çok kısa olduğu (0.435 OD) görülmektedir (Elbahnasawy, et al., 2021). Ashraf ve arkadaşları (2019) *Enterobacter cloacae* aracılı ekstraselüler AgNP sentez prosesini istatistiksel bir yaklaşımla optimize etmişler ve sonuçta maksimum AgNP sentezinin reaksiyon karışımında 2.5 mM'lık AgNO<sub>3</sub> varlığında olduğunu rapor etmişlerdir. Bakteri aracılı ekstraselüler AgNP sentezinin gerçekleştirildiği bir başka çalışmada maksimum verimlilik için en uygun AgNO<sub>3</sub> konsantrasyonunun *Escherichia coli* sa2, *Exiguobacterium aurantiacumm* sa3 ve *Brevundimonas diminuta* sa4 kültür sıvısının kullanıldığı reaksiyon karışımlarında 1 mM olduğu belirtilmiştir (Saeed, 2020).

#### 4.1.2. Reaksiyon Sıcaklığının Gümüş Nanopartiküllerin Sentezine Etkileri

Farklı sıcaklıklarda sürdürülen reaksiyonlar sonrasında sentezlenen AgNP'lere ait SPR pikleri Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. Reaksiyon sıcaklığının 20 ve 30 °C'de olduğu koşullarda AgNP'lerin sentezinin oldukça düşük olduğu belirlenmiştir. Sıcaklığın 40 °C'ye artırılması ile önemli sayılabilecek seviyede nanopartikül sentezinin gerçekleştiği görülmüştür. Ancak, SPR piklerinin görece geniş olması bu sıcaklıklarda sentezlenecek nanopartiküllerin boyut dağılımlarının oldukça dengesiz olacağını göstermiştir. Gümüş nanopartiküllerinin sentezi için en uygun sıcaklık en dar ve en yüksek SPR pikinin gözlemlendiği 50 °C olarak belirlenmiştir.

Gümüş nanopartiküllerin kimyasal yöntemlerle sentezi genellikle yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilmektedir. Literatürde bitki özütlerinin kullanıldığı sentez süreçlerinin de yüksek sıcaklıkta gerçekleştiği çok sayıda rapor bulunmaktadır (Kazlagić, 2020; Tailor 2020; Elmusa 2021). Bakteri aracılı sentezler ise her ne kadar bakterinin türüne göre değişiklik gösterse de genellikle 25-45 °C gibi mezofilik sıcaklıklarda gerçekleştirilmektedir.



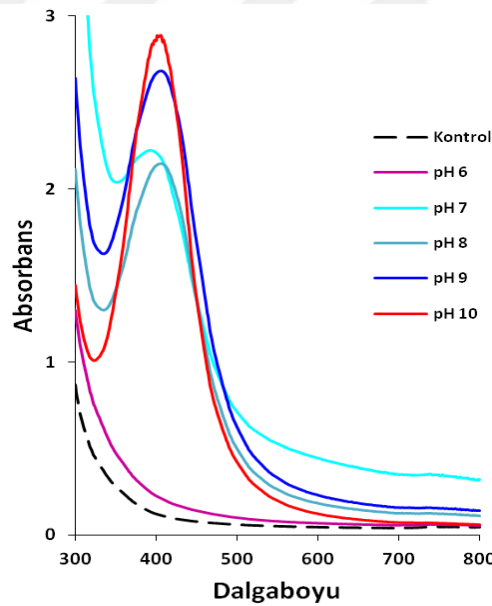
Şekil 4.2. Gümüş nanopartiküllere farklı sıcaklıkların etkisini gösteren UV-vis spektrumları

Literatürde *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Pseudoduganella* ve *Paenibacillus* gibi taksonlarda sınıflandırılan bazı bakteri türleri ile gerçekleştirilen çalışmalarda AgNP'lerin ekstraselüler sentezi için gerekli en uygun sıcaklıkların 25 – 50 °C aralığında olduğu rapor edilmiştir (Hamed, 2020; Beeler 2020; Otari 2015, Huq 2020a, Huq 2020b). Bakteri aracılı nanopartikül sentez veriminin bu sıcaklık

aralıklarında yüksek olmasının sebebi sentezde rol alan nitrat redüktaz gibi enzimlerin bu sıcaklıklarda maksimum aktivite göstermesi olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

#### 4.1.3. pH Derecesinin AgNP Sentezine Etkileri

Farklı pH derecelerinde hazırlanan reaksiyon karışımları ile sentezlenen AgNP sentezine ait SPR pikleri Şekil 4.3.'te gösterilmiştir. pH 6 derecesinde hazırlanan reaksiyon karışımında AgNP sentezine rastlanmamıştır. pH 7 ve 8'de hazırlanan reaksiyon karışımlarında sentezlenen AgNP birbirine oldukça yakındır ancak pH 9 ve 10'da en iyi AgNP sentezi gözlenmiştir. En iyi SPR pikinin olduğu pH derecesi 10 olarak gözlenmiştir. Benzer şekilde, *Pseudomonas taiwanensis* ile AgNP sentezinde reaksiyon karışımı pH'sının 4'den 12'ye arttırılmasıyla sentez veriminin arttığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, literatürde aktinobakteri-aracılı birçok AgNP sentezinde reaksiyon karışımı başlangıç pH'sının 7 ve 8' de tutulduğu görülmektedir (Shanmugasundaram, 2013).



Şekil 4.3. Gümüş nanopartiküllere pH derecesinin etkisini gösteren UV-vis spektrumları

#### 4.2. Gümüş Nanopartikül Sentezinde Kültür Besiyerinin Optimizasyonu

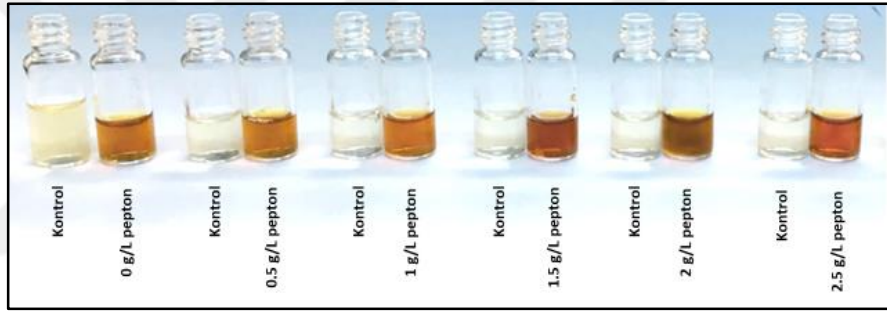
Mikroorganizmalar aracılığıyla biyoteknolojik olarak sentezlenen AgNP'lerin endüstriyel olarak kullanılabilmesi ve rakipleriyle rekabet edebilmesi için maliyetin düşürülmesi amacıyla AgNP sentezinde bakterilerin kültür ortamı bileşenlerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon iki farklı metotla gerçekleştirilmiştir. Birincisinde değişkenlerin biri hariç diğerlerinin sabit tutulduğu "tek zamanda tek faktör (one factor at time: OFAT)", ikincisinde ise "yüzey yanıt

yöntemi- merkezi kompozit dizayn (response surface methodology-central composite design: RSM-CCD) yaklaşımları kullanılmıştır.

#### 4.2.1. OFAT Yöntemi ile Optimizasyon

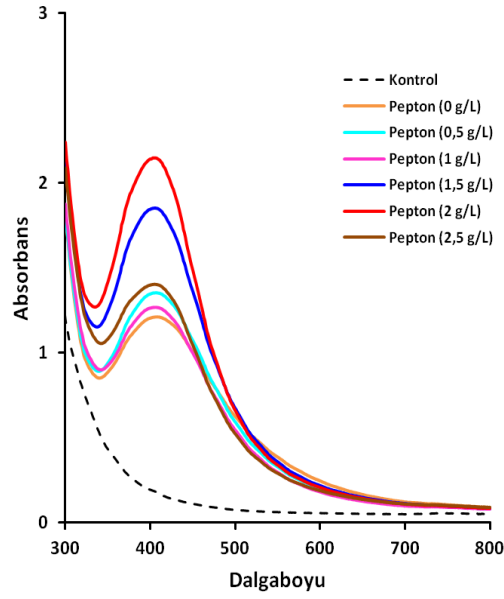
##### 4.2.1.1. Peptonun Gümüş Nanopartikül Sentezine Etkileri

Besiyerindeki peptonun *K. turkmenica* 16K104 aracılı ekstraselüler AgNP sentezi üzerine etkisinin gözlemlenmesi için kültür besiyerleri farklı konsantrasyonlarda (0-2.5 g/L) pepton ile hazırlanmıştır. Kültivasyon sonrasında ekstraselüler kültür sıvıları santrifügasyonla ayrılarak nanopartikül sentezinde kullanılmıştır. Besiyerinde peptonun yokluğunda ve farklı konsantrasyonlarda pepton varlığında elde edilen kültürlerin süpernatantlarının kullanıldığı tüm sentez reaksiyonları sonucunda AgNP'lerin sentezlendiğini gösteren açık sarıdan kahverengiye doğru oluşan renk değişimi gözlemlenmiştir (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda pepton ile hazırlanan besiyerlerindeki renk değişimleri

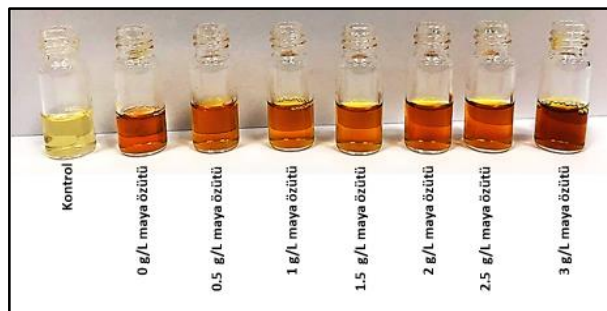
Sentezlenen AgNP'lerin miktarları 300-800 nm dalgaboyları arasındaki absorpsiyon spektrumlarının karşılaştırılması ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.5.). Buna göre, en yüksek nanopartikül sentezi 2 g/L pepton içeren besiyerlerinde geliştirilen *K. turkmenica* 16K104'nın kültür sıvısı ile elde edilmiştir. Elde edilen AgNP'lere ait SPR piki tepe noktasının ise 406 nm'de olduğu gözlemlenmiştir. Besiyerindeki pepton konsantrasyonunun 1.5 mg/mL'nin altında ya da 2 mg/mL'nin üzerinde tutulduğu koşullarda ise sentezlenen SPR piklerinin yüksekliklerinde önemli ölçüde azalma gözlemlenmiştir.



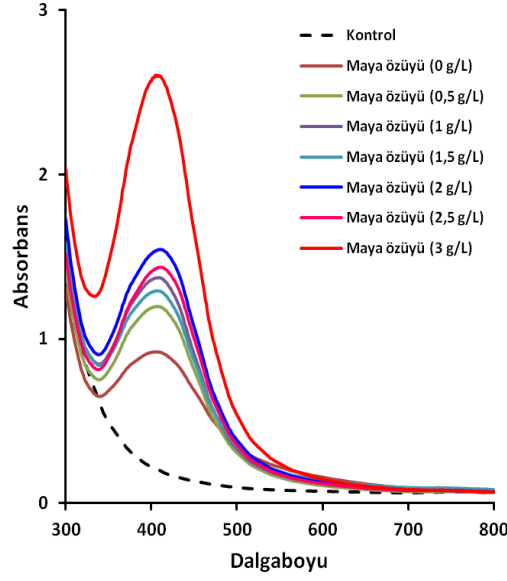
Şekil 4.5. Pepton konsantrasyonunun gümüş nanopartikül sentezine etkisi

#### 4.2.1.2. Maya Özütünün Gümüş Nanopartikül Sentezine Etkileri

*K. turkmenica* 16K104 kültürünün hazırlanması için kullanılan besiyerindeki maya özütü miktarının gümüş nanopartiküllerinin sentezi üzerindeki etkisinin oldukça önemli olduğu hem görsel olarak (Şekil 4.6.) hem de sentezlenen AgNP'lerin 300-800 nm dalgaboyları arasındaki absorpsiyon spektrumlarının karşılaştırılması ile belirlenmiştir (Şekil 4.7.). Sarıdan koyu kahverengiye renk değişiminin en fazla görüldüğü reaksiyon karışımının 3 g/L maya içeren besiyerinde geliştirilen *K. turkmenica* 16K104 kültürünün süpernatantı ile hazırlandığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda maya özütü ile hazırlanan renk değişimleri



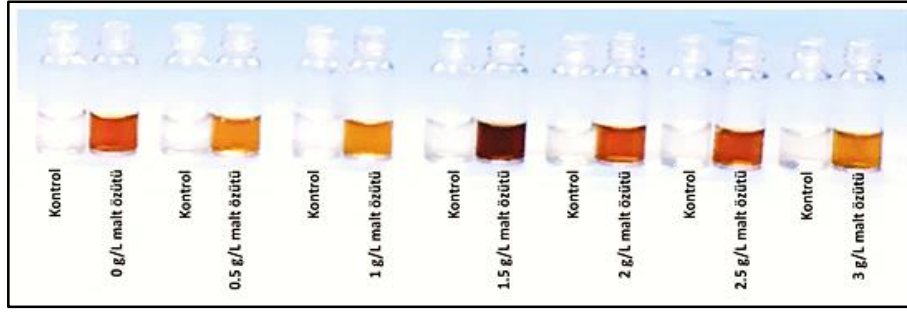
Şekil 4.7. Maya özütü konsantrasyonunun gümüş nanopartikül sentezine etkisi

Spektrofotometrik analizler sonucunda en iyi SPR piki besiyerindeki maya özütünün 3 g/L olduğu koşullarda çizilmiştir. Maya özütünün azaltılması ile sentezlenen gümüş nanopartiküllerine ait SPR piklerinin yüksekliklerinin de önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, maya özütünün düşük konsantrasyonlarında (0-0,5 g/L) bant genişlemesi, orta seviyedeki konsantrasyonlarda ise (1-2 g/L) önemli ölçüde pik kayması gözlemlenmiştir.

#### 4.2.1.3. Malt Özütünün Gümüş Nanopartikül Sentezine Etkileri

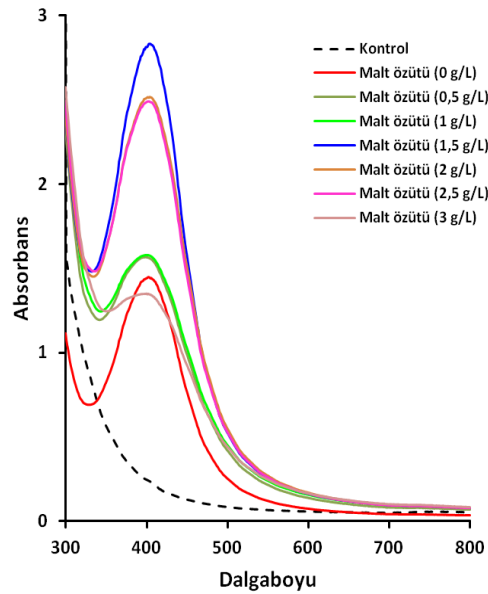
Besiyerinde bulunan malt özütünün *K. turkmenica* 16K104 aracılı ekstraselüler AgNP sentezi üzerine etkisi hem görsel olarak hem de spektrofotometrik analizlerle değerlendirilmiştir. Şekil 4.8.'de gösterildiği gibi besiyerinde 1,5 g/L malt özütü kullanıldığı koşullarda elde edilen kültür sıvısı ile gerçekleştirilen nanopartikül sentezi sonunda reaksiyon ortamındaki sarıdan kahverengiye renk değişiminin daha kuvvetli olduğu gözlemlenmiştir.

Artan malt özütü oranlarıyla hazırlanan besi yerinde en iyi AgNP sentezi ve SPR piki malt özütünün 1,5 g/L olduğu Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Malt özütünün en yüksek oranda bulunduğu besiyerinde AgNP sentezinde azalma, SPR pikinde genişleme gözlemlenmiştir, bu da AgNP boyutunda artışa neden olmuştur.



Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda malt özütü olan besiyerlerinde renk değişimleri

Spektrofotometrik analiz sonucunda da, maksimum nanopartikül sentezinin 1.5 g/L malt özütünün kullanılmasıyla elde edilebileceği görülmüştür. En yüksek SPR piki besiyerinde 1.5 g/L malt özütünün kullanıldığı koşullarda gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, malt özütünün 2 ve 2.5 g/L olarak besiyerine ilave edildiği koşullarda da yüksek sentez verimi kaydedilmiştir. Malt özütünün 3 g/L'ye arttırılması ise nanopartikül sentezinde önemli bir düşüşe neden olmakla birlikte sentezlenen nanopartiküllere ait SPR pikinin genişlemesine ve pik tepe noktasının daha yüksek dalga boylarında görülmesine sebebiyet vermiştir.



Şekil 4.9. Malt özütü konsantrasyonunun gümüş nanopartikül sentezine etkisi

#### 4.2.1.4. Glukozun Gümüş Nanopartikül Sentezine Etkileri

*K. turkmenica* 16K104 kültürleri farklı konsantrasyonlarda glukoz kullanılarak hazırlandıktan sonra santrifügasyonla kültür sıvıları geri kazanılmış ve AgNP'lerin sentezinde kullanılmıştır. Böylece, kültürün hazırlanması sırasında besiyerindeki

glukoz miktarının ekstraselüler AgNP'lerin sentezi üzerindeki etkisi sentez sonrasında reaksiyon karışımındaki renk değişimi (Şekil 4.10.) ve elde edilen AgNP'lerin 300-800 nm dalgaboyları arasındaki absorpsiyon spektrumlarının karşılaştırılması ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.11.).

Kontrol haricinde farklı konsantrasyonlarda glukoz olan besiyerlerinde geliştirilmiş *K. turkmenica* 16K104 kültürü ile gerçekleştirilen tüm ekstraselüler sentez deneylerinde AgNP'lerin sentezlendiği görsel olarak kanıtlayan renk değişimi gözlemlenmiştir (Şekil 4.10.) Ancak, renk değişim oranlarının tüm denemelerde benzer olmasından dolayı besiyerindeki glukoz konsantrasyonunun AgNP'lerin ekstraselüler sentezi üzerindeki etkisi görsel olarak değerlendirilememiştir. Bununla birlikte, 4 g/L glukoz bulunan besiyerinde geliştirilen *K. turkmenica* kültürüne ait süpernatantın kullanıldığı sentez işlemi sonrasında reaksiyon karışımının renginin diğerlerine oranla daha koyu olduğu dikkat çekmektedir.



Şekil 4.10. Farklı konsantrasyonlarda glukoz olan besiyerlerindeki renk değişimleri

Sentezlenen AgNP'lerin 300-800 nm dalgaboyları arasındaki absorpsiyon spektrumları incelendiğinde ise besiyerinde bulunan glukozun *K. turkmenica* 16K104 aracılı AgNP'lerin ekstraselüler sentezi üzerinde önemli etkisi olduğu görülmüştür. SPR pik tepe noktalarına karşılık gelen absorbanlara göre karşılaştırılma yapıldığında, gümüş nanopartiküllerinin en yüksek verimle sentezi glukozun litrede 4 gram kullanıldığı besiyerinde geliştirilen bakteri kültürüne ait süpernatantının kullanılması ile gerçekleştirilmiştir. Bu koşulda sentezlenen AgNP'lere ait SPR pikinin tepe noktasına karşılık gelen absorban ve dalga boyu ise sırasıyla 3.5288 ve 403 nm bulunmuştur. Besiyerindeki glukoz konsantrasyonunun 2 g/L olduğu koşullarda sentezlenen AgNP'lere ait SPR pikinin tepe noktasının ise 3.0168 absorban ve 404 nm dalga boyuna karşılık geldiği tespit edilmiştir. Glukozun diğer konsantrasyonlarında ise sentezlenen AgNP'lere ait SPR piklerinin boyunun önemli

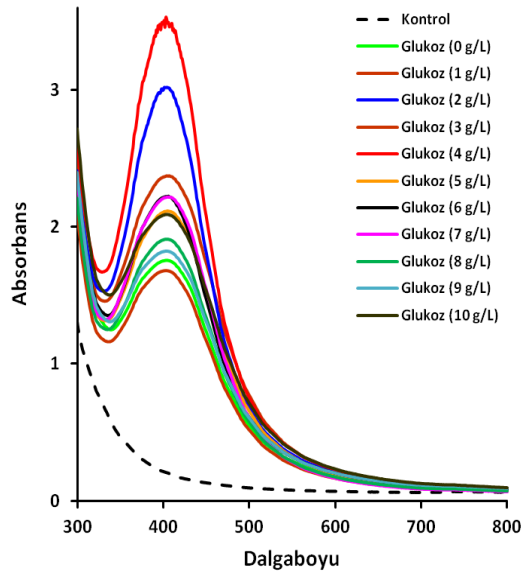
oranda azaldığı ( $< 2.4$ ) görülmüştür. Ayrıca, bu SPR piklerine ait tepe noktasına karşılık gelen dalga boyularında da 0.1 - 0.3 nm'lik artış tespit edilmiştir. Sonuç olarak, AgNP'lerin sentezinde kullanılacak bakteri kültürünün üretimi için en uygun glukoz konsantrasyonunun 4 g/L olduğu belirlenmiştir.

Besiyeri bileşenlerinin yüksek verimlilikte AgNP üretimi için OFAT yaklaşımı ile gerçekleştirilen optimizasyonu neticesinde en uygun pepton, maya özütü, malt özütü ve glukoz konsantrasyonun sırasıyla 2 g/L , 3 g/L, 1.5 g/L ve 4 g/L olduğu belirlenmiştir. Optimize edilen besiyeri ile elde edilen *K. turkmenica* 16K104 kültür sıvısı ile sentezlenen AgNP'lere ait SPR pikinin tepe noktasının ise spektrumun 403 nm dalgaboyunda konumlandığı tespit edilmiştir.

Gerçekleştirilen deneyler neticesinde besiyeri bileşenlerinin konsantrasyonunun kültür sıvısı ile sentezlenecek AgNP'lerin miktarları ve boyutları üzerinde önemli bir etki gösterdiği açıkça görülmektedir. Bu etkinin;

- i) *K. turkmenica* 16K104'nın aynı bileşenlerin farklı konsantrasyonları ile oluşturulan besiyerlerinde farklı büyüme davranışı gösterebilmesi,
- ii) Herhangi bir bileşenin  $\text{AgNO}_3$ 'ün AgNP'lere indirgenmesinde rol alan bir ya da birkaç molekülün sentezlendiği biyokimyasal yolağın çalışma hızını artırabilmesi

gibi sebeplerden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.



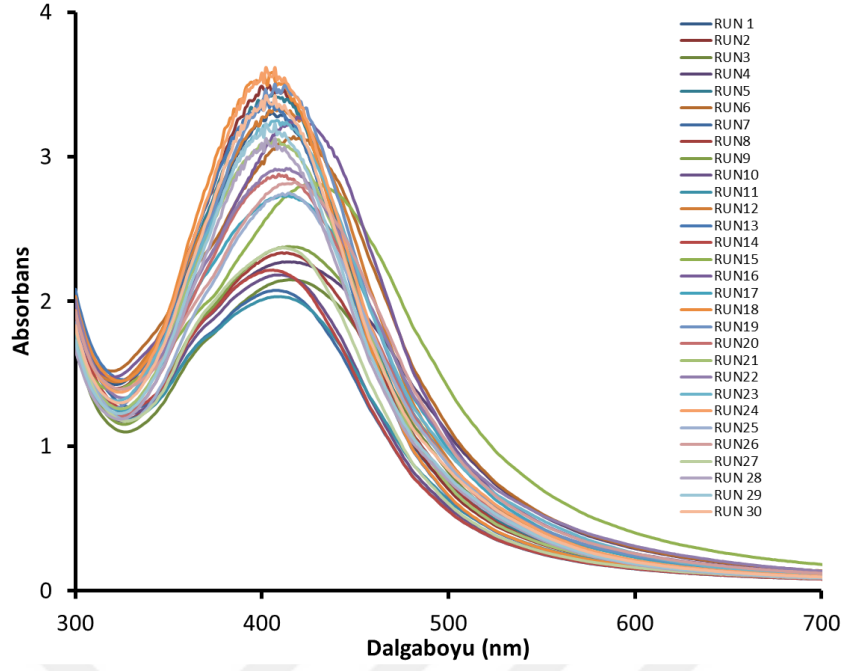
Şekil 4.11. Glukoz konsantrasyonunun gümüş nanopartikül sentezine etkisi

#### 4.2.2. RSM-CCD ile Optimizasyon

Gümüş nanopartikül sentezi için kültür besiyerinin istatistiki optimizasyonu için RSM-CCD yaklaşımı kullanılmıştır. Bu yaklaşım ile; *K. turkmenica* 16K104 kültürünün hazırlanması için kullanılan glukoz, maya özütü, malt özütü ve pepton arasındaki ilişkinin AgNP'lerin sentezi üzerine etkileri araştırılmıştır. Böylece; besiyeri bileşenlerinin maksimum seviyede nanopartikül sentezi için kültür ortamına ilave edilmesi gereken konsantrasyonları belirlenmiştir. RSM deney tasarımı sonucunda elde edilen deneysel ve tahmini yanıtlar Tablo 4.1.'de gösterilmiştir. Buna göre en yüksek miktarda nanopartikül sentezi 7.5 g/L glukoz, 2.25 g/L maya özütü, 2.25 g/L malt özütü ve 1.88 g/L pepton içeren besiyerinin kullanıldığı, en düşük miktarda nanopartikül sentezi ise 2.5 g/L glukoz, 0.75 g/L maya özütü, 0.75 g/L malt özütü ve 0.63 g/L pepton içeren besiyerinin kullanıldığı *K. turkmenica* 16K104 kültürü ile elde edilmiştir. Ayrıca deneysel ve tahmini yanıtlar arasında bir anlamsızlık tespit edilmemiştir. Her bir deneye ait spektrumlar Şekil 4.12'de gösterilmiştir. Spektrum analizleri neticesinde, sentezlenen nanopartikül miktarının azalması anlamına gelen absorbans azalması SPR piklerinin tepe noktası kayması ve pik genişlemesi gözlemlenmiştir. Bu durum, sentez miktarı azaldıkça AgNP boyutunun arttığını ve aynı zamanda parçacık dağılım aralığının da genişlediği şeklinde yorumlanmıştır.

Tablo 4.1. RSM-CCD tasarımı deney yanıtları ve tahminleri.

No	Deneysel yanıt (absorbans)	Tahmini yanıt (absorbans)	No	Deneysel yanıt (absorbans)	Tahmini yanıt (absorbans)
1	3.19	3.23	16	2.66	2.73
2	3.16	3.23	17	2.26	2.33
3	2.67	2.74	18	3.80	3.86
4	2.07	2.11	19	1.69	1.63
5	3.18	3.23	20	3.26	3.23
6	2.20	2.14	21	3.28	3.23
7	3.97	3.91	22	3.59	3.66
8	3.33	3.38	23	3.12	3.06
9	1.97	1.94	24	2.93	2.85
10	3.78	3.84	25	3.72	3.68
11	3.43	3.37	26	3.28	3.23
12	2.92	2.89	27	3.47	3.54
13	2.98	3.02	28	2.37	2.43
14	3.75	3.67	29	2.86	2.79
15	1.52	1.59	30	3.36	3.30



Şekil 4.12. RSM-CCD tasarımı deneyleri sonucunda elde edilen spektrumlar.

Deneyisel tasarım çerçevesince elde edilen sonuçlar neticesinde yanıtlara göre besiyeri bileşenleri ve gümüş nanopartiküllerin sentezi arasındaki ilişkiyi tanımlayan matematiksel model, olacak şekilde formüle edilmiştir.

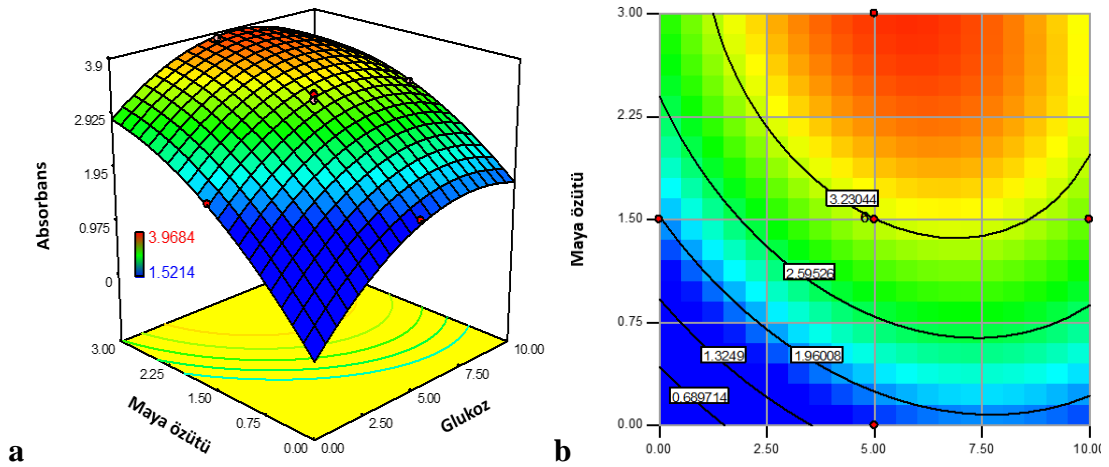
$$\begin{aligned} \text{Absorbans} : & +3.23 + 0.27 X_1 + 0.55 X_2 + 0,15 X_3 + 0,19 X_4 - 0.072 X_1 X_2 \\ & - 0.064 X_1 X_3 - 0.016 X_1 X_4 + 0.021 X_2 X_3 + 0.027 X_2 X_4 \\ & - 0.083 X_3 X_4 - 0.19 X_1^2 - 0.12 X_2^2 + 0.033 X_3^2 - 0.015 X_4^2 \end{aligned}$$

Modelin istatistiksel analizi varyans analizi (ANOVA) ile gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda model için  $p$ -değeri ve  $F$ -değeri sırasıyla  $< 0.0001$  ve  $126.01$  olarak hesaplanmıştır. Modelin istatistiksel açıdan değerlendirilmesi esnasında  $p$ -değerinin  $F$ -değerine bölümü ile elde edilen sonucun  $0.05$ 'den küçük olması modelin anlamlı olduğu yönünde yorumlanmaktadır. Bu bakımdan nanopartikül üretiminde besiyeri bileşenlerinin etkisini belirleyen ve optimize edilmesinde kullanılan bu model istatistiki olarak anlamlıdır. Ayrıca, modelde hata meydana gelme şansının  $\%0.01$ 'den küçük olduğu da tespit edilmiştir. Modele ait  $0.9916$  olarak hesaplanan regresyon katsayısı ( $R^2$ ) değeri model eşitliği yardımı ile tahmin edilecek sonuçların deneysel sonuçlara oldukça yakın olacağını göstermektedir. Ek olarak, elde edilen  $R^2$  değeri değişkenlerin ve sonuçların  $\%99.16$ 'sının model kapsamında açıklanabileceğini ifade etmektedir. Model için tahmini (predicted) regresyon katsayısı ( $\text{Pred-}R^2$ ) ve düzenlenmiş (adjusted) regresyon katsayısı ( $\text{Adj-}R^2$ ) değerleri sırasıyla  $0.9567$  ve  $0.9837$  olarak hesaplanmıştır. Bu iki regresyon katsayısının birbirine yakınlığı ise

modele herhangi bir terim eklenmesine gerek olmadığını göstermiştir. Sinyal'in gürültüye oranını belirten Adeq-Precision değeri 39.628 olarak bulunmuştur. Bu değer 4'ün üzerinde olması modele ait sinyal gücünün ve modelin hassasiyetinin yeterliliğini göstermektedir.

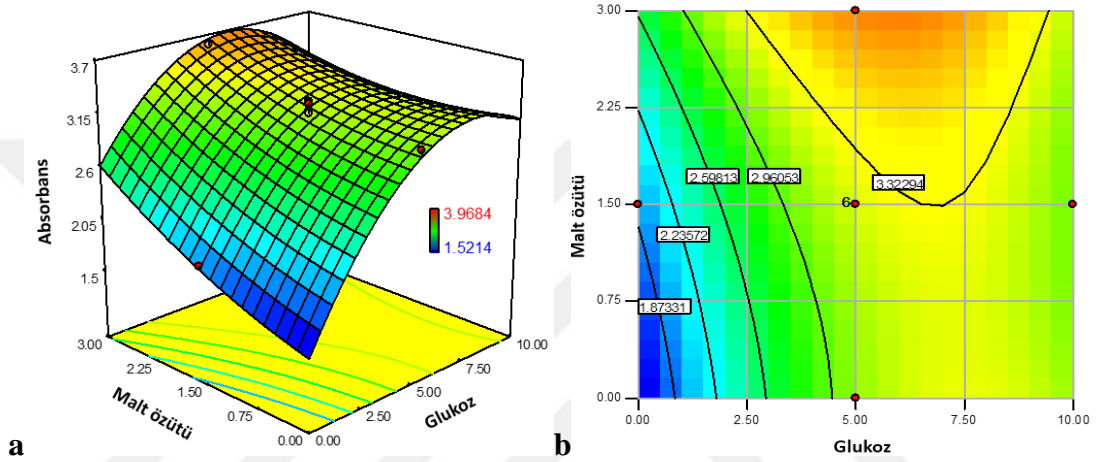
Varyans analizi neticesinde bağımsız değişkenlerin hepsinin ( $p/F < 0.0001$ ) nanopartikül sentezi üzerindeki etkisi istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Değişkenlerin birbirleri arasındaki etkileşimlerin gümüş nanopartiküllerinin sentezi üzerine etkileri istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Buna göre; glukoz – maya özütü ( $p$ -değeri= 0.0035), glukoz – malt özütü ( $p$ -değeri= 0.0076) ve malt özütü – pepton ( $p$ -değeri= 0.0012) aralarındaki çoklu regresyon ilişkilerinin gümüş nanopartiküllerinin sentezini anlamlı düzeyde etkilediği saptanmıştır. Öte yandan glukoz – pepton, maya özütü – malt özütü, maya özütü – pepton aralarındaki ilişkinin sentez üzerindeki etkisinin herhangi bir istatistiki anlam taşımadığı tespit edilmiştir ( $p$ -değeri  $>0.1$ ).

Maya özütü ve glukoz arasındaki ilişkinin gümüş nanopartiküllerinin sentezi üzerindeki etkileri Şekil 4.13.'te hem üç boyutlu (3D) hem de 2 boyutlu olarak sunulmuştur. Buna göre maya özütü düşük ve orta seviyedeysen glukoz konsantrasyonunun orta seviyeye yükseltilmesi ile gümüş nanopartiküllerinin sentezinde artış olduğu gözlemlenmiştir. Besiyerindeki glukoz konsantrasyonunun yüksek seviyelere çıkartılması ( $>7.5$  g/L) ise AgNP'lerin sentezini olumsuz etkilemiştir. Glukoz konsantrasyonunun düşük ve orta seviyelerde tutulduğu koşullarda, besiyerindeki maya özütü konsantrasyonunun artırılması sentezlenen nanopartikül miktarının artışına sebep olmuştur.



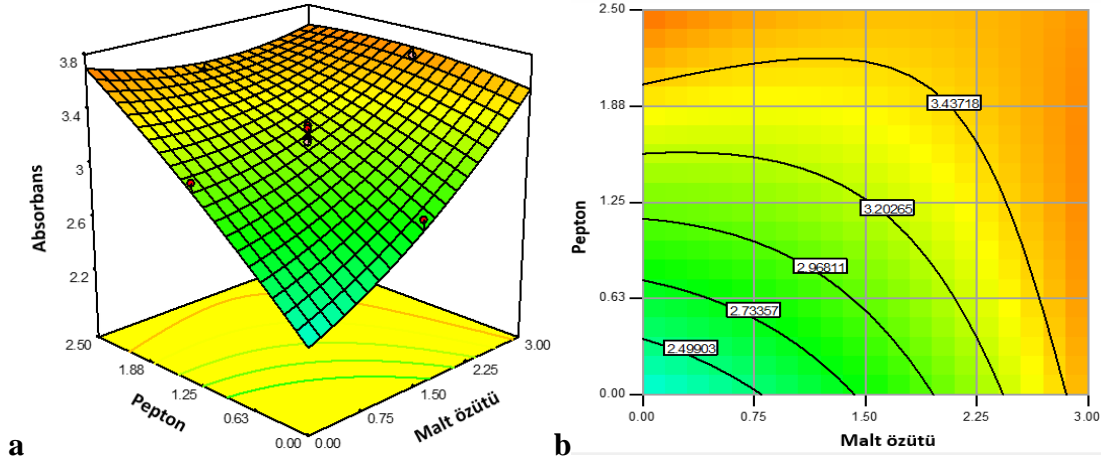
Şekil 4.13. Besiyerindeki maya özütü ve glukoz konsantrasyonlarının sentez üzerine etkisi üç boyutlu (a) ve iki boyutlu (b) grafikler

Besiyerindeki glukoz ve malt özütü konsantrasyonunun AgNP'lerin sentezi üzerine etkilerinin gösterildiği Şekil 4.14.'e göre her iki bileşenin konsantrasyonlarının yüksek seviyede tutulması ile sentezlenen AgNP miktarında azalma gözlemlenmiştir. Ayrıca, besiyerindeki glukoz konsantrasyonundaki orta seviyeye kadar olan artışın malt özütündeki artışa göre AgNP'lerin sentezi üzerindeki etkisinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Besiyerindeki glukoz yoğunluğunun 0-5 g/L olduğu koşullarda ise malt özütünün arttırılmasıyla sentezlenen AgNP miktarının da arttığı belirlenmiştir.



Şekil 4.14. Besiyerindeki malt özütü ve glukoz konsantrasyonlarının sentez üzerine etkileri üç boyutlu (a) ve iki boyutlu (b) grafikler

Pepton ve malt özütü arasındaki ilişkinin nanopartikül sentezi üzerindeki etkilerini gösterir 3D ve 2D grafikler Şekil 4.15.a ve Şekil 4.15.b' de gösterilmektedir. Buna göre, peptonun besiyerindeki konsantrasyonunun düşük ve orta düzeyde tutulduğu koşullarda malt özütü konsantrasyonunun yükseltilmesi sentezlenen AgNP miktarında önemli düzeyde artışa neden olmuştur. Benzer durum malt ekstraktın düşük ve orta düzeyde tutulduğu koşullarda pepton için de kaydedilmiştir. Dolayısıyla, optimizasyon sürecinde her iki bileşenden sadece birinin besiyerindeki konsantrasyonunun arttırılmasının yeterli olacağı ve bu durumun minimum girdi ile yüksek verimlilik açısından önemli olduğu tespit edilmiştir.

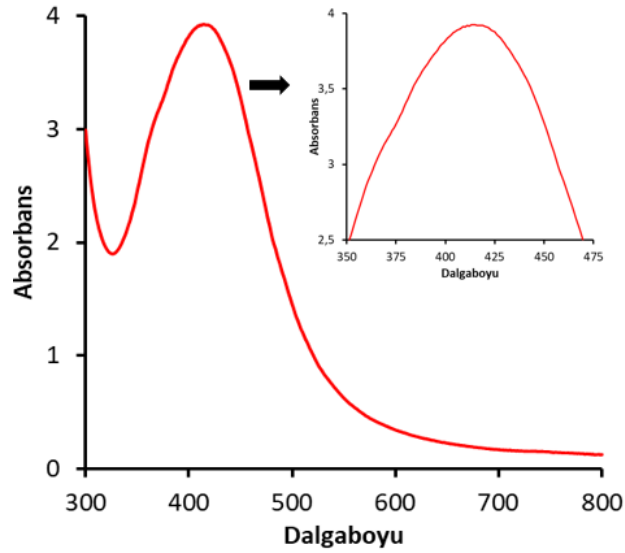


Şekil 4.15. Besiyerindeki pepton ve malt özütü konsantrasyonlarının sentez üzerine etkileri üç boyutlu (a) ve iki boyutlu (b) grafikler

Elde edilen veriler çerçevesince besiyeri bileşenlerinin maksimum nanopartikül sentezi için en uygun konsantrasyonları Design Expert 7 programındaki “numerical optimization” aracı kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuca göre en uygun konsantrasyonlar glukoz, maya özütü, malt özütü ve pepton için sırasıyla 5.71 g/L, 2.35 g/L, 0.66 g/L ve 2.34 g/L olarak belirlenmiştir.

#### 4.2.3 Optimizasyon Sonucunun Doğrulanması

*K. turkmenica* 16K104 RSM-CCD ile optimize edilmiş besiyerinde geliştirildikten sonra, kültür sıvısı kullanılarak gümüş nanopartikülleri optimum şartlar altında sentezlenmiştir. Sentez sonrasında Şekil 4.16.’da gösterilen gümüş nanopartikül süspansiyonuna ait absorpsiyon spektrumuna göre gerçek sonuçların tahmini sonuca yakın olduğu gözlemlenmiştir. Ancak, SPR pik tepe noktası klasik yöntemle optimizasyon sonrası sentezlenen nanopartiküllere ait SPR pik tepe noktasının 12 nm ilerisine kaymıştır. Bu durum, RSM-CCD ile optimize edilmiş besiyerinin kullanıldığı koşullarda sentezlenen nanopartiküllerin boyutlarının klasik yöntemle optimize edilmiş besiyerinin kullanıldığı koşullarda sentezlenenlerden daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bundan dolayı, sentez için klasik yöntemle optimize edilmiş besiyeri tercih edilmiştir.

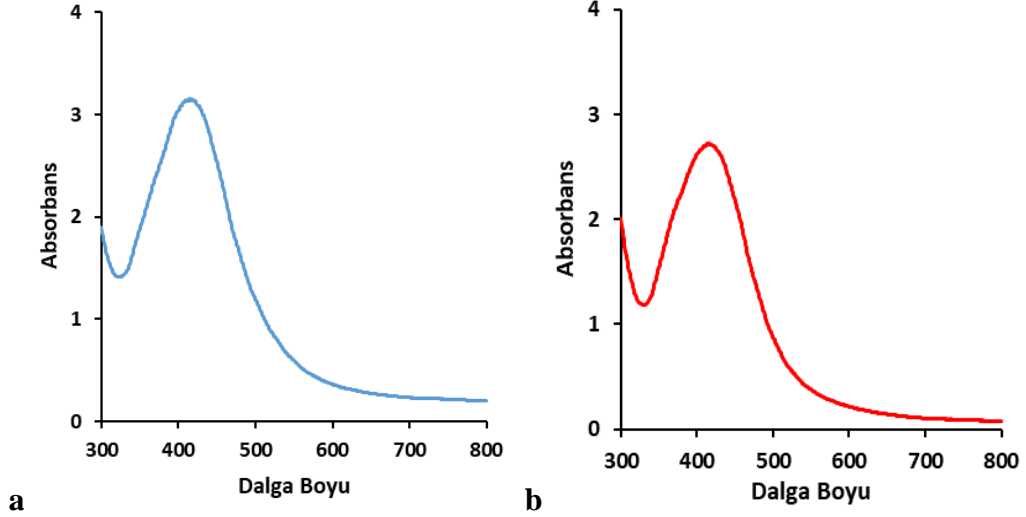


Şekil 4.16.RSM-CCD ile optimize edilmiş nanopartiküllerin absorpsiyon spektrumları

### 4.3. Gümüş Nanopartiküllerin Kararlılığı

Optimum koşullarda sentezlenen AgNP'lerin sentezlendikten hemen sonraki ve bir yıl sonunda UV-Vis spektrum ölçümleri şekil 4.17.'de gösterilmiştir. AgNP'lerin sentezinden hemen sonra çizilen SPR pikinin tepe noktası 414 nm dalga boyunda, bir yıl süresince oda sıcaklığında bekletilen AgNP'lere ait SPR pikinin tepe noktası ise 413 nm dalga boyunda gözlemlenmiştir. Ayrıca, tepe noktasına karşılık gelen absorbansda da önemli bir değişim görülmemiştir. Bu durum; sentezlenen AgNP'lerin kümeleşerek boyutunun büyümediğini ifade etmektedir. Sentezlenen nanopartikülün kararlılığının yüzeyindeki bakteri kültüründen köken alan fonksiyonel gruplardan ya da yüksek pozitif ya da negatif zeta potansiyeline sahip olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Gözlemlenen bu özelliklik endüstriyel açıdan oldukça önemlidir. Çünkü; gerek kimyasal, gerek fiziksel gerekse de biyolojik yöntemler aracılığı ile ticari amaçlar için üretilen AgNP'ler 1-3 ay gibi kısa sürede kümeleşmekte ve boyutları farklılaşmaktadır. Bundan dolayı, üretim siparişe göre yapılmakta ve üretim sonrasında hızla alıcıya teslim edilmek zorundadır. Ayrıca alıcının kullanımına kadar bekletebileceği süre de oldukça kısa olmaktadır. Bu anlamda, gerçekleştirdiğimiz çalışma neticesinde sentezlenen AgNP'lerin sanayideki muadillerine göre daha çok tercih edilme potansiyeli yüksektir.



Şekil 4.17. AgNP'lerin sentezden hemen sonra (a) ve bir yıl sonra (b) çizilen absorbanans spektrumları

#### 4.4. AgNP Karakterizasyonu

##### 4.4.1. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ve EDS verileri

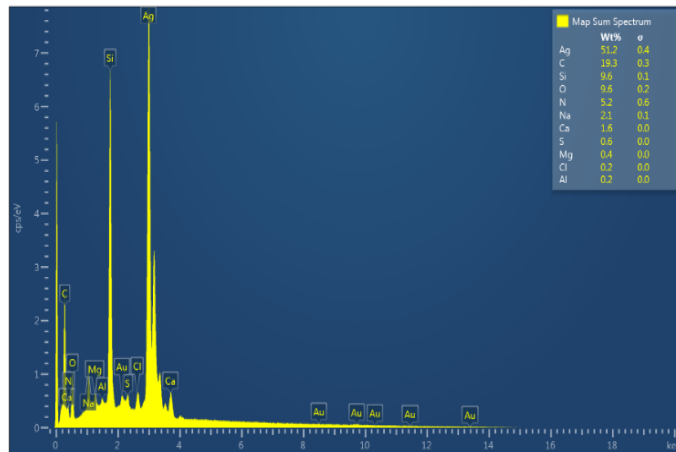
Optimum koşullar altında *K. turkmenica* 16K104 aracılığıyla ekstraselüler olarak sentezlenen AgNP'lerin SEM mikrografi Şekil 4.18.'de gösterilmektedir. AgNP'lerin SEM mikrografi görüntülerine göre gümüş nanopartiküllerin küresel formda oldukları ve boyutlarının 5-50 nm arasında olduğu tespit edilmiştir. Literatür çalışması neticesinde, ekstraselüler sentez sırasında farklı aktinobakteri suşları ile farklı boyutlarda ve şekillerde nanopartiküllerin elde edilebileceği görülmektedir. Manikprabhu ve arkadaşlarının (2016) gerçekleştirdiği çalışmada, hareketsiz bir aktinobakteri olan *Sinomonas mesophila* MPKL 26 ile ekstraselüler olarak sentezlenen AgNP'lerin boyutlarının 4-50 nm arasında olduğu belirlenmiştir. Vijayabharath ve arkadaşlarının (2018) gerçekleştirdiği çalışmada *Streptomyces griseoplanus* SAI-25 aracılı AgNP sentezi sonucunda oluşan partiküllerin boyutunun SEM analizine göre yaklaşık 20-25 nm olduğu görülmektedir. Benzer şekilde, *Streptomyces naganishii* MA7 (Shanmugasundaram, 2013), *Streptomyces calidiresistens* IF11 (Wypij, 2018), *Pilimelia* SP. SF23 (Anasane, 2016) ve *Streptomyces coelicolor* klmp33 (Manikprabhu and Lingappa, 2014) aracılığıyla ekstraselüler olarak sentezlenen AgNP'lerin 5-50 nm arasında boyutlara sahip oldukları rapor edilmiştir. Bunun yanı sıra, *Streptomyces rochei* MHM13 (Abd-Elnaby, 2016) ve *Rhodococcus* sp. (Otari, 2012) ile sentezlenen AgNP'lerin boyutlarının sırasıyla 85 ve 100nm'ye kadar ulaşabileceği görülmüştür. Tamil Nadu (Hindistan) sahillerinden izole edilen bir

aktinobakteri olan *Nocardiopsis dassonvillei*- DS013 ile sentezlenen AgNP'lerin boyutlarının ise yaklaşık 100 nm olduğu bildirilmiştir (Dhanaraj, 2020).



Şekil 4.18. Optimum koşullarda sentezlenen Gümüş nanopartiküllerin SEM mikrografı

EDS analizi sonucunda nanopartiküllerin elemental içeriğini gösteren grafik Şekil 4.19.'da gösterilmektedir. SEM ile analiz edilen gümüş nanopartiküllerin var olduğu EDS analizi ile kuvvetli gümüş sinyali ile bir kez daha doğrulanmıştır. EDS analizinde kaplamaya, analiz zeminin cam olmasına ve reaksiyon karışımındaki organik bileşiklere bağlı olarak sırasıyla altın; silisyum ve azot, oksijen kükürt sinyallerine rastlanıldığı şekil 4.19'da görülmüştür.

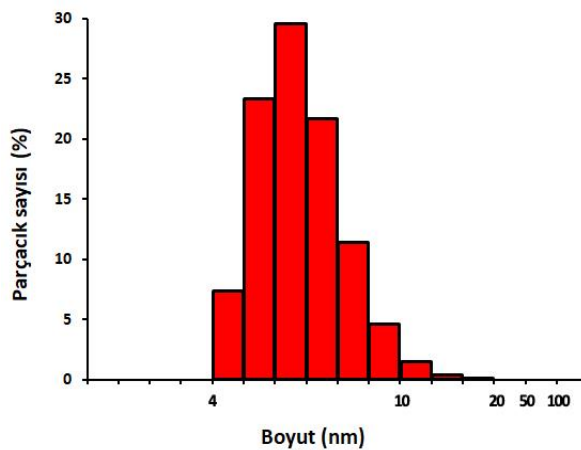


Şekil 4.19. Elemental analiz sonuçlarını gösteren EDS grafiği

#### 4.4.2. Parçacık Boyut Dağılım Analizi

Sentezlenen gümüş nanopartiküllerin boyut dağılımları DLS ile analizi Şekil 4.20.'de gösterilmiştir. Dinamik Işık Saçılımı (DLS) analizi, nanopartiküllerin partikül boyutunu ve stabilitesini belirlemek için kullanılan etkili bir yöntemdir (Shah and Rather, 2020). Analiz sonucunda gümüş nanopartiküllerin boyut dağılımının homojen olduğunu bulunan 0.311'lik polidispersite indisi ( $PDI < 0.5$ ) göstermektedir. Sentezlenen gümüş nanopartiküllerin endüstriyel olarak kullanılabilmesi için çözelti içinde boyut dağılımının homojen ve daha küçük sınırlar arasında olması beklenmektedir. Yapılan DLS analizinin sonuçları da sentezlenen gümüş nanopartiküllerin beklenildiği gibi 4-20 nm boyutları arasında oldukça dar sınırlar arasında dağılım gösterdiğini ortaya koymuştur.

Daha önce yapılan çalışmalara bakıldığında Singh ve arkadaşlarının bakteriyel kaynaklı sentezlenip analiz edilen AgNP'lerin ortalama boyutunu, polidispers değer (0,369) ile yaklaşık  $228.7 \pm 2.4$  nm bulmuşlardır (Singh, vd., 2018). Singh ve arkadaşlarının 2016 yılında *Sporosarcina koreensis* DC4 'den sentezledikleri AgNP için gözlemlenen ortalama parçacık boyutunu PDI 0.240 ile 102 nm olarak bulmuşlardır (Singh, vd., 2016). Rapor edilen çalışmalara bakıldığında bakteriyel kaynaklı sentezlenen AgNP'lerin boyutları 50-200 nm arasında değişiklik göstermektedir (Kumar and Mamidyala, 2011). *Kribbella turkmenica* 16K104 aracılığı ile sentezlenen gümüş nanopartiküllerin diğer nanopartiküllere kıyasla daha küçük boyutlarda olduğu görülmektedir.

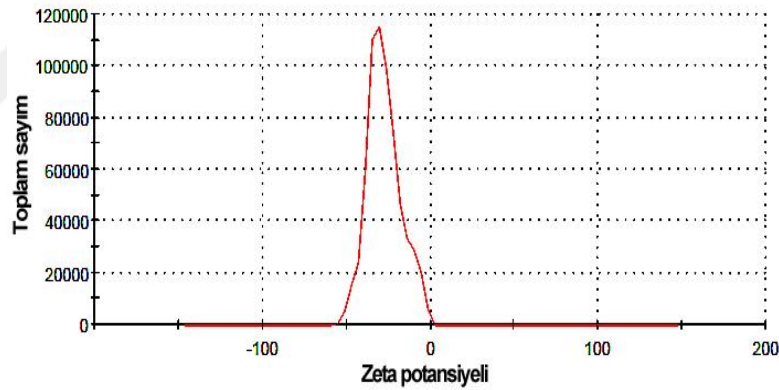


Şekil 4.20. Gümüş nanopartiküllerin DLS analizi ile boyut dağılımı

#### 4.4.3. Zeta Potansiyeli Analizi

Nanopartiküllerin karakterizasyonunda sahip oldukları zeta potansiyelleri oldukça önemli bir analizdir. 30 mV'den yüksek veya -30 mV'den düşük bir zeta potansiyeli, kararlı bir sistemin göstergesidir (Geengan, et al., 2013). *K. turkmenica* 16K104 aracılığıyla sentezlenen gümüş nanopartiküllerin zeta potansiyeli  $-30.6 \pm 10.1$  olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.21.).

Süspansiyondaki tüm parçacıklar büyük bir negatif veya pozitif zeta potansiyeline sahip olduğunda, birbirlerini itme eğiliminde olacaklar ve parçacıkların bir araya gelme eğilimi olmayacaktır. Yani, partiküllerin zeta potansiyel değerleri düşük ise partiküllerin bir araya gelip topaklaşmasını engelleyecek bir kuvvet olmayacaktır. AgNP'lerin yüksek negatif zeta potansiyelinden dolayı doğada polidispersiyon olduğu açıktır; bu nedenle, elektrostatik itme kuvveti bunlar arasında nanopartiküllerin aglomerasyonunun önlenmesi ile sonuçlanır ve ayrıca çözeltide uzun vadeli stabilite için çok yardımcı olmaktadır (Elamawi, et al., 2018).



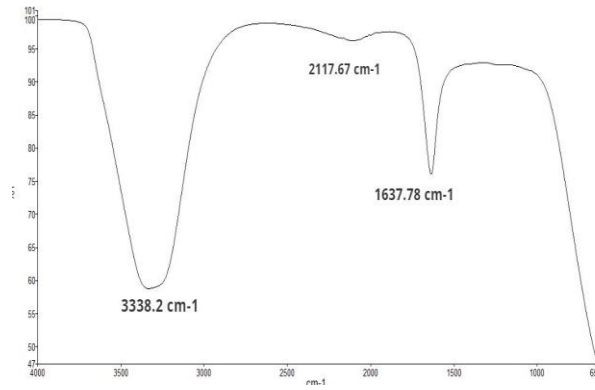
Şekil 4.21. Gümüş nanopartiküllerin zeta büyüklüğü ve dağılımı

Önceki çalışmalara bakıldığında Prakasham ve arkadaşlarının 2012 yılındaki çalışmalarında *Streptomyces albidoflavus* aracılığı ile sentezledikleri AgNP'ün zeta potansiyelini -8,5 mV olarak ölçmüşlerdir (Prakasham, et al., 2012). Kumar ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada *Pseudomonas aeruginosa* aracılığı ile sentezledikleri AgNP'ün zeta potansiyelini -9,5 mV olarak bulmuşlardır (Kumar and Mamidyala, 2011). +30 mV'den yüksek veya -30 mV'den düşük zeta potansiyel değerleri nanopartiküllerin kararlılığını önemli ölçüde etkilemektedir. Sentezlenen AgNP'ler büyük bir negatif veya pozitif zeta potansiyeline sahip olduklarında, birbirlerini itme eğiliminde olacaklardır ve parçacıkların bir araya gelerek

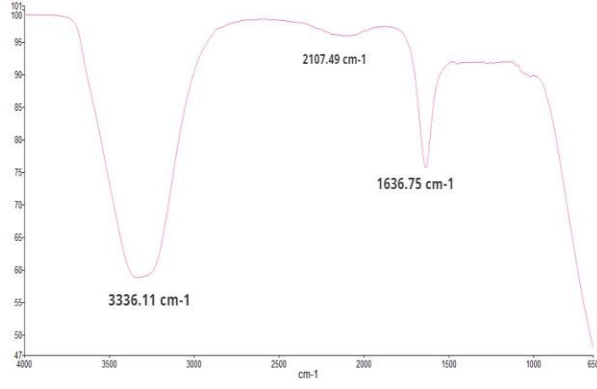
kümeleşmeleri engellenmiş olacaktır. Endüstriyel amaçlı kullanılması planlanan nanopartiküller birbirini itme eğiliminde olduklarında zamanla kümeleşerek boyutlarının büyümeleri engellenmiş olmaktadır, bu da ürünün raf ömrünün uzamasına ve antimikrobiyal aktivitesinin yüksek olmasıyla sonuçlanmaktadır.

#### 4.4.4. Fourier Dönüümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

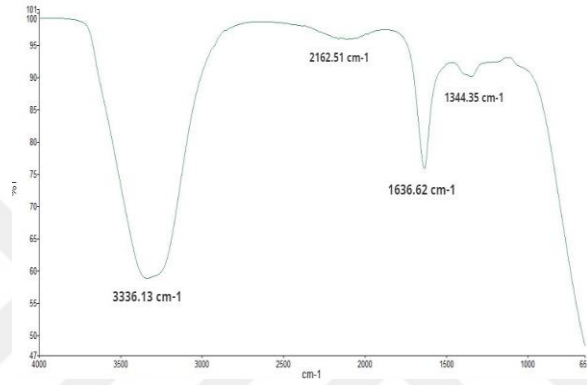
FTIR, metal nanopartiküller ile biyomoleküller arasındaki fonksiyonel grupların bağımlı anlamaya yönelik etkili bir analizdir. FTIR analizleri gümüş nanopartiküllerin indirgenmesinden, kaplanmasından ve etkin stabilitesinden sorumlu olabilecek biyomolekülleri belirlemek amacıyla gerçekleştirilmektedir (Eraslan, 2020). AgNP sentezine ait fonksiyonel grupların piklerini gösteren FTIR spektrumu Şekil 4.22.'de gösterilmektedir. AgNP sentezinin gerçekleştiği kültür ortamının FTIR spektrumu Şekil 4.23.'te gösterilmektedir. 2 mM AgNO<sub>3</sub>'ün FTIR spektrumu Şekil 4.24.'te gösterilmektedir. FTIR spektrum piklerine bakıldığında 3338.2, 3336.11 ve 3336,13 pikleri O-H (H-bağılı karboksilik asit) ve N-H (Amin, amid) gruplarını vermektedir. 2117,67, 2107,49 ve 2162,51 FTIR spektrum pikleri C≡C Alkin grubunu ifade etmektedir. 1637,78, 1636,75 ve 1636,62 pikleri C=C Alken grubunu ifade etmektedir. 2 mM AgNO<sub>3</sub> çözeltisindeki 1344,35 piki NO<sub>2</sub> Nitro bileşikler veya C-N Amin, amid gruplarını ifade etmektedir.



Şekil 4.22. AgNP'ün FTIR spektrumu



Şekil 4.23. MGYP besi yerinin FTIR spektrumu



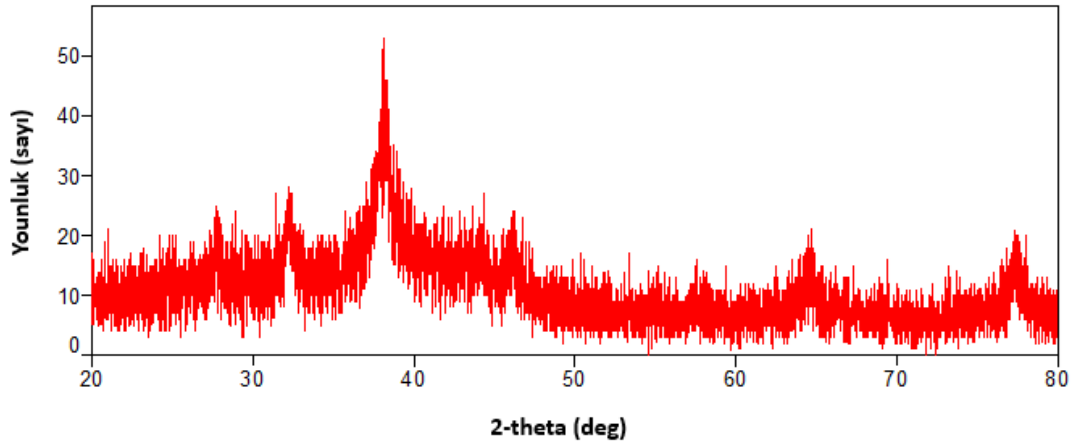
Şekil 4.24. AgNO<sub>3</sub> çözeltisinin (2mM) FTIR spektrumu

Literatüre bakıldığında, Fouad ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptıkları çalışmada *Bacillus amyloliquefaciens* (D29)'den sentezledikleri AgNP'lerde 3384.91, 1633.91, 1359.54, 1064.84 ve 528.96 cm<sup>-1</sup> FTIR spektrum piklerini, *B. subtilis* (A15)'den sentezledikleri AgNP'lerde 3386.75, 1634.43, 1395.58, 1079.35 ve 532.60 cm<sup>-1</sup> FTIR spektrum piklerini elde etmişlerdir. Elde edilen FTIR spektrum piklerine göre AgNP'lerin sentezi sırasında amino asit kalıntıları ve sentezlenen protein arasında bulunan O-H gerilmesi ve C=C, =C-H, C=O, N-H fonksiyonel gruplarının AgNP sentezine neden olabileceğini göstermektedir (Fouad, et al., 2017).

#### 4.4.5. X - Işını Difraksiyon (X-RD)

X-ışınları kırınımı, kristallerin atomlarının aralarındaki mesafe ve geometrik düzeni hakkında bilgi veren bir yöntemdir. XRD analizi biyolojik olarak sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerdeki kristalin bileşiklerin kalitatif olarak tanınmasında kullanılmaktadır (Kütük, 2019). *K. turkmenica* 16K104 aracılığıyla sentezlenen AgNP'lerin XRD sonucu Şekil 4.25.'te gösterilmektedir. XRD analizi sonucunda *Kribballa turkmenica* 16K104 aracılığı ile biyolojik yöntemlerle sentezlenen

AgNP'lere ait  $38^\circ$  'de yoğun bir pik elde edilmiştir. Yapılan diğer çalışmalara bakıldığında AgNP sentezine dair XRD sonuçlarında benzer sonuçlar olduğu görülmektedir. İqtedar ve arkadaşlarının 2019 yılında *Bacillus mojavensis* BTCB15 'ten elde ettikleri AgNP'de  $2\theta = 8, 20, 25, 32, 38, 43, 50, 75, 84$  'te pikler elde etmişlerdir (İqtedar, ve diğerleri, 2019). Zaki ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları çalışmada *E. Coli* 'den elde ettikleri AgNP'de  $2\theta = 45.3$  'te yoğun bir pik gözlemlenmişlerdir (Zaki, et al., 2011).



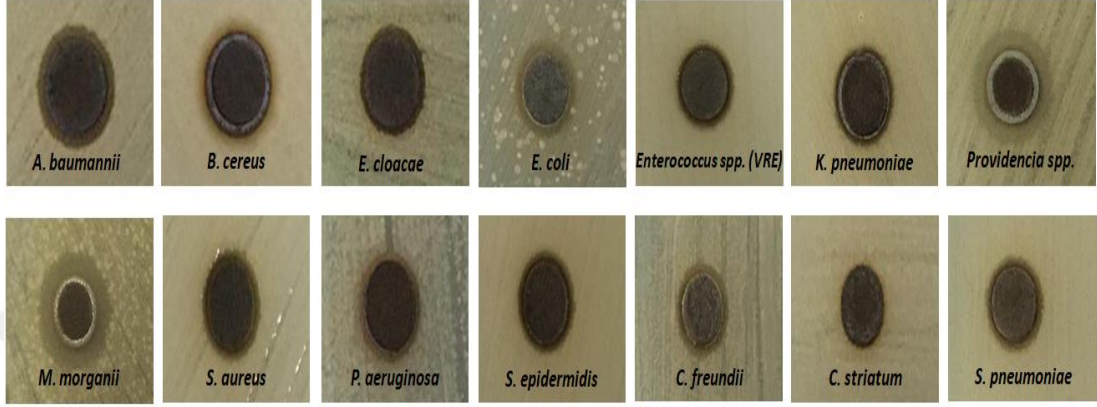
Şekil 4.25. AgNP'lerin XRD grafiği

#### 4.5. Gümüş Nanopartiküllerin Bakteriler Üzerindeki Etkileri

##### 4.5.1. Gümüş Nanopartiküllerin Disk Difüzyon Tekniği İle Belirlenen Bakteriler Üzerindeki Etkileri

Disk difüzyon tekniği bir maddenin bakteriler üzerindeki inhibe edici etkisinin gözlemlenmesi açısından oldukça pratik bir yöntemdir. Disk difüzyon tekniği ile her ne kadar sayısal bir sonuç alınması çok fazla mümkün olmasa da bir maddenin antimikrobiyal etkili farklı maddelerle kıyaslanması açısından da fikir verici bir yöntemdir. Yapılan disk difüzyon deneyi sonucunda, gümüş nanopartiküllerin *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus. cereus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. (VRE), *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia* spp., *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Citrobacter freundii*, *Corynebacterium striatum* ve *Streptococcus pneumoniae* patojenlerine karşı antibakteriyel etkisinin olduğu görülmüştür. Fakat; nanopartiküllerin emdirildikleri filtrelerden besiyerine difüzyon hızı ve difüzyon oranlarının yetersiz olması nanopartiküllerin farklı patojenlere karşı antibakteriyel aktivitesinin etkilerinin

kıyaslanmasını engellemiştir. Filtre üzerindeki gümüş nanopartikül miktarının artışına paralel olarak gözlemlenmesi gereken zon çapı artışı da yetersiz difüzyon hızı ve oranından dolayı açıkça görülemedi. Patojen bakteri suşlarının geliştirildiği besiyerlerine yerleştirilen ve gümüş nanopartikül emdirilen filtrelerin etrafında oluşan inhibisyon zonları Şekil 4.26’da gösterilmiştir.



Şekil 4.26. Gümüş nanopartiküllerin patojen mikroorganizmalara inhibisyon zonları

#### 4.5.2. AgNP’lerin Bakteri Suşları Karşısındaki Minimum İnhibe Edici Konsantrasyonları (MİK)

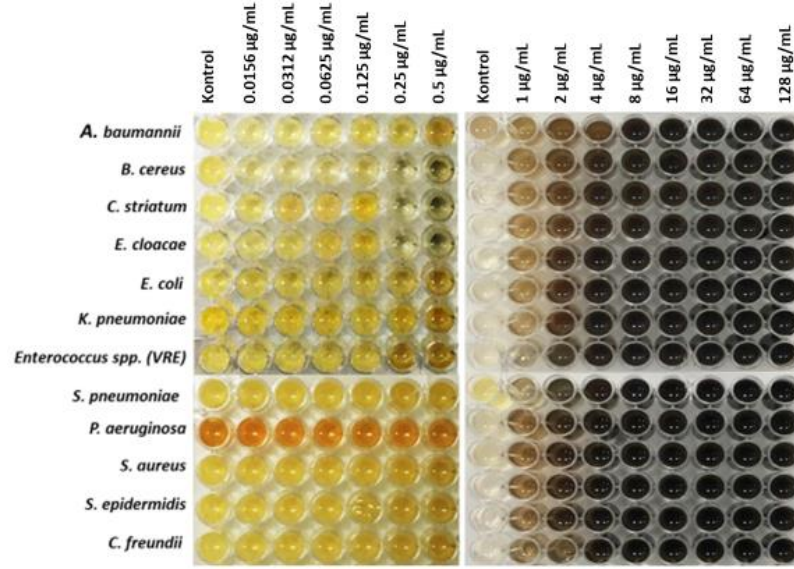
*K. turkmenica* 16K104 aracılığıyla sentezlenen gümüş nanopartiküllerin analizi yapılan patojen mikroorganizmalara karşı MİK değerleri Tablo 4.2’de gösterilmektedir. Gümüş nanopartiküller *Escherichia coli*’ye karşı en düşük inhibe edici etki olan 0.25 µg/mL MİK değerini, *Morganella morgani* ve *Providencia spp.*’ye 4 µg/mL’lik MİK değerini, *Klesiella pneumoniae*, *Enterococcus spp.* (VRE), *Pseudomonas aeruginosa*, *Stapylococcus aureus*, *Stapylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Citrobacter freundii*’ye karşı 1 µg/mL MİK değeri olarak ölçülmüştür. Plakalardaki bakteriyel gelişim Şekil 4.27’de gösterilmiştir.

El-Bendary ve arkadaşlarının 2021 yılında yaptıkları çalışmada *Aspergillus caespitosus*’tan elde edilen AgNP’lerin MİK değerleri, *Bacillus cereus* için en düşük MİK ve *E. coli* ve *Candida albicans* için en yüksek MİK değeri 0.235-1.174 mg/ml olarak bulmuşlardır (El-Bendary, et al., 2021). Alsamhary’nin 2020 yılında çalışmada *Bacillus subtilis* aracılığı ile sentzlediği AgNP’lerin MİK değerlerini *Staphylococcus aureus* (MRSA) için 60 µg/mL, *Staphylococcus epidermidis* için 70 µg/mL, *Klebsiella pneumoniae* 90 µg/mL, *Escherichia coli* için 50 90 µg/mL, *Candida albicans* için 205 µg/mL olarak bulmuştur ( Alsamhary, 2020). Velmurugan ve arkadaşlarının 2014

yılında yaptıkları çalışmada *Bacillus subtilis* EWP-46 tarafından sentezledikleri AgNP'lerin MİK değerlerini *P. fluorescens* için  $129 \pm 10.8 \mu\text{g/mL}$  ve *S. aureus* için  $116 \pm 12.6 \mu\text{g/mL}$  olarak bulmuşlardır (Velmurugan, et al., 2014). *K. turkmenica* 16K104 aracılığıyla sentezlenen gümüş nanopartiküllerin antibakteriyal etkisinin diğer bakteriler tarafından sentezlenen gümüş nanopartiküllerle karşılaştırıldığında daha yüksek miktarda olduğu yapılan çalışmalara bakıldığında görülmektedir. Antimikrobiyal aktivitesinin yüksek olması sentezlenen gümüş nanopartikülün kaynağına, boyutuna ve boyutlarının küçülmesinden dolayı meydana gelen etki ettiği yüzey alanının büyümesinden dolayı olabilmektedir.

Tablo 4.2. *Kribbella turkmenica* 16K104 tarafında sentezlenen gümüş nanopartiküllerin çalışılan patojenlere karşı MİK değerleri

<b>Bacteria</b>	<b>MİK (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2
<i>Bacillus cereus</i>	0.5
<i>Corynebacterium striatum</i>	0.5
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.5
<i>Escherichia coli</i>	0.25
<i>Klesiella pneumoniae</i>	1
<i>Enterococcus</i> spp. (VRE)	1
<i>Morganella morganii</i>	4
<i>Providencia</i> spp.	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
<i>Stapylococcus aureus</i>	1
<i>Stapylococcus epidermidis</i>	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
<i>Citrobacter freundii</i>	1



Şekil 4.27. AgNP'lerin MİK deneylerine ilişkin plaka görüntülerinden örnek

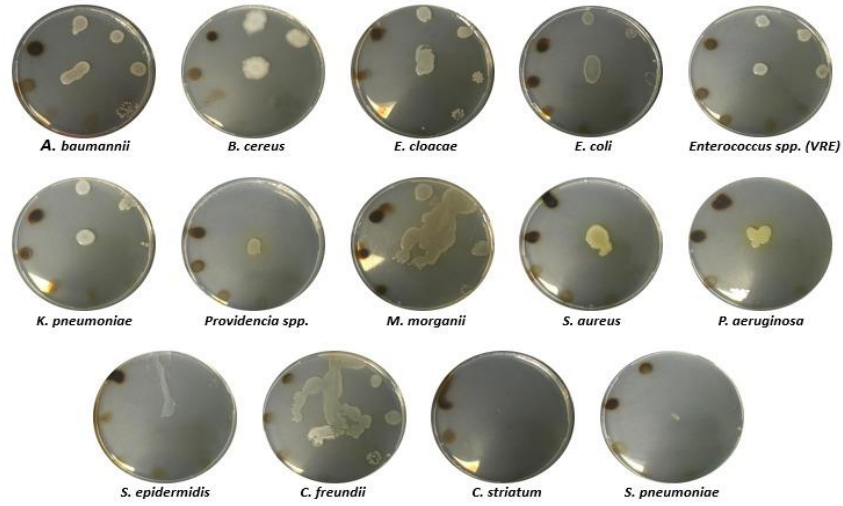
#### 4.5.3. Gümüş Nanopartiküllerin Bakteri Suşları Karşısındaki Minimum Bakterisidal Konsantrasyonları (MBK)

*K. turkmenica* 16K104 aracılığıyla sentezlenen gümüş nanopartiküllerin analizi yapılan patojen mikroorganizmalara karşı MBK değerleri Tablo 4.3.'te gösterilmektedir. MBK değerleri tespit edilirken Şekil 4.28'de üremenin görülmediği kuyulardan örnekler alınarak besiyerine damlatılmıştır. Besiyerlerinin inkübasyonu sonrasında her bir bakteri suşunun gelişimi ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Besiyeri yüzeyine damlatılanlardan bakteri gelişiminin gözlemlenmediği örneklerin alındığı kuyucuklar tespit edilmiştir. Bu kuyucuklardaki gümüş nanopartikül konsantrasyonunu bakteriyi öldürmek için gerekli konsantrasyonları ifade etmektedir. Bu kuyucuklarda bulunan en düşük nanopartikül konsantrasyonu gümüş nanopartiküllerin ilgili bakteri karşısındaki MBK değeri olarak belirlenmiştir. Gerçekleştirilen deneylerden elde edilen sonuçlara göre gümüş nanopartiküller en yüksek bakteriyosidal etkiyi *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı 1 µg/mL olarak gösterirken, *Bacillus cereus*'a karşı 2 µg/mL, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* spp. (VRE), *Klesiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* 'e karşı 8 µg/mL, *Morganella morganii* ve *Acinetobacter baumannii* 'e karşı 16 µg/mL, *Enterobacter cloacae* ve *Citrobacter freundii* 'e karşı 32 µg/mL MBK değeri göstermişlerdir. *Corynebacterium striatum*, *Providencia* spp. ve *Streptococcus pneumoniae* patojenlere karşı MBK değerleri çalışılan aralıkların üzerinde olduğu analiz edilmiştir.

Daha önceden yapılan çalışmalara bakıldığında Singh ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptıkları çalışmada *Solibacillus isronensis sp.* aracılığıyla sentezledikleri AgNP'lerin MBK değerlerini *E. Coli* için 6.25 µg/mL, *P. Aeruginosa* için 3.12 µg/mL, *S. epidermidis* ve *S. aureus* için 50 µg/mL olarak bulmuşlardır (Singh, et al., 2020). Pallavi ve arkadaşlarının 2021 yılında yaptıkları çalışmada *Streptomyces hirsutus* aracılığıyla sentezledikleri AgNP'lerin MBK değerlerini *S. aureus* ve *P. aeruginosa* için 32 µg/mL, *E. Faecalis* için 64 µg/mL, *E. Coli* için 128 µg/mL olarak elde etmişlerdir (Pallavi, et al., 2021). Bakteriler aracılığıyla sentezlenen AgNP'lerin MBK değerlerine bakıldığında *K. turkmenica* 16K104 tarafından sentezlenen nanoparçacığın diğerlerine göre bakterilerde daha fazla bakterisidal aktivite gösterdiği görülmektedir. Bu üstünlüğün sentezlenen nanopartiküllerin boyutuna, homojen dağılım göstermesine sentezlendiği mikroorganizmaya bağlı olduğu düşünülmektedir.

Tablo 4.3. *Kribbella turkmenica* 16K104 tarafında sentezlenen gümüş nanopartiküllerin çalışılan patojenlere karşı MBK değerleri.

<b>Bacteria</b>	<b>MBK (µg/mL)</b>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	16
<i>Bacillus cereus</i>	2
<i>Corynebacterium striatum</i>	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	32
<i>Escherichia coli</i>	8
<i>Klesiella pneumoniae</i>	8
<i>Enterococcus spp. (VRE)</i>	8
<i>Morganella morganii</i>	16
<i>Providencia spp.</i>	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
<i>Stapylococcus aureus</i>	1
<i>Stapylococcus epidermidis</i>	8
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	32

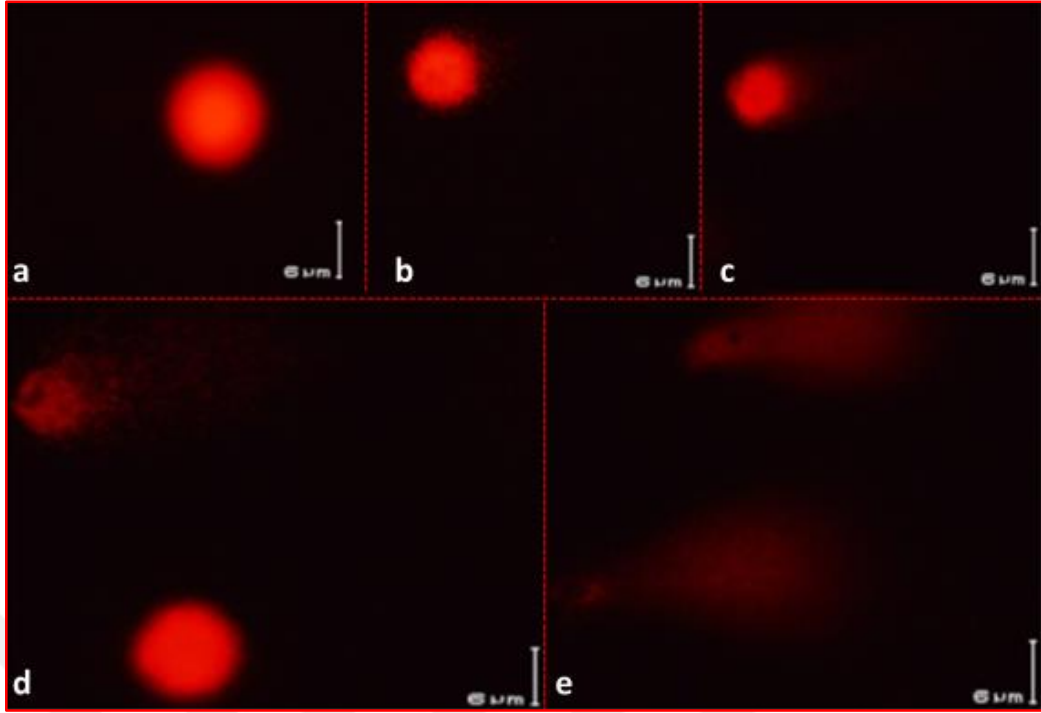


Şekil 4.28. AgNP'lerin MBK deneylerine ilişkin petri görüntülerinden örnek

#### 4.6. Gümüş Nanopartiküllerin Genotoksik Potansiyelleri

*Kribbella turkmenica* 16K104 tarafından sentezlenen gümüş nanopartiküllerin Hep G2 hücre hatlarında çalışılan genotoksisite deneylerinde meydana gelen DNA hasarlarının değerlendirilebilmesi için hücreler kuyruk uzunluklarına göre tip 0, tip 1, tip 2, tip 3 ve tip 4 olarak sınıflandırılmıştır. Şekil 4.29'da Hep G2 hücrelerinin *K. turkmenica* 16K104 aracılığıyla sentezlenen AgNP'lere maruziyeti sonucu oluşan kuyruk tiplerinin floresan mikroskop görüntüleri a) tip 0, b) tip 1, c) tip 2, d) tip 3 ve e) tip 4 şeklinde verilmiştir. Elde edilen verilere göre genotoksik potansiyelin değerlendirilmesinde genetik hasar indeks (GHI) değeri kullanılmıştır. Genetik hasar indeksi aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{GHI} = [(\% \text{ Tip 0} \times 0) + (\% \text{ Tip 1} \times 1) + (\% \text{ Tip 2} \times 2) + (\% \text{ Tip 3} \times 3) + (\% \text{ Tip 4} \times 4)] / 100$$



Şekil 4.29. Gümüş nanopartiküllerin genotoksik potansiyelini gösteren komet analiz görüntüleri

Analizin duyarlılığının belirlenmesi için hücreler hidrojen peroksit maruz bırakılmıştır. Maruziyet sonucunda genetik hasar indeksi değerinde negatif kontrole ( $0.67 \pm 0.02$ ) göre ciddi bir artış ( $1.87 \pm 0.4$ ) görülmüştür. Analiz edilen hücrelerin  $0.25$ ,  $0.5$ ,  $1$ ,  $2$ ,  $4$  ve  $8 \mu\text{g mL}^{-1}$  yoğunluklarında gümüş nanopartiküllere maruziyeti sonrasında genetik hasar indeksi sırasıyla yaklaşık  $0.69 \pm 0.02$ ,  $0.71 \pm 0.01$ ,  $0.74 \pm 0.01$ ,  $0.78 \pm 0.02$ ,  $0.80 \pm 0.03$  ve  $0.92 \pm 0.03$  olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak yorumlandığında genetik hasar indeksi değerlerinde ciddi bir artış bulunmamıştır. Ancak, hücreler  $16$  ve  $32 \mu\text{g mL}^{-1}$  yoğunluklarında gümüş nanopartiküllere maruz bırakıldığında negatif kontrole göre genetik hasar indeksinde ciddi bir artış olduğu gözlenmiştir.

Nanopartiküllerin genotoksik potansiyellerini belirlemek amacıyla yaygın olarak komet ve mikronükleus testleri kullanılmaktadır. Komet testi veya diğer bir ismiyle tek hücre jel elektroforez testi, DNA hasarı ve tamirinin tek hücre seviyesinde belirlenmesinde kullanılan çok yönlü, basit ve çeşitli hücre tiplerine uygulanabilen bir testtir. Komet, negatif yüklü DNA parçalarının, agaroz jel ortamında uygulanan elektroforez esnasında kuyruklu yıldız benzer bir görüntü oluşturmasıyla bilinen bir testtir. Bu test, DNA'da zincir kırıklarını (zincir kırığı ve tamamlanmamış kesip çıkarma onarım bölgeleri), alkali-label bölgeleri ve çapraz bağlar gibi çeşitli DNA

hasarlarının tespit edilmesinde kullanılmaktadır (Saygılı, vd., 2021). Moteriya ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptıkları çalışmada AgNP'lerin lenfosit kültüründe genotoksik potansiyellerini belirlemişlerdir. Lenfosit kültürü, AgNP'nin üç farklı konsantrasyonu (2 µg, 50 µg, 200 µg) ile muamele edilmiş ve DNA hasarı, kuyruklu yıldız uzunluğu veya kuyruk uzunluğuna göre ölçülmüştür. Negatif kontrolle karşılaştırdıklarında 2 ug ve 50 ug AgNP ile muamele edilmiş hücrelerde önemli düzeyde DNA kırığına rastlamamışlardır. Ancak, 200 ug ile muamele edilmiş hücrelerin çekirdeklerinde DNA kırıklarını belirlemişlerdir. (Moteriya and Chanda, 2020). Daha önce AgNP'lerin genotoksik potansiyellerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda genelde kimyasal olarak sentezlenen AgNP'ler veya biyolojik sentez yoluyla mantarlar ve bitki özütleri kullanılarak analizler yapılmıştır. Yapılan çalışma ile bakteriler tarafından sentezlenen AgNP'lerin genotoksik potansiyeli hakkında bilgiler literatüre kazandırılmıştır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gerçekleştirilen tez çalışmasında AgNP'lerin sentezi *Kribbella turkmenica* 16K104 tarafından biyolojik yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. AgNP'lerin sentezi zararlı kimyasalların olmadığı, yüksek sıcaklık ve enerji gerektirmeyen koşullarda olmuştur; ayrıca bitki ve mantarlar kullanılmadığı için sentezin daha kısa sürede ve düşük maliyetle gerçekleşmesi sağlanmıştır. AgNP'lerin en yüksek verimde, en küçük boyutta ve homojen bir şekilde dağılım göstererek sentezlenebilmesi için reaksiyon koşulları ve kültür ortamının bileşenleri optimize edilmiştir. Optimum koşullarda sentezlenen AgNP'lerin karakterizasyonu belirlemek amacıyla bazı analizler yapılmıştır. Bunlar; SEM, EDS, DLS, FTIR, Zeta potansiyel ve XRD'dir. Optimum koşullarda sentezlenen AgNP'ler negatif yüklü, küresel şekilde ve 4-20 nm boyutları arasında homojen dağılım göstermektedir. Optimum koşullar altında sentezlenen AgNP'lerin endüstriyel amaçlı kullanımı için büyük ölçekli üretimi biyoreaktör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Endüstriyel amaçlı kullanımda AgNP'lerin kararlılığı ve uzun süre homojen bir şekilde dağılım göstererek saklanması son derece önemli ve rakipleriyle yarışmasında büyük bir fırsattır. Sentezlenen AgNP'lerin patojen mikroorganizmalara karşı mikrobiyal aktiviteleri analiz edilmiş ve *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Klesiella pneumoniae*, *Enterococcus spp. (VRE)*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stapylococcus aureus* ve *Stapylococcus epidermidis'* e karşı inhibe edici ve öldürücü ajan olarak kullanılabilecekleri belirlenmiştir. Ek olarak, genotoksisite değerlendirmesi sonucunda test edilen düşük yoğunluklarda, sentezlenen AgNP'lerin DNA hasarına neden olmadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, sentezlenen AgNP'lerin farklı uygulama alanlarında güvenilir şekilde kullanılabileceği önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Adıgüzel, A., Adıgüzel, S., MAZMANCI, B., Tunçer, M., & Mazmancı, M. (2018). Silver nanoparticle biosynthesis from newly isolated streptomyces genus from soil. *Materials Research Express*, 5(4), 045402.
- Ahmad, S., Das, S., Khatoun, A., Ansari, M., Afzal, M., Hasnain, M., & Nayak, A. (2020). Bactericidal Activity of Silver Nanoparticles: A Mechanistic Review. *Materials Science for Energy Technologies*.
- Ahmad, S., Munir, S., zeb, n., Ullah, A., Khan, B., Ali, J., . . . Ali, S. (2019). Green nanotechnology: a review on green synthesis of silver nanoparticles — an ecofriendly approach . *International Journal of Nanomedicine*, 14 5087–5107.
- Ajitha, B., Reddy, Y., Reddy, P., Suneeth, Y., Jeon , H.-J., & Ahn, C. (2016). Instant biosynthesis of silver nanoparticles using Lawsonia inermis leaf extract: Innate catalytic, antimicrobial and antioxidant activities . *Journal of Molecular Liquids* 219, 474-481.
- Akçay, F., & Avcı, A. (2018). Bakteriyel Yollarla Metal Nanopartiküllerin Sentezi. *Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 6(4) , 408-414.
- Akintelu, S., Bo, Y., & Folorunso, A. (2020). A Review on Synthesis, Optimization, Mechanism, Characterization, and Antibacterial Application of Silver Nanoparticles Synthesized from Plants . *Journal of Chemistry*.
- Alam, A., Tanveer, F., Khalil, A., Zohra, T., Khamlich, S., Alam, M., . . . Maaza, M. (2021). Silver nanoparticles biosynthesized from secondary metabolite producing marine actinobacteria and evaluation of their biomedical potential. *Antonie van Leeuwenhoek*, 114(10), 1497-1516.
- Almalah,, H., Alzahrani, H., & Abdelkader, H. (2019). Green Synthesis of Silver Nanoparticles using Cinnamomum Zylincicum and their Synergistic Effect against Multi-Drug Resistance Bacteria. *Journal of Nanotechnology Research*, 95-107.
- Alsamhary, K. (2020). Eco-friendly synthesis of silver nanoparticles by Bacillus subtilis and their antibacterial activity. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(8), , 2185-2191.
- Aydın, Ç., & Pehlivanoglu, S. (2019). Biberiye Özü ile Biyosentezi ve MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde Sitotoksik Etkisi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 10(2), , 172-176.
- Awwad, A., Salem, N., & Abdeen, A. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles using carob leaf extract and its antibacterial activity. *International journal of Industrial chemistry*, 4(1),, 1-6.
- Badi'ah, H., Seede, F., Supriyanto, G., & Zaidan, A. (2019). Synthesis of silver nanoparticles and the development in analysis method. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 217, No. 1, p. 012005)*.
- Baker, S., Kumar, M., Santosh, P., Rakshith, D., & Satish, S. (2015). Extracellular synthesis of silver nanoparticles by novel Pseudomonas veronii AS41G inhabiting Annona squamosa L. and their bactericidal activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136,, 1434-1440.
- Bakht Dalir, S., Djahaniani, H., Nabati, F., & Hekmati, M. (2020). Characterization and the evaluation of antimicrobial activities of silver nanoparticles biosynthesized from Carya illinoensis leaf extract. *Heliyon*, 6(3), e03624.

- Bamal, D., Singh, A., Chaudhary, G., Kumar, M., Singh, M., Rani, N., . . . Sehrawat, A. (2021). Silver nanoparticles biosynthesis, characterization, antimicrobial activities, applications, cytotoxicity and safety issues: An updated review. *Nanomaterials*, 11(8), 2086.
- Beykaya, M., & Çağlar, A. (2016). Bitkisel Özütlere Kullanılarak Gümüş-Nanopartikül (AgNP) Sentezlenmesi ve Antimikrobiyal Etkinlikleri Üzerine Bir Araştırma. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 035403 (631-641).
- Bruna, T., Maldonado-Bravo, F., Jara, P., & Caro, N. (2021). Silver nanoparticles and their antibacterial applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 7202.
- Chutrakulwong, F., Thamaphat, K., & Limsuwan, P. (2020). Photo-irradiation induced green synthesis of highly stable silver nanoparticles using durian rind biomass: Effects of light intensity, exposure time and pH on silver nanoparticles formation. *Journal of Physics Communications*, 4(9), 095015.
- Crisan, C., Mocan, T., Manolea, M., Lasca, L., Tăbăran, F.-A., & Mocan, L. (2021). Review on silver nanoparticles as a novel class of antibacterial solutions. *Applied Sciences*, 11(3), 1120.
- Dhand, V., Soumya, L., Bharadwaj, S., Chakra, S., Bhatt, D., & Sreedhar, B. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles using Coffea arabica seed extract and its antibacterial activity. *Materials Science and Engineering C*, 36-43.
- Dong, H., Bin, W., & Melnik, R. (2014). Relative importance of grain boundaries and size effects in thermal conductivity of nanocrystalline materials. *Scientific reports*, 4(1), 1-5.
- Duan, H., Wang, D., & Li, Y. (2015). Green chemistry for nanoparticle synthesis. *Chemical Society Reviews*, vol. 44, no. 16, pp. 5778-5792, 2015.
- Duman, F., Şahin, U., & Atabani, A. (2019). Harvesting of blooming microalgae using green synthesized magnetic maghemite ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticles for biofuel production. *Fuel*, 256, 115935.
- Elamawi, R., Al-Harbi, R., & Hend, A. (2018). Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Trichoderma longibrachiatum* and their effect on phytopathogenic fungi. *Egyptian journal of biological pest control*, 28(1), 1-11.
- El-Bendary, M., Moharam, M., Hamed, S., Abo El-Ola, S., Khalil, S., Mounie, M., . . . Allam, M. (2021). Mycosynthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus caespitosus*: Characterization, antimicrobial activities, cytotoxicity, and their performance as an antimicrobial agent for textile materials. *Applied Organometallic Chemistry*, 35(9), e6338.
- Eraslan, T. (2020). Daphne oleoides' den sentezlenen gümüş nanopartiküllerin antioksidan aktivitesinin değerlendirilmesi. *Necmettin Erbakan Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi*.
- Erci, F. (2018). Yeşil Sentez İle Elde Edilen Metal Nanopartiküllerin Antimikrobiyal Ve Antibiyofilm Etkinliklerinin Değerlendirilmesi. Doktora tezi. *Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı, İstanbul*, 3.
- Esmeray, E., & Özata, O. (2019). Nanopartiküllerin Çevre Mühendisliği Alanında Kullanımı ve Temel Laboratuvar Malzemeleri ile Gümüş Nanopartikül (AgNPs) Sentezi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi* (16), 521-527.
- Fayaz, A., Balaji, K., Kalaichelvan, P., & Venkatesan, R. (2009). Fungal based synthesis of silver nanoparticles—an effect of temperature on the size of particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74(1), 123-126.

- Feroze, N., Arshad, B., Younas, M., Afridi, M., Saqib, S., & Ayaz, A. (2020). Fungal mediated synthesis of silver nanoparticles and evaluation of antibacterial activity. *Microscopy Research and Technique*, 83(1), 72-80.
- Fouad, H., Hongjie, L., Yanmei, D., Baoting, Y., El-Shakh, A., Abbas, G., & Jianchu, M. (2017). Synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* to control filarial vector *Culex pipiens pallens* and its antimicrobial activity. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 45(7), 1369-1378.
- Gahlawat, G., & Choudhury, A. (2019). A review on the biosynthesis of metal and metal salt nanoparticles by microbes. *RSC Advances* 9(23), 12944-12967.
- Garg, D., Sarkar, A., Chand, P., Bansal, P., Gola, D., Sharma, S., . . . Randhir, B. (2020). Synthesis of silver nanoparticles utilizing various biological systems: mechanisms and applications—a review. *Progress in Biomaterials*, 1-15.
- Garibo, D., Borbón-Nuñez, H., Díaz de León, J., Mendoza, E., Estrada, I., Toledano-Magaña, Y., . . . Susarrey-Arce, A. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles using *Lysiloma acapulcensis* exhibit high-antimicrobial activity. *Scientific reports*, 10(1), 1-11.
- Gengan, R., Anand, K., Phulukdaree, A., & Chuturgoon, A. (2013). A549 lung cell line activity of biosynthesized silver nanoparticles using *Albizia adianthifolia* leaf. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 105, 87-91.
- Ghodake, G., Kim, M., Sung, J.-S., Shinde, S., Yang, J., Hwang, K., & Kim, D.-Y. (2020). Extracellular synthesis and characterization of silver nanoparticles—Antibacterial activity against multidrug-resistant bacterial strains. *Nanomaterials*, 10(2), 360.
- Gündoğan, M. (2021). *Onosma sericeum* willd. bitkisinin kök ekstresinden ve ekstreden sentezlenmiş gümüş nanopartikülden oluşan yara kremi formülasyonlarının geliştirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi*.
- Hammamchi, H. (2019). *Biyolojik Yollar ile Sentezlenen Organik / İnorganik Nanopartiküllerin Bioaktivitelerinin Belirlenmesi ve Tedavi Amaçlı Kullanımları. Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi.*
- Hulikere, M., & Joshi, C. (2019). Characterization, antioxidant and antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized using marine endophytic fungus-*Cladosporium cladosporioides*. *Process biochemistry*, 82, 199-204.
- Huq, A. (2020). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Pseudoduganella eburnea* MAHUQ-39 and Their Antimicrobial Mechanisms Investigation against Drug Resistant Human Pathogens. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1510.
- Hussein, N., & Muslim, A. (2019). Detection of the antibacterial activity of AgNPs biosynthesized by *Pseudomonas aeruginosa*. *The Iraqi Journal of Agricultural Science*, 50(2), 617-25.
- Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S., & Zolfaghari, B. (2014). Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences* 9(6), 385.
- Iqtedar, M., Aslam, M., Akhyar, M., Shehzaad, A., Abdullah, R., & Kaleem, A. (2019). Extracellular biosynthesis, characterization, optimization of silver nanoparticles (AgNPs) using *Bacillus mojavensis* BTCB15 and its antimicrobial activity against multidrug resistant pathogens. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 49(2), 136-142., 136-142.

- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y., Dufresne, A., & Danquah, M. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials history, sources, toxicity and regulations . *Beilstein journal of nanotechnolog* , 9(1), 1050-1074.
- Ji, H., Zhou, S., Fu, Y., Wang, Y., Mi, J., Lu, T., . . . Lü, C. (2020). Size-controllable preparation and antibacterial mechanism of thermoresponsive copolymer-stabilized silver nanoparticles with high antimicrobial activity . *Materials Science and Engineering: C*, 110, 110735.
- Kah, M., Kookana, R., Gogos, A., & Bucheli, T. (2018 ). A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues . *Nature Nanotechnology* 13(8), 677-684.
- Kalemtaş, A. (2019). Gıda Ambalajlarında Nanoteknoloji Uygulamaları .
- Kratošová, G., Holišová, V., Konvičková, Z., Ingle, A., Gaikwad, S., Škrlová, K., . . . Plach, D. (2018). From Biotechnology Principles to Functional and Low-cost Metallic Bionanocatalysts. *Biotechnology advances*, 37(1), 154-176.
- Kumar, C., & Mamidyala, S. (2011). Extracellular synthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84(2), 462-466.
- Kumar, S., Rajendran, N., Houreld, N., & Abrahamse, H. (2018). Recent Advances on Silver Nanoparticle and Biopolymer Based Biomaterials for Wound Healing Applications . *International journal of biological macromolecules* 115, 165-175.
- Kütük, Y. (2019). Konsantre güneş ışığı ve mikrodalga yöntemi kullanılarak gümüş nanopartiküllerin fitosentezi, karakterizasyonu, sitotoksikite ve antibakteriyel özelliklerinin değerlendirilmesi. *Yıldız Teknik Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi*.
- Lee, S., & Jun, B.-H. (2019). Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. *International journal of molecular sciences*, 20(4), 865.
- Lin , P.-C., Lin , S., Wang, P., & Sridhar, R. (2014). Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology advances*, 32(4), 711-726.
- Marsili, E., & Das, S. (2016). Biosynthetic nanoparticles for biotechnological and biomedical applications . *Enzyme and Microbial Technology* 100(95), 1-3.
- M.Saravanan. (2010). Extracellular synthesis of silver bionanoparticles from *Aspergillus clavatus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* , 214-218 .
- Molnár, Z., Bódai, V., Szakacs, G., Erdély, B., Fogarassy, Z., Sáfrán, G., . . . Lagz, I. (2018). Green synthesis of gold nanoparticles by thermophilic filamentous fungi. *Scientific reports*, 8(1), 1-12.
- Moteriya, P., & Chanda, S. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles from *Caesalpinia pulcherrima* leaf extract and evaluation of their antimicrobial, cytotoxic and genotoxic potential (3-in-1 system). *ournal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 30(10), 3920-3932.
- Narayanan, K. B. (2010). Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Advances in Colloid and Interface Science* , 156(1-2), 1-13.
- Naser, D., Abbas, A., & Aadim, K. (2020). Zeta Potential of Ag, Cu, ZnO, CdO and Sn Nanoparticles Prepared by Pulse Laser Ablation in Liquid Environment. *Iraqi Journal of Science*, 2570-2581.
- Nasrollahzadeh, M., Sajadi, S., Sajjadi, M., & Issaabadi, Z. (2019). An Introduction to Nanotechnology. *Interface Science and Technology vol. 28: Elsevier* , 1-27.

- Özcan, K. (2019). Yıldız Gölü Sedimentinden İzole Edilen Aktinobakterilerin Antimikrobiyal ve Enzim Üretim Kapasitelerinin Araştırılması . *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 9(1), 144-151.
- Özdoğan, E., Demir, A., & Seventekin, N. (2006). Nanoteknoloji ve Tekstil Uygulamaları. *Tekstil ve Konfeksiyon*, 16(3), 160-168.
- Öztürk, B., Gürsu, B., & Dağ, İ. (2020). Antibiofilm and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles using marine red algae *Gelidium corneum*. *Process Biochemistry*, 89, 208-219.
- Pallavi, S., Rudayni, H., Bepari, A., Niazi, S., & Nayaka, S. (2021). Green synthesis of Silver nanoparticles using *Streptomyces hirsutus* strain SNPGA-8 and their characterization, antimicrobial activity, and anticancer activity against human lung carcinoma cell line A549. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L., Campos, E., Torres, M., Torres, L., . . . Shin, H.-S. (2018). Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 16, no. 1, p. 71,.
- Prakasham, R., Kumar, B., Kumar, Y., & Shankar, G. (2012). Characterization of silver nanoparticles synthesized by using marine isolate *Streptomyces albidoflavus*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 22(5), 614-621.
- Pugazhendhi, A., Prabakar, D., Jacob, J., Karuppusamy, I., & Saratale, R. (2018). Synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Gelidium amansii* and its antimicrobial property against various pathogenic bacteria. *Microbial pathogenesis*, 114, 41-45.
- Ramanathan, S., Gopinath, S., MdArshad, M., Poopalan, P., & Perumal, V. (2021). Nanoparticle synthetic methods: strength and limitations . *In Nanoparticles in Analytical and Medical Devices*, 31-43.
- Ramsden, J. J. (2005). What is nanotechnology? *Department of Advanced Materials, Cranfield University, Bedfordshire, UK. Nanotechnology Perception*, 1, 3-17.
- Rao, J., & Paria, S. (2013). Green Synthesis of Silver Nanoparticles from Aqueous *Aegle marmelos* Leaf Extract. *Materials Research Bulletin* 48(2), 628-634.
- Saka, E., & Gülel, G. (2015). Gıda Endüstrisinde Nanoteknoloji Uygulamaları . *Etilik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 26(2), 52-57.
- Salleh, A., Naomi, R., Utami, N. D., Mohammad, A., Mahmoudi, E., Mustafa, N., & Fauzi, M. (2020). The Potential of Silver Nanoparticles for Antiviral and Antibacterial Applications: A Mechanism of Action . *Nanomaterials*, 10(8), 1566.
- Sanjivkumar, M., Vaishnavi, R., Neelakannan, M., Kannan, D., Silambarasan, T., & Immanuel, G. (2019). Investigation on characterization and biomedical properties of silver nanoparticles synthesized by an actinobacterium *Streptomyces olivaceus* (MSU3). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 151-159.
- Saygılı, T. (2021). Gümüş nanopartikül içeren polimer esaslı antibakteriyel nanoliflerin elektrospın yöntemiyle üretimi . *Konya Teknik Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi*.
- Saygılı, Y., Ünal, F., & Yüzbaşıoğlu, D. (2021). Metal Oksit Nanopartiküllerin Genotoksik Etkileri . *International Journal of Advances in Engineering and Pure Sciences*, 33(3), 429-443.
- Saygin, H., Ay, H., Guven, K., & Sahin, N. (2019). *Kribbella turkmenica* sp. nov., isolated from the Karakum Desert. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 69(8), 2533-2540.

- Shah, A., & Rather, M. (2020). Effect of calcination temperature on the crystallite size, particle size and zeta potential of TiO<sub>2</sub> nanoparticles synthesized via polyol-mediated method. *Materials Today: Proceedings* (44), 482-488.
- Singh, P., Pandit, S., Mokkalapati, V., Garnæs, J., & Mijakovic, I. (2020). A sustainable approach for the green synthesis of silver nanoparticles from *Solibacillus isronensis* sp. and their application in biofilm inhibition. *Molecules*, 25(12), 2783.
- Singh, P., Singh, H., Kim, Y., Mathiyalagan, R., Wang, C., & Yang, D. (2016). Extracellular synthesis of silver and gold nanoparticles by *Sporosarcina koreensis* DC4 and their biological applications. *Enzyme and microbial technology*, 86, 75-83.
- Singh, R., Shedbalkar, U., Wadhvani, S., & Chopade, B. (2015). Bacteriogenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism, and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(11), 4579-4593.
- Singh, Y., Kaushal, S., & Singh Sodhi, R. (2020). Biogenic synthesis of silver nanoparticles using cyanobacterium *Leptolyngbya* sp. WUC 59 cell-free extract and their effects on bacterial growth and seed germination. *Nanoscale Advances*, 2(9), 3972-3982.
- Singh, H., Du, J., Singh, P., & Yi, T. (2018). Extracellular synthesis of silver nanoparticles by *Pseudomonas* sp. THG-LS1. 4 and their antimicrobial application. *Journal of pharmaceutical analysis*, 8(4), 258-264., 258-264.
- Singh, P., Kim, Y.-J., Zhang, D., & Yang, D.-C. (2016). Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. *Trends in biotechnology*, 34(7), 588-599.
- Taha, Z., Hawar, S., & Sulaiman, G. (2019). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles from *Penicillium italicum* and its antioxidant, antimicrobial and cytotoxicity activities. *Biotechnol Lett* 41(8), 899-914.
- Thakkar, K. N. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine*, 257–262.
- Uyanıkgil, E., & Salmanoğlu, D. (2020). Metalik nanopartiküllerin hedeflendirilmesi. *Ege Journal of Medicine*, 59 (1): 71-81.
- Ünal, İ. (2019). rheum ribers (ışgın) ve paeonia kesraunensis (ayıgülü) bitkilerinin ekstraktından gümüş nanopartikül sentezi, karakterizasyonu ve sitotoksitesinin belirlenmesi. *Doktora tezi Tokat GaziOsman Paşa Üniversitesi*, 17.
- Ünşar, E., & Perendeci, N. (2016). Nanopartiküllerin çevresel akıbetleri ve anaerobik parçalanma prosesine etkileri. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 22(6), 503-512.
- Wei, L., Lu, J., Xu, H., & Patel, A. (2015). Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discovery Today* 20(5), 595-601.
- Xu, L., Wang, Y.-Y., Chen, C.-Y., Wang, Z.-X., & Xie, H. (2020). Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. *Theranostics*, 10(20): 8996-9031.
- Velmurugan, P., Iydroose, M., Mohideen, M., Mohan, T., Cho, M., & Oh, B.-T. (2014). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Bacillus subtilis* EWP-46 cell-free extract and evaluation of its antibacterial activity. *Bioprocess and biosystems engineering*, 37(8), 1527-1534.
- Yousaf, H., Mehmood, A., Ahmad, K., & Raffi, M. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles and their applications as an alternative antibacterial and antioxidant agents. *Materials Science and Engineering: C*, 112, 110901.

- Y. Kumarasmy, K. G. (2015). The Applications of Nanotechnology In Mechanical Engineering. in *International Conference on Modeling & Simulation (ICMS'15)*, (ICMS'15).
- Yin, I. X. (2020). The Antibacterial Mechanism of Silver. *International Journal of Nanomedicine*, 2555.
- Zaki, S., Kady, M., & Abd-El-Haleem, D. (2011). Biosynthesis and structural characterization of silver nanoparticles from bacterial isolates. *Materials research bulletin*, 46(10), , 1571-1576.
- Zayed, M., Eisa, W., & Shabaka, A. (2012). Malva parviflora extract assisted green synthesis of silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 98,, 423-428.
- Zhang, T., Wang, L., Chen, Q., & Chen, C. (2014). Cytotoxic Potential of Silver Nanoparticles . *Yonsei medical journal*, 55(2), 283-291.



## ÖZ GEÇMİŞ

Tuğba ÇELİK, Amasya Anadolu Öğretmen Lisesi'ni bitirdikten sonra Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi'nden 2018 yılında mezun oldu. 2019 yılında OMÜ LEE Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans programına girdi.

### İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0001-5918-253X

### Yayımlar:

1. Çelik T., Yağız N., Doruk T., Tuncer M., Adıgüzel A. O. Co-Production Of Pectinase, Cellulase And Xylanase By Thermophylic Aspergillus Sp. 55SZ For Clarification Of Fruit Juices. 2019/10. 6 th International Conference on Sustainable Agriculture and Environment October 3-5, 2019, City of KONYA – TURKEY.
2. Çelik T, Könen Adıgüzel S, Adıgüzel AO, 2021. Gümüş Nanoparçacıklarının Kribbella turkmenica 16K104 Aracılığıyla Sentezi, Karakterizasyonu, Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi ve Genotoksik Potansiyelinin Değerlendirilmesi. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(4): 3138-3151

### Kazanılan Ödüller, Teşvikler ve Burslar

1. OMÜ BAP tarafından 1904 nolu proje desteği
- 2.