

Mikroalg Aracılı Altın Nanopartiküllerinin Biyosentezi, Karakterizasyonu ve Antifungal
Etkilerinin Değerlendirilmesi

Nurbanu Gürsoy

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı

Mart 2020

Biosynthesis, Characterization of and Microalgae Mediated Gold Nanoparticles and
Evaluation of Their Antifungal Effects

Nurbanu Gursoy

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biotechnology and Biosafety

March 2020

Mikroalg Aracılı Altın Nanopartiküllerinin Biyosentezi, Karakterizasyonu ve Antifungal Etkilerinin Değerlendirilmesi

Nurbanu Gürsoy

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. İlknur Dağ

Bu tez ESOGU BAP tarafından “2019-2519” no’lu proje çerçevesinde desteklenmiştir.

Mart 2020

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. İlknur DAĞ danışmanlığında hazırlamış olduğum “Mikroalg Aracılı Altın Nanopartiküllerinin Biyosentezi, Karakterizasyonu ve Antifungal Etkilerinin Değerlendirilmesi” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 05 / 03 / 2020

Nurbanu Gürsoy
İmza

ÖZET

Algler ekosistem bütünlüğünün korunmasında çok önemli canlı gruplarıdır. Yapılarında çeşitli minerallerin yanı sıra vitaminler, antioksidanlar, terpenler ya da flavonoidler gibi çeşitli bileşikler bulundurulur. Bu bileşikler nanobiyoteknolojide biyolojik indirgeyici ajan olarak sıkça kullanılmaya başlanmıştır. Nanoteknolojik çalışmalar endüstri, teknoloji ve tıp alanlarındaki yaygın uygulamaları nedeniyle, çeşitli nanomalzemelerin üretimi için yoğun talep görmektedir. Nanopartiküllerin sentezlenme aşaması genel olarak kimyasal yollarla gerçekleşir ancak bu olay oldukça yüksek maliyetler gerektirir. Son yıllarda daha ekonomik ve daha az kimyasal gerektiren çevre dostu üretim teknikleri üzerine yoğunlaşılmaktadır ve bu üretim tekniği ‘Yeşil Sentez’ olarak adlandırılmaktadır.

Çalışmamızda, Eskişehir il sınırlarında yer alan Musaözü göletinden izole ve identifiye edilen yeşil mikroalgler kullanılmış ve yeşil sentez yoluyla altın nanopartikül eldesi için pH, metal tuzu konsantrasyonu ve zaman parametreleri kullanılarak optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen nanopartiküller UV-Vis spektrofotometre, dinamik ışık saçılımı (DLS), Zeta-sizer, X-ışını kırınımı (XRD), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile karakterize edilmiştir. *Chlorella* özütünden elde edilen nanopartiküller ortama 5-15 nm, *Scenedesmus* özütünden elde edilen nanopartiküller ise ortama 3-15 nm boyutunda ve küresel yapıdadır. Broth mikrodilüsyon ve agar disk difüzyon testleri kullanılarak altın nanopartiküllerin standart ve klinik *Candida* izolatları üzerine güçlü antifungal etkileri tespit edilmiştir. Altın nanopartiküller ile *Candida* hücreleri arasındaki morfolojik ve hücresel etkileşimler TEM ile değerlendirilmiştir. Nanopartiküller genel olarak hücre üzerinde duvar ve membran yapılarını hasarlandırmış, sonrasında da stoplazma erimeleri ve düzensizlikleriyle etkisini göstermiştir. Sonuç olarak yeşil sentez ile elde edilen altın nanopartiküller medikal ve endüstriyel kullanım için güçlü bir potansiyele sahiptirler.

Anahtar Kelimeler: Mikroalg, Altın nanopartikül, Karakterizasyon, Antifungal

SUMMARY

Algae are one of the important living group in maintaining the integrity of the ecosystem and they provide nutrient and protection for aquatic organisms. They have various minerals as well as vitamins, antioxidants, terpenes or flavonoids in their structural compounds. Nanotechnological studies due to widespread applications in the fields of industry, technology and medicine see high demand for the production of various nanomaterials. The synthesis process of nanoparticles usually takes place chemically, however, requires very high costs. In recent years, it is focused on more economical and requires less chemical environmentally friendly production techniques and these production technique is called 'Green Synthesis'.

In our study, green microalgae isolated and identified from Musaözü pond located in the provincial borders of Eskişehir were used and optimization was performed using the pH, metal salt concentration, and time parameters to obtain gold nanoparticle by green synthesis. Synthesized nanoparticles will be characterized by UV-Vis spectrophotometer, dynamic light scattering (DLS), Zeta-sizer, X-ray diffraction pattern (XRD), alternately Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) and transmission electron micro (TEM). Nanoparticles obtained from *Chlorella* extract are 5-15 nm, and nanoparticles obtained from *Scenedesmus* extract are 3-15 nm in size and spherical. Strong antifungal effects of gold nanoparticles were determined on standard and clinical *Candida* isolates of gold nanoparticles using broth microdilution and agar disc diffusion tests. Morphological and cellular interactions between gold nanoparticles and *Candida* cells were evaluated by TEM. Nanoparticles generally damaged the wall and membrane structures on the cell and then showed an effect with cytoplasm melting and irregularities. As a result, gold nanoparticles obtained by green synthesis have a strong potential for medical and industrial use.

Keywords: Microalgae, Green synthesis, Gold nanoparticle, Characterization, Antifungal

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince gösterdikleri yakın ilgiyle, anlayışla, güler yüzleriyle, değerli zamanlarını benim için ayıran ve beni yönlendiren, kıymetli tecrübelerinden faydalandığım danışman hocam Prof. Dr. İlknur DAĞ ve danışman hocam gibi çalışmamın tüm aşamalarında bana yol gösteren, değerli yardım ve katkılarıyla ufkumu genişleten Doç. Dr. Betül Yılmaz ÖZTÜRK hocalarıma,

Çalışmalarımın ilgili kısımlarını gerçekleştirebilmem için değerli bilgi ve desteklerini benden esirgemeyen değerli Öğr. Gör. Dr. Bükay Yenice GÜRSU ve Öğr. Gör. Tayfun ŞENGEL'e,

Her türlü destekleri için ESOGÜ-ARUM'daki tüm ekibe,

Tez çalışmamı 2019-2519 no'lu proje ile destekleyen ESOGU-BAP'a,

Tüm eğitim hayatımda maddi ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan çok değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	3
2.1. Nanoteknoloji	3
2.1.1. Tanımı ve tarihçesi	3
2.1.2. Uygulama alanları	4
2.2. Nanopartiküllerin Sınıflandırılması.....	4
2.3. Metal Nanopartiküller	5
2.3.1. Uygulama alanları	5
2.3.2. Metal nanopartikül çeşitleri.....	6
2.3.2.1. <u>Altın nanopartiküller</u>	7
2.4. Nanopartikül Sentezinin Genel Mekanizması	8
2.5. Metal Nanopartiküllerin Sentez Yöntemleri	8
2.5.1. Fiziksel ve kimyasal yöntem	9
2.6. Biyosentez (Yeşil Sentez)	10
2.6.1 Mikroorganizmalar ile nanopartikül sentezi	11
2.6.2. Bitkiler ile nanopartikül sentezi	12

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.6.3. Algler ile nanopartikül sentezi	14
2.7. Algler.....	17
2.7.1. Alglerin kullanım alanları	17
2.7.2. Alglerin sınıflandırılması	18
2.7.3. Çalışmamızda kullanılan alg türleri	20
2.8. Sentezlenen Nanopartiküllerin Karakterizasyon Yöntemleri.....	20
2.9. Nanopartiküllerin Antifungal Etkileri	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM	23
3.1. Kullanılan Mikroorganizmalar	23
3.2. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar	23
3.3. Kullanılan Cihazlar.....	25
3.4. Alglerin Toplanması ve Hazırlanması	25
3.5. Alg Özütlelerinin Hazırlanması	26
3.6. Altın Nanopartiküllerin Sentezlenmesi	26
3.6.1. Altın nanopartikül sentezinde pH optimizasyonu	27
3.6.2. Altın nanopartikül sentezinde metal tuzu optimizasyonu	27
3.6.3. Altın nanopartikül sentezinde zaman optimizasyonu.....	27
3.7. Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	27
3.8. Altın Nanopartiküllerin Antifungal Etkisinin Değerlendirilmesi	29
3.8.1. Antifungal duyarlılık testleri	29
3.8.1.1. <u>Agar difüzyon testi</u>	29
3.8.1.2. <u>MİK ve MFK testleri</u>	29
3.8.2. Etken maddelerin <i>Candida</i> izolatları üzerine etkisinin TEM ile incelenmesi	30
4.BULGULAR VE TARTIŞMA	31
4.1. Alglerin Çoğaltılması	31

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.1.1. Ters (inverted) mikroskopik inceleme	33
4.2. Altın Nanopartiküllerin Sentezlenmesi	34
4.2.1. Elde edilen altın nanopartiküllerin UV-Vis karakterizasyonu	34
4.2.1.1. <i>C. sorokiniana</i> ile nanopartikül sentezinde pH optimizasyonu	34
4.2.1.2. <i>C. sorokiniana</i> ile nanopartikül sentezinde tuz optimizasyonu	36
4.2.1.3. <i>C. sorokiniana</i> ile nanopartikül sentezinde zaman optimizasyonu	37
4.2.1.4. <i>S. incrassatus</i> ile nanopartikül sentezinde pH optimizasyonu	39
4.2.1.5. <i>S. incrassatus</i> ile nanopartikül sentezinde tuz optimizasyonu	41
4.2.1.6. <i>S. incrassatus</i> ile nanopartikül sentezinde zaman optimizasyonu	42
4.3. Karakterizasyon	45
4.3.1. Altın nanopartiküllerinin ZETA ve DLS karakterizasyonu	45
4.3.2. Altın nanopartiküllerinin FE-SEM karakterizasyonu	48
4.3.3. Altın nanopartiküllerin TEM ile karakterizasyonu	50
4.3.4. Altın nanopartiküllerin FTIR ile karakterizasyonu	52
4.3.5. Altın nanopartiküllerinin XRD karakterizasyonu	55
4.4. Nanopartiküllerin Antifungal Etkisinin Değerlendirilmesi	56
4.4.1. Agar difüzyon testi	56
4.4.2. MİK ve MFK Sonuçları	58
4.4.3. Etkin maddelerin <i>Candida</i> izolatları üzerine etkisinin TEM ile incelenmesi	59
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	64
KAYNAKLAR DİZİNİ	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Nanopartikül sentez basamakları.....	26
4.1. BG-11 katı besiyerinde çoğalan ve göletin farklı yerlerinden izole edilen alg kolonileri: üsttekiler epifitik, alttakiler epilitik	31
4.2. Alg hücrelerinin invert mikroskop altında seyreltme prosedürü ile saflaştırılması	32
4.3. BG-11 sıvı besiyerlerindeki solda <i>Scenedesmus incrassatulus</i> ve sağda <i>Chlorella sorokiniana</i>	32
4.4. <i>Chlorella sorokiniana</i> türünün ters mikroskop görüntüsü	33
4.5. <i>Scenedesmus incrassatulus</i> türünün ters mikroskop görüntüsü	33
4.6. <i>C. sorokiniana</i> ile nanopartikül sentezinde pH değişimine bağlı olarak reaksiyonlarda gözlenen renk farklılıkları	35
4.7. <i>C. sorokiniana</i> ile nanopartikül sentezinde pH optimizasyonu için UV-Vis analizi ...	35
4.8. <i>C. sorokiniana</i> ile nanopartikül sentezinde altın tuzu molaritesine bağlı olarak reaksiyon öncesi ve sonrası renk değişimleri.....	36
4.9. <i>C. sorokiniana</i> ile nanopartikül sentezinde tuz optimizasyonu için UV-Vis analizi ...	37
4.10. <i>C. sorokiniana</i> ile nanopartikül sentezinde zamana bağlı olarak gerçekleşen renk değişimi	38
4.11. <i>C. sorokiniana</i> ile nanopartikül sentezinde zaman optimizasyonu için UV-vis analizi	39
4.12. <i>S. incrassatulus</i> ile nanopartikül sentezinde pH değişimine bağlı olarak reaksiyonlarda gözlenen renk farklılıkları	40
4.13. <i>S. incrassatulus</i> ile nanopartikül sentezinde pH optimizasyonu için UV-vis analizi..	40
4.14. <i>S. incrassatulus</i> ile nanopartikül sentezinde altın tuzu molaritesine bağlı olarak reaksiyonlardaki renk değişimleri.....	41
4.15. <i>S. incrassatulus</i> ile nanopartikül sentezinde tuz optimizasyonu için UV-vis analizi..	42
4.16. <i>S. incrassatulus</i> zamana bağlı olarak reaksiyonlardaki renk değişimleri	43
4.17. <i>S. incrassatulus</i> ile nanopartikül sentezinde zaman optimizasyonu için UV-vis analizi	44

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.18. <i>Chlorella</i> -AuNP zeta potansiyeli	46
4.19. <i>Scenedesmus</i> -AuNP zeta potansiyeli	46
4.20. <i>Chlorella</i> -AuNP DLS analizi	47
4.21. <i>Scenedesmus</i> -AuNP DLS analizi	48
4.22. <i>Chlorella</i> -AuNP FE-SEM görüntüsü	48
4.23. <i>Scenedesmus</i> AuNP FE-SEM görüntüsü	49
4.24. <i>Chlorella</i> -AuNP TEM görüntüleri	50
4.25. <i>Scenedesmus</i> -AuNP TEM görüntüleri.....	51
4.26. <i>Chlorella</i> -AuNP EDS analizi	51
4.27. <i>Scenedesmus</i> -AuNP EDS analizi.....	52
4.28. <i>Chlorella</i> özütü FTIR analizi.....	53
4.29. <i>Chlorella</i> -AuNP FTIR analizi	53
4.30. <i>Scenedesmus</i> özütü FTIR analizi	54
4.31. <i>Scenedesmus</i> -AuNP FTIR analizi	54
4.32. <i>Chlorella</i> -AuNP XRD analizi	56
4.33. <i>Scenedesmus</i> -AuNP XRD analizi	56
4.34. <i>C. albicans</i> ATCC 14053 izolatında kontrol grubu, <i>Chlorella</i> -AuNP ve <i>Scenedesmus</i> -AuNP maruziyeti sonrası elde edilen TEM görüntüleri	59
4.35. <i>C. tropicalis</i> 1660 hücrelerinin <i>Chlorella</i> -AuNP ve <i>Scenedesmus</i> -AuNP ile maruziyeti ve öncesi ve sonrası elde edilen TEM görüntüleri.....	61
4.36. <i>C. glabrata</i> 1744 izolatında kontrol grubu, <i>Chlorella</i> -AuNP ve <i>Scenedesmus</i> - AuNP maruziyeti sonrası elde edilen TEM görüntüleri.....	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Alg aracılı altın nanopartiküllerin biyosentez çalışmaları	16
2.2. Farklı alg gruplarına ait habitat, pigment yapısı, depo maddeleri ve hücre duvar yapısı farklılıkları	19
4.1. <i>Chlorella</i> -AuNP, <i>Scenedesmus</i> -AuNP ve Amfoterisin B ilacının farklı <i>Candida</i> türleri üzerine disk difüzyon testiyle gösterdikleri antifungal etki sonuçları	57
4.2. <i>Candida</i> suşlarına karşı Amfoterisin B ve sentezlenen altın nanopartiküllerin MİK ve MFK değerleri	58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

g	Gram
°C	Santigrad derece
mg	Miligram
L	Litre
mM	Milimolar
ml	Mililitre
nm	Nanometre
µm	Mikrometre
mm	Milimetre
rpm	Dakikada dönme hızı
%	Yüzde
dk	Dakika

Kısaltmalar

Açıklama

DLS	Dinamik Işık Saçılması
FTIR	Fourier Dönüşümü Kızılötesi
FE-SEM	Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskopisi
ICP-MS	İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MFK	Minimum Fungisidal Konsantrasyonu
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskopisi
UV-Vis	UV-Görünür Bölge Spektroskopisi
XRD	X-Işını Kırınımı

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Metal nanopartiküller sahip oldukları eşsiz fiziksel ve kimyasal özelliklerle optik, elektronik ve biyomedikal bilimlerde yaygın olarak kullanılmakta olup, performansları boyut, şekil ya da kompozisyonlarına bağlı değişiklikler göstermektedir. Çok farklı kimyasal yöntemlerle sentezlenebilmelerine rağmen, reaksiyonlarda kullanılan başlatıcı ve reaktantların çoğu toksik ve potansiyel olarak tehlikelidir. Ayrıca proses sırasında ortaya çıkan istenmeyen yan ürünler, uygulama olanaklarını ve üretilen nanomateryalin biyouyumluluğunu önemli ölçüde sınırlar. ‘Yeşil Sentez’ yöntemi ile metal nanopartiküllerin eldesi, geleneksel kimyasal yöntemlere göre çok daha avantajlı alternatifler sunar. Çünkü bu yöntem, güvenli olmayan kimyasalların kullanımını azaltmak ve tehlikeli atıkların meydana gelişini minimize etmek suretiyle yenilenebilen, düşük maliyetli ve çevre dostu bir üretim yöntemi sağlayabilmektedir. Bu amaçla mikroorganizmalar, mantarlar, bitkiler ya da algler kullanılmaktadır. Kullanılan bu biyolojik malzemeler ya da bunlardan elde edilen özütler çeşitli protein, polisakkarit, vitamin ya da alkaloidler gibi bileşenler içerirler. Bu bileşenler sentez sırasında nanopartikül oluşumunu uyarmak ve kümelenmeyi engellemek suretiyle, biyobozunur ve toksik olmayan bir yöntemle nanopartiküllerin eldesine imkan verir. Özellikle algler, metal nanopartikül sentezi için önemli bir fitokimyasal kaynağı olup doğal olarak bulunabilen canlılardır ve son yıllarda farklı alg özütleri kullanılarak çeşitli metal nanopartikül sentezi çalışmaları çok dikkat çekicidir. Metal nanopartiküller yeşil sentez yöntemiyle elde edilebilmesine rağmen, üretilen materyallerin boyut, şekil ya da dağılma özellikleri kullanılan ‘yeşil yaklaşım’a göre değişiklik gösterir. Böylece fiziksel ve kimyasal özelliklere paralel olarak üretilen partikülün biyolojik aktivitesi de büyük farklılıklar gösterebilir. Bu nedenle nanomateryal üretiminde kullanılacak yeşil maddenin seçimi ve sonrasında elde edilen ürünün etkinliğini tayin etmede kullanılacak tarama yöntemlerinde de çok dikkatli olunması gerekir.

Metal nanopartiküller geniş yüzey alanları ve hacim oranları ile güçlü bir antimikrobiyal etkinliğe sahiptirler, böylece geleneksel antibiyotiklere göre toksisitede azalma, maliyet düşüklüğü ve direncin üstesinden gelme gibi avantajları vardır. Patojenik mikroorganizmalar üzerine nanoboyuttaki partiküllerin antifungal etkilerinin araştırılması, güçlü antifungal ajanlar olarak etkinliklerini açıklayabilir.

Metal nanopartiküller teşhis, tedavi ve ilaç salınım sistemleri gibi pek çok uygulamada kullanılmaktadırlar. Boyut ve şekil bağımlı optik özellikler gösterdiklerinden farklı biyomedikal uygulamalarda kullanımları mümkündür. Özellikle altın nanopartiküller derin doku görüntülemelerinde önemli bir yer tutar. Canlı hücreler indirgeyici ajanlarla metalik iyonları tek değerlikli forma indirgeyebildiklerinden, toksik olmayan yeşil sentez olayının gerçekleşmesi büyük dikkat çekmektedir. Bu şekilde gerçekleşen yeşil sentez olayı, kullanılan biyolojik materyale bağlı olarak değişiklikler göstermektedir. Bu materyaller bitki, mantar, alg ya da bakteriler olabilmektedir ve yeşil sentez sentetik kimyasal indirgeyici ajanlarla yapılan senteze karşı toksik olmayan, çevre dostu ve daha ekonomik bir alternatiftir. Gümüş nanopartiküller şimdiye kadar üzerinde en fazla çalışılan gruptur. Altın nanopartiküllerle yapılan sınırlı sayıda çalışmada ise yüksek derecede biyouyumlu ve nispeten kolay bir şekilde sentez gerçekleştiği rapor edilmektedir. Algler sulu ortamda yaşayan fototrofik organizmalar olup bazıları çeşitli ağır metalleri biriktirebilme yeteneğindedir. Ancak alglerle yapılan biyosentez üzerine ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Diğer yandan altın nanopartiküllerin mikroorganizmalarla etkileşime girerek çeşitli antimikrobiyal aktiviteler gösterebildiği bilinmektedir. Ancak antifungal aktiviteleri ve etki mekanizmaları üzerine çok az çalışma mevcuttur. Amacımız alg aracılı yeşil sentez yoluyla altın nanopartiküllerin üretimi, karakterizasyonu ve antifungal etkilerinin detaylı olarak araştırılabilmesidir.

Tez kapsamında izlenecek aşamalar şu şekilde planlanmıştır:

1. İzole ve identifiye edilen alglerden özüt hazırlanması,
2. Elde edilen özütler yardımıyla metal iyonunun (Altın (Au)) indirgenmesi ve sonrasında metal nanopartiküllerin sentezlenmesi,
3. Oluşan nanopartiküllerin boyut, şekil ve agregasyon durumları hakkında bilgi edinebilmek için gerekli karakterizasyon testlerinin yapılması,
4. Seçilen maya izolatları üzerine antifungal etkinliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Nanoteknoloji

Nanoteknoloji, maddeler üzerinde 1-100 nm boyutlarında gerçekleştirilen işleme, ölçüm, tasarım, modelleme ve düzenleme gibi çalışmalara olanak veren bir bilim dalıdır. Maddeye atom ve molekül seviyesinde gelişmiş ya da tamamen yeni fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler kazandırmayı hedeflemekte ve hızla gelişmektedir. Nanoteknolojinin diğer bilim dallarından en önemli farkı, malzemenin nanoboyutlarda yüzey/hacim oranlarının artmasıdır ki bu, malzemenin tümüne göre yüzeydeki atomlarının artışı demektir (Beykaya ve Çağlar, 2016). Böylece malzemenin özelliklerinde büyük değişiklikler sağlanabilmektedir. Mekanik dayanım, termal stabilite, elektrik iletkenliği, manyetik ve optik özellikler bunlar arasında sayılabilir.

2.1.1. Tanımı ve tarihçesi

Nanoteknoloji terimi “nano” ve “teknoloji” kelimelerinin birleşmesi ile oluşur. “Nano” kelimesi temel olarak Yunanca kaynaklı olup “nannos” yani “cüce” anlamındadır. Fiziksel bir büyüklüğün milyarda biri nano ölçekli olarak kabul edilir ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) (Gündüz, 2018). Bir malzemenin makroskobik ve mikroskobik boyutlardaki özellikleri ile nano boyuttaki özellikleri önemli farklılıklar göstermektedir. Nanoteknoloji bilimi sayesinde doğadaki atomik dizilimin taklit edilebilmesi ve atom ya da moleküllerin hassas biçimde birleştirilebilmesi mümkün olmaktadır. Dolayısıyla farklı maddeler atom seviyesinde işlenerek yeni maddeler elde edilebilmektedir (Özer, 2008).

Nanoteknoloji konusundaki araştırmalar 1950’li yıllarda başlamış ve kuantum elektrodinamiği konusunda çalışmalar yapan fizikçi Richard P. Feynman ilk kez nanoteknoloji fikrini ortaya koymuştur. Bu araştırmacı 1959 yılında “aşağıda bir sürü yer var (There’s Plenty of Room at the Bottom)” başlıklı konuşmasını American Physical Society toplantısında yapmış ve maddelerin minyatürleştirilmesi konusunda bilim insanlarının büyük dikkatini çekmiştir (Özer, 2008). Terim olarak nanoteknoloji ise ilk kez 1974 yılında Tokyo Üniversitesi’nde çalışan bilim insanı Norio Taniguchi tarafından

kullanılmıştır. Takip eden yıllar içerisinde nano boyutta ölçüm yapabilen çeşitli mikroskoplar geliştirilmiş ve Binning ve Rohrer, geliştirdikleri Taramalı Tünelleme Mikroskobu ile 1986 yılında Nobel Fizik Ödülü almışlardır. 1990'lı yıllarda karbon atomlarının simetrik olarak sıralanmasıyla elde edilen “fullerene” molekülleri ve sahip oldukları üstün özellikler keşfedilmiştir. 1991 yılında ise Sumio Iijima tarafından karbon nanotüpler keşfedilmiştir. Avrupa Birliği tarafından nanoteknoloji çalışmalarının, Çerçeve Programına öncelikli alan olarak eklenmesi ile bu konudaki araştırmalar büyük bir hız göstermiştir (Gündüz, 2018).

2.1.2. Uygulama alanları

Nanoteknolojik yöntemler sayesinde nano boyutlu yapıların eldesi, bu yapıların çeşitli özelliklerinin tayini enerji veriminin artırılabilmesi, ekonomik ve sağlam yapıların eldesi, nano ölçekli ve üstün nitelikli cihaz, malzeme ve sistemlerin geliştirilebilmesi mümkün olmaktadır (Dandıl, 2013).

Nanopartiküller, nanoteknolojinin temel taşlarından birini oluşturmakta ve farklı nanopartiküllerin farklı uygulama alanları bulunmaktadır (Shankar vd., 2016). İçinde bulunduğumuz yüzyılda geliştirilen inovativ teknolojilerle, nanopartiküller stratejik bir değer kazanmış ve enerji, gıda, tarım, sağlık, su arıtma, bilgi ve iletişim teknolojileri ya da çevre gibi birçok uygulama alanında kendine yer bulmuştur (Tunca, 2015).

2.2. Nanopartiküllerin Sınıflandırılması

Nanopartiküllerin inorganik ve organik olmak üzere iki çeşidi bulunmaktadır (Loomba ve Scarabelli, 2013). Organik nanopartiküller ise poly-lysine, kuaterner amonyum bileşenleri, katyonik kuaterner polielektrolitler, N-halamin bileşenler ve kitosanı kapsar. Organik nanopartiküller genellikle yüksek sıcaklıklarda daha az stabildirler. Bu yüzden antimikrobiyal polimerler olarak inorganik nanopartiküller daha çok tercih edilirler. İnorganik nanopartiküller, potansiyel antibakteriyal ajanlar olan metal ve metal oksitlerini içerirler. Gümüş, demir oksit, titanyum oksit, bakır oksit ve çinko oksit inorganik nanopartiküllere örnek olarak verilebilir. Metaller nanopartiküller sahip oldukları üstün özelliklerden dolayı pek çok bilim alanında ilgi çekmektedir.

2.3. Metal Nanopartiküller

Metallik nanopartiküller 10-100 nm boyutunda olabilen nano boyutlu metallerdir. Oldukça büyük bir yüzey alanı/hacim oranına sahiptirler ve bu durum difüzyonun daha hızlı olmasını sağlar. Diğer yandan düşük sıcaklıklarda uygulanabilme olanağı da sağlar. Bu sebeplerden dolayı metal nanopartiküllerin antimikrobiyal aktivite özelliği oldukça güçlüdür. Ayrıca yüzey plazmon rezonansı ve optik özellikleri sebebiyle de eşsiz bir karakteristiğe sahiptirler (Kumar vd., 2018).

2.3.1. Uygulama alanları

Son yıllarda özellikle gümüş, altın, demir gibi metal nanopartiküllerin optik, elektronik, biyolojik ve farmasötik uygulamalardaki geniş uygulamalarından dolayı, üretimlerinde de inanılmaz bir artış gözlemlenmektedir.

Metall nanopartiküllerin bazı kullanım alanları:

Nanotüp içeren bileşikler, kimyasal kaplamalar, alaşımlar, akıllı malzemeler

Bilgisayar teknolojisi, hafıza kartları

Biyoanaliz sistemleri, ayırıştırma teknolojiler

Kozmetik endüstrisi

Hidrojen üretimi ve bataryalar

Filtre sistemleri, yapıştırıcılar, boyalar ve parlaticı maddeler

TV teknolojisi, elektronik cihazlar, mobil iletişim sistemleri

Optik sistemler

Sensörler, dedektörler, lazerler

Doku mühendisliği ve ilaç taşıyıcılar

Tıpta görüntüleme teknolojileri, yapay implantlar

Tekstil, otomobil endüstrisi, inşaat malzemeleri şeklinde sıralanabilir (Bar vd., 2009; Shankar vd., 2016).

2.3.2. Metal nanopartikül çeşitleri

Şimdiye kadar yapılan metal ve metal oksit nanopartiküllerle ilgili çalışmalar incelendiğinde altın, gümüş, demir ya da paladyum gibi metalik nanopartiküller üzerine yoğun çalışmalar rapor edilmektedir. Günümüzde sentezlenen metallik nanopartiküller çeşitli kimyasal fonksiyonel gruplarla modifiye edilerek biyoteknoloji, hedeflenmiş ilaç salınımı, diagnostik görüntüleme gibi pek çok alanda uygulama potansiyeli bulmaktadır (Mody vd., 2010).

Demir oksit kırmızımsı-kahverengi ve doğada paramanyetik olarak bulunan inorganik bir bileşendir. Boyutu, manyetik özellikleri ve biyouyumluluğu sebebiyle çeşitli biyomedikal uygulamalar için iyi bir aday konumundadırlar. Ancak bazı nöronal hücre tipleri üzerine toksik etki göstermeleri kullanımlarının sınırlı olmasına sebep olur (Mody vd., 2010).

Gümüş nanopartiküller çalışılan birkaç nanopartikül arasında en çok uygulama alanı bulan ve önemli görülen materyallerdir. Kanser teşhis ve tedavisi, antibakteriyal, antifungal, antiviral, antiinflamatuvar gibi pek çok amaçla kullanılmak üzere araştırılmakta ve olumlu sonuçlar alınmaktadır. Gümüş nanopartiküllerin biyolojik özelliklerinin yanı sıra optik, elektrik, termal, yüksek elektriksel iletkenlik gibi özellikleri de bulunmaktadır ve böylece endüstriyel, evsel ve sağlık bakımı ürünlerinde, medikal araç kaplamalarında, kozmetikte, besin endüstrisinde, ortopedik alanda ya da tekstil sanayisinde olmak üzere pek çok alanda kullanılmaktadırlar (Zhang vd., 2016).

Bakır oksit yarı iletken bir metal olup önemli optik, elektrik ve manyetik özelliklere sahiptir. Böylece manyetik depolama, sensör, kataliz, yakın kızılötesi filtreler ve yarı-iletken alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca antimikrobiyal ve biyosit özellikleri dikkat çekmektedir ancak toksik etkileri medikal alanda kullanımı için dezavantajdır. Başlıca toksisite sebebi reaktif oksijen türlerinin üretimindeki artışa dayanmaktadır. Böylece bu nanopartiküller oksidatif stresi indükleyerek DNA ve mitakondri hasarına yol açabilir (Grigore vd., 2016).

Çinko oksit nanopartiküller ise ilginç fiziksel ve kimyasal özellikleri sebebiyle kauçuk, boya, kaplama ve kozmetik alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca biyoyumlu, ekonomik ve düşük toksisiteli özellikleri sebebiyle biyolojik uygulamalarda da oldukça popülerdir. Diğer yanda çinko, insülinin yapısal bütünlüğünü sağladığı için antidiyabetik tedavide önemlidir ve çinko nanopartiküller önemli lüminesans özellikleri sebebiyle biyo-görüntülemeye kullanılmaktadır (Jiang vd., 2018).

2.3.2.1. Altın nanopartiküller

Altın, keşfedilen ilk metallere biri olup en az birkaç bin yıldır bilinmektedir. Kollaidal altın üzerine ilk veriler Çin, Arap ve Hint bilim insanları tarafından tıbbi amaçlarla kullanılmıştır. Kollaidal altın Avrupa'da Ortaçağ boyunca çalışılmış ve simya laboratuvarlarında kullanılmıştır. Daha sonraki yıllarda altın, mental hastalıklar ve sifilis tedavisinde epilepsi, diare ya da cüzzam gibi hastalıklarda tedavi amaçlı olarak kullanılmıştır. Altın nanopartiküllerin biyolojik çalışmalarda ilk kez kullanımı ise 1971 yılında İngiliz bilim insanları tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar *Salmonella* yüzey antijenlerinin direkt elektron mikroskopik incelenmesi için kollaidal altın içeren antikor konjugasyonu kullanmışlardır. Daha sonraki pek çok çalışmada altın nanopartiküller klinik kimya, genomik, biyosensör araştırmaları, immüno analizler, ilaç hedefleme çalışmaları optik görüntüleme, mikroorganizmalar ve kanser hücrelerinin tespiti gibi alanlarda çok geniş kullanım alanları bulmuştur. Genel olarak altın nanopartiküller teşhis, tedavi, korunma ve hijyen gibi hemen hemen tüm medikal uygulamalarda kullanılabilir (Dykman and khlebtsov, 2011).

Altın nanopartiküller önemli fizikokimyasal özellikleri ve potansiyallerinden dolayı büyük ilgi görmektedir. Altın değerli, inert ve daha az toksik bir metal olup çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Tıp alanında kanser tespit ve tedavisindeki yerleri yoğun biçimde araştırılmaktadır (Rajeshkumar vd., 2013). Genelde köşegenli bir yapıya sahip olan altın nanopartiküller özelliklerine göre farklı davranışlar sergilemektedir. Farklı boyutlardaki altın nanopartiküller biyolojik molekülleri tespit etmede geniş biçimde kullanılmaktadırlar. Örneğin biyolojik moleküller ve neoplastik hücreler altın nanopartiküllerin yüzeyine kolayca yapışabilir. Kolloidal altın nanopartiküller, spesifik DNA sekanslarını ya da tek bazlı mutasyonları tespit etmede; gen tedavisi, hedefleme ve in

vivo salınım teknolojilerinde de önemli kullanım alanlarına sahiptirler. Son yıllarda *Sargassum wightii*, *Turbinaria conoides*, *Laminaria japonica* ve *Stoe chospermum marginatum* gibi çeşitli alg özütleri kullanılarak altın nanopartiküllerin sentezlendiği çalışmalar rapor edilmiştir (Ramaswamy vd., 2016). Altın nanopartiküller kozmetik ürünlerinde ve derinin korunmasında da yaşlanma karşıtı komponentler olarak yer almaktadırlar. Tekstilde pamuk ya da yün ipliklerin kalıcı olarak boyanmasında ya da nanokompozitler halinde kaplama ve boyama uygulamalarında da yüksek bir potansiyele sahiptirler (Li vd., 2011).

2.4. Nanopartikül Sentezinin Genel Mekanizması

Nanopartikül sentezinin genel mekanizması incelendiğinde aktivasyon, gelişme ve sonlanma olmak üzere üç faz içerdiği görülmektedir. Aktivasyon fazı metal iyonlarının indirgenmesi ve takiben çekirdeklenmeyi kapsar. Gelişim fazı küçük ve bitişik nanopartiküllerin termodinamik bir stabiliteyle daha büyük boyutlu partiküller oluşturmak üzere doğal kaynaşmasını içerir. Sonlanma fazı ise nanopartiküllerin son şeklini aldığı dönemdir (Shankar vd.,2016). Üretim sırasında kullanılan kimyasal reaktantlar; metal kaynak, indirgeyici ajan ve büyümeyi kontrol etmek için capping ligand'ı kapsamaktadır (Iravani., 2014). Sentez olayı ayrıca sıcaklık, pH, substrat konsantrasyonu, karıştırma ya da statik durumlar gibi pek çok parametreden etkilenir.

2.5. Metal Nanopartiküllerin Sentez Yöntemleri

Nanopartikül üretimi için kullanılan yöntemler, malzemeden istenilen özelliğe göre değişiklik gösterir. Üretim ve çalışma parametreleri, elde edilecek nanopartikülün boyut, morfoloji, kristal yapı ya da kimyasal kompozisyonunu büyük ölçüde etkiler. Bu yüzden malzemeye ait spesifik özelliklerin geliştirilmesi, kullanılan prosesin kontrolü ile direkt ilişkilidir. Nanopartiküllerin üretiminde kullanılan yöntemler yukarıdan aşağı 'Top Down' ve aşağıdan yukarı 'Bottom Up' olarak iki ana yaklaşımda toplanmaktadır.

2.5.1. Fiziksel ve kimyasal yöntem

Yukarıdan aşağı yaklaşımına dahil olan yöntemlerde, hacimsel malzemeye dışarıdan mekaniksel ya da kimyasal yollarla enerji verilir ve malzemenin nano boyuta inecek kadar küçük parçalara ayrılması sağlanır. Bu yaklaşıma çok sık kullanılan elektrobiriktirme yöntemi, litografi ve mekanik öğütme yöntemleri örnek verilebilir (Dauthal ve Mukhopadhyay, 2016). Elektrobiriktirme yönteminde iyon yapılarını içeren ve elektrolit adı verilen çözeltiye elektrot daldırılır ve ardından elektroda uygulanan potansiyel ile elektrot/elektrolit ara yüzeyinde elektron transferi gerçekleşir. Böylece elektrot yüzeyinde atomlar birikir ve redüklenen diğer atomların kendinden önceki atomla bir araya gelmesi sonucu çekirdek meydana gelir. Litografi normalde baskılı devre ve bilgisayar kartlarının kullanımında kullanılan bir teknik iken, nanolitografide molekül düzeyindeki yapılar bir yere biriktirilir ya da oradan uzaklaştırılır. Mekanik öğütme tekniğinde yüzey aktifleştiriciler ile stabil bir yüzey alanı oluşturulmakta ve malzemelerin mekanik olarak öğütülmesine kimyasal ve fizikokimyasal etkileşimler eşlik eder. Yukarıdan aşağı yaklaşımlar içinde metal nanopartiküllerin üretiminde en çok kullanılan yöntemdir. Ancak bu yöntemde üretilen nanopartiküller geniş bir boyut aralığına sahip olduğundan partikül boyutunun kontrolü çok zor olmaktadır (Gürmen ve Ebin, 2008).

Aşağıdan yukarı yaklaşımına dahil yöntemlerde ise atomik ya da moleküler boyuttaki yapılar, kimyasal reaksiyonlar ile büyütülerek partikül oluşumu gerçekleştirilir. Bu yaklaşım ile daha kompleks yapıda nanopartiküler üretilir. Örneğin elektrokimyasal sentez yöntemi, katı yüzeyler üzerinde inorganik depozitler oluşturmak için kullanılan bir yöntemdir. Elementel haldeki metalin okside olmasını ve çözeltiye geçen metal iyonlarının katota indirgenmesini sağlar. Sonokimyasal çöktürme tekniğinde ise, yüksek enerjili sonokimyasal tepkimelerde moleküler birleşme olmaksızın, bir sıvı içinde bulunan kimyasal türlerin ultrasonik etki ile topak şeklinde çökmesi, büyümesi ve şekillenmesi ile nanoyapılar meydana gelmektedir.

Diğer bir sınıflandırmada ise kullanılan fizikokimyasal prosese dayalı üretim şekli gaz ve sıvı fazından nanopartiküller elde etmek şeklinde ikiye ayrılır. Gaz fazından nanopartikül elde etmek için gaz yoğunlaştırma tekniği ve kimyasal buhar yoğunlaştırma gibi yöntemler kullanılırken, sıvı fazdan nanopartikül elde etmek için sol jel ve çöktürme

teknikleri sıkça kullanılır. Gaz yoğunlaştırma yönteminde metalik ya da organik malzemeler basınç altında ve asal gaz ortamında buharlaştırılır. Hedef metal, yüksek sıcaklıkta buharlaştırıcının üzerine gönderilir ve metalin buharlaşması sağlanır. Oluşan metal buharları hareket halindeki asal gaza çarparak yoğunlaşır ve nanopartikül oluşumu sağlanır (Gürmen ve Ebin, 2008).

Açıklanan bu yaklaşımlar dışında nanopartikül üretim tekniklerinin kimyasal ve fiziksel temelli olarak da gruplandırılması mümkündür. Kimyasal buhar yoğunlaştırma yönteminde temel olarak gaz fazına geçirilen malzemeler termal parçalanma ile nanopartiküle dönüştürülür. Redükleyici ya da asal taşıyıcı gazlar ile başlangıç reaktifi reaktöre taşınmakta ve termal parçalanma sonucu elde edilen nanopartiküller sıvı azot ile soğutulmuş yüzey etrafında çöktürülürler. Sol-jel yönteminde, metal klorürün düşük sıcaklıklarda ve sulu ayrışımı ile seramik yapıli polimer ya da nanopartiküller yoğunlaştırılarak oluşturulur. Sol-jel yönteminde üç boyutlu çapraz bağlayıcılar içeren çözücüler içinde katı formda nanopartiküller elde edilir. Bu bağlayıcılar yardımıyla nanopartiküller yoğunlaşarak jel formunda elde edilirler (Toygun, 2013). Çöktürme tekniğinde ise nanopartikül oluşumunu sağlayıcı bir ajan ile nanopartiküller çökelti şeklinde elde edilerek süzülürler. Böylece sulu ya da sulu olmayan çözeltilerden ince taneli metal oksit ya da metal nanopartiküller elde edilir (Gürmen ve Ebin, 2008).

Mevcut fiziksel ve kimyasal birçok teknikle farklı boyut ve şekillerde altın nanopartikülleri sentezlemek mümkün olmasına rağmen, kullanılan tüm kimyasal yöntemlerde hem toksik hem de pahalı ayıraçlara gereksinim bulunmaktadır. Tüm bu sebeplerden dolayı altın nanopartiküllerin yeşil sentezle üretimi oldukça önemlidir. Böyle bir sentez hem çevre dostu hem de düşük maliyetli bütçelerle gerçekleştirilebilir (Gonzalez-Ballesteros vd, 2017).

2.6. Biyosentez (Yeşil Sentez)

Son yıllarda çevre dostu ve yeşil kimya bazlı tekniklerle nanopartikül sentezi gerçekleştirilmekte ve bu amaçla bitki, mantar, bakteri, polisakkarit, biyobozunur polimerler ya da algler gibi doğal materyaller kullanılmaktadır. Böylece çevre dostu, basit, ekonomik ve temiz bir teknoloji kullanarak ve zararlı kimyasal, kontaminant ya da yan ürün içermeyen

bir yöntemle üretim mümkün olabilmektedir (Ishak vd, 2019). Bir tepkime ya da materyalin ‘yeşil’ olabilmesi için güvenli olması, tek bir tepkime basamağı içermesi, atık üretmemesi, yenilenebilir hammaddeler kullanması, çevresel olarak kabul edilebilir olması, ürünün tepkime ortamından basitçe ayrıştırılabilmesi ve %100 verim vermesi gerekir, ancak birçok tepkimede bu koşulların tamamını yerine getirmek zordur.

Farklı biyolojik kaynaklar kullanılarak nanopartikül sentezi kullanım stratejileri genel olarak şu şekilde özetlenebilir:

2.6.1. Mikroorganizmalar ile nanopartikül sentezi

Mikroorganizmalar nanopartikül üretimi için temiz, toksik olmayan ve çevre dostu yaklaşımlar sunan nanofabrikalardır. Ayrıca nanopartikül sentezi için gerekli olan hücre dışı ve hücre içi enzimlerin de potansiyel kaynağıdır. Uygun çevresel koşulların sağlanması durumunda nanopartikülün tespiti ve optimizasyonu daha kolay gerçekleşmektedir. Çevrelerinden hedef iyonları tuttuklarında nanopartikül biyosentezi olur ve sonra metal iyonlarını hücre aktiviteleriyle meydana getirilen enzimlerle elemental metal atomlarına çevirirler. Sentez, nanopartikülün yerleşimine göre hücre içinde ya da dışında olabilir. Hücre dışı nanopartikül sentezinde hücre yüzeyindeki metal iyonları tutuklanır ve bu iyonlar enzimler yardımıyla indirgenir. Hücre içi nanopartikül sentezinde ise iyonlar nanopartikül sentezi için enzim yardımıyla mikrobiyal hücreye taşınır. Şimdiye kadar mikroorganizmalar aracılı metal nanopartikül sentezi konusunda pek çok çalışma gerçekleştirilmiş ve aşağıda kullanılan mikroorganizma grubuna göre gruplandırılarak özetlenmiştir:

Virüsler ile metal nanopartikül sentezi: Bu sistemde yağ asidi ve aminoasit benzeri biyomoleküller yarı-iletken kristallerin üretimi için kalıp olarak kullanılabilirler. Mao vd. (2004) tütün mozayik virüsü kullanarak oksidatif hidroliz yoluyla demir oksit nanopartikülü sentezlemişlerdir.

Mayalar ile metal nanopartikül sentezi: Mayalar genelde yarı iletken nanopartiküllerin sentezi için kullanılmışlardır. Bir çalışmada hücre dışı hegzagonal gümüş nanopartiküllerinin üretimi için gümüş toleranslı MKY3 mayası kullanılmıştır (Kowshik vd, 2003).

Aktinomisetler ile metal nanopartikül sentezi: Aktinomisetler hem hücre içi hem de hücre dışı olarak nanopartikül sentezinde kullanılabilirler. Yapılan çalışmada monodispers ve küresel altın nanopartiküllerin hücre dışı sentezi için *Thermomonospora* sp. kullanılmıştır (Maheswari vd, 2012). Diğer bir çalışmada *Rhodococcus* sp. hücre duvarı ve stoplazmik membranın iç tarafı üzerinde metal nanopartiküllerin hücre içi biyosentezi için kullanılmışdır (Gericke ve Pinches, 2006).

Funguslar ile metal nanopartikül sentezi: Metallerin biyobirikimi ve metal tolerans yetenekleri fungusları metal nanopartiküllerin biyolojik üretimi için iyi bir aday haline getirmektedir. Yapılan bir çalışmada *Schizosaccharomyces pombe* suşu ile hücre içi yolla demir kadmiyum sülfid nanopartikül sentezi için kullanılmışlardır (Kowshik vd, 2002).

Bakteriler ile metal nanopartikül sentezi: Nanopartiküllerin bakteriyogenezi hem hücre içi hem de hücre dışı olarak gerçekleşebilir. Yapılan bir çalışmada *B. licheniformis* yoluyla gümüş nanopartiküllerin hücre dışı sentezini gerçekleştirmişlerdir (Husseiny vd, 2007). Yine *Lactobacillus*'lar metal iyonlarına maruz bırakıldıklarında bakteriyel hücreler içinde metal nanopartiküller tespit edilmiştir (Pugazhenthiran vd, 2009).

2.6.2. Bitkiler ile nanopartikül sentezi

Bitkisel sistemler temel fotosentetik ototroflar olup besin zincirinin ilk üreticileridir. Doğal çevrede yüksek bir biyokütle üretiminden sorumludurlar. Güneş enerjisini kimyasal enerjiye çevirebilme yeteneklerinden dolayı nanopartikül üretimi için yenilenebilir ve sürdürülebilir kaynaklar olarak kullanılabilmektedirler. Geniş bir antioksidan ikincil metabolit kaynağı olarak bilinirler. Ancak nanopartikül üretimi için sahip oldukları potansiyel hala tam olarak belirli değildir. Bitkiler, prokaryotik mikrobiyal sistemlere göre daha yararlı sistemlerdir. (Rai vd, 2009). Örneğin mikrobiyal sistemler pahalı kültür korunma sistemleri gerektirirler. Bitki aracılı metal nanopartikül sentezi; bitkisel sistemlerin alım, biriktirme, kullanma ve farklı minerallerin geri kazanımı yetenekleri baz alınarak gerçekleştirilir (Haverkamp ve Marshall, 2009). Böylece yüksek derecede stabil nanopartiküller çok hızlı ve ekonomik biçimde üretilmiş olur. Bitki biyokütlesi, nanopartikül sentezi için fiziksel ve kimyasal yöntemlere göre çevre dostu bir alternatif oluşturmaktadır.

Bu sistemde bitki metabolitleri genellikle meyve, tohum ya da yaprak gibi organların konsantre sulu özüt halinde geliştirilmekte ve yüksek düzeyde antioksidan polifenol içermektedir. Bol bulunuşları ve kolay eldeleri sebebiyle bitki aracılı nanopartikül sentezi üzerine çok fazla çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar ağırlıklı olarak canlı bitkiler (hücre içi), bitki özütleri (hücre dışı) ve fitokimyasallar kullanılarak altın ve gümüş nanopartiküllerin sentezine yoğunlaşmıştır. Ancak bu çalışmaların çoğunda nanopartiküllerin kümelenmediği ve stabil olmadığı; bunun sebebi olarak da e özütte bulunan, stabilizasyon ve redüksiyonda anahtar rol oynayan fitokimyasalların yüksek oranda olması gösterilmektedir (Shankar vd, 2016).

Farklı bitki türlerinin, ağır metal birikimi ve detoksifikasyon (fitoremediasyon) potansiyelleri vardır. Bu yüzen araştırmacılar metal nanopartikül sentezinde çeşitli bitki türlerinin bu potansiyelini araştırmaktadırlar. Yapılan bir çalışmada ilk kez katı besiyerinden altın iyon alımı yoluyla altın nanopartikülleri üretmek için *Medicago sativa* canlı bitkisini kullanmışlardır (Gardea-Torresday vd., 2002). Harris ve Bali (2008) *Brassica juncea* ve *M. sativa* bitkilerini kullanarak gümüş alım potansiyelini araştırmış ve gümüş nanopartikül üretimini rapor etmişlerdir.

Literatürde metal nanopartiküllerin hücre içi sentezinden çok az bahsedilmektedir. Çünkü biyokütleden nanopartikül elde etmek için pahalı ve zaman alıcı sistemler gerekir. Bitkiler yoluyla metal nanopartikül sentezi işlemini kolaylaştırmak için metal iyonlarının indirgenmesinden sorumlu fitobileşenler özüt haline getirilir ve direk olarak metal nanopartikül sentezi için kullanılır ki bu proses de hücre dışı sentez olarak bilinir. Bu yolla metal nanopartikül sentezi ve potansiyel uygulamalarının incelenmesi için pek çok araştırma yapılmıştır (Pavani vd, 2013; Seralathan vd, 2014). Bu yöntemde farklı fitokimyasal kompozisyonlarının bulunuşundan dolayı nanopartikül sentezinin gerçek mekanizmasını tahmin etmek çok zordur. Bu yüzden araştırmacılar metal nanopartikül sentezi için belirli antioksidan fitobileşenlerinin izolasyonuna odaklanmışlardır. Bu konuda yapılan çok sınırlı çalışma bulunmaktadır (Dauthal ve Mukhopadhyay, 2016). Genel olarak sulu ortamda ve yeşil sentezle metal nanopartikül üretiminde gerçekleşen spesifik mekanizmalar tam olarak açık değildir. Çünkü bitki özütünde bulunan fitokimyasallar (flavonoidler, fenolik asit ve terpenoidler, proteinler, organik asitler) çok fazladır ve yapıları komplekstir. Bu bileşenler stabilize edici ve indirgeyici ajanlar olarak iş görürler. Burada bazı fitobileşenlerin sinerjistik

etkiyle çalışabileceği de unutulmamalıdır. Bitki aracılı nanopartiküllerin biyomedikal, endüstriyel ve çevresel uygulamalarının yanı sıra antimikrobiyal, antifungal, antiparazitik ve antikanser aktiviteleri üzerine bazı çalışmalar mevcuttur (Dauthal ve Mukhopadhyay, 2016).

2.6.3. Algler ile nanopartikül sentezi

Algler metal nanopartiküllerin sentezi için bir biyofabrika olarak kullanılmaktadırlar. Bol ve kolay bulunuşları onları metal nanopartikül sentezi için önemli bir kaynak haline getirmektedir. Ayrıca alglerle yapılan nanopartikül sentezi diğer biyosentez yöntemlerinden daha kısa sürede gerçekleşmektedir. Özellikle makroalgler, yüksek metal alım kapasiteleri, düşük maliyetleri ve makroskopik yapılarından dolayı nanopartikül sentezinde belirgin avantajlara sahiptirler.

Algler yoluyla nanopartikül sentezinin üç önemli adımı bulunmaktadır:

- (a) Alg özütünün su ya da organik bir çözücünde belirli bir süre ısıtılarak/kaynatılarak hazırlanması,
- (b) İyonik metal bileşenlerinin molar çözeltilerinin hazırlanması,
- (c) Alg özütü ve iyonik metal bileşenlerin belirli koşullar ve sürede sürekli karıştırarak ya da karıştırmadan inkübasyonu (Thakkar vd, 2010).

Nanopartikül sentezi doz bağımlı olup kullanılan alg çeşidiyle ilgilidir. Polisakkaritler, pigmentler ya da peptitler gibi çeşitli biyomoleküller metallerin indirgenmesinden sorumludur. Sulu çözeltilerde metal nanopartiküllerin stabilizasyon ve kaplama ajanları amino grupları ya da sistein kalıntıları yoluyla proteinlerle ya da sülfatlanmış polisakkaritlerle gerçekleşir.

Alglerle gerçekleşen nanopartikül sentezi antibakteriyal, antifungal, antikanser ve yara iyileştirici aktivitelere sahip olduğundan, biyomedikal uygulamalarda çok önemlidir. Algler yoluyla sentezlenen nanopartiküllerin antifungal etkileri üzerine ise çok sınırlı çalışma bulunmaktadır. Bu konuda yapılan bir çalışmada kırmızı alg *Gelidiella acerosa*'nın sulu özütü kullanılarak gerçekleştirilen gümüş nanopartikül sentezi sonucu nanopartiküllerin *Humicola insolens* (MTCC 4520), *Fusarium dimerum* (MTCC 6583), *Mucor indicus* (MTCC 3318) ve *Trichoderma reesei* (MTCC 3929) üzerine antifungal aktivitesi

gösterilmiştir (Marimuthu vd.,2011). Diğer bir çalışmada ise *Sargassum longifolium* aracılı gümüş nanopartikül sentezinin patojenik *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* ve *Fusarium* türleri üzerine antifungal etkisi rapor edilmiştir (Rajeshkumar vd., 2014). Gümüş-klorid nanopartikülü sentezi için deniz algi *Sargassum plagiophyllum* kullanılan başka bir çalışmada yapılan floresan ve elektron mikroskop analizleri nanopartiküllerin *Escherichia coli* üzerine bakterisidal etki gösterdiğini ortaya koymuştur (Dhas vd., 2014).

Algler yoluyla sentezlenen metal nanopartiküllerin antikanser ve antioksidan özellikleri de çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (Boca vd, 2011; Govindaraju vd, 2015; Eroglu vd, 2013; Sharma vd, 2014). Yapılan başka bir çalışmada, bakır oksit nanopartikülün sentezi için *Bifurcaria bifurcate* (kahverengi alg) kullanılmış ve elde edilen nanopartiküllerin (5-45 nm) gram negatif *Enterobacter aerogenes* ve gram pozitif *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı antibakteriyel etkisi gösterilmiştir (Abboud vd., 2014).

Rajeshkumar vd., (2013) kahverengi deniz algi *Turbinaria conoides* kullanarak altın nanopartikül sentezlemiş ve *Streptococcus sp*, *Bacillus subtilis* ve *K. pneumoniae* türleri üzerine antibakteriyel etkisini göstermişlerdir. Diğer bir çalışmada *Galaxaura elongata* kullanılarak sentezlenen altın nanopartiküllerin *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *MRSA*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerine karşı antibakteriyel etkileri rapor edilmiştir (Abdel-Raouf vd., 2013). Alg ile gerçekleştirilen altın nanopartiküllerin biyosentezi sonucu çeşitli boyut ve şekillerde oluşan altın nanopartikül çalışmaları Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Alg aracılı altın nanopartiküllerin biyosentez çalışmaları

<u>NP</u>	<u>Alg Türleri</u>	<u>NP Boyutu</u> <u>(nm)</u>	<u>NP'ün Şekli</u>	<u>Referans</u>
Au	<i>Ecklonia cava</i>	30	küresel-üçgen	J. Venkatesan vd., 2014
	<i>Fucus vesiculosus</i>	çeşitli	küresel	Y.N. Mata vd., 2009
	<i>Sargassum muticum</i>	5-15	-	A. Susan vd., 2013
	<i>Chlorella vulgaris</i>	2-10	Uzamsal dizi	J. Annamalai vd., 2015
	<i>Chondrus crispus</i>	30-50	polihedral ve küresel	S. Jayashee vd., 2015
	<i>Cystoseira baccata</i>	2.2-8.4	küresel	N. González-Ballesteros vd., 2017
	<i>Dunaliella salina</i>	5-45 nm	küresel, hekzagonal,üçgen	Ankit Kumar Singh vd., 2019
	<i>Padina gymnospora</i>	53-67	küresel, hekzagonal	M. Singh vd., 2013
	<i>Padina pavonica</i>	30-100	küresel	G. Isaac vd., 2015
	<i>Phormidium valderianum</i>	7.9-15	-	G. Singaravelu vd., 2007
	<i>Spirulina subsalsa</i>	5-30	-	D. Parial vd., 2014
	<i>Spyrogira insignis</i>	50	-	S. Jayashee vd., 2015
	<i>Stoechospermum marginatum</i>	19-94	küresel, hekzagonal,üçgen	F.A.A. Rajathi vd., 2012
	<i>Tetraselmis kochinensis</i>	5-35	küresel-üçgen	S. Senapati vd., 2012
	<i>Turbinaria conoides</i>	6-10	-	R. Shanmugam., 2013
	<i>Ulva intestinalis</i>	42	küresel	D. Parial vd., 2014

2.7. Algler

Algler ekonomik ve ekolojik açıdan önemli bir fotosentetik organizma grubudur. Tatlı su, deniz suyu ya da nemli kaya yüzeylerinde yaşayabilen tek ya da çok hücreli organizmalardır.

Yüksek bitkilerle birçok benzerlik göstermelerine rağmen, diğer yandan hiçbir bitki grubunda rastlanmayan hücre çeper yapıları, hareketsizlik, gelişme evreleri, pigment yapısı ve şekillerinin farklılığı nedeniyle sayısız ayrıcalıklara sahiptirler. Heterotrofik canlılar için organik besin kaynağı oluşturma yanı sıra, fotosentez yaparak ortamın oksijenasyonunu da sağlarlar. Algler dış görünüşleri bakımından tek hücreliden kolonial duruma, iplikli biçimlerden karışık gelişmiş talluslu yapılara kadar değişik biçimlerde gözlenebilmektedirler.

Şimdiye kadar yapılan birçok çalışmada farklı alg türlerinin çeşitli fungal patojenler üzerinde güçlü fungisidal aktiviteleri rapor edilmiştir (Mickymaray ve Alturaiki, 2018; Pesando ve Caram, 1984; Abedin ve Taha, 2008).

2.7.1. Alglerin kullanım alanları

Doğada biyolojik aktivite açısından en önemli kaynaklardan biri de alglerdir ve yapılarında pek çok biyoaktif bileşen bulunmaktadır. Diğer yandan okyanuslar için çok önemli bir oksijen kaynağıdır (Akyıl vd, 2016). Algler mineral, vitamin, protein, polisakkarit, aminoasit ve sterol gibi bileşenlerce zengin olup kozmetik endüstrisinde, gıda sektöründe ve eczacılıkta yoğun biçimde kullanılmaktadır (Akyıl vd, 2016).

Algler hem deniz hem de tatlı su habitatlarında bulunabilmekte ve pek çok alanda kullanılmaktadırlar. Örneğin yakıt endüstrisinde temiz, çevre dostu ve ekonomik bir biyoyakıt adayıdır. Bazı algler besin olarak kullanıldığı gibi farmasotik ve kozmetik alanlarında pigment, biyoaktif madde ya da tek hücre proteini üretimindeki potansiyelleri de büyük ilgi çekmektedir. Makro alglerden elde edilen agar besin endüstrisinde çeşitli alanlarda kullanıldığı gibi agaroz şeklinde moleküler biyolojide ya da tablet, antikoagulan ve kapsül gibi biyomedikal alanlarda da kullanılmaktadır. Tekstil endüstrisinde sıkça

kullanılan aljinat, bir kahverengi alg türevidir ve jelleşme özelliği sebebiyle büyük önem taşımaktadır. Bazı alg yemleri çeşitli balık larvaların kültüründe kullanılmaktadır. Selüloz içeren algler kağıt üretiminde kullanılmakta ya da bazı mikro ve makro algler çimlenmeyi, bitki gelişimini ve çiçeklenmeyi uyardığı için kullanılmakta ya da bitki hastalıklarına karşı biyolojik koruyucular olarak görev yapmaktadırlar. Çeşitli biyoaktif lipid bileşenlerinin en önemli kaynakları deniz mikroalgleridir ve çeşitli hastalıklara karşı etkili yağ asitleri içerirler. Diğer yandan mikroalgal özütler anti-aging krem, güneş koruyucuları ve saç bakım ürünleri gibi kozmetik alanlarında kullanılmaktadır (Sharma ve Sharma., 2017).

Algler denizlerde tatlısulara oranla daha dar bir alan içerisinde yaşama olanağı bulurlar. Fakat primer ürün olarak denizlerin verimliliği üzerinde önemli bir etkiye sahiptirler. Aynı zamanda atmosfer, su ve sediment arasındaki kimyasal değişim zincirinin de önemli bir halkasını oluştururlar. Deniz algleri yağ, vitamin ve mineral açısından zengin olup polisakkarit, protein gibi biyoaktif maddeler içerirler. Bu özellikleri ile kanser, oksidatif stres, inflamasyon, alerji, tromboz, lipide mi, yüksek tansiyon ve diğer dejeneratif hastalıklara karşı potansiyel faydaları bulunmaktadır. Diğer yandan, sahip oldukları fitokimyasallar tek bir adımda nanopartikül sentezini sağlayabilen hidroksil, karboksil ve amino fonksiyonel gruplarını içermektedir.

2.7.2. Alglerin sınıflandırılması

Gerçek kök, gövde ve yaprakları bulunmayan algler, boyutlarına göre mikroalg ve makroalg olarak ikiye ayrılırlar. Mikroalgler, hareket organelleri olmayan, su hareketleriyle yer değiştirebilen, boyutları mikronla ifade edilen canlılardır. Makro algler ise boyutları türe göre 1-2 cm ile 40-50 m arasında değişen, sucul canlılar için beslenme, barınma ve üreme ortamı oluşturan organizmalardır. Algler içerdikleri pigment maddelerine göre farklı renklerde görülürler. Örneğin Esmer (*Phaeophyta*), Kırmızı (*Rhodophyta*) ve Yeşil (*Chlorophyta*) algler morfolojik olarak renginden cins düzeyinde ayırt edilebilirler. Farklı alg gruplarının kendilerine ait özellikleri ortaya çıktıkça farklı alanlarda kullanılmaya da devam etmektedirler (Çizelge 2.2). En iyi bilinen kullanım şekillerinden biri mikrobiyolojik çalışmalarda kırmızı alglerden elde edilen agardır. Kahverengi alg bileşenlerinden alginat, fukoidan, laminaran ve mannitol en bilinenleridir. Yeşil algler içinde besin değeri yüksek

bir cins olan *Ulva*, B vitamini açısından oldukça zengindir, ayrıca yeşil alglerde A, B, E az miktarda da bazı diğer vitaminlere sahip olduğu bilinmektedir. (Güner ve Aysel, 2011).

Çizelge 2.2. Farklı alg gruplarına ait habitat, pigment yapısı, depo maddeleri ve hücre duvar yapısı farklılıkları (Wehr, J.D ve Robert, G., 2003, Barsanti, L ve Gualtieri, P., 2014)

Alg Grupları	Habitat	Pigmentler	Depo maddeleri	Hücre duvarı yapısı	Flagella
Chlorophyta (Yeşil algler)	Tatlısu, deniz, toprak, simbiyotik	Klorofil a, klorofil b, α , β ve γ karoten, lutein, parasinoksantin	Niştasta	Selüloz hücre duvarı	0-çok
Phaeophyta (Kahverengi algler)	Tatlısu, deniz, toprak, simbiyotik	Klorofil a, klorofil c ve fukoksantin, karoten	Laminarin	Hücre duvarı alginat matriks ile	2(eşit olmayan)
Rhodophyta (Kırmızı algler)	Tatlısu, deniz, toprak, simbiyotik	Klorofil a, Fikoeritrin, fikosiyenin, α , β karoten, lutein	Floride niştası	Hücre duvarı galaktoz polimer matriks ile	0

Yeşil alglerin çok farklı tallus (tek hücreli, kolonial, filamentli, sifonlu, parankimatik talluslu) yapıları mevcuttur. Genellikle tatlısu algleri olup denizel formlarının yanı sıra toprakta ve simbiyotik yaşayanları da mevcuttur. Hücre yapılarında flagella bulunur. Yeşil alglerde sessil yaşayanlar olduğu gibi (*Ulvophyceae*) hareketli yaşayanlar da (*Chlamydomonaceae*) vardır. Klorofil a, b, α , β ve γ karoten, lutein, parasinoksantin pigmentleri içerirler. Kloroplastları ve çekirdeklerinin yanı sıra pirenoidlere de sahiptirler. Hücre çeperi pektin ve selülozdur. Depolama ürünleri niştadır.

Kahverengi algler genellikle deniz algleri olup %1 den daha azı tatlısularda yaşar. Hücre yapılarında flagella (eşit olmayan şekilde ve 2 adet) bulunur. Klorofil a, klorofil c ve fukoksantin, karoten pigmentleri bulundurulur. Karotenler daha baskın olduğu için kahverengi görülürler. Depolama ürünleri laminarindir.

Kırmızı algler ise genellikle makroskobik olup, *Floridophyceae*'lar denizel alglerdir ancak hem mikroskobik olup hem de tatlı suda yaşayan *Bangiophyceae* familyasına ait türleri de bulunmaktadır. Hücre yapılarında hiç flagella bulunmaz. Pigmentlerden klorofil grubundan sadece klorofil a içerirken, diğerlerinden tıpkı siyanobakterilerde olduğu gibi fikosiyenin ve fikoeritrin bulunur. Kloroplastları çift zarlıdır, depolama ürünleri florida nişastasıdır. (Barsanti, L., ve Gualtieri, P., 2014).

2.7.3. Çalışmamızda kullanılan alg türleri

Yeşil bir mikroalg olan *Chlorella sorokiniana* (Shih Ira ve R. W. Krauss), *Chlorellaceae* familyasına aittir (Guiry, 2002; Safi vd, 2014). *Chlorella sorokiniana* yüksek besin içeriğine sahip olup doğal bir antioksidandır. Ayrıca lipit ve karbonhidrat içeriği bakımından yüksek bir üretim kapasitesine sahiptir. Besin içeriğini koruyan kalın bir hücre duvarı bulunmaktadır (Azaman vd, 2017). *Chlorella* hücreleri genellikle küresel görünümlüdür koloniyal formları da bulunur. Kloroplastları tekli ya da parietal olup, hücre içinde pirenoit oluşumu mevcuttur (Schmidt ve Wilhelm, 2014).

Yeşil bir mikroalg olan *Scenedesmus incrassatulus* (Bohlin) *Scenedesmaceae* familyasına aittir (Guiry, 2002). Temel morfolojik karakteristikleri bir ya da iki sıra halinde düzenlenmiş olan hücrelerde düz ya da hafifçe eğri plakalı sönobiyum bulunmasıdır. Bazı türlerinde boynuz benzeri çıkıntılarının olması ile karakteristiktir. Bu familyaya ait olan türlerle son zamanlarda biyoenerji üretimi konusunda çalışmalar geliştirilmektedir. Bunun sebebi bünyesinde bulundurduğu lipitlerden kaynaklanmaktadır. Böylece fosil yakıtlara alternatif olabilecekleri çalışmalarla desteklenmektedir (Wu vd, 2013).

2.8. Sentezlenen Nanopartiküllerin Karakterizasyon Yöntemleri

Nanopartiküllerin fiziksel olarak stabil olduklarını anlayabilmek için partikül boyutuna ve partiküllerin dağılımına bakılır. Dinamik ışık saçılması ya da lazer kırınımı gibi yöntemlerle elde edilebilir. Bu yöntemlerde en önemli parametre PDI (Poly dispersity index) değeridir. PDI değerinin 0.1-0.25 arasında olması durumunda istenilen dar dağılım elde edilirken, 0.5'in üzerinde olması geniş dağılım anlamına gelir. Ultraviyole ve görünür ışık (UV-vis) absorpsiyon spektroskopisi, bir ışın demetinin örnekten geçtikten ya da

yansıtıldıktan sonraki azalmasının ölçülmesidir. Işığın şiddetinin azalması absorblamanın arttığını gösterir. Örneğin derişimi, belli bir dalga boyundaki absorbsiyonu ölçerek bulunur. Kolloidal partiküllerin karakterizasyonu için önemli bir kriterdir. Özellikle metal partiküller için idealdir, çünkü bu partiküller görünür bölgede güçlü yüzey plasmon rezonans absorbsiyonu gösterirler ve yüzey modifikasyonuna çok duyarlıdır. Nanopartiküllerin en sık karşılaşılan zorlukları kararlılıklarıdır. Zeta potansiyellerinin ölçülmesi, kolloidal dispersiyonun saklama stabilitesi hakkında tahminde bulunmaya olanak verir. Genel olarak yüklü partiküller zeta potansiyeli yüksek olup, elektriksel itme nedeniyle partikül agregasyonu meydana gelme ihtimali daha azdır. Nanopartiküllerin zeta potansiyellerine bakılarak kararlılıkları ve topaklaşma eğilimleri elde edilebilmektedir. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrumu (FT-IR) ise metal nanopartiküllerin sentezinin hangi bağlar üzerinden yürüdüğünü belirler. Geçirimli (TEM) ve alan emisyonlu taramalı (FE-SEM) elektron mikroskopi analizi de elde edilen nanopartiküllerin şekil, büyük ve dağılımlarını görüntülemeye kullanılır. X-Işını kırınımı (XRD) ölçümleri, oluşan partikülün fazını ve kristalin derecesini tespit etmede kullanılmaktadır.

Nanopartikül sentezinde sıklıkla karşılaşılan problemler stabilizasyon sorunu, kristal gelişimi ve partikül agregasyonudur. Biyosentez yoluyla elde edilen metal nanopartiküllerin boyut ve şekillerinin kontrol edilebilmesi ancak ilgili biyosentez mekanizmalarının detaylı araştırılmasıyla mümkün olabilir. Ancak nanopartiküllerin biyomoleküler, indirgeme ve stabilizasyonunda görev alan mekanizmalar hala kesin olarak bilinmemektedir.

2.9. Nanopartiküllerin Antifungal Etkileri

Günümüzde fungal enfeksiyonların görülme sıklığındaki hızlı artış, mevcut antifungal ilaçların sınırlı sayıda olması, ökaryotik yapıdaki fungal hücrelere toksik etkili olan antifungal ilaçların yine ökaryotik yapıdaki insan hücrelerine de toksik etki göstermesi antimikrobiyal direnç sorununun çok önemli bir tehdit oluşturmaası ve hatta çoklu ilaç direnci gösteren suşların artışı gibi sebeplerden dolayı yeni tedavi seçimlerine acilen ihtiyaç bulunmaktadır. Tüm fungal enfeksiyonlar içerisinde *Candida* türleri en sık gözlenen ve insan sağlığını en çok etkileyen mikroorganizmalardır. Örneğin dünyadaki hastane kaynaklı *Candida* enfeksiyonlarının büyük çoğunluğu yüksek mortalite oranları göstermektedir (Gutiérrez vd., 2018).

Gümüş nanopartiküllerin çeşitli fungal türler üzerine antifungal aktiviteleri üzerine yapılan çalışmalar oldukça fazladır (Mussın vd., 2019., khatemi ve vd., 2017, Ouda., 2014). Mallman vd. (2015) yeşil sentezle üretilen gümüş nanopartiküllerin *C. albicans* ve *C. tropicalis* üzerine yüksek antifungal etki gösterdiğini rapor etmiş ve bu etkinin Amfoterisin B ilacına benzer bir etki gösterdiğini belirtmişlerdir.

Altın nanopartiküllerin antifungal etkinliği üzerine yapılan çalışmalar daha sınırlıdır ve bu konuda detaylı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada araştırmacılar yanık enfeksiyonlu hastalardan izole edilen fulukanazol dirençli *C. albicans* suşlarına karşı indolisidin bağlı altın nanopartiküllerin antifungal etkinliği olduğunu rapor etmişlerdir (Rahimi vd., 2019). Nidhin vd. (2019) nişasta kullanarak yeşil sentezle küresel şekilli ve 5 nm boyutlarında altın nanopartikül sentezi gerçekleştirmişlerdir ve sentezlenen nanopartiküllerin *C. albicans* izolatu üzerine etkinliğini araştırmışlardır. Araştırmacılar 0.5 mM konsantrasyonda fungal hücrelerin gelişiminin inhibe edildiğini rapor etmişlerdir. Diğer bir çalışmada ise *Annona muricata*'nın yaprak özütlerinden altın nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiş ve çeşitli mantar ve bakteriler üzerine antimikrobiyal etkinliği araştırılmıştır. Araştırmacılar altın nanopartikül etkinliğinin konsantrasyon bağımlı olduğunu ve konsantrasyon arttıkça daha iyi antimikrobiyal aktivite görüldüğünü belirtmişlerdir (Folorunso vd., 2019). Alg bazlı metal nanopartiküllerin antifungal etkinlikleri üzerine çalışmalar ise oldukça yenidir ve bu konuda detaylı araştırmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Mikroorganizmalar

Çalışmamız için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilen *Candida* izolatları 3 farklı türü kapsamakta olup bu izolatlar *C. tropicalis* 1660, *C. glabrata* 1744 ve *C. albicans* ATCC 14053, türlerini içermektedir. Bu izolatların identifikasyonlarında germ tüp testi, mısır unlu Tween 80 agarda mikroskopik morfolojinin incelenmesi, karbonhidrat fermentasyon testleri ile API 20C (bioMerieux, Marcy l'Etoile-France) ticari asimilasyon testi kullanılmıştır. İzolatların saklanması için gliserollü (%20) Yeast Ekstrakt Pepton Dekstroz (YPD) kullanılmış ve -80 °C'de stoklama yapılmıştır. Taze kültür eldesi için stoktan çekilen izolatlar, RPMI 1640 besiyerinde 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir (CLSI M27-A2)

3.2. Kullanılan Besiyerleri ve Kimyasallar

Kloroaurik asit ($M_A=339.785$ g/mol): Nanopartikül sentezinde kullanılmak üzere Fisher Scientific (A.B.D) firmasından ticari olarak satın alınmıştır.

BG-11 besiyeri: Algleri kültüre etmede kullanılan bu besiyeri içeriğinde (NaNO_3 , (Emsure, Almanya) 15 g; $\text{K}_2\text{HP04}$, (Acros Organics A.B.D) 0.4 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, (Acros Organics A.B.D) 0.75 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 0.2\text{H}_2\text{O}$, (Acros Organics A.B.D) 0.36 g; sitrik asit, (Acros Organics A.B.D) 0.06 g; demir (III) amonyum sitrat, (Acros Organics A.B.D) 0.06 g; $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, (Acros Organics A.B.D) 0.01g; Na_2CO_3 , (Acros Organics A.B.D) 0.2 g / L, 1 mL; iz element çözeltisi, (H_3BO_3 , (Emsure, Almanya) 61 mg; MnSO_4 ; H_2O , (Emsure, Almanya) 169 mg; ZnSO_4 ; $7\text{H}_2\text{O}$, (Acros Organics A.B.D) 287 mg; CuSO_4 ; $5\text{H}_2\text{O}$, (Acros Organics A.B.D) 2.5 mg; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, (Acros Organics A.B.D) 12.5 mg / L) kimyasalları kullanılmıştır (Katırcıoğlu vd, 2008; Rippka, 1988).

RPMI 1640 besiyeri: İzolatların aktivasyonunda kullanılan RPMI 1640 besiyeri (L-glutamin ve sodyum bikarbonatlı), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Almanya) firmasından hazır olarak alınmıştır. Antimikrobiyal etkinlik çalışmaları için MOPS ile tamponlanan RPMI 1640 sıvısı kullanılmıştır.

Yeast Extract Pepton Dekstroz (YPD) besiyeri: İzolatların aktivasyonu ve disk difüzyon testlerinde kullanılan bu besiyeri, Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Almanya) firmasından ticari olarak satın alınmış ve üreticinin belirttiği oranda distile su içerisinde çözdürüldükten sonra otoklavda 121 °C’de 15 dk sterilize edilmiştir.

Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS): Elektron mikroskopi çalışmalarında tampon çözelti olarak kullanılmak üzere (Sigma-Aldrich, ABD) ticari olarak hazır alınan PBS, üretici firmanın talimatları doğrultusunda 200 ml distile su içerisinde 1 tablet PBS olacak şekilde çözdürülmüştür (pH 7,4).

Gluteraldehit tespit çözeltisi (%2,5): Örneklerin elektron mikroskopik incelemesinde Primer fiksatif olarak kullanılan bu çözelti için 20 ml PBS içerisine 3 ml %2,5’luk gluteraldehit (EMS, ABD) alınır ve koyu renkli bir şişe içerisinde +4 C’de saklanmıştır (pH 7,2).

Osmiyum Tetraoksit (OsO₄) tespit çözeltisi (%1): Örneklerin elektron mikroskopik incelemesinde sekonder fiksatif olarak kullanılan bu çözeltinin hazırlanması için 0,1 g OsO₄ (EMS, ABD) ampülü iyice yıkanıp kurulandıktan sonra 5 ml distile su içeren koyu renkli bir şişeye alınmış ve kapağı sıkıca kapatılarak şiddetle çalkalanmış ve ampülün kırılması sağlanmıştır. Şişenin ağzı parafilmlemlenmiş ve +4 °C’de 1 gece bekletildikten sonra içine 5ml PBS eklenmiş ve kullanılmak üzere buzdolabında saklanmıştır.

Araldit Resin: Kimyasal takip sonrası gömme ortamı olarak kullanılmak üzere 20 ml Araldit CY212 ve 20 ml DDSA (sertleştirici) bir behere alınarak 20 dk süreyle yavaşça cam bagetle karıştırılmıştır. Daha sonra 1 ml dibütil fitalat (plastik yapıcı) eklenmiş ve 15 dk daha karıştırılmıştır. Son aşamada 0,6 ml BDMA (katalizör) ilavesi ile hazır hale getirilen karışım enjektörlere eşit miktarlarda çekilerek -20 °C’de kullanılabilecek şekilde saklanmıştır.

Uranil Asetat: TEM için kesitleri alınan örneklerin kontrastlanması amacıyla kullanılan bu boya hazırlanırken 7 g uranil asetat, 50 ml metanol ve 50 ml distile su karıştırılarak buzdolabında stoklanmıştır. Boyama sırasında öncelikle oda sıcaklığına gelmesi beklenmiş ve filtre edildikten sonra kullanılmıştır.

Kurşun boyası: TEM için kesitleri alınan örneklerin kontrastlanması amacıyla kullanılan bu boya hazırlanırken öncelikle A ve B olmak üzere iki çözelti hazırlanmıştır. A çözeltisi için 2 g 10 N NaOH (Sodyum hidroksit) ve 5 ml distile su; B çözeltisi için de 0,02 g Kurşun Sitrata ve 10 ml distile su iyice karıştırılmıştır. Daha sonra B çözeltisi içine damla damla olacak şekilde 1 N NaOH eklenmiş ve pH 12'ye ayarlanmıştır. Buzdolabında kullanılabilecek şekilde saklanan bu boya işlem sırasında önce oda sıcaklığına getirilmiş ve filtrasyon sonrası kullanılmıştır.

3.3. Kullanılan Cihazlar

Santrifüj (Beckmann-Coulter Allegra X30-R & Hermle Z326k, Almanya); Ultramikrotom (Leica-Almanya); Trim cihazı (Leica-Almanya); Knifemaker (Leica-Almanya); Manyetik karıştırıcı (Schott, A.B.D.); Buzdolabı (Arçelik- Türkiye); Distile su cihazı (Elga- Almanya); Etüv (Binder, Almanya); Hassas terazi (Ohaus-İsviçre); UV-Vis (AE-S90-2D UV-VIS Spectrophotometer, Çin); TEM (Hitachi Ht 7800, Japonya); FE-SEM (Hitachi Regulus 8230, Japonya); EDS (E2V Scientific Instruments, İngiltere); FTIR spectra (Perkin Elmer Spectrum 100 FTIR- ATR unit, Almanya); X-Işını kırınımı (XRD) cihazı (Panalytical Empyrean, İngiltere); Liyofilizatör (Christ Alpha Plus, Almanya); Ters (Inverted) Mikroskop (Zeiss Primovert, Almanya); Malvern-Zetasizer (Nano-Z590, İngiltere)

3.4. Alglerin Toplanması ve Hazırlanması

Çalışmamızda Eskişehir-Kütahya yolu üzerinde merkeze 21 km uzaklıkta olan Devler Su İşleri (DSİ) Sulama Göleti'nden (Musaözü) (39° 41' 51" Kuzey 30° 19' 25" Doğu) toplanan taş, çamur ve bitki örnekleri göl suyu ile doldurulmuş cam şişelerde toplanmıştır. BG-11 katı besiyerine çizgi ekimi yöntemiyle ekilmiştir. 1 hafta sonra oluşan kolonilerden BG-11 sıvı besiyerlerine aktarım yapılmıştır. Kullanılan kültürler, 25 ° C'de 3000 lux beyaz flüoresan ışık yoğunluğu altında (12 saat gece-12 saat gündüz) BG-11 içeren steril erlenler içerisinde büyütülmüş ve 15-20 gün boyunca log fazına ulaşılması beklenmiştir.

Saf kültür elde etmek için, seyreltme yöntemi uygulanmıştır (Rippka, 1988). Bu yöntemde, doğal ortamlardan alınan karışık kültürler petri kabına yerleştirilmiş ve steril su

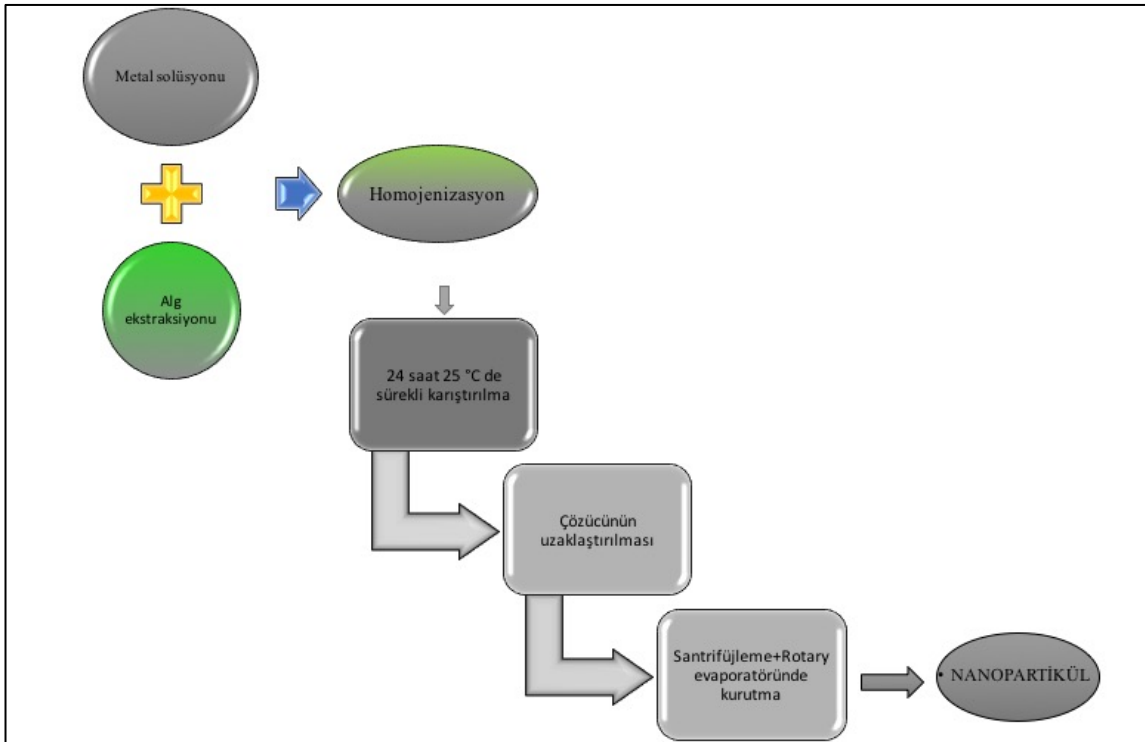
ile seyreltilmiştir. Bu seyreltme prosedürü, tek hücrelerin süspansiyonda serbest şekilde temin edilinceye kadar birkaç kez tekrarlanmıştır. Daha sonra her bir hücre ayrı ayrı ters mikroskop altında pastör pipeti yardımıyla izole edilmiştir. Tekli hücreler elde edildikten sonra, bunlar büyümeleri için BG-11 ortamına aktarılmıştır. Saf kültür olduğundan emin olduktan sonra morfolojik özelliklerine bakarak tür teşhisi yapılmıştır.

3.5. Alg Özütlerinin Hazırlanması

Chlorella ve *Scenedesmus* türleri 4.500 rpm’de 10 dk boyunca santrifüjlenmiş ve 1 kez ultra saf suyla yıkanmıştır. Algleri özüt haline getirmek için son olarak 80 °C’ de 20 dk ısıtılmış ve Whatman No 1 filtre kağıdı kullanılarak filtrelenmiştir. Özütler buzdolabında saklanmıştır.

3.6. Altın Nanopartiküllerin Sentezlenmesi

Tez kapsamında gerçekleştirilen sentez işleminde aşağıda belirtilen yöntem kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Nanopartikül sentez basamakları

3.6.1. Altın nanopartikül sentezinde pH optimizasyonu

1 ml *Chlorella sorokiniana* özütü ile 2,5 ml (1 mM) HAuCl₄, 80 °C 'de HCl/KOH kullanılarak çözeltilerin pH'ları sırasıyla pH 4, 5, 6, 7, 8, 9 olacak şekilde hazırlanıp, UV-vis ölçümlerine göre pH optimizasyonu yapılmıştır. Aynı şekilde pH optimizasyonu 1 ml *Scenedesmus incrassatulus* özütü ve 1,25 ml HAuCl₄ (1 mM) ile tekrar yapılmıştır.

3.6.2. Altın nanopartikül sentezinde metal tuzu optimizasyonu

1 ml *Chlorella sorokiniana* özütü ve 2,5 ml HAuCl₄ molariteleri 0,5 mM, 1 mM ve 5 mM olacak şekilde 80 °C 'de, optimum pH değerinde hazırlanarak UV-vis ölçümlerine göre metal tuzu optimizasyonu yapılmıştır. Aynı şekilde metal tuzu optimizasyonu 1 ml *Scenedesmus incrassatulus* özütü ve 1,25 ml HAuCl₄ ile tekrar yapılmıştır.

3.6.3. Altın nanopartikül sentezinde zaman optimizasyonu

1 ml *Chlorella sorokiniana* özütü ve 2,5 ml HAuCl₄ (1 mM), 80 °C 'de, optimum pH değerinde hazırlanıp, reaksiyonun sırasıyla 1.dk, 3.dk, 5.dk, 10.dk, 15.dk, 30.dk, 45.dk, 60.dk, 75.dk, 90.dk ve 24.saaatin UV-vis ile ölçümleri alınarak zaman optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Aynı şekilde zaman optimizasyonu 1 ml *Scenedesmus incrassatulus* özütü ve 1,25 ml HAuCl₄ (1 mM) ile 80 °C 'de, optimum pH değerinde tekrar yapılmıştır.

3.7. Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

UV-Vis: UV-Vis spektrumları oda sıcaklığında UV-VIS (AE-S90-2D Spectrophotometer, Çin) cihazı ile kaydedilmiştir. Optimizasyon reaksiyonlarımızın (pH, tuz ve zaman) spektrumlarını belirlemek için ölçümler maksimum absorbans dalga boyunda kaydedilmiştir. Tüm taramalar 190-1100 nm dalga boyunda yapılmıştır.

Partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümleri: Nanoparçacıkların optik özellikleri spektral analizle incelenmiştir. Nanopartiküllerin absorbans spektrumu, spektrofotometre ve 10 mm'lik yol uzunluğu kuvars küveti kullanılarak tespit edilmiştir. Yeşil sentezle sentezlenmiş nanopartiküllerinin partikül boyutu, zeta potansiyeli, elektriksel iletkenlik

ölçümleri zetapotansiyometre kullanılarak yapılmıştır. Ard arda üç ölçüm gerçekleştirilmiş, ölçümler sırasında cihazın sıcaklığı 25° C, ışık saçılım açısı 90° olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu işlemler Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Kimya Bölümü Polimer Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

FE-SEM ve TEM: Araştırmamızda elektron mikroskop iki aşamada kullanılmıştır: FE-SEM analizleri ile yüzey karakteristiklerinin belirlenebilmesi için, Whatman kağıdı üzerine (No 1) örnekler damlatılmış ve kurutulduktan sonra karbon bant yapıştırılmış stublar üzerine yerleştirilmişlerdir. Ardından alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) ile incelenmiştir. Örneklerin morfolojik özelliklerinin geçirimli elektron mikroskobu (TEM) yoluyla belirlenebilmesi amacıyla, aynı örneklerden bakır gridler üzerine damlatılmış ve iyice kurutulduktan sonra TEM ile incelenmiş ve enerji dağılımı X-ışını spektroskopisi (EDS) dedektörü ile de elementel analiz yapılmıştır.

FTIR: Nanopartiküller yeşil sentez ile elde edildiğinden dolayı öncelikle nanopartikül yüzeylerine bağlı olmayan organik bileşiklerin uzaklaştırılması için FTIR deneylerinden önce damıtılmış su ile üç kez tamamen yıkanmıştır. Daha sonrasında nanoparçacıklar liyofilize edilerek katı hale getirilmiş ve sonrasında Potasyum Bromür (KBr) 100 °C’de 1 saat ısıtılarak nemin uzaklaştırılması sağlandıktan sonra yaklaşık 3 mg KBr bir havanda ince toz haline getirilip pres makinasına konularak üzerine 3000 bar basınç uygulanıp ince film şeklinde disk elde edilmiştir. Bu disk FTIR cihazına konularak 400-4000 cm^{-1} aralığında spektrumlar alınmıştır. Böylece indirgenmiş altın nanopartiküllerinin yüzey kimyası ve özütlerin biyolojik işlevli kısımlarının varlığını kontrol etmek için analiz yapılmıştır.

XRD: Nanopartiküllerin kristal yapısını belirlemek için Panalytical Empyrean X-ışını difraktometresi (XRD) kullanılarak numunelerin toz kırınım deseni analizleri alınmıştır. XRD cihazında Cu K α tüpü kullanılarak (λ :1,54 Å), 45 kV voltaj ve 40 mA akım analiz koşullarında 2 θ açısı taraması yapılmıştır. Bu yöntem ile saf kristal halde bulunan yapının çözülmesi sağlanarak; birim hücrenin bağ uzunlukları, bağ açıları ve üç boyutlu yapının kimyasal analizi sağlanabilmiştir.

3.8. Nanopartiküllerin Antifungal Etkisinin Değerlendirilmesi

3.8.1. Antifungal duyarlılık testleri

Sentezlenen nanopartiküllerin antifungal duyarlılıkları agar difüzyon ve broth mikrodilüsyon (Minimum inhibitör konsantrasyonu-MİK) testleri ile değerlendirilmiştir.

3.8.1.1. Agar difüzyon testi

Altın nanopartiküllerinin antifungal aktivitesinin araştırılabilmesi için yapılan disk difüzyon yönteminde YPD agar besiyeri kullanılmıştır. Aktive edilmiş mikroorganizmaları McFarland 0,5 değerine ayarlanmış ve besi ortamına inokülasyonu sonrası 100 µl olacak şekilde enjekte edilen altın nanopartiküllerle hazırlanmış diskler, besi ortamına yerleştirilmiştir. 24 saat sonunda oluşan zonlar ölçülmüştür. Deneyler 3 kez tekrar edilmiştir (Jorgensen vd., 2015).

3.8.1.2. MİK ve MFK testleri

Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerlerinin belirlenmesinde Klinik Laboratuar Standartları Enstitüsü tarafından mayalar için önerilen kriterler kullanılmıştır (CLSI M27-A2; Zgoda vd., 2001). Çalışmaya kontrol grubu ve etken maddeyi içeren gruplar dahil edilmiştir. Amfoterisin B standart ilaç olarak kullanılmıştır. Antifungal duyarlılık testleri yapılırken, steril, U tabanlı ve 96 kuyucuklu mikropatlara etken maddelerin seri 2 katlık dilüsyonları hazırlanmıştır. RPMI 1640 besiyeri içindeki test organizmalarının kuyucuk içerisindeki yoğunlukları $0.5-2.5 \times 10^3$ CFU/ml olacak şekilde ayarlanmış ve 37 °C'de 48 saat inkübasyon sonrası mikropat okuyucuda 600 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Mikrobiyal gelişimi inhibe eden en düşük nanopartikül konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenmiştir.

Minimum fungisidal konsantrasyon (MFK) değerini belirlemek için MİK değerinin altında konsantrasyon içeren temiz kuyucuklardan 50 µl alınıp YPD petrilere ekim yapılmış ve 37 °C 'de 48 saat süreyle inkübe edilmişlerdir. Agar yüzeyinde üreme olmayan en düşük konsantrasyon MFK olarak belirlenmiştir.

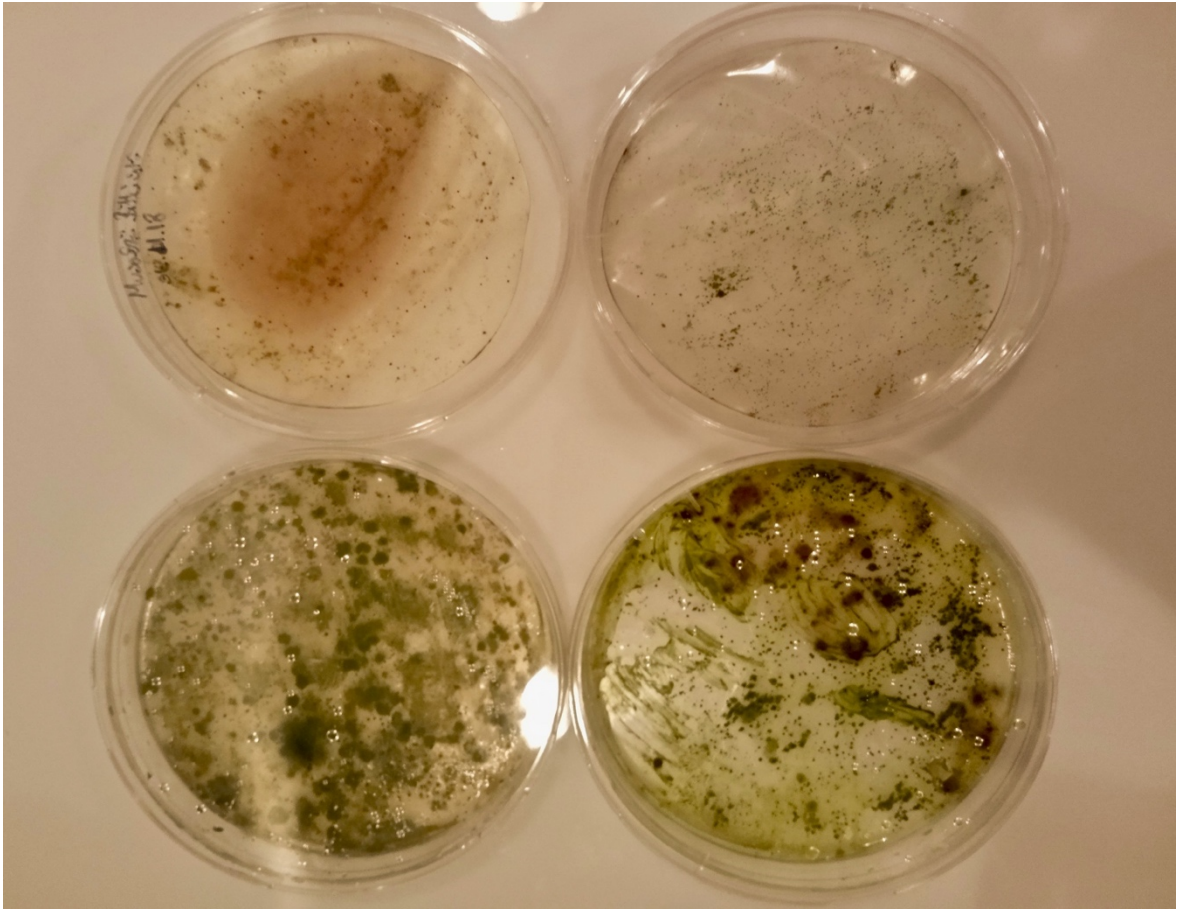
3.8.2. Etken maddelerin *Candida* izolatları üzerine etkisinin TEM ile incelenmesi

Hücreler 10^5 CFU/ml olacak şekilde ayarlandıktan sonra 1xPBS ile 3 kez yıkanmış ve daha sonra oda sıcaklığında etken madde ile muamele edilmiş ve edilmemiş hücreler PBS'de hazırlanmış % 2.5 glutaraldehit içine alınmış ve 24 saat fiske edilmiştir. PBS ile 3 kez yıkanan örnekler %1'lik Osmium tetraoksit içinde 1 saat sekonder fiksasyona alınmıştır. Tekrar tamponla yıkanan örnekler dehidrasyon işlemleri için alkol serilerinden geçirilmiştir (%30 etanolde 10 dk + %50 etanolde 10 dk + %70 etanolde 10 dk + %90 etanolde 10 dk + %95 etanolde 10 dk + %100 etanolde 10 dk). Ardından şeffaflaştırma işlemi için örnekler önce oda sıcaklığında 10 dk propilene alıp, sonrasında propilen + araldehit karışımında 10 dk rotatorda tutulmuştur. Son olarak örnekler saf araldehite alınıp, 1 gün boyunca rotatorda bırakılmıştır. Araldit bazlı gömme materyaline alınan hücreler 60 °C'de 48 saat polimerizasyona bırakılmış ve blok haline getirilmişlerdir. Örneklerin ultramikrotom (Leica Ultracut R) ile alınan tam ince kesitleri de (60 nm) grid üzerine alınarak uranil asetat- kurşun sitrat ile boyandıktan sonra TEM'de incelenmişlerdir (Børsheim, K. Y. vd., 1990).

4.BULGULAR VE TARTIŞMA

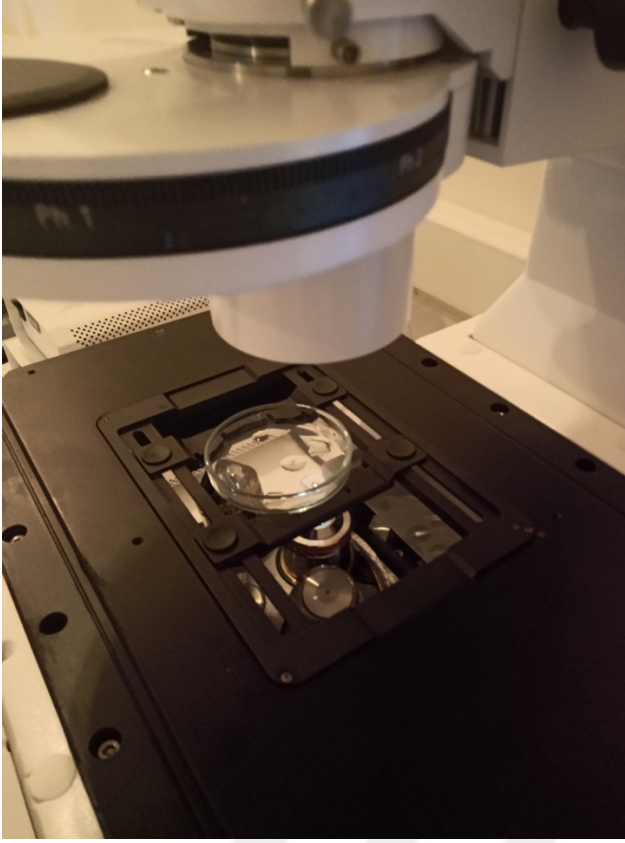
4.1. Alglerin Çoğaltılması

Çalışmamızda DSİ Sulama Göleti'nden (Musaözü) toplanan örnekler BG-11 katı besiyerinde bir hafta içerisinde çoğalmış (Şekil 4.1), ardından çoğalan kolonilerden BG-11 sıvı besiyerlerine aktarım yapılmış ve 15-20 gün sonra algler log fazına geçmişlerdir.

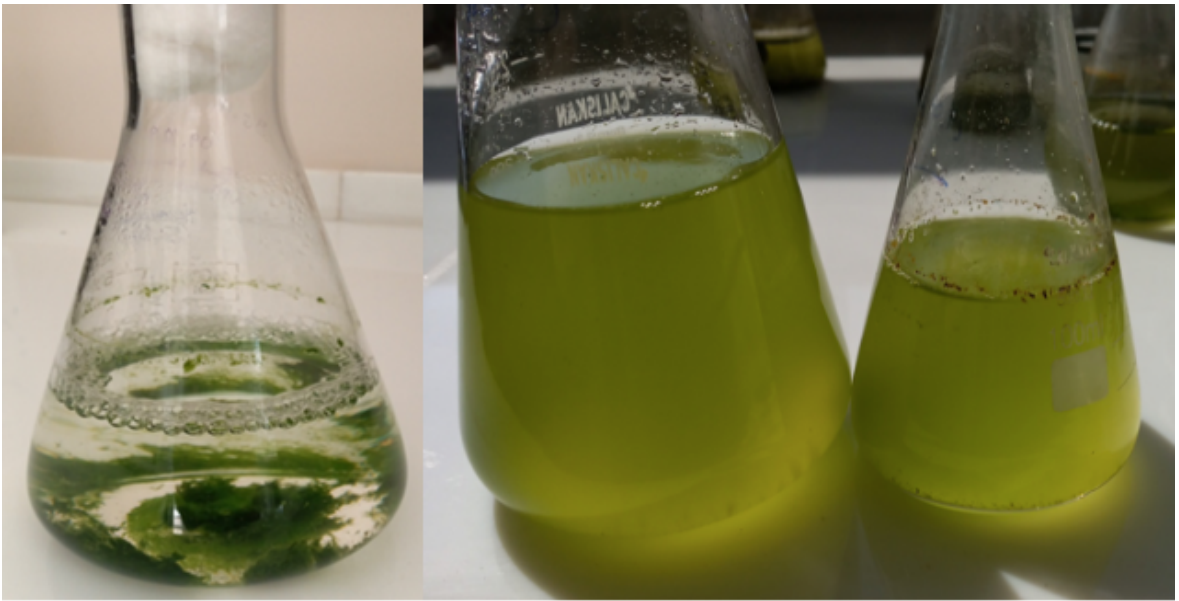


Şekil 4.1. BG-11 katı besiyerinde çoğalan ve göletin farklı yerlerinden izole edilen alg kolonileri: üsttekiler epifitik, alttakiler epilitik

Bu aşamadan sonra ters (inverted) mikroskopta seyreltme prosedürü kullanılarak izole edilen tekli hücreler, saf kültür olarak çoğaltılmak üzere yeni BG-11 sıvı besiyerine inoküle edilmişlerdir (Şekil 4.2). Yaklaşık 2 hafta sonra saflaştırılmış hücrelerin log fazına ulaştığı tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



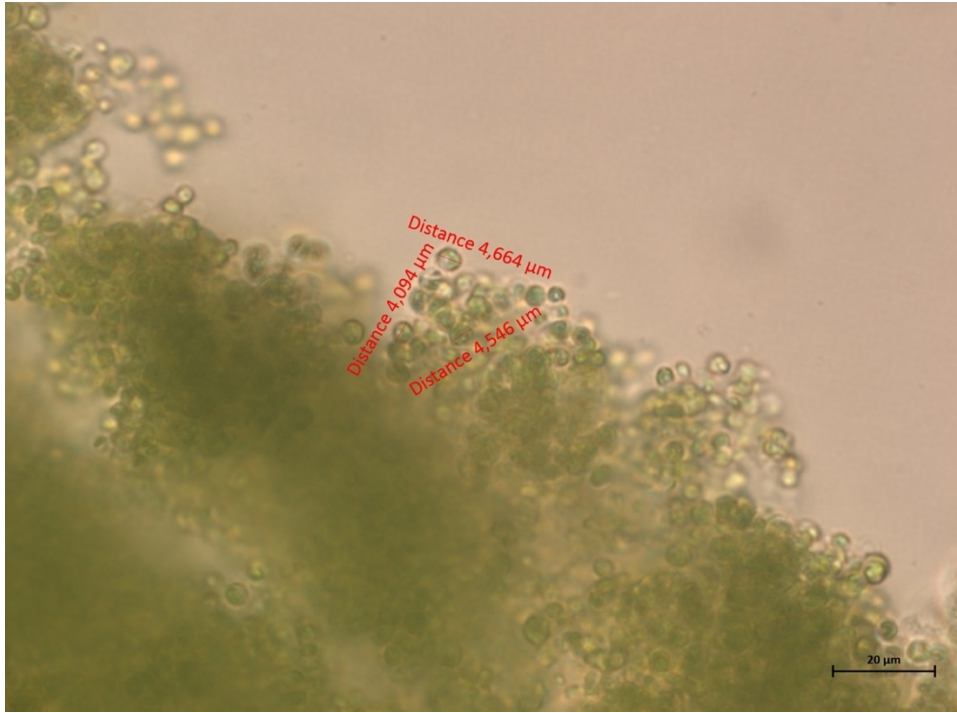
Şekil 4.2. Alg hücrelerinin invert mikroskop altında seyreltme prosedürü ile saflaştırılması



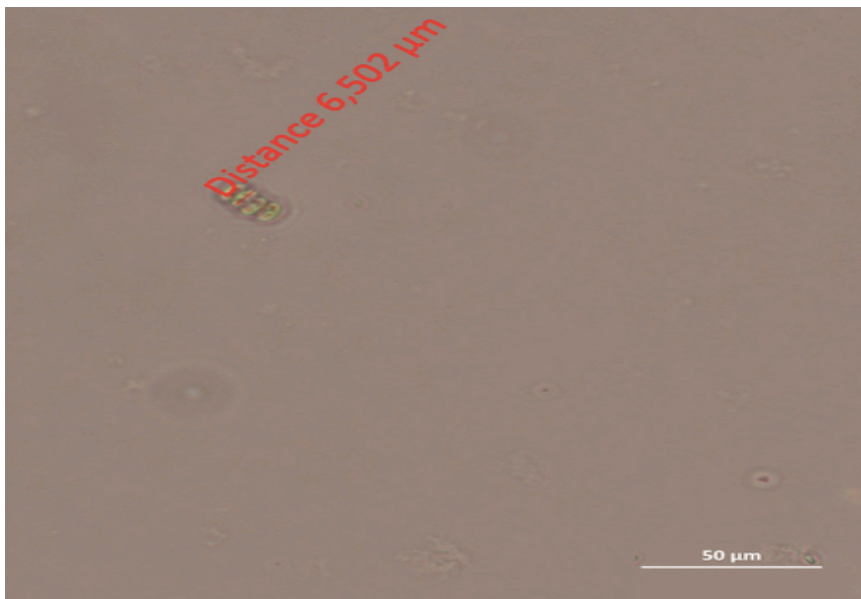
Şekil 4.3. BG-11 sıvı besiyerlerindeki solda *Scenedesmus incrassatulus* ve sağda *Chlorella sorokiniana*

4.1.1. Ters (inverted) mikroskopik inceleme

Ters mikroskop ile log fazına ulaşan saf kültürlerin tür teşhisleri, morfolojik özellikleri incelenerek yapılmış, *Chlorella sorokiniana* ve *Scenedesmus incrassatulus* kültürleri ile çalışmaya devam edilmiştir (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5).



Şekil 4.4. *Chlorella sorokiniana* türünün ters mikroskop görüntüsü



Şekil 4.5. *Scenedesmus incrassatulus* türünün ters mikroskop görüntüsü

4.2. Altın Nanopartiküllerin Sentezlenmesi

Chlorella sorokiniana ve *Scenedesmus incrassatulus* özütleri kullanarak altın nanopartikül sentez ve optimizasyonları gerçekleştirilmiştir.

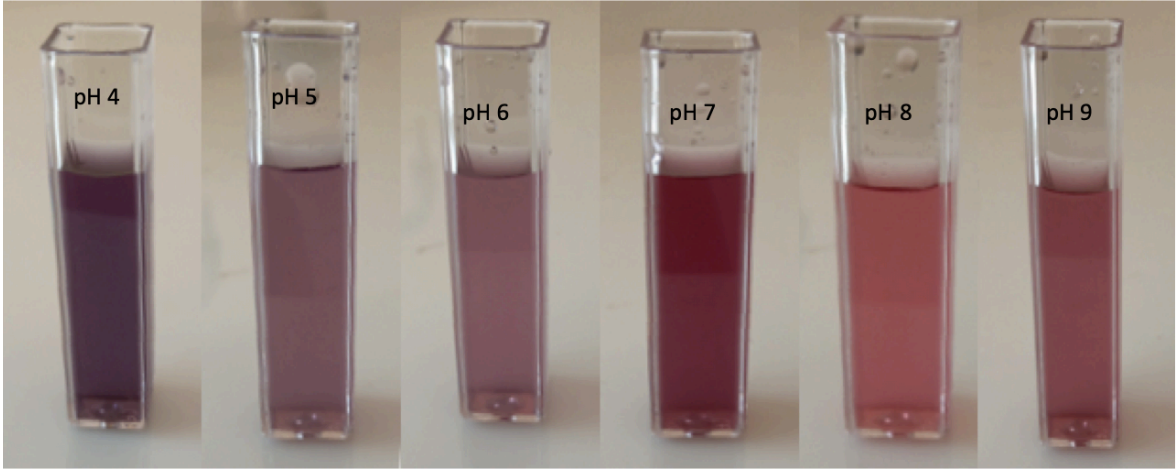
4.2.1. Elde edilen altın nanopartiküllerin UV-Vis karakterisasyonu

Çalışmada altın nanopartikül sentezi için önemli pH, zaman ve tuz gibi deneysel koşullar optimize edilmiştir. Bu işlem gerçekleştirilirken altın nanopartiküllerin karakteristik yüzey plazmon rezonansı (SPR) bandının görülmesi, nanopartikül oluşumunu doğrular. SPR bandı reaksiyon ortamındaki nanopartiküllerin çeşitli boyutlarda ve şekillerde oluşabileceği spektrumlarla anlaşılabilir. Özellikle az yoğun ve geniş spektrumlar bu nanopartiküller hakkında fikir vermiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda optimum altın nanopartiküller sentezlenmiştir.

Altın nanopartiküllerin oluşumu pembe veya kırmızımsı bir renk görünümü ile doğrulanmaktadır. Renk değişimi metalik nanopartiküllerle etkileşen elektro-manyetik alanın neden olduğu elektronların kolektif salınımını gösterir (Mulvaney, 1996; Velmurugan, 2014).

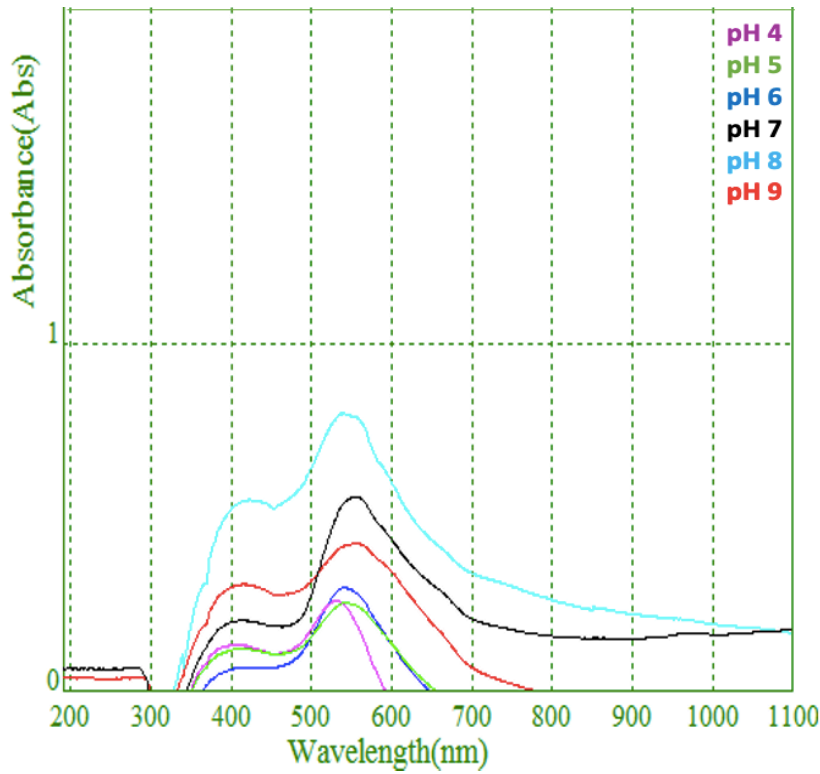
4.2.1.1. C. sorokiniana ile nanopartikül sentezinde pH optimizasyonu

Optimizasyonu gerçekleştirmek için 1 ml *C. sorokiniana* özütü ve 2,5 ml HAuCl₄ (1 mM) karıştırılıp 80 °C’ de, sırasıyla pH 4-5-6-7-8-9 olacak şekilde reaksiyonlar oluşturulmuş ve her reaksiyon için pembenin farklı tonlarında renk değişimleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.6). Bu değişim yüzey plazmon rezonansı sebebiyle gerçekleşmektedir.



Şekil 4.6. *C. sorokiniana* ile nanopartikül sentezinde pH değişimine bağlı olarak reaksiyonlarda gözlenen renk farklılıkları

Şekil 4.7’ de, 532 nm’de kaydedilen UV-vis spektrumları görülmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda en iyi spektrum pH 8’de alınmıştır. Optimum pH’nın ayarlanması, reaksiyon sentez zamanını da etkilemiş ve pH 8’de diğer pH koşullarına göre çok daha hızlı bir renk değişimi gözlenmiştir. Bu sebeple bir sonraki deney şartları oluşturulurken pH 8 ile devam edilmiştir.

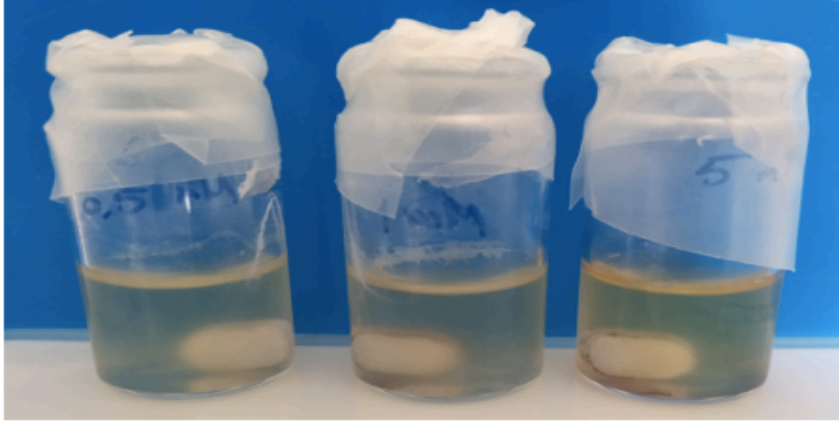


Şekil 4.7. *C. sorokiniana* ile nanopartikül sentezinde pH optimizasyonu için UV-Vis analizi

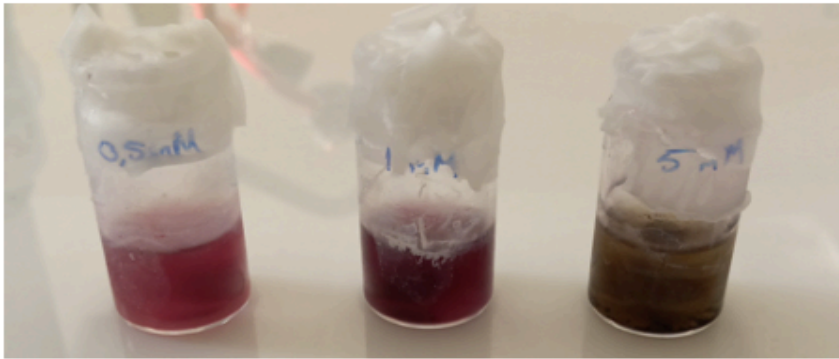
4.2.1.2. C. sorokiniana ile nanopartikül sentezinde tuz optimizasyonu

Tuz optimizasyonu için 1 ml *C. sorokiniana* özütü ve 2,5 ml HAuCl_4 sırasıyla 0,5 mM, 1 mM ve 5 mM HAuCl_4 olacak şekilde karıştırılıp 80 °C’ de pH 8’de reaksiyona girmiş ve her birinde renk değişimi gözlemlenmiştir (Şekil 4.8).

Şekil 4.9’da, 532 nm’de kaydedilen UV-vis spektrumları görülmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda 1 mM HAuCl_4 derişiminin altın nanopartikül sentezi için en iyi sonucu verdiği görülmektedir. Tuz ayarlaması, reaksiyon sentez zamanını da etkilemiş ve 1 mM HAuCl_4 , diğer tuz konsantrasyonlarına göre çok daha hızlı bir şekilde renk değişimi göstermiştir. Bu sebeple bir sonraki deney şartları oluşturulurken 1 mM HAuCl_4 ile devam edilmiştir.

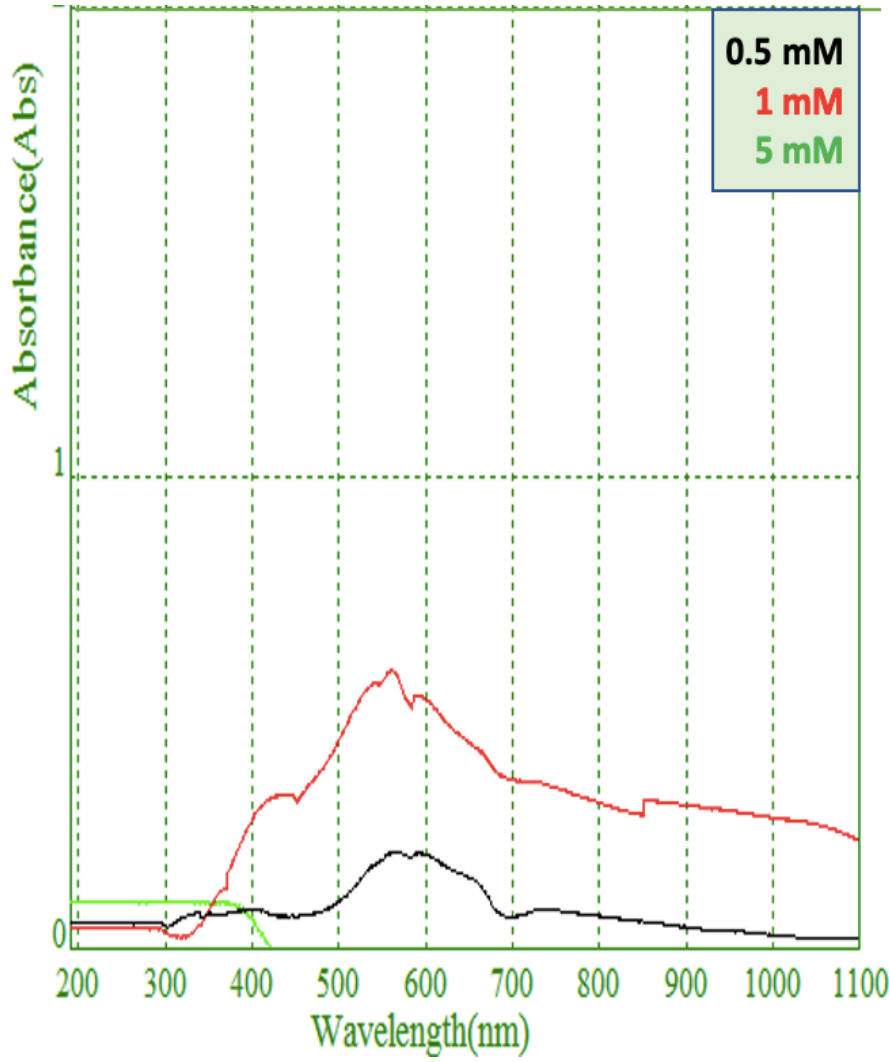


Reaksiyon öncesi



Reaksiyon sonrası

Şekil 4.8. *C. sorokiniana* ile nanopartikül sentezinde altın tuzu molaritesine bağlı olarak reaksiyon öncesi ve sonrası renk değişimleri

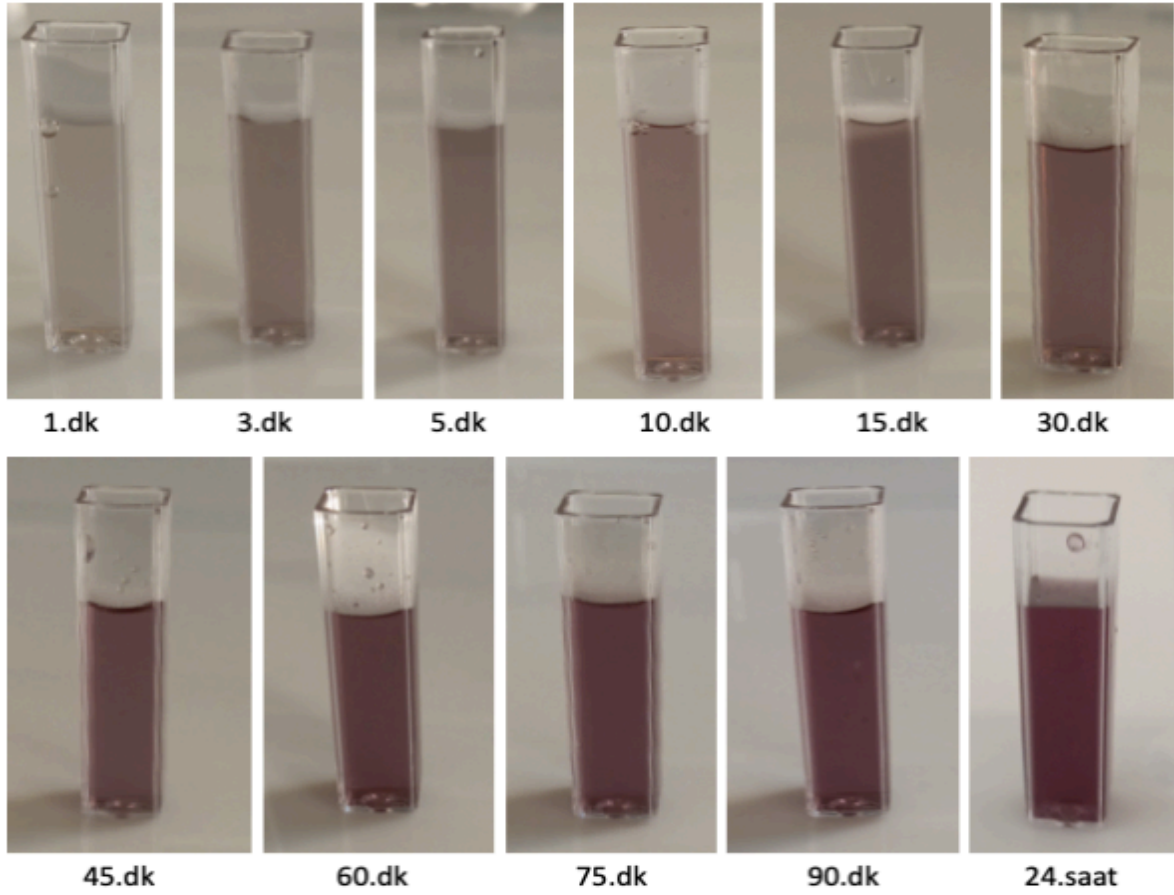


Şekil 4.9. *C. sorokiniana*. ile nanopartikül sentezinde tuz optimizasyonu için UV-Vis analizi

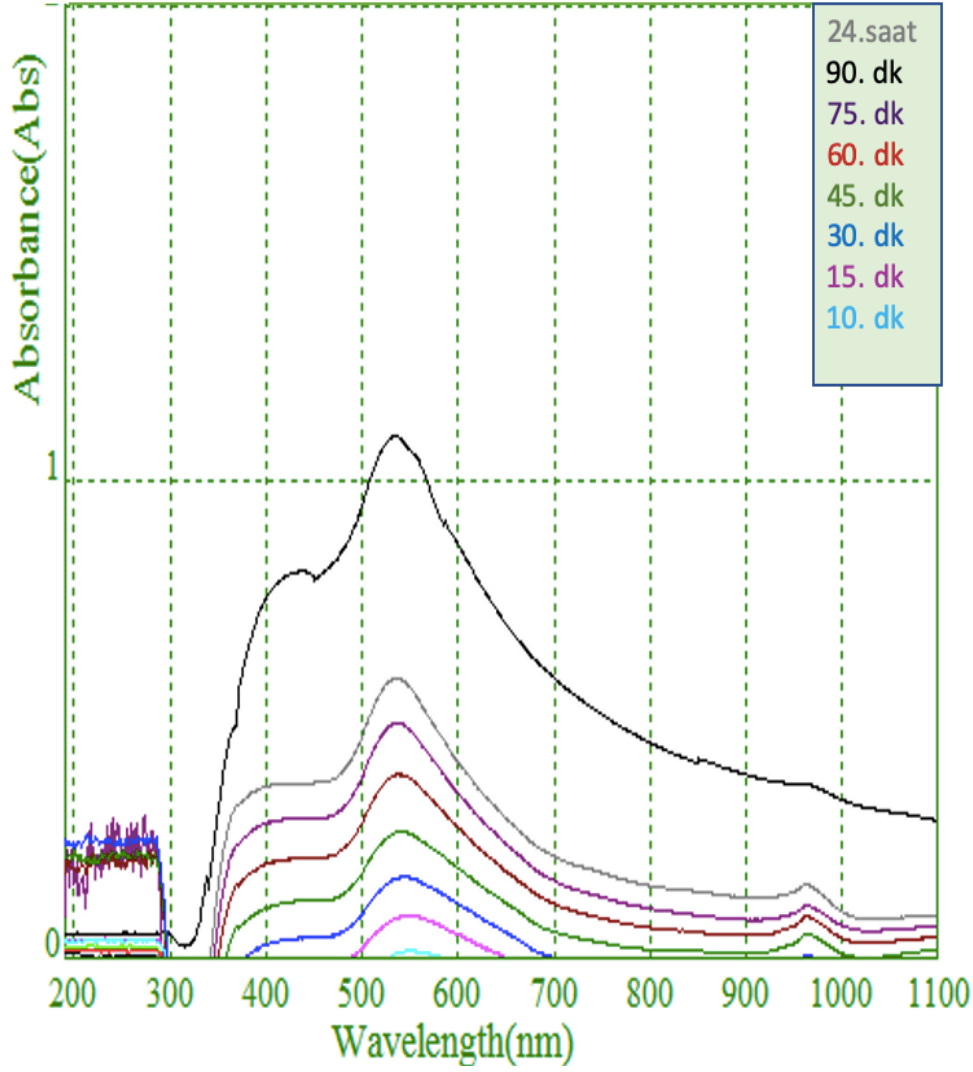
4.2.1.3. *C. sorokiniana* ile nanopartikül sentezinde zaman optimizasyonu

Yapılan optimizasyonlar sonucu 1 ml *C. sorokiniana* özütü ve 2,5 ml (1 mM) HAuCl_4 karıştırılıp 80 °C’ de, pH 8 olacak şekilde reaksiyon oluşturulmuş, önce 1 dk’lık reaksiyonun UV-vis ölçümü alınmış ve ardından sırasıyla 3., 5., 10., 15., 30., 45., 60., 75., 90. dk’larda ve 24. saatte UV-vis ölçümleri alınmıştır. Reaksiyonun süresi arttıkça renk değişimi görülmüştür (Şekil 4.10). Buna göre 1. dakikadan itibaren renk değişimi başlamıştır. Bu durum altın nanopartiküllerinin oluştuğunun bir işareti olarak görülmektedir. Tüm sürelerin UV-vis ölçümleri değerlendirildiğinde hem 75. hem de 90. dakikalarda 537 nm’de pik verdiği görülmüş ama absorbans değeri 90. dk’da daha yüksek çıktığı için optimal zamanın 90. dk olduğu sonucuna varılmıştır. Şekil 4.11’ de Reaksiyonun ilk dakikasından itibaren

absorbansta hızlı bir artış görülmüş ve bu sonuç özüt matrisi içindeki altın atomlarının hızlı bir şekilde çekirdeklenmesine bağlı olarak nanopartiküllerin sentezlendiğini gösterir. Ölçümler 24. saatin de takibi sonrasında sonlandırılmıştır.



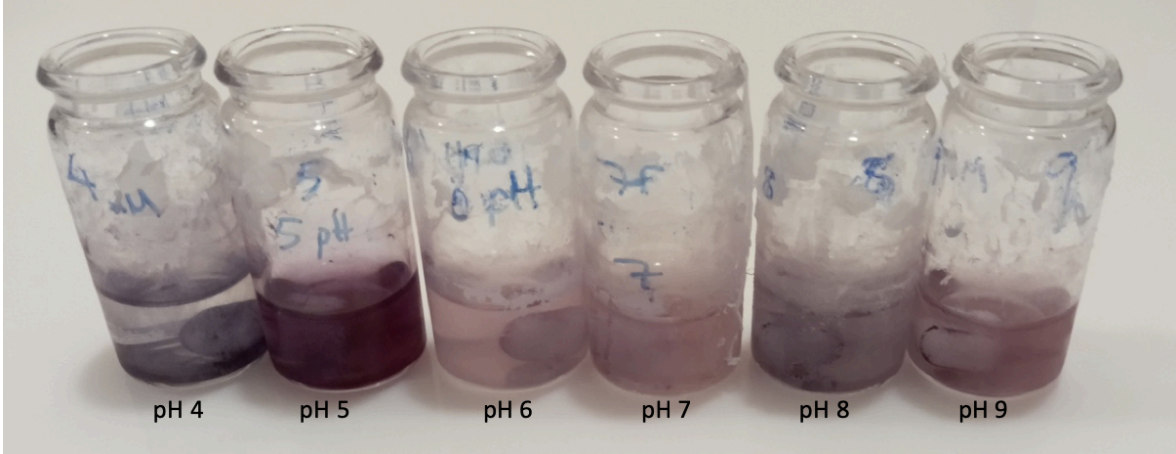
Şekil 4.10. *C. sorokiniana* ile nanopartikül sentezinde zamana bağlı olarak gerçekleşen renk değişimi



Şekil 4.11. *C. sorokiniana*. ile nanopartikül sentezinde zaman optimizasyonu için UV-vis analizi

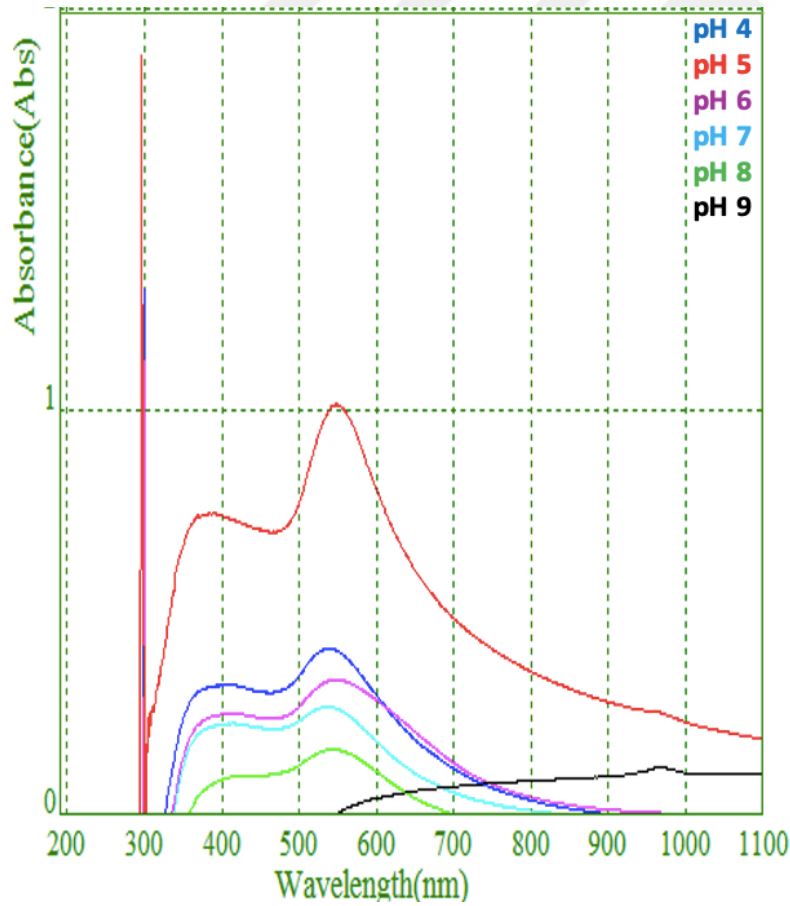
4.2.1.4. *S. incrassatus* ile nanopartikül sentezinde pH optimizasyonu

S. incrassatus ile nanopartikül sentezinde pH optimizasyonu için, 1 ml *S. incrassatus* özütü ve 1,25 ml HAuCl_4 (1 mM) karıştırılıp 80 °C’ de, sırasıyla pH 4-5-6-7-8-9 olacak şekilde reaksiyonlar oluşturulmuş ve pH değişimine bağlı olarak her reaksiyonda mor-pembenin farklı tonlarında renk değişimi gözlemlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. *S. incrassatus* ile nanopartikül sentezinde pH değişimine bağlı olarak reaksiyonlarda gözlenen renk farklılıkları

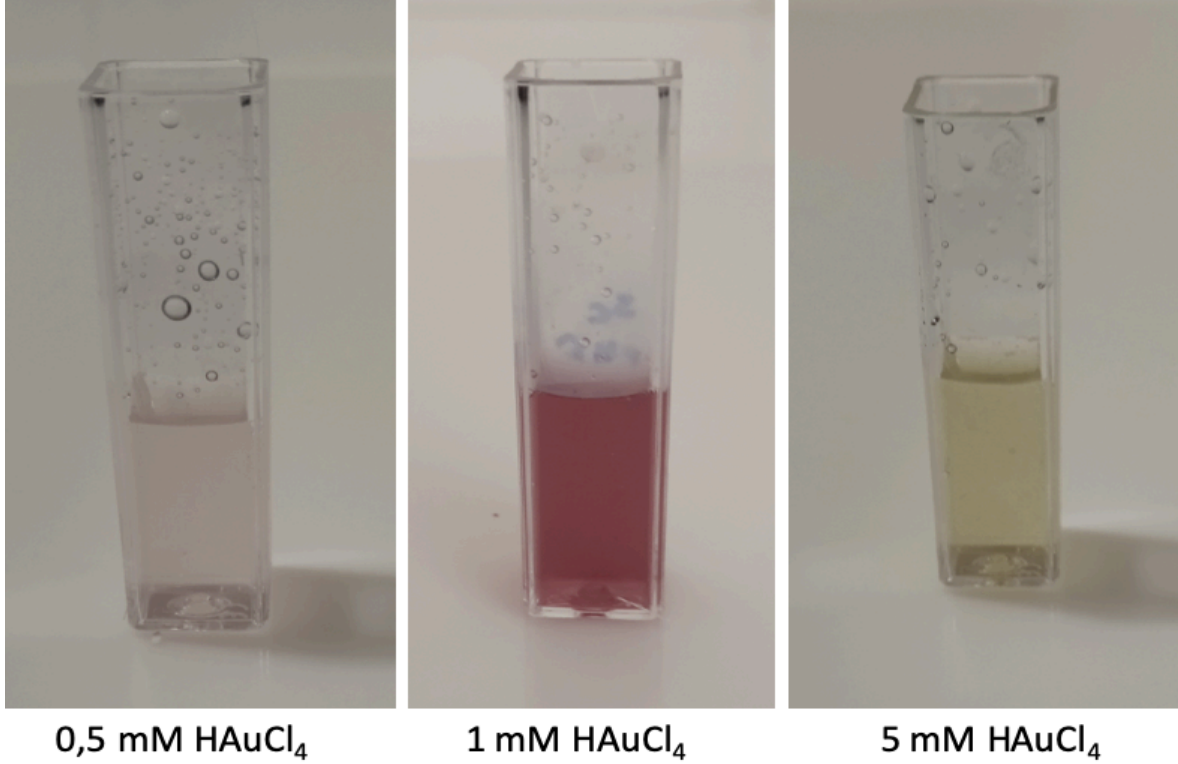
Şekil 4.13'te verilen UV-vis ölçümleri, en iyi sonucun pH 5 değerinde olduğu göstermiştir.



Şekil 4.13. *S. incrassatus* ile nanopartikül sentezinde pH optimizasyonu için UV-vis analizi

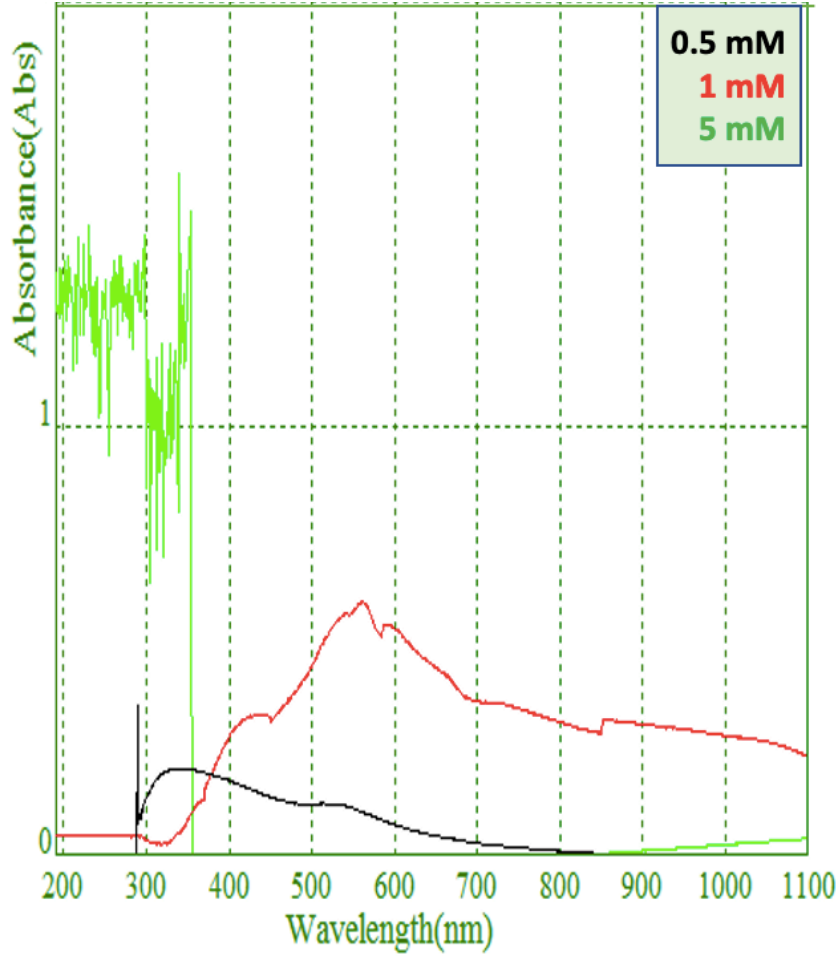
4.2.1.5. *S. incrassatus* ile nanopartikül sentezinde tuz optimizasyonu

Çalışmamızın bu aşamasında 1 ml *S. incrassatus* özütü ve 1,25 ml sırasıyla 0,5 mM, 1 mM ve 5 mM HAuCl_4 olacak şekilde karıştırılıp 80 °C' de pH 5'de reaksiyonlar oluşturulmuş ve her birinde renk değişimi gözlemlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. *S. incrassatus* ile nanopartikül sentezinde altın tuzu molaritesine bağlı olarak reaksiyonlardaki renk değişimleri

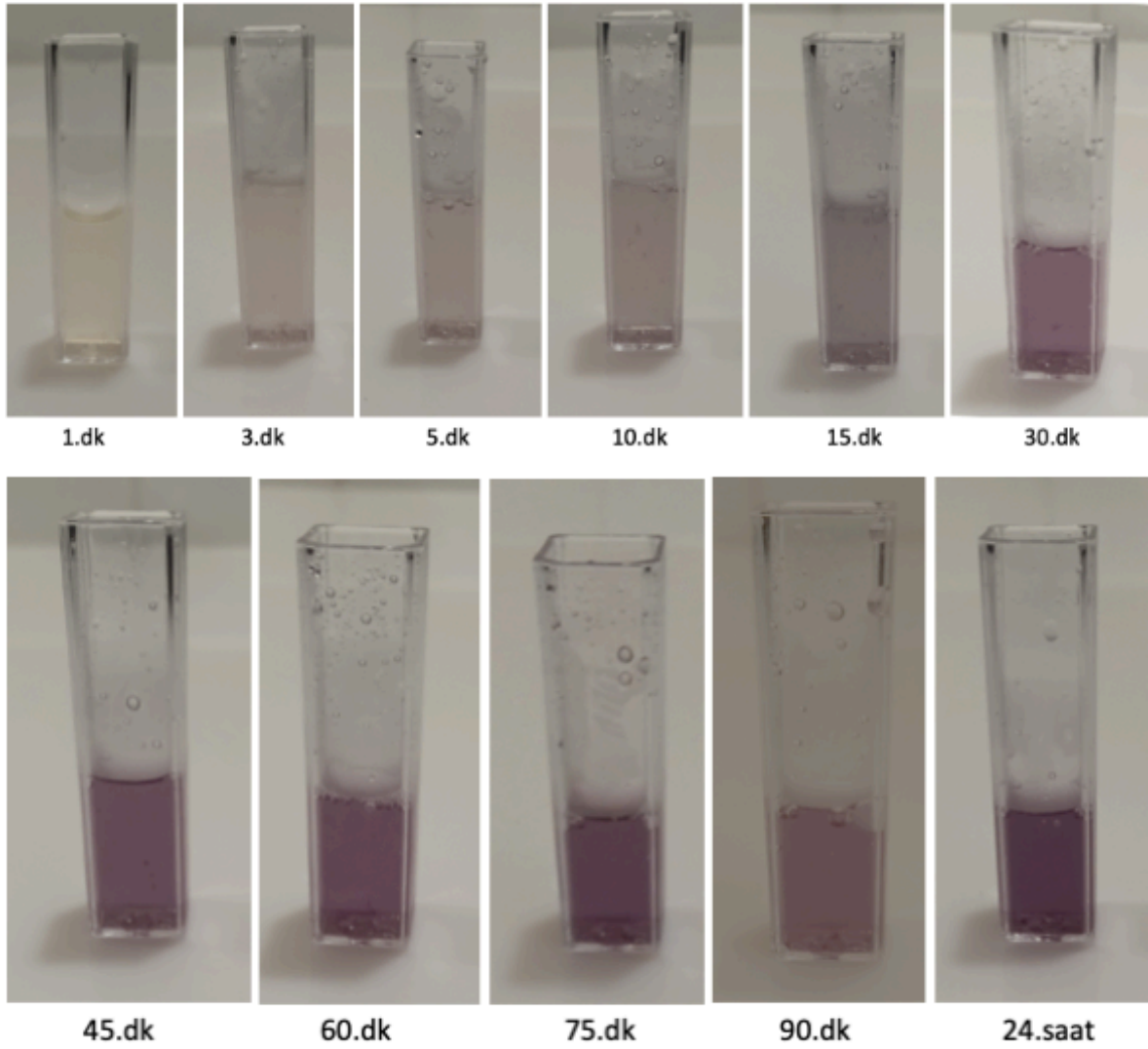
UV-vis ölçümleri sonucunda 1 mM HAuCl_4 derişiminin en iyi sonucu verdiği görülmektedir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. *S. incrassatus* ile nanopartikül sentezinde tuz optimizasyonu için UV-vis analizi

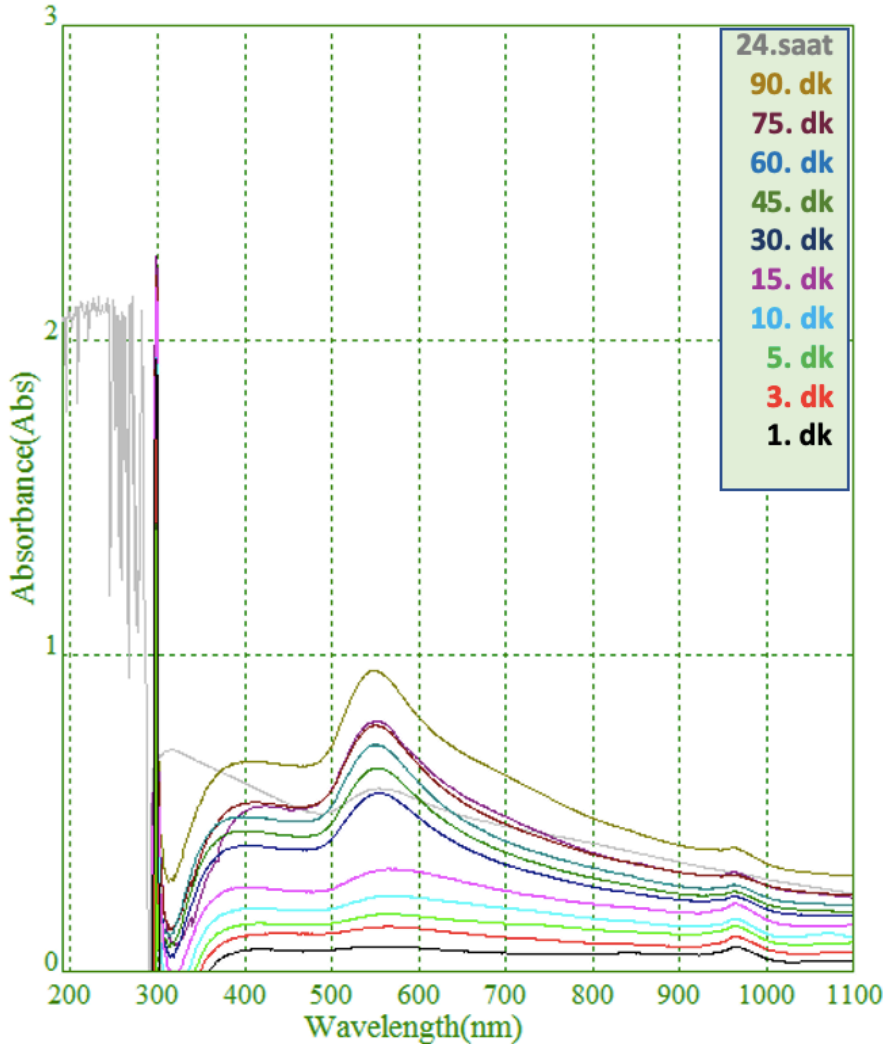
4.2.1.6. *S. incrassatus* ile nanopartikül sentezinde zaman optimizasyonu

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucu ulaşılan veriler gözönüne alındığında 1 ml *S. incrassatus* özütü ve 1,25 ml H_{Au}Cl₄ (1 mM) karıştırılıp 80 °C’ de ve pH 5 olacak şekilde reaksiyon oluşturulmuş, önce 1 dk’lık reaksiyonun UV-vis ölçümü alınmış; ardından sırasıyla 3., 5., 10., 15., 30., 45., 60., 75., 90. dakikalarda ve 24. saatte UV-vis ölçümleri belirlenmiştir. Reaksiyon süresine bağlı olarak farklı renk değişimleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. *S. incrassatulus* zamana bağlı olarak reaksiyonlardaki renk değişimleri

Tüm sürelerin UV-vis ölçümleri değerlendirildiğinde dalga boylarının 30., 45. ve 60. dakikalar için 553 nm olduğu, 75. dk için 552 nm, 90. dk için 551 nm ve 24. saat için 549 nm olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bununla birlikte absorbans değeri de göz önüne alındığında optimal değer 90. dk'da elde edildiği bulgusuna ulaşılmıştır (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. *S. incrassatus* ile nanopartikül sentezinde zaman optimizasyonu için UV-vis analizi

Elde edilen iki alg özütünün pH, zaman ve tuz konsantrasyonları bakımından optimizasyonları değerlendirildiğinde, gözlenen farklılıkların özüt içeriğindeki biyomoleküllerin değişkenliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu yüzden nanopartikül sentez çalışmaları için kullanılan canlıların farklılıkları önem taşımaktadır.

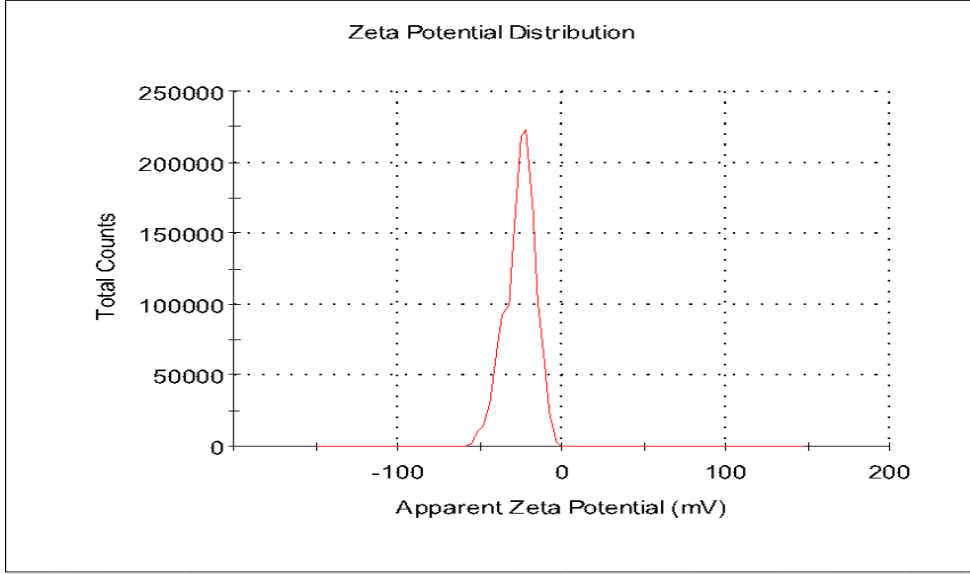
Yapılan optimizasyonlar sonucunda 1 ml *C. sorokiniana* özütü ve 2,5 ml HAuCl₄ (1 mM) karıştırılıp 80 °C’ de, pH 8 ve 1 ml *S. incrassatus* özütü ve 1,25 ml HAuCl₄ (1 mM) karıştırılıp 80 °C’ de ve pH 5 olacak şekilde 90 dakikada altın nanopartikül sentezi gerçekleştirilip, nanopartiküllerin glomerat oluşturmalarını engellemek için 18.000 rpm’de 5 dk santrifüjlenmiş ve süpernatant kısmını pipetle ependorfa alınıp, buzdolabında saklanmıştır.

Nanopartikül üretimi sonrası yapılan optimizasyon çalışmaları optimum reaksiyon parametrelerinin elde edilmesi için çok önemlidir. Literatürde yapılan nanopartikül sentez çalışmaları incelendiğinde optimizasyon prosesinin çok az sayıda yapıldığı görülmektedir. *Zingiber officinale* kök özütü kullanılarak 10-20 nm boyutlarında altın ve gümüş nanopartikül sentezi gerçekleştiren araştırmacılar optimizasyon için sıcaklık, pH, zaman ve metal tuzu konsantrasyonu parametrelerini kullanmışlardır (Velmutuguran vd., 2014). Bizim çalışmamızda da pH, zaman ve metal tuzu konsantrasyonu parametreleriyle optimizasyon yapılmıştır. Singaravelu vd. (2007) *Sargassum wightii* kullanarak hücre dışı altın nanopartikül biyosentezi gerçekleştirmişlerdir ve hücre dışı sentezin oldukça stabil ve kısa süre içinde altın nanopartikül eldesi sağladığını belirtmişlerdir. Algler kullanılarak gerçekleştirilen hücre içi ve dışı nanopartikül sentez çalışmalarında altın nanopartiküllerin küresel, üçgen, hegzogonal şekillerde olabildiği ve boyutlarının da kullanılan alg türüne bağlı olarak geniş bir aralıkta olduğu rapor edilmektedir (Shankar vd., 2016).

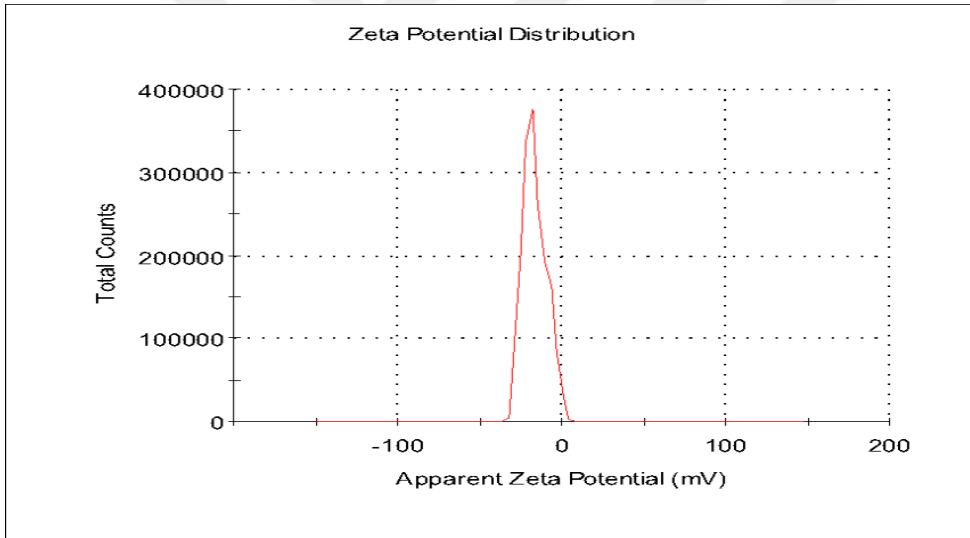
4.3. Karakterizasyon

4.3.1. Altın nanopartiküllerinin ZETA ve DLS karakterizasyonu

Zeta potansiyeli, altın nanopartiküllerin hem kararlılığını hem de toplam yükünü belirlemede kullanılır ve nanopartiküllerin uzun süreli stabilitesini öngören, ayrıca çözeltideki yüzey yükünü belirlemek için kullanılan önemli bir araçtır (Swain vd., 2016). Sentez sonrası altın nanopartiküllerin üç tekrarlı analizi sonucu Malvern-Zetasizer (Nano-Z590, İngiltere) cihazında *Chlorella sorokiniana* kaynaklı altın nanopartiküllerin (*Chlorella*-AuNP) ölçümü -28.8 mV (Şekil 4.18), *Scenedesmus incrassatulus* kaynaklı altın nanopartiküllerinin (*Scenedesmus*-AuNP) ölçümü ise -16.7 mV (Şekil 4.19), olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.18. *Chlorella*-AuNP zeta potansiyeli

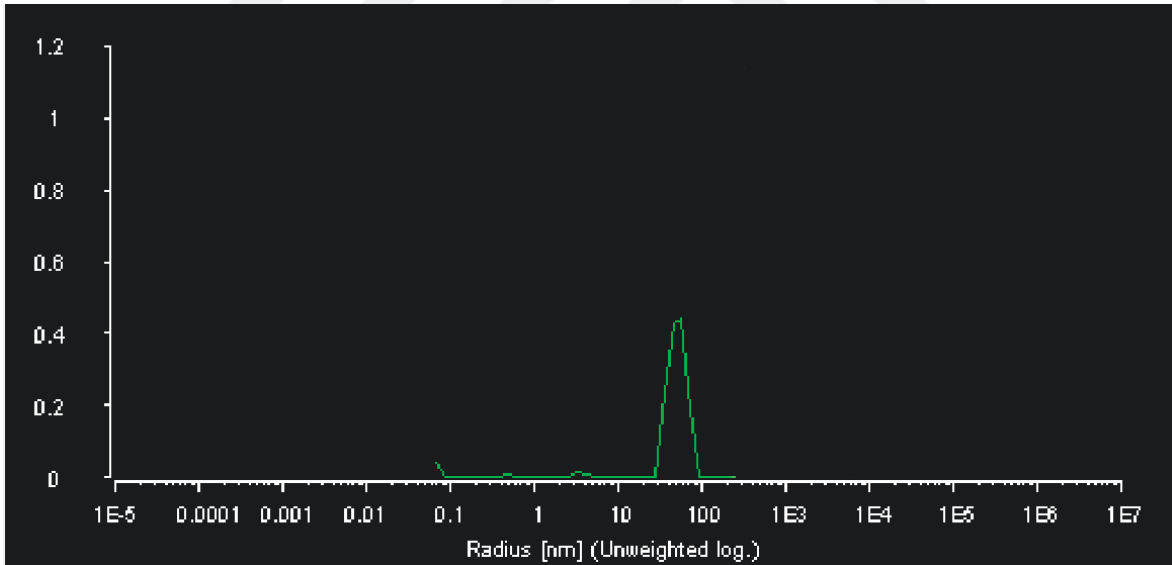


Şekil 4.19. *Scenedesmus*-AuNP zeta potansiyeli

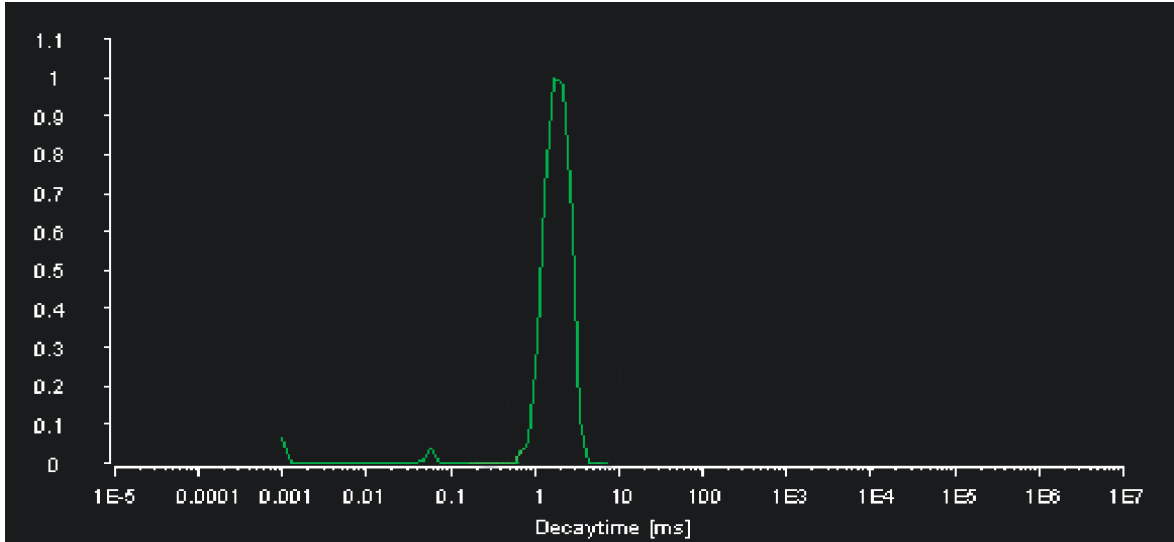
Zeta potansiyeli, solüsyondaki metal nanopartiküllerin stabilitesini ve dağılımını belirlemek için önemli bir parametre olarak kabul edilirken aynı zamanda numunenin solüsyondaki toplam yükünü de göstermektedir (Patra vd., 2015). Genel olarak, +30 mV'den yüksek veya -30 mV'den küçük Zeta potansiyel değerinde olan nanopartiküller tipik olarak stabil kabul edilmektedir (Anand vd., 2014). *C. sorokiniana* ile elde edilen zeta potansiyeli -28.8 mV olup, -30 mV'a çok yakın bir değer olduğu için kararlı bir sistem gösterir. Çözelti içerisinde askıda kalan nanopartiküllerin mevcut negatif ya da pozitif zeta potansiyelleri, bu parçacıkların biraraya gelmemesi için bir itme gücü ortaya çıkarmaktadır. Bunun aksine zeta

potansiyelinin düşük olması durumunda bu itme gücü ortadan kalkmakta ve parçacıkları bir araya getirerek aglomerasyona yol açmaktadır. Bu sebeple zeta potansiyeli nanopartiküllerin stabilitesi hakkında bilgi sunmaktadır (Rao vd., 2013; Öztürk., 2019).

Çalışmamızda daha sonra altın nanopartiküllerinin ortalama parçacık boyutu, dağılımı ve polidispersite indeksi (PDI) hakkında bilgi edinmek için DLS analizi yapılmıştır. DLS, sulu süspansiyondaki nanopartiküllerin hidrodinamik boyutunu ölçmektedir (Markus vd., 2016). Ancak, TEM ve DLS ile elde edilen nanopartikül boyutları, ölçüm için kullanılan değişkenler nedeniyle farklılık gösterebilir (Anand vd., 2014). Bu farklılıklar nanopartiküllerin sulu bir çözelti içinde topaklaşma eğiliminden kaynaklanabilir. Bu yüzden DLS'den elde edilen değerler TEM'den elde edilen değerlerden daha yüksek çıkabilir (Domingos vd., 2009). Verilerimize göre *Chlorella*-AuNP için PDI 0.38 (Şekil 4.20), *Scenedesmus*-AuNP için DPI 0.46 (Şekil 4.21) olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre *Chlorella*'nın PDI değerleri dikkate alındığında *Scenedesmus*'a göre daha monodispers olduğu söylenebilir.



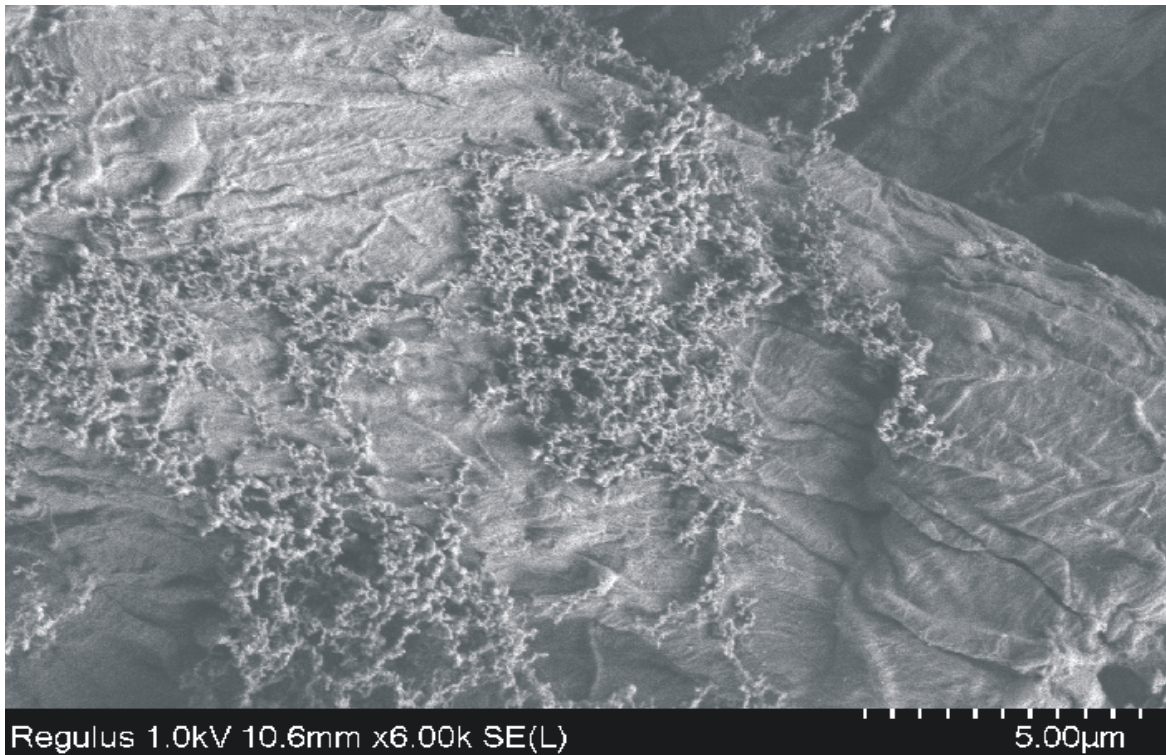
Şekil 4.20. *Chlorella*-AuNP DLS analizi



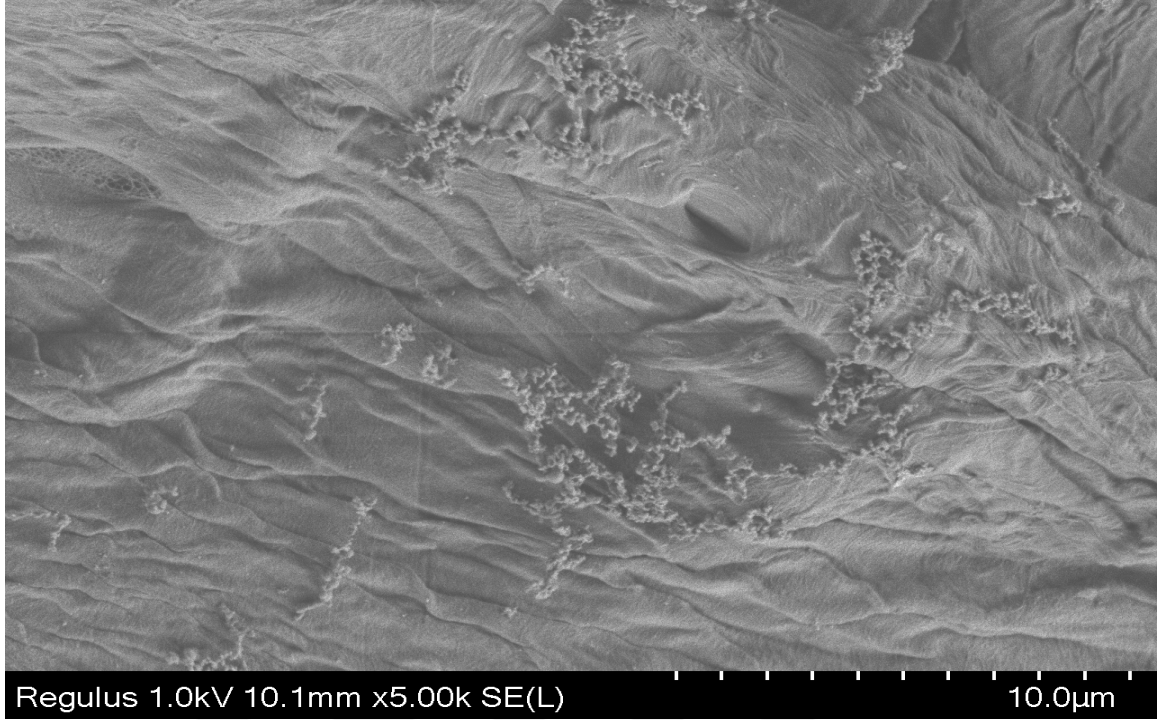
Şekil 4.21. *Scenedesmus*-AuNP DLS analizi

4.3.2. Altın nanopartiküllerinin FE-SEM karakterizasyonu

Altın nanopartiküllerin görüntülenebilmesi ve karakterize edilebilmesi için FE-SEM kullanılmıştır. Şekil 4.22 ve 4.23'te küresel şekilde yayılım gösteren nanopartiküller görülmektedir.



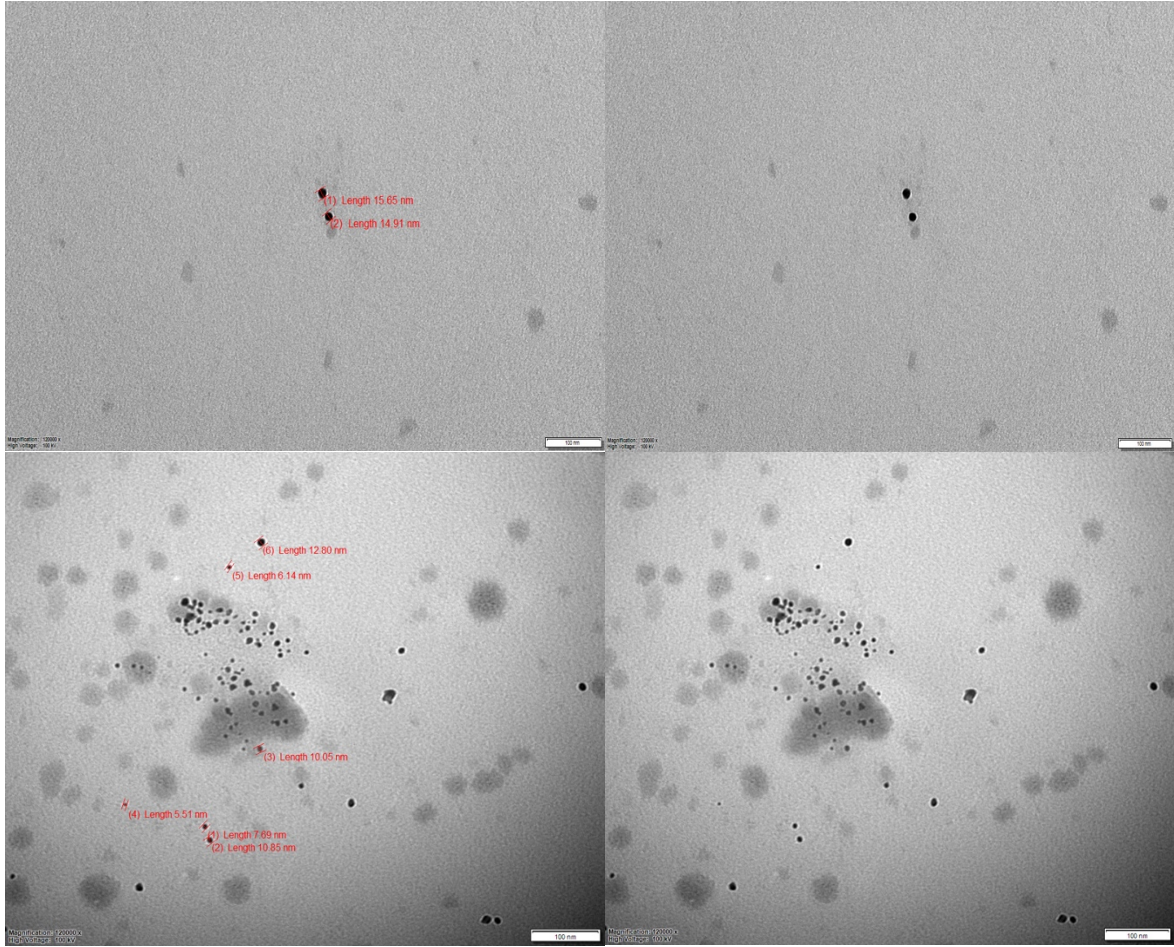
Şekil 4.22. *Chlorella*-AuNP FE-SEM görüntüsü (skala bar: 5 µm)



Şekil 4.23. *Scenedesmus*-AuNP FE-SEM görüntüsü (skala bar: 10 μ m)

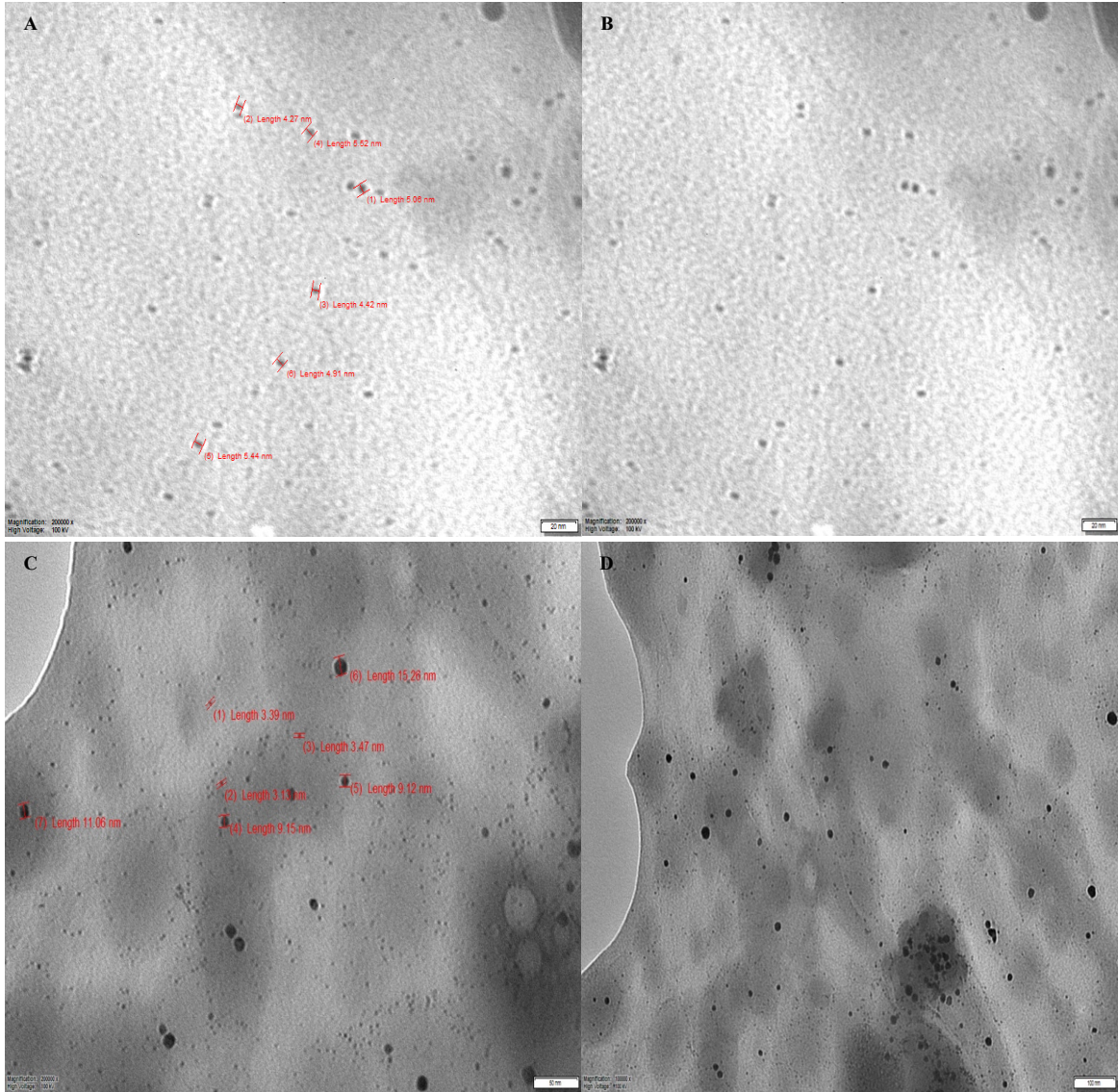
Yapılan bir çalışmada araştırmacılar deniz kahverengi algı olan *Ecklonia cava* kullanarak altın nanopartikül sentezi gerçekleştirmişler ve SEM analizlerinde, sentezlenen nanopartiküllerin küresel ve üçgen şekilli olduğunu belirtmişlerdir (Venkatesan vd., 2014). Benzer şekilde Xie vd. (2007) *Chlorella vulgaris* kullanarak altın nanopartiküller sentezlemiş; FE-SEM analizleriyle üçgen ve hegzogonal kenarlı yapılarını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda ise hem TEM hem de FE-SEM verileriyle küresel şekilli nanopartiküller gözlenmiştir.

4.3.3. Altın nanopartiküllerin TEM ile karakterizasyonu

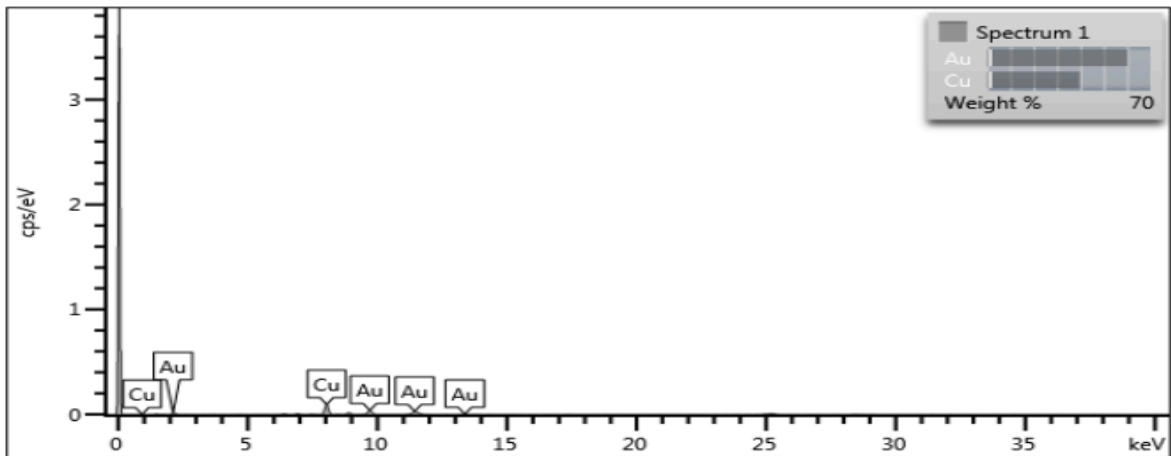


Şekil 4.24. *Chlorella*-AuNP TEM görüntüleri (skala bar: 100 nm)

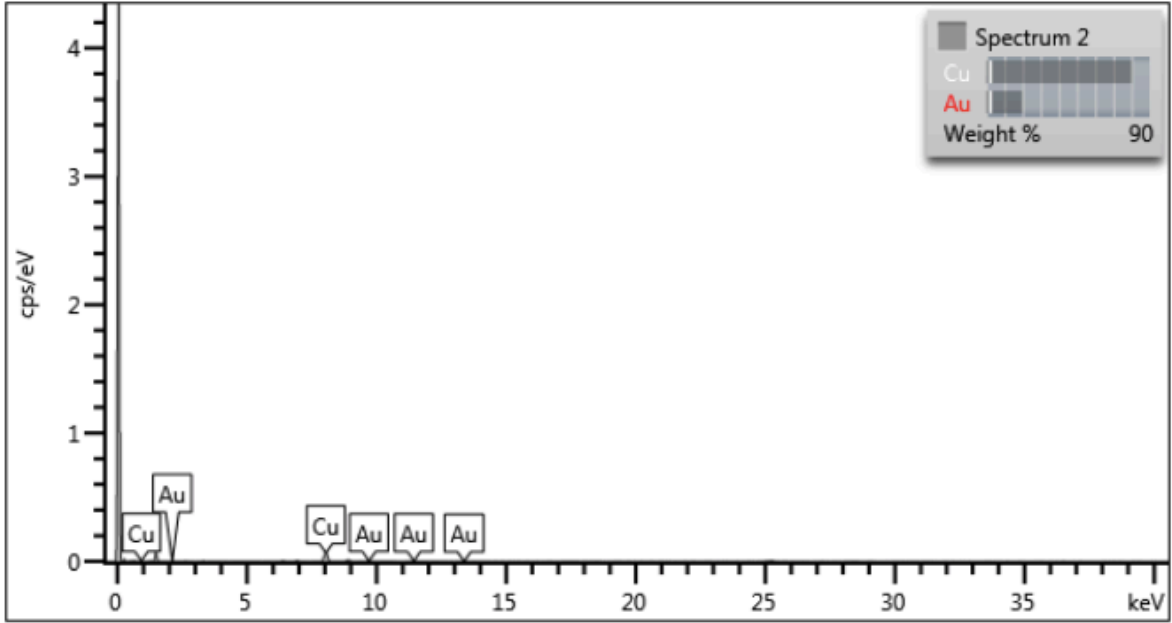
Çalışmamızda altın nanopartiküllerinin morfolojik görüntüleri ve elementel analizleri hakkında detaylı bilgi almak için yüksek çözünürlüklü TEM kullanıldı. Bu sonuçlara göre *Chlorella sorokiniana* özütünden elde edilen altın nanopartiküller morfolojik olarak küresel şekilde olup, ortalama 5-15 nm (Şekil 4.24) ve *Scenedesmus incrassatulus* özütünden elde edilen altın nanopartiküllerin ortalama 3-15 nm boyutlarında, homojen olarak dağılmış şekilde bulunmaktadır (Şekil 4.25). EDS dedektörü ile elementel analizi yapılan nanopartiküllerin altın olduğu doğrulanmıştır (Şekil 4.26 ve Şekil 4.27).



Şekil 4.25. *Scenedesmus*-AuNP TEM görüntüleri (Şekil A ve B skala bar: 20 nm, Şekil C skala bar: 50 nm, Şekil D skala bar: 100 nm)



Şekil 4.26. *Chlorella*-AuNP EDS analizi

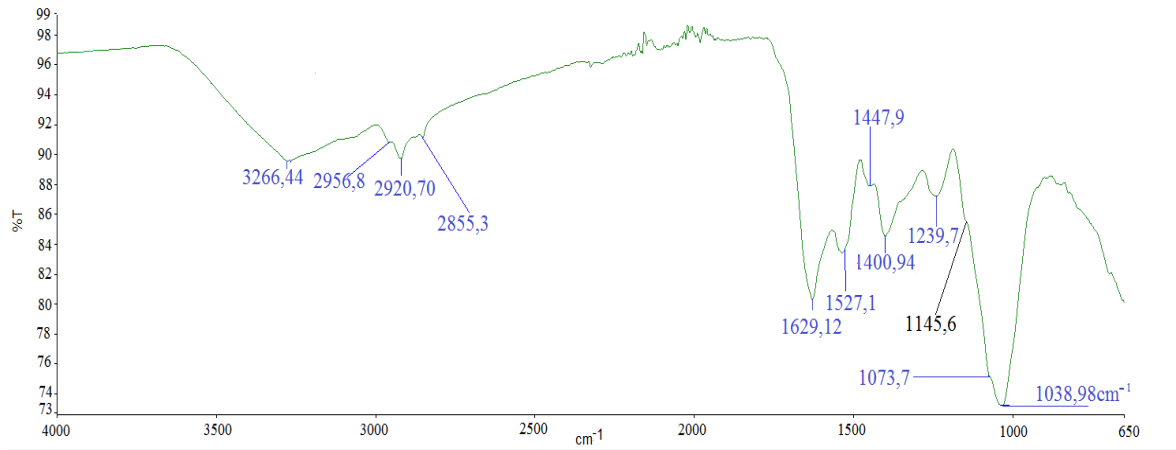


Şekil 4.27. *Scenedesmus*-AuNP EDS analizi

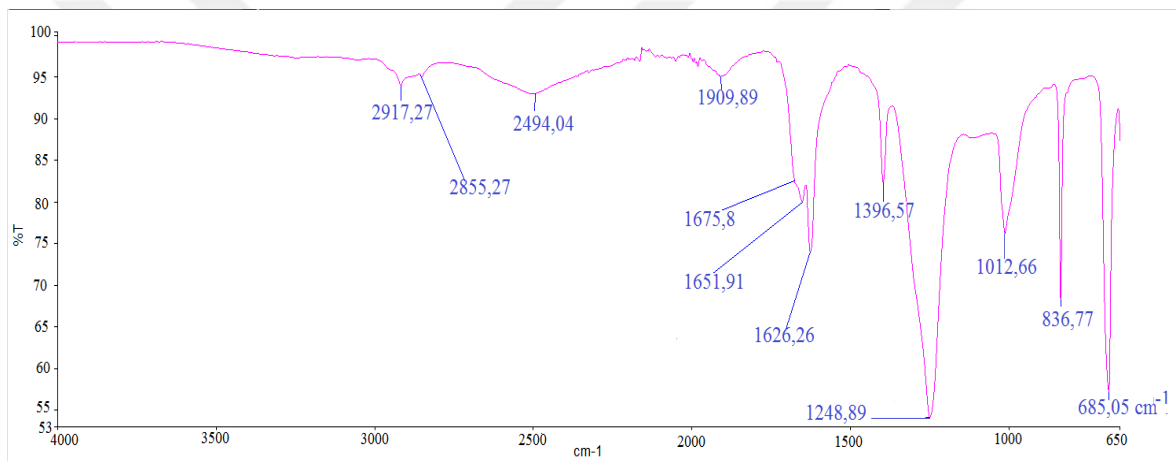
Literatürde küresel, üçgen ve psödo-küresel şekillerde ve alg aracılı altın nanoparçacık sentezi gerçekleştiren çalışmalar bulgularımızı desteklemektedir (Noruzi vd., 2011; Raghunandan vd., 2011). Benzer şekilde diğer bir çalışmada, 15 ila 20 nm arası boyutlarda altın nanoparçacıkları sentezlemiştir ve bu sonuçlar bulgularımızla benzerlik göstermektedir (Ghodake ve Lee, 2009).

4.3.4. Altın nanopartiküllerin FTIR ile karakterizasyonu

FTIR analizi, altın nanopartiküllerin oluşması sürecindeki metal indirgenmesinde görev alan fonksiyonel grupları araştırmak amacıyla hem alg özütlerinin hem de HAuCl_4 eklenip AuNP'lerin oluşumu sonrasında spektrum ölçümleri ile belirlenmiştir. *Chlorella sorokiniana* özütü için sırasıyla 3266.44, 2956.8, 2920.70, 2855.3, 1629.12, 1527.1, 1447.9, 1400.94, 1239.7, 1145.6, 1073.7 ve 1038.95cm^{-1} 'de bantlar görülmüştür (Şekil 4.28). *Chlorella*-AuNP için ise sırasıyla 2917.27, 2855.3, 2494.04, 1909.89, 1675.8, 1651.91, 1626.26, 1396.57, 1248.89, 1012.66, 835.77, ve 685.05cm^{-1} 'de bantlar görülmüştür (Şekil 4.29).



Şekil 4.28. *Chlorella* özütü FTIR analizi

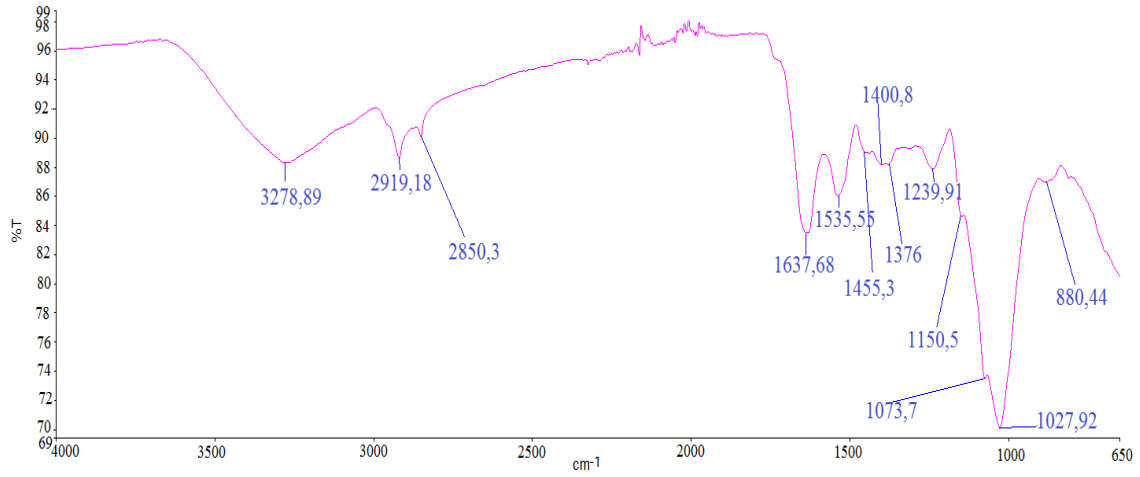


Şekil 4.29. *Chlorella*-AuNP FTIR analizi

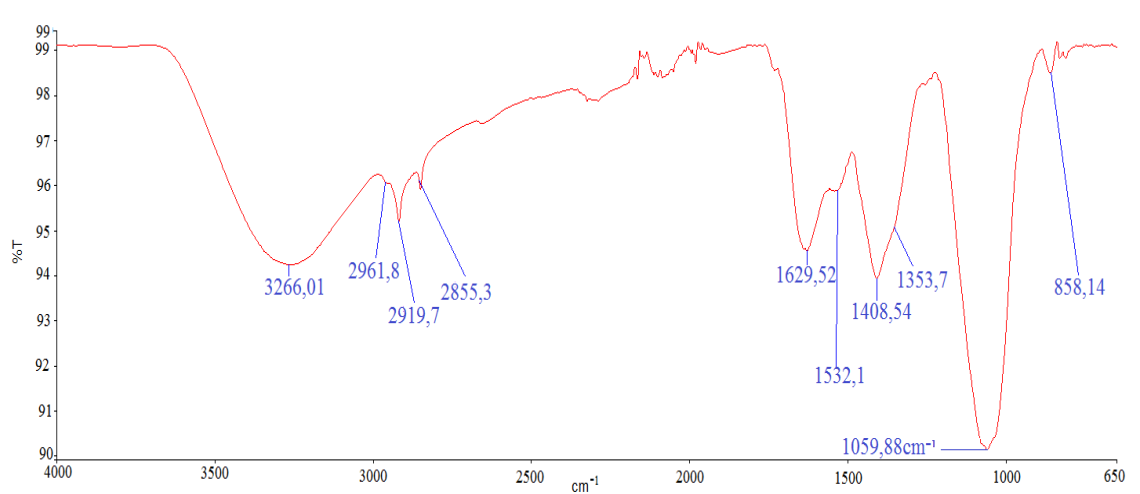
3266.44 cm^{-1} 'deki FTIR spektrumu, N-H bandının yerini ve zayıf da olsa karbonil bandını ifade etmektedir. Altın indirgenmesi sırasında bu spektrumun tamamen kaydığı görülmektedir. İndirgenme sonrasında da O-H gerilmesi sonucu geniş dimer bandları ortaya çıkmıştır ve bu bantlar, O-H düzlem içi eğilmesiyle dimerin C-O gerilmesinin eşlenmesinden oluşur (Erdik, 2008).

FTIR spektrumlarından sırasıyla C=C gerilmesi alkenlerin varlığını (1629.12); N-H eğilmesi ve N=O gerilmesi karbonil bileşiklerin varlığını (1527.1); N-O gerilmesi peptitlerin varlığını (1447.9); SO_2 asimetrik gerilmesi protein ve glukosinatların varlığını (1400.94) göstermiştir. Altın indirgenmesi sırasında ise bu bandların tamamen ortadan kalktığını görülmüştür (Erdik, 2008). Bu fonksiyonel grupların indirgemede etken bağlar olduğu düşünülmektedir.

1073.7 ve 1038.95 cm^{-1} 'de görülen aromatik C-H düzlem içi eğilmesi ortadan kalkarak 836.77 cm^{-1} bandına doğru kaymıştır. Bu durum altın iyonlarının indirgenmesinde aromatik yapıların etkili olduğunu düşündürmektedir. Karotenoid gibi alg pigmentlerinin altın indirgenmesine katılmış olabileceği öngörülmektedir. Bu pigmentler indirgeme özelliğine sahiptir ve difüzyonla çözeltiye salınırlar (Kuyucak ve Volesky, 1989; Isaac vd., 2015). Bu çözünür elementler nanopartiküllerin kümeleşmesini önleyen ve şekillenmesinde rol oynayan kapatma ajanları olarak görülebilirler (Huang vd., 2007; Isaac vd., 2015). Spektrumdaki bu kaymalar altın iyonlarının bağlanma ve indirgemesi için gereken bağlar hakkında fikir verirler.



Şekil 4.30. *Scenedesmus* özütü FTIR analizi

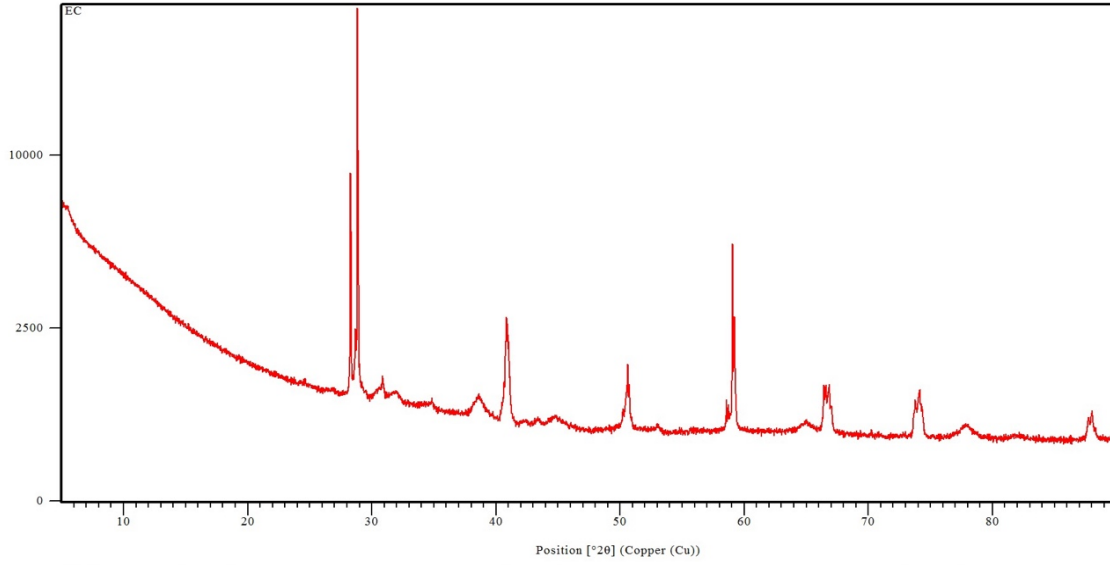


Şekil 4.31. *Scenedesmus*-AuNP FTIR analizi

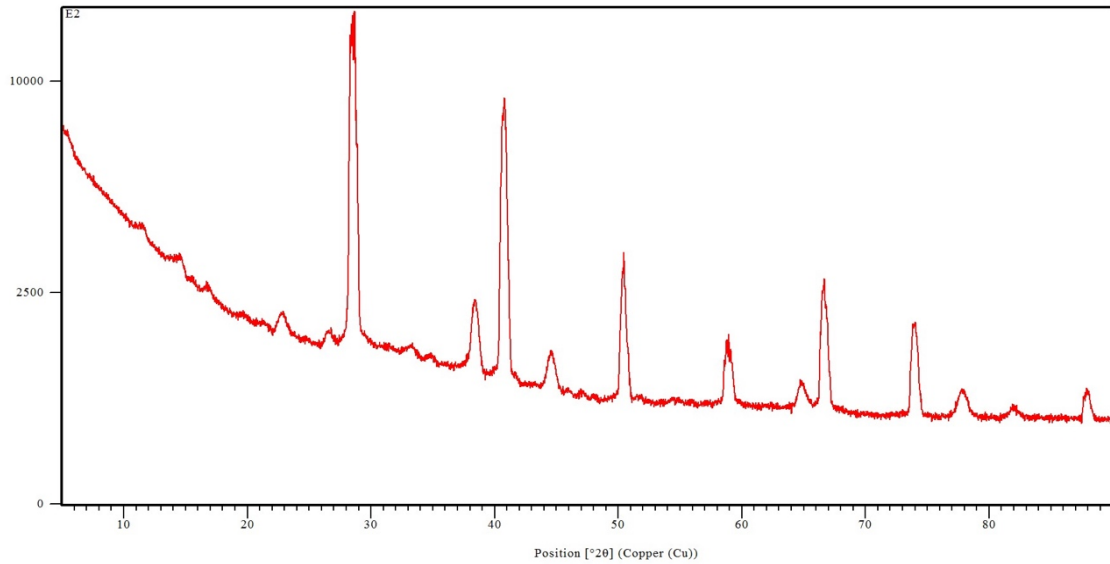
Scenedesmus incrassatulus özütü için sırasıyla 3278.98, 2919.18, 2850.3, 1637.68, 1535.55, 1455.3, 1400.8, 1376, 1239.91, 1150.5, 1073.7, 1027.91, 880.44 cm^{-1} 'de bantlar görülmüştür (Şekil 4.30). *Scenedesmus*-AuNP için ise sırasıyla 3266.01, 2951.8, 2919.7, 2855.3, 1629.52, 1532.1, 1408.54, 1353.7, 1059.88, 858.14 cm^{-1} 'de bantlar belirlenmiştir (Şekil 4.31). *Scenedesmus* özütünde 3278.98 cm^{-1} 'deki spektrum, polifenoller ve polisakkaritlerden kaynaklı geniş bir pik göstermiş ve indirgenme sonrası bu pik daha da genişlemiştir. (González-Ballesterosa vd., 2017). Yine aynı 3278.98 cm^{-1} 'deki spektrum N-H bandını gösterirken, aynı zamanda karbonil bandının zayıf da olsa görüldüğünü ortaya koymaktadır. Altın iyonlarının indirgenmesi sırasında ise bu band genişlemiştir. Özütte görülen 1535.55 cm^{-1} spektrumu, N-H eğilmesini ifade ederken aynı zamanda N=O gerilmesi de karbonil bileşiklerine benzediğini göstermektedir. İndirgenme sırasında bu yapıların C-H düzlem dışı eğilimi SO_2 asimetrik gerilmesine dönüşmüştür. 1239.91 cm^{-1} 'de P-H eğilmesi ve 1150 cm^{-1} 'deki C-H düzlem içi simetrik eğrisinin tamamen ortadan kalktığı görülmüştür (Erdik, 2008).

4.3.5. Altın nanopartiküllerinin XRD karakterizasyonu

Altın nanopartiküllerin kristalin doğasını doğrulamak için X-ışını kırınım çalışmaları yapılmıştır. Rapor edilen XRD paterni sırasıyla (111), (200), (220) ve (311) yansımalarıdır. Bizim sonuçlarımızda bu yansımalar *Chlorella*-AuNP için $2\theta = 38.5^\circ$, 44.7° , 65° ve 77.9° , *Scenedesmus*-AuNP için $2\theta = 38.4^\circ$, 44.6° , 64.8° ve 77.8° kırınım pikleri olarak görülmüştür (Şekil 4.32 ve Şekil 4.33). Nanopartiküllere karşılık gelen yoğun piklerin varlığı, Bragg'ın kırınım paterni ile tanımlanan altın yansımalarına uygun olarak eşleşmiştir (Shankar vd., 2003). Bu paterne göre yüz merkezli kübik metal altın yapıların (111) yüzeylerine 38.5° ve 38.4° 'de yer alan güçlü bir kırınım piki, diğer üç yüzün kırılma piklerine göre daha güçlü görülmüştür. Karakteristik piklerin yanı sıra farklı büyüklükte pikler de fark edilmiştir. Bu durumun nanopartikülün sentezlenmesi sırasında kullanılan özütten kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Singh vd. (2013) *Padina gymnospora* kahverengi algından elde edilen altın nanopartiküllerde ve aynı zamanda Raghunandan vd. (2009) yapmış oldukları çalışmada da *Psidium guajava* yaprak özütünden elde edilen altın nanopartikülleri için benzer sonuçlar bulunmuştur. Sonuç olarak XRD paterni yeşil sentez yöntemiyle elde edilen nanopartiküllerin kristal yapıda olduğu açıkça gösterilmiştir.



Şekil 4.32. *Chlorella*-AuNP XRD analizi



Şekil 4.33. *Scenedesmus*-AuNP XRD analizi

4.4. Nanopartiküllerin Antifungal Etkisinin Değerlendirilmesi

4.4.1. Agar difüzyon testi

C. sorokiniana ve *S. incrassatus* türleri aracılığıyla elde edilen altın nanopartiküllerin antifungal etkileri *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. glabrata* maya mantarları üzerinde öncelikle agar difüzyon testi ile test edilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.1.'de sunulmuştur. Kontrol ilacı olarak güçlü bir antifungal olan Amfoterisin B kullanılmıştır.

Çalışılan izolatlar üzerine etken maddelerin zon çapları oldukça benzer sonuçlar göstermiştir. Ayrıca altın nanopartiküller Amfoterisin B ‘den daha kuvvetli bir zon çapı göstermişlerdir.

Çizelge 4.1. *Chlorella*-AuNP, *Scenedesmus*-AuNP ve Amfoterisin B ilacının farklı *Candida* türleri üzerine disk difüzyon testiyle gösterdikleri antifungal etki sonuçları

	Amfoterisin B Zon çapı (mm)	<i>Chlorella</i>-AuNP Zon çapı (mm)	<i>Scenedesmus</i>-AuNP Zon çapı (mm)
<i>C. albicans</i>	8 mm	10 mm	10 mm
<i>C. tropicalis</i>	8 mm	11 mm	10 mm
<i>C. glabrata</i>	7 mm	11 mm	12 mm

Elde edilen bulgulara göre *Candida* türlerinin tümünde altın nanopartiküllerin Amfoterisin B’ye göre daha etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır. *C. albicans* için *Chlorella*-AuNP ve *Scenedesmus*-AuNP’lerinin eşit zon çaplarındadır (10 mm); *C. tropicalis* için *Chlorella*-AuNP’ler (11 mm) ve *C. glabrata* için de *Scenedesmus*-AuNP’lerinin (12 mm) daha etkili bulunmuştur.

Literatürde *Chlorella vulgaris* kullanılarak sentezlenen altın nanopartiküllerin *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida albicans* patojenlerine karşı antimikrobiyal aktiviteleri olduğu rapor edilmiştir. Bu amaçla yapılan disk-difüzyon teslerinde *C. albicans* 16 mm’lik bir zon çapı göstermiştir (Hassan ve Hosny, 2018). Patra ve Baek, (2017) endüstriyal biyolojik atık materyaller kullanarak gümüş nanopartikül sentezlemiş ve elde edilen nanopartiküllerin antikandidal ve antibakteriyal etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada gümüş nanopartiküller ılımlı bir antibakteriyal etki göstermişlerdir (9.26-11.57 mm inhibisyon zon çapı). Araştırmacılar gümüş nanopartikülleri standart bir antibakteriyal ya da antikandidal ajanla birlikte kullandıklarında güçlü sinerjistik antibakteriyal (10.62-12.80 mm) ve antikandidal (11.43-14.33 mm) aktivite tespit etmişlerdir. Araştırmacılar sentezlenen bu nanomateryalin besinlerin paketlenmesi ya da korunması gibi alanlarda kullanım potansiyeli olduğunu rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da sentezlenen altın nanopartiküller ortalama 10-12 mm inhibisyon zon çapı ile güçlü bir antifungal aktivite görülmüştür.

4.4.2. MİK ve MFK Sonuçları

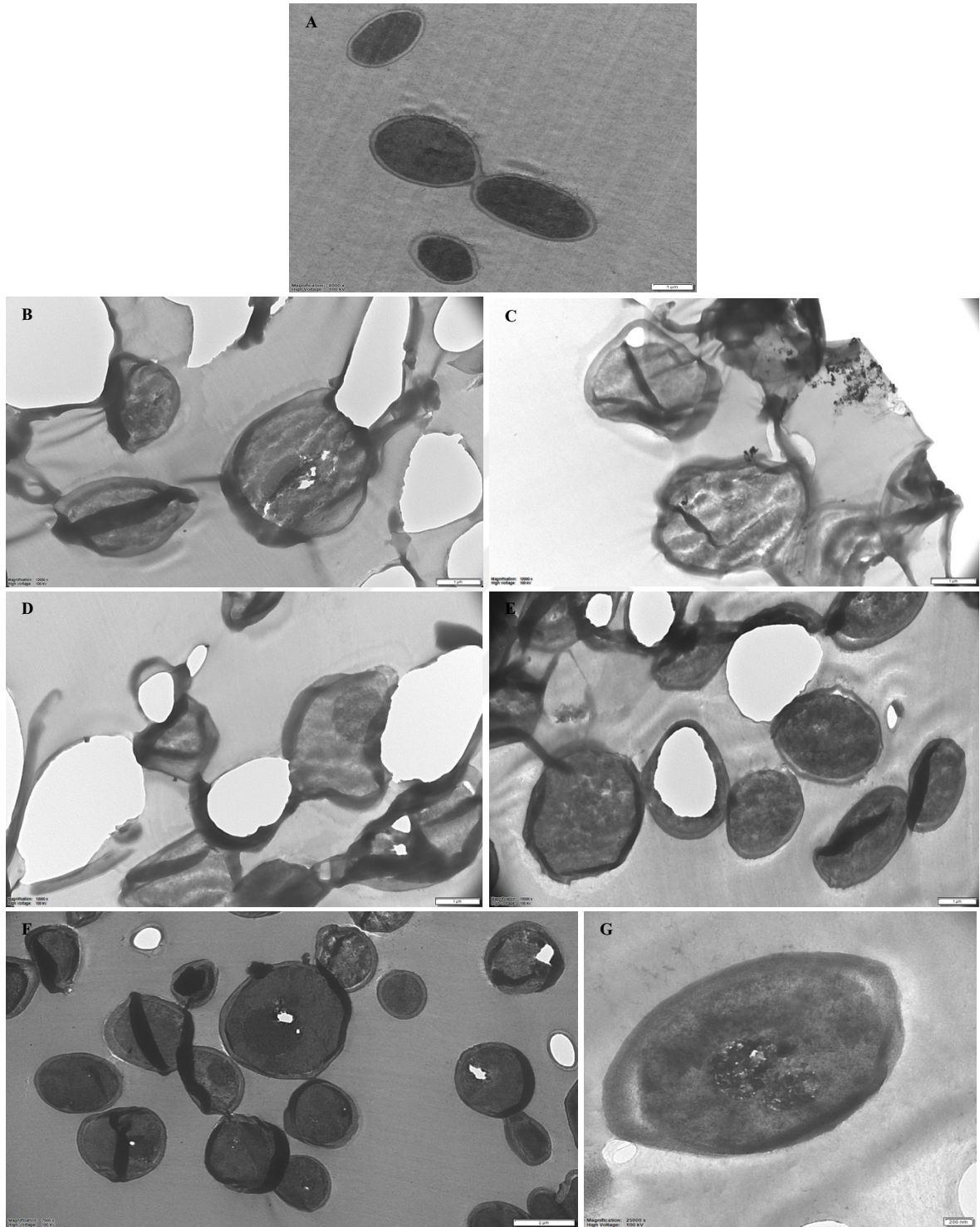
MİK ve MFK değerleri, test edilen altın nanopartiküllerin antifungal etkinlikleri hakkında kantitatif veriler sunmaktadır. MİK sonuçlarımız Hem *Chlorella*-AuNP hem de *Scenedesmus*-AuNP'lerin tüm izolatlarda aynı MİK değerlerini gösterdiğini ortaya koymaktadır (Çizelge 4.2). Konsantrasyon aralığını belirleyebilmek için ICP-MS cihazında sentezlenmiş olan nanopartiküllerin kantitatif analizi yapılmıştır. Bu analiz sonuçlarına göre her iki etken madde de 600 µg/ml olarak ölçülmüştür. Her iki altın nanopartikül için en etkili sonucu 4,31 µg /ml MİK değeri ile *C. albicans* ATCC 14053'de gözlenmiştir. Ayrıca izolatların MFK değerleri göz önüne alındığında MİK değerlerine göre iki katlık bir artış tespit edilmiştir. Her iki altın nanopartikülün antifungal etkisi *C. glabrata* 1744 izolatı üzerine *C. tropicalis* 1660 izolatına kıyasla daha yüksektir.

Çizelge 4.2. *Candida* suşlarına karşı Amfoterisin B ve sentezlenen altın nanopartiküllerin MİK ve MFK değerleri

	Amfoterisin B		<i>Chlorella</i> -AuNP		<i>Scenedesmus</i> -AuNP	
	MİK	MFK	MİK	MFK	MİK	MFK
<i>C. albicans</i>	3,13 µg/ml	6,25 µg/ml	4,31 µg /ml	8,625 µg/ml	4,31 µg/ml	8,625 µg/ml
<i>C. tropicalis</i>	6,25 µg/ml	12,5 µg/ml	17,25 µg /ml	34,5 µg/ml	17,25 µg/ml	34,5 µg/ml
<i>C. glabrata</i>	3,13 µg/ml	6,25 µg/ml	8,625 µg /ml	17,25 µg/ml	8,625 µg/ml	17,25 µg/ml

Araştırmacılar *Gelidium corneum* algını kullanarak gümüş nanopartikül sentezi gerçekleştirmişler ve elde edilen nanopartiküllerin *C. albicans* üzerine 0.51 µg/ml MİK değeri ile güçlü bir antifungal etki gösterdiğini rapor etmişlerdir (Öztürk vd., 2019). Diğer bir çalışmada yeşil bir alg olan *Botryococcus braunii* kullanarak bakır ve gümüş nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar sentezlenen nanopartiküllerin hem gram negatif hem de gram pozitif bakteriler üzerine hem de fungal bir izolat üzerine yüksek derecede toksik etkisi olduğunu agar kuyu difüzyon testi ve MİK testi ile göstermişlerdir (Arya vd., 2018).

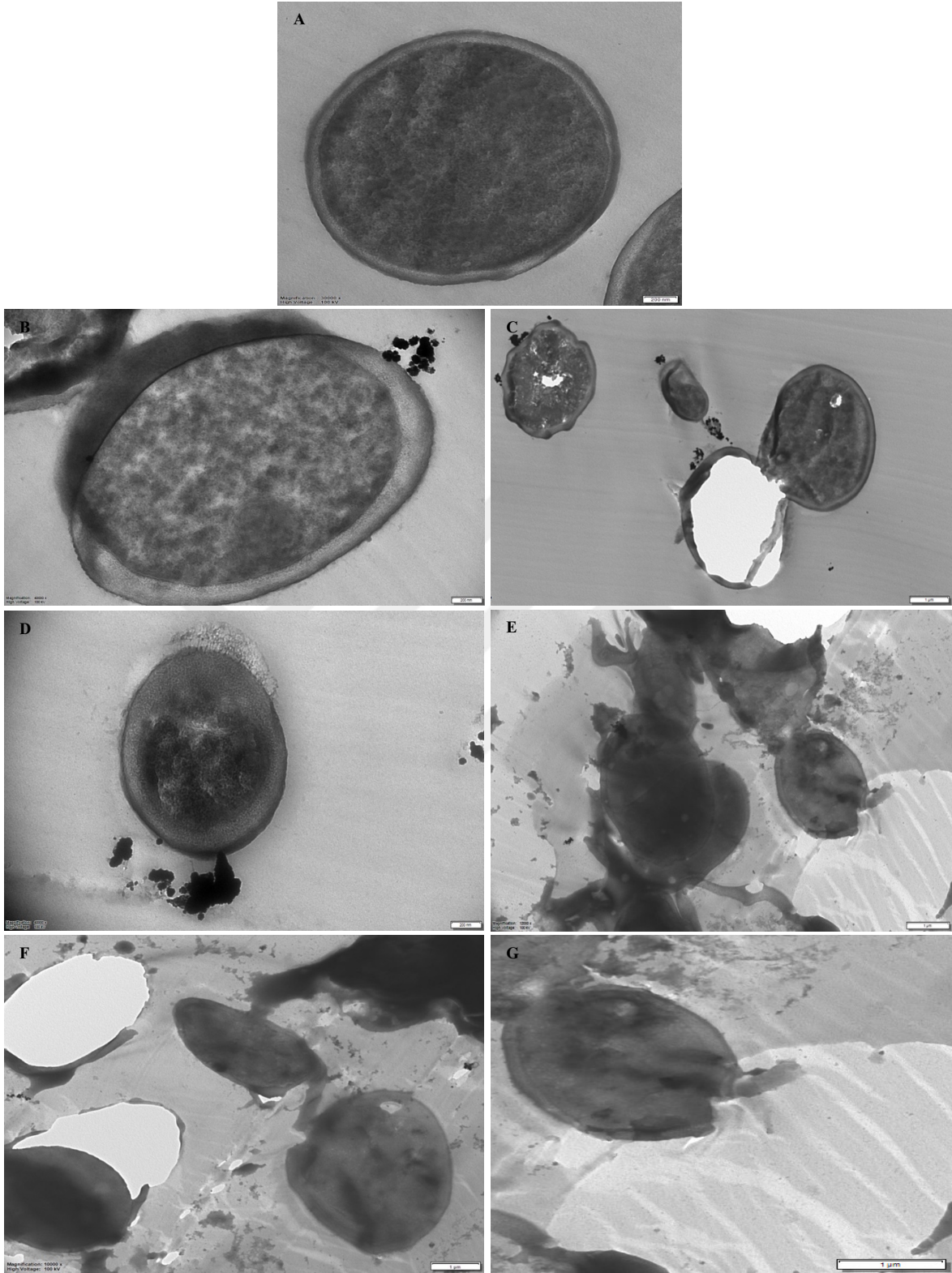
4.4.3. Etken maddelerin *Candida* izolatları üzerine etkisinin TEM ile incelenmesi



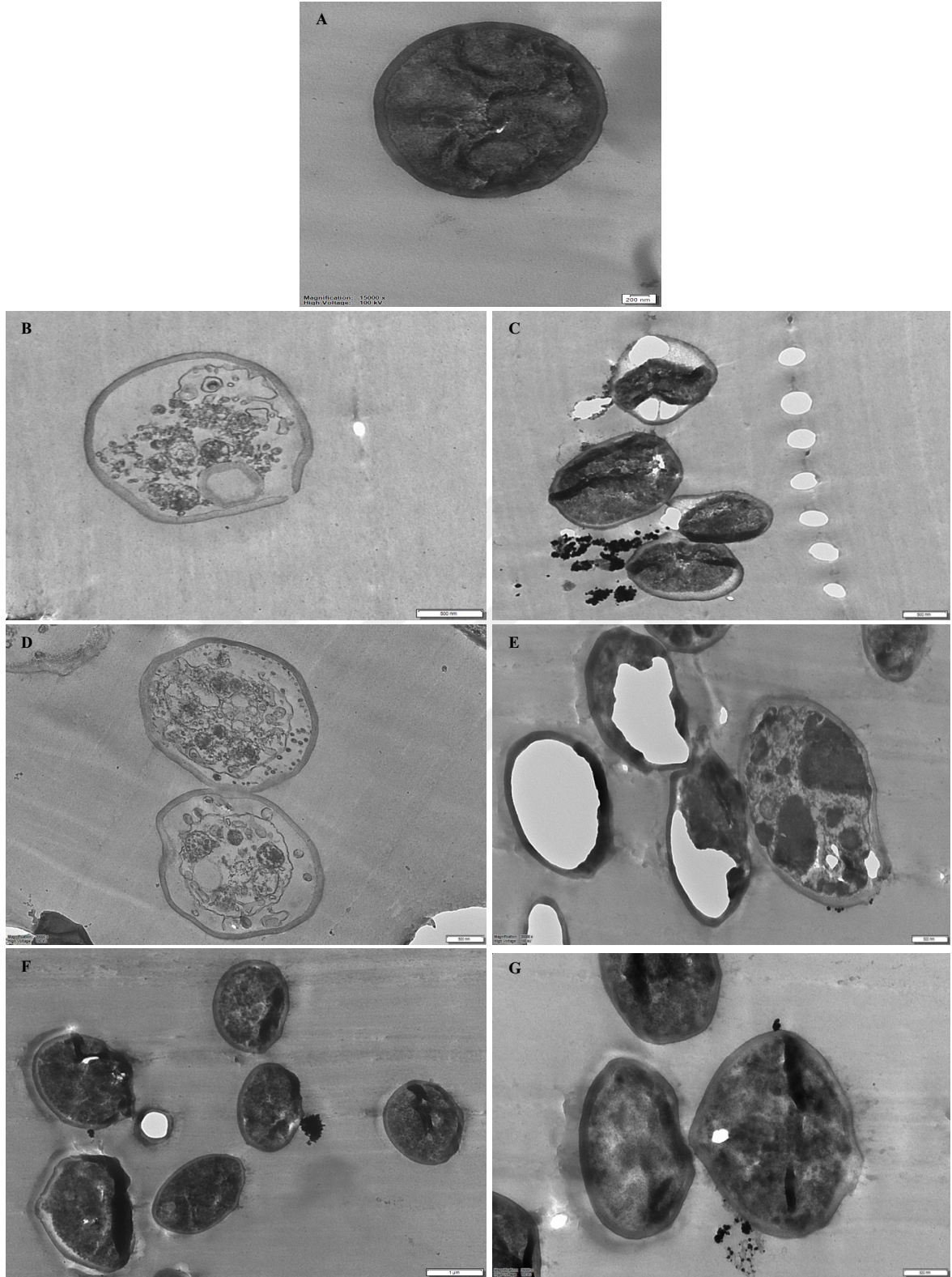
Şekil 4.34. *C. albicans* ATCC 14053 izolatında kontrol grubu, *Chlorella*-AuNP ve *Scenescmus*-AuNP maruziyeti sonrası elde edilen TEM görüntüleri (Şekil A: Düzenli morfolojik ultrayapısal özellikler gösteren kontrol grubu hücreleri; Şekil B, C, D: *Chlorella*-AuNP uygulanan hücrelerde gözlenen ileri hasarlar; Şekil E, F, G: *Scenescmus*-AuNP maruziyeti sonrası izlenen ultrayapısal hasar bulguları (A, B, C, D, E skala bar: 1 µm, F skala bar: 2 µm, G skala bar: 200 nm))

C. albicans ATCC 14053 izolatında kontrol grubu hücreleri ile alg aracılı altın nanopartikül maruziyeti sonrası elde edilen TEM görüntüleri Şekil 4.34'te sunulmuştur. *C. albicans* ATCC 14053 izolatında kontrol grubu hücreleri düzenli oval ve yuvarlak morfolojide olup membran ve duvar yapıları bütünlük göstermektedir, stoplazma homojendir (Şekil 4.34. A). *Chlorella*-AuNP maruziyeti sonrası hasar bulguları çok ileri derecede olup hücre ölümleri ve çekirdek hasarları tespit edilmiştir (Şekil 4.34. B, C, D). *Scenedesmus*-AuNP maruziyeti sonrası hayalet hücreler, hücre duvar ve membran hasarları, stoplazmik içe çekilmeler görülmüştür. Genel bir bulgu olarak hücre duvar ve membran yapılarında içe ve dışa doğru kıvrılmalar dikkat çekmektedir. Yer yer az sayıda sağlam hücreler görülmesine rağmen hasar bulguları daha baskındır. Çekirdek yapısı düzgün yuvarlak olmakla birlikte bazı hücrelerde periferik çekilmiş ya da hasarlı olarak izlenmektedir (Şekil 4.34. E, F, G).

C. tropicalis 1660 izolatında kontrol grubu hücreleri ile alg aracılı altın nanopartikül maruziyeti sonrası elde edilen TEM görüntüleri Şekil 4.35'te sunulmuştur. *C. tropicalis* 1660 hücrelerinin kontrol grubu TEM resimleri iyi korunmuş hücresel morfoloji ve tam hücre yapısı göstermiştir (Şekil 4.35 A). *Chlorella*-AuNP ile muamele sonrası hayalet hücreler, duvar ve membran arası mesafede genişleme ve nanopartiküllerin hücre duvarına teması sonrası düzenli yapısını kaybeden ve ondülasyon görünümünde olan kıvrımlı hücre şekillerine rastlanmıştır (Şekil 4.35 B, C, D). *Scenedesmus*-AuNP ile muamele edilen hücrelerde ileri derecede hasar bulguları gözlenmiştir. Hücreler yer yer parçalanmış ya da birbiriyle kaynaşmış; membran, duvar ve stoplazma yapıları bozulmuştur (Şekil 4.35 E, F, G).



Şekil 4.35. *C. tropicalis* 1660 hücrelerinin *Chlorella*-AuNP ve *Scenesmus*-AuNP ile maruziyeti ve öncesi ve sonrası elde edilen TEM görüntüleri (Şekil A: iyi korunmuş hücresel morfoloji gösteren kontrol grubu hücresi (A skala bar: 200 nm); Şekil B, C, D: *Chlorella*-AuNP ile muamele sonrası tespit edilen hasar bulguları (B, D skala bar: 500 nm, C skala bar: 1 μ m); Şekil E, F, G: *Scenesmus*-AuNP ile muamele edilen hücrelerde gözlenen düzensizlik ve hasarlar (E, F, G skala bar: 1 μ m))



Şekil 4.36. *C. glabrata* 1744 izolatında kontrol grubu, *Chlorella*-AuNP ve *Scenescmus*-AuNP maruziyeti sonrası elde edilen TEM görüntüleri (Şekil A: İyi korunmuş ultrayapısal özellikler gösteren kontrol grubu (Şekil A skala bar: 200 nm); Şekil B, C, D: *Chlorella*-AuNP uygulanan hücrelerde tespit edilen ileri derece hasar bulguları (Şekil B, C, D skala bar: 500 nm); Şekil E, F, G: *Scenescmus*-AuNP ile maruziyet sonrası gözlenen ultrayapısal hasarlar (Şekil E, G skala bar: 500 nm, Şekil F skala bar: 1 µm))

C. glabrata 1744 izolatında kontrol grubu hücreleri ile alg aracılı AuNP maruziyeti sonrası elde edilen TEM görüntüleri Şekil 4.36'da sunulmuştur. Burada kontrol grubu hücreleri düzenli duvar ve mebran yapısı ile homojen bir stoplazmik dağılım göstermekte ve bütünlük sergilemektedir (Şekil 4.36. A). *Chlorella*-AuNP uygulanan hücrelerde ise stoplazmik erimeler, organel bozulmaları, bazı bölgelerde hücre membran ve duvar kopmaları, lizise uğramış hücreler, stoplazmanın içe çekilmesi, bol miktarda koful oluşumu, belirgin veziküler yapılar ve nanopartiküllerin duvarda yoğun tutulumları görülmüştür (Şekil 4.36. B, C, D). *Scenesmus*-AuNP ile maruziyet sonrası hayalet hücre denilen içi boşalmış yapılar, stoplazmik erimeler ya da hücrelerin belli bölgelerinde stoplazma yoğunlaşmaları, hücre duvarı dışında tutunmuş nanopartiküller ve bu tutunma sonrası duvar ve zar kısımlarında ileri hasarlar ve yapısal bozulmalar tespit edilmiştir (Şekil 4.36. E, F, G).

Literatürde nanopartiküllerin membranlardaki elektrostatik akışa engel olarak membran yapılarını bozduğu belirtilmektedir. Özellikle altın nanopartiküller sülfür ve fosfor içeren gruplarla reaksiyona girerler ya da enzimlerin tiyol fonksiyonel (NADH) gruplarıyla temas ettiklerinde yüksek miktarda serbest radikal üreterek solunum zincirlerine zarar verir ve hücre ölümüne yol açarlar. Altın nanopartiküllerin olası bir diğer mekanizması da yüzeyle etkileşim sonucu DNA yapısının bozulmasıdır (Nadeem vd., 2017). Jalal vd. (2018) orofaringeal *C. glabrata* izolatlarından gümüş nanopartikül biyosentezi gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen gümüş nanopartiküllerin antibakteriyal ve antifungal etkinlikleri MİK, MBK, MFK ve kuyu difüzyon yöntemleriyle araştırılmıştır. Araştırmacılar bakteriyal izolatların fungal izolatlara göre gümüş nanopartiküllere karşı çok daha duyarlı olduğunu belirtmişlerdir ve bu farklılıkların bakteri ve maya hücrelerinin yapı ve organizasyon farklılığından ileri geldiğini rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada gümüş nanopartiküllerin *C. albicans* ile etkileşimi sonucu nanopartiküllerin hücre içine penetre olduğu gösterilmiştir. Böylece hücre membran ve hasarı sonucu por oluşumları tespit edilmiştir. Ayrıca TEM analizlerinde gümüş nanopartikülle muamele edilen *Candida* hücreleri çok deforme olmuş, membran bütünlüğü kaybı olmuş ve hücre ölümü gerçekleşmiş olabileceği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda da her iki alg aracılı sentezle elde edilen altın nanopartiküllerin *Candida* hücreleri üzerine etkileri genel olarak değerlendirildiğinde, en belirgin hasarların hücre duvar ve membran yapısı üzerine olduğu; bütünlüğü bozulan hücrelerin stoplazma ve çekirdek yapılarındaki hasar oluşumları sonrası hücrelerin öldüğü görülmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Nanopartikül sentezinde kullanılan fiziksel ve kimyasal yöntemler oldukça popülerdir ancak bu yöntemler hem maliyetli olduğu hem de üretim sırasında toksik bileşenler açığa çıkardığı için sınırlı kullanıma sahiptirler. Yeşil sentez yöntemi çevre dostu, ekonomik ve hızlı bir yöntem olup, oldukça yeni bir araştırma alanıdır. Nanopartikül sentez teknolojisinde en büyük zorluklardan biri boyut, şekil ve dağılım kontrolünün yeterince sağlanamamasıdır ve yeşil sentez prosedürünün bu sorunun çözümünde önemli bir potansiyeli olabileceği düşünülmektedir.

Algler metal nanopartiküllerin sentezinde adeta bir biyofabrika olarak kullanılmaktadırlar. Lipit, mineral, vitamin ve bazı biyoaktif maddeler açısından oldukça zengin olan algler tıbbi ve endüstriyel alanlarda kullanımları için yüksek bir potansiyele sahiptirler. Yapılarında hidroksil, karboksil ve amino fonksiyonel gruplar içerdiklerinden tek bir adımda metal nanopartikül sentezi gerçekleştirebilmektedirler. Özellikle altın nanopartiküller biyoyumlu olduklarından hastalıkların teşhis ve tedavisinde önemli yer tutmaktadırlar. Ayrıca altın nanopartiküller metilen mavisi, diklorometan ve metil oranjin remediasyonunda da kullanılabilirler.

Çalışmamızda iki farklı yeşil alg olan *Chlorella sorokiana* ve *Scenedesmus incrassatulus* kullanılarak yeşil sentez yoluyla hücre dışı altın nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu sentezde herhangi bir toksik kimyasal kullanılmamış ve çevreye zararlı bir atık bırakılmamıştır. Sentezlenen nanopartiküller küresel yapıda ve *Chlorella*-AuNPlar ortalama 5-15 nm, *Scenedesmus*-AuNPlar ortalama 3-15 nm boyutlarındadır. Gerçekleştirdiğimiz optimizasyon çalışmalarıyla en uygun reaksiyon parametreleri belirlenmiştir ve bu tür sentez uygulamalarında optimizasyon yapılması çok önemlidir. Altın nanopartiküllerin *Candida* hücreleri üzerine standart antifungal ilaçlara oranla oldukça güçlü bir toksik etki sergilemesi dikkat çekici bir bulgudur. Mantar enfeksiyonlarının tedavisi giderek daha zorlaşmakta ve dirençli suşların artması halk sağlığını tehdit etmektedir. Özellikle deri üzerinde lezyonlar oluşturan mantar enfeksiyonları önemli bir sağlık problemidir. Bu bakımdan, verilerimizin ayrıntılı çalışmalarla desteklenmesi gerekmekte ve antifungal ilaç üretiminde ya da direnç problemiyle mücadelede fikir verici olabileceği düşünülmektedir. Algler yoluyla nanopartikül sentezinin büyük ölçekli ve çevre dostu

üretime de olanak sağlayabileceği söylenebilir. Diğer yandan alg aracılı yeşil sentezle elde edilen altın nanopartiküller oldukça küçük boyutludur ve böylece hem çeşitli kanser hücre hatları üzerindeki etkinliklerinin ve hem de sağlıklı hücreler üzerine sitotoksik aktivitelerinin in vitro ve ardından da in vivo hayvan deneyleri ile değerlendirilmesi gerekmektedir.

Günümüzde yeşil sentezin mekanizması hala tam olarak bilinmemektedir, bu mekanizmanın anlaşılmasıyla istenilen yapısal özelliklere sahip nanopartiküllerin sentezlenmesi sağlanabilir. Bu durumda yeşil sentezin endüstriyel boyutta biyoyumlu nanopartikül üretimi için çok iyi bir seçenek olacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, yeşil sentez yoluyla üretilen metal nanopartiküller antifungal ya da diğer ilaçlar kadar etkili sonuç verebilirler. Bu da farmasotik uygulamalardaki potansiyellerini büyük ölçüde arttırmaktadır. Ancak nanotıptaki güvenli kullanımları üzerinde detaylı araştırmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abboud, Y., Saffaj, T., Chagraoui, A., El Bouari, A., Brouzi, K., vd., 2014, Biosynthesis, characterization and antimicrobial activity of copper oxide nanoparticles produced using brown algae extract (*Bifurcaria bifurcate*), *Applied Nanoscience* 4, 571–576.
- Abdel-Raouf, N., Al-Enazi, N. M., Ibraheem, I. B., 2013, Green biosynthesis of gold nanoparticles using *Galaxaura elongata* and characterization of their antibacterial activity, *Arabian Journal of Chemistry*, 10(2), 3029-3039.
- Abedin, R. M.A., Taha. H. M., 2008, Antibacterial and antifungal activity of cyanobacteria and green microalgae. Evaluation of medium components by Plackett-Burman design for antimicrobial activity of *Spirulina platensis*, *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry* 3.1 (2008): 22-31.
- Akyıl, S., İlter, I., Koç, M., Kaymak-Ertekin F., 2016, Alglerden Elde Edilen Yüksek Değerlikli Bileşiklerin Biyoaktif/Biyolojik Uygulama Alanları, *Akademik Gıda* 14(4) 418-423
- Ali, D.M., Gopinath, V., Rameshbabu, N., Thajuddin, N., 2012, Synthesis and characterization of CdS nanoparticles using *C. phycoerythrin* from the marine cyanobacteria, *Materials Letters* 74, 8– 11.
- Altun, H. U., Şener B., 2008, Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 39(2), 82-8.
- Anand, K., Gengan, R. M., Phulukdaree, A., & Chuturgoon, A., 2014, Agroforestry waste *Moringa oleifera* petals mediated green synthesis of gold nanoparticles and their anti-cancer and catalytic activity. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 21, 1105–1111.
- Annamalai, J., Nallamuthu, T., 2015, Characterization of biosynthesized gold nanoparticles from aqueous extract of *Chlorella vulgaris* and their anti-pathogenic properties, *Applied Nanoscience* 5, 603–607.
- Arsiya, F., Sayadi, M. H., Sobhani, S., 2017, Green synthesis of palladium nanoparticles using *Chlorella vulgaris*, *Materials Letters*, 186, 113-115.
- Arya, A., Gupta, K., Chundawat, T. S., Vaya, D., 2018, Biogenic synthesis of copper and silver nanoparticles using green alga *Botryococcus braunii* and its antimicrobial activity. *Bioinorganic chemistry and applications*, 2018.
- Azaman, S. N. A., Nagao, N., Yusoff, F. M., Tan, S. W., Yeap, S. K., 2017, A comparison of the morphological and biochemical characteristics of *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella zofingiensis* cultured under photoautotrophic and mixotrophic conditions, *PeerJ -the Journal of Life and Environmental Sciences*, 5, e3473.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Azizi, S., Namvar, F., Mahdavi, M., Ahmad, M. B., & Mohamad, R., 2013, Biosynthesis of silver nanoparticles using brown marine macroalga, *Sargassum muticum* aqueous extract, *Materials*, 6(12), 5942-5950.
- Bar H., Bhui D.Kr., G. P. Sahoo., Sarkar P., De S. P., Misra A., 2009, Green synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas*, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and engineering aspects*, 339, 134-139.
- Barsanti, L., Gualtieri, P., 2014, *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*, CRC press, Taylor & Francis Group, p, 6-49.
- Barwal, I., Ranjan, P., Kateriya, S., Yadav, S.C., 2011, Cellular oxido-reductive proteins of *Chlamydomonas reinhardtii* control the biosynthesis of silver nanoparticles, *Journal of Nanobiotechnology* 9, 1–12.
- Beykaya, M., Çağlar, A., 2016, Bitkisel Özütlere Kullanılarak Gümüş-Nanopartikül (AgNP) Sentezlenmesi ve Antimikrobiyal Etkinlikleri Üzerine Bir Araştırma, *Afyon Kocatepe University Journal of Sciences and Engineering*, 16, 631-641.
- Boca, S. C., Potara, M., Toderas, F., Stephan, O., Baldeck, P. L., Astilean, S., 2011, Uptake and biological effects of chitosan-capped gold nanoparticles on Chinese Hamster Ovary cells, *Materials Science and Engineering: C*, 31(2), 184-189.
- Børsheim, K. Y., Bratbak, G., & Heldal, M. 1990, Enumeration and biomass estimation of planktonic bacteria and viruses by transmission electron microscopy, *Applied and Environmental Microbiology*, 56(2), 352-356.
- Brown, A.N., Smith, K., Samuels, A., Lu, J., Obare, S.O., Scott, M.E., 2012, Nanoparticles functionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Appl Environ Microbiol*, 78(8), 2768–2774.
- Choi, O., Deng, K.K., Kim, N.J., Ross, L. Jr., Surampalli R.Y., Hu, Z., 2008, The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth, *Water Research*, 42(12), 3066–3074.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P., 1999, Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science*, 284(5418), 1318-1322.
- Clinical Laboratory Standards Institute, 2002, Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, Approved Standard M27-A2, Wayne PA
- Dandil, S., 2013, Silika nanopartikül esaslı süperhidrofobik ve transparan kompozit filmlerin sentezi ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans tezi, Gazi.Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü, 91 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dauthal, P., Mukhopadhyay, M., 2016, Noble metal nanoparticles: Plant-mediated synthesis, mechanistic aspects of synthesis, and applications, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 55, 9557–9577.
- Devi, J.S., Bhimba, B.V., 2014. Antimicrobial potential of silver nanoparticles synthesized using *Ulva reticulata*, *Asian Journal Pharmaceutical Clinical Research*. 7, 82–85.
- Dhanalakshmi, P.K., Azeez, R., Rekha, R., Poonkodi, S., Nallamuthu, T., 2012. Synthesis of silver nanoparticles using green and brown seaweeds, *Phykos* 42, 39–45.
- Domingos R. F., Baalousha M.A., Ju-Nam Y., Reid M. M., Tufenkji N., vd., 2009, Characterizing manufactured nanoparticles in the environment: multimethod determination of particle sizes, *Environmental Science & Technology*, 43(19), 7277-7284.
- Dykman, L. A., Khlebtsov, N. G., 2011, Gold Nanoparticles in Biology and Medicine: Recent Advances and Prospects, *Acta Naturae* Vol. 3 No 2 (9)
- El Shafay, S. M., Ali, S. S., El-Sheekh, M. M., 2016. Antimicrobial activity of some seaweeds species from Red sea, against multidrug resistant bacteria, *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 42(1), 65-74.
- Eroglu E., Chen X., Bradshaw M., Agarwal V., Zou J., Stewart S. G., Duan X., Lamb, R. N., Smith S. M., Raston, C.L., Iyera, S. K., 2013, Biogenic production of palladium nanocrystals using microalgae and their immobilization on chitosan nanofibers for catalytic applications, *RSC Advances*, 3(4), 1009-1012.
- Erdik, E. 2008, *Organik kimyada spektroskopik yöntemler*, Gazi Büro Kitabevi, 5.basım.
- Fakruddin, Md., Hossain, Z., Afroz, H., 2012, Prospects and applications of nanobiotechnology: a medical perspective, *Journal of Nanobiotechnology*, 10:31
- Folorunso, A., Akintelu, S., Oyebamiji, A. K., Ajayi, S., Abiola, B., Abdusalam, I., & Morakinyo, A., 2019, Biosynthesis, characterization and antimicrobial activity of gold nanoparticles from leaf extracts of *Annona muricata*, *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 9(2), 111-117.
- Gardea-Torresday, J.L., Gomez, E., Parsons, J.G., Peralta-Videa, J.R., Santiago, P., Torresday, K.J., Troiani, H.E., Yacaman, M.J., 2002, Formation and growth of Au nanoparticles inside live alfalfa plants, *Nano Letters*, 2, 397-401.
- Gericke, M., Pinches, A., 2006, Microbial production of gold nanoparticles, *Gold Bulletin*, 39(1), 22-28.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ghodake, G., Lee, D.S., 2011, Biological synthesis of gold nanoparticles using the aqueous extract of the brown algae *Laminaria japonica*, *Journal of Nanoelectronics and Optoelectronics* 6, 1–4.
- González-Ballesteros, N., Prado-López, S., Rodríguez-González, J.B., Lastra, M., Rodríguez-Argüelles M.C., 2017, Green synthesis of gold nanoparticles using brown algae *Cystoseira baccata*: Its activity in colon cancer cells, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 153 (2017) 190–198
- Govindaraju, K., Krishnamoorthy, K., Alsagaby, S. A., Singaravelu, G., Premanathan, M., 2015, Green synthesis of silver nanoparticles for selective toxicity towards cancer cells, *IET nanobiotechnology*, 9(6), 325-330.
- Guiry, M. D., 2002, *Chlorella sorokiniana* Shihira & R. W. Krauss, https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=51508&-session=abv4:AC1F0F3E02d001906AQta76ACEA5, erişim tarihi: 03.03.2020
- Guiry, M. D., 2002, *Cenedesmus incrassatulus* Bohlin, https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=36404&sk=0&from=results, erişim tarihi: 03.03.2020
- Gutiérrez, J. A., Caballero, S., Díaz, L. A., Guerrero, M. A., Ruiz, J., vd., 2018, High Antifungal Activity against *Candida* Species of Monometallic and Bimetallic Nanoparticles Synthesized in Nanoreactors, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(2), 647–653.
- Gündüz, S., Manyetik demir nanopartiküllerin yeşil sentez metodu ile üretilmesi ve nanobiyosensör olarak kullanımının incelenmesi, Yüksek Lisans tezi, Atatürk Üniversitesi, 102 s.
- Güner, H., Aysel, V., 2011. Tohumuz bitkiler sistematigi, Cilt. I (Algler), Ege Üniversitesi Fen Fak. Kitaplar Serisi, 8. Basım, 108, 245.
- Gürmen, S., Ebin, B., 2008, Nanopartiküller ve Üretim Yöntemleri -1, *Metallurji Dergisi*, 08, 150.
- Grigore, M., Biscu, E., Holban, A., Gestal, M., Grumezescu, A., 2016, Methods of Synthesis, Properties and Biomedical Applications of CuO Nanoparticles, *Pharmaceuticals*, 9(4), 75.
- Harris, A. T., Bali, R., 2008, On the formation and extent of uptake of silver nanoparticles by live plants, *Journal of Nanoparticle Research*, 10(4), 691-695.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Haverkamp, R. G., Marshall, A. T., 2009, The mechanism of metal nanoparticle formation in plants: limits on accumulation, *Journal of Nanoparticle Research*, 11(6), 1453-1463.
- Hassaan, M. A., Hosny, S., 2018, Green synthesis of Ag and Au nanoparticles from micro and macro algae-review, *International Journal of Atmospheric and Oceanic Sciences*, 2(1), 10-22.
- Huang, J., Chen, C., He, N., Hong, J., Lu, Y., vd., 2007, Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf, *Nanotechnology*, 2007,18; 105–106.
- Husseiny, M. I., El-Aziz, M. A., Badr, Y., Mahmoud, M. A., 2007, Biosynthesis of gold nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa*, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 67(3), 1003-1006.
- Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S.V., Zolfaghari, B., 2014, Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods, *Research in Pharmaceutical Science*, 9 (6), 385–406.
- Isaac, G., Renitta, R. E., 2015, Brown algae mediated synthesis, characterization of gold nano particles using *Padina pavonica* and their antibacterial activity against human pathogens, *International Journal Of Pharmtech Research*. 8, 31–40.
- Jalal, M., Ansari, M. A., Alzohairy, M. A., Ali, S. G., Khan, H. M., vd., 2018, Biosynthesis of silver nanoparticles from oropharyngeal *candida glabrata* isolates and their antimicrobial activity against clinical strains of bacteria and fungi, *Nanomaterials*, 8(8), 586.
- Jayashee, S., Thangaraju, N., 2015, Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using marine macro algae *Sargassum plagiophyllum*, C. agardh, *Journal Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 05, 705–712.
- Jegadeeswaran, P., Shivaraj, R., & Venckatesh, R. (2012). Green synthesis of silver nanoparticles from extract of *Padina tetrastrum* leaf. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 7(3), 991-998.
- Jiang, J., Pi, J., Cai, J., 2018, The advancing of zinc oxide nanoparticles for biomedical applications, *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 1–18.
- Jorgensen, J. H., Turnidge, J. D. 2015, Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In *Manual of Clinical Microbiology*, American Society of Microbiology, Eleventh Edition, 1253-1273.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Joseph, B., Otta, S. K., Karunasagar, I., Karunasagar, I. 2001, Biofilm formation by *Salmonella spp.* on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers, *International Journal Of Food Microbiology*, 64(3), 367-372.
- Kannan, R.R., Arumugam, D., Ramya, K. Manivannan, P., 2013, Anantharama, Green synthesis of silver nanoparticles using marine macroalga *Chaetomorpha linum*, *Applied Nanoscience*. 3, 229–233.
- Kathiraven, T., Sundaramanickam, A., Shanmugam, N., Balasubramaniam, T., 2015, Green synthesis of silver nanoparticles using marine algae *Caulerpa racemosa* and their antibacterial activity against some human pathogens, *Applied Nanoscience*. 5, 499–504.
- Katırcıoğlu, H., Aslım, B., Türker, A. R., Atıcı, T., Beyatlı, Y., 2008, Removal of cadmium (II) ion from aqueous system by dry biomass, immobilized live and heat-inactivated *Oscillatoria sp. H1* isolated from freshwater (Mogan Lake). *Bioresource Technology*, 99(10), 4185-4191.
- Khatami, M., Mortazavi, S. M., Kishani-Farahani, Z., Amini, A., Amini, E., vd., 2017, Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Pine Pollen and Evaluation of the Antifungal Efficiency. *Iranian Journal of Biotechnology*, 15(2), 95–101.
- Kowshik, M., Ashtaputre, S., Kharrazi, S., Vogel, W., Urban, J., Kulkarni, S. K., Paknikar, K. M., 2002, Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-tolerant yeast strain MKY3, *Nanotechnology*, 14(1), 95.
- Kowshik, M., Deshmukh, N., Vogel, W., Urban, J., Kulkarni, S. K., Paknikar, K. M., 2002, Microbial synthesis of semiconductor CdS nanoparticles, their characterization, and their use in the fabrication of an ideal diode, *Biotechnology and Bioengineering*, 78(5), 583-588.
- Kumar, P., Senthamil Selvi, S., Govindaraju, M., 2013, Seaweed-mediated biosynthesis of silver nanoparticles using *Gracilaria corticata* for its antifungal activity against *Candida sp.*, *Applied Nanoscience*. 3, 495–500.
- Kumar, P., Senthamil, S., Selvi, A., Prabha, L., Prem Kumar, K., Ganeshkumar, R.S., Govindaraju, M., 2012, Synthesis of silver nanoparticles from *Sargassum tenerrimum* and screening phytochemicals for its antibacterial activity, *Nano Biomedicine and Engineering*. 4,12–16.
- Kuyucak, N., Volesky, B., 1989, Accumulation of gold by algal biosorbent, *Biorecovery* 1; 189–204.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- LewisOscar, F., MubarakAli, D., Nithya, C., Priyanka, R., Gopinath, V., Alharbi, N. S., Thajuddin, N., 2015, One pot synthesis and anti-biofilm potential of copper nanoparticles (CuNPs) against clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Biofouling*, 31(4), 379-391.
- Li, C., Li, D., Wan, G., Xu, J., Hou, W., 2011, Facile synthesis of concentrated gold nanoparticles with low size-distribution in water: temperature and pH controls, *Nanoscale Research Letters*, 6:440
- Loomba, L., Scarabelli, T., 2013, Metallic nanoparticles and their medicinal potential. Part I: gold and silver colloids. *Therapeutic Delivery*, 4(7), 859-873.
- Ishak, N. M., Kamarudin, S. K., & Timmiati, S. N., 2019, Green synthesis of metal and metal oxide nanoparticles via plant extracts: an overview, *Materials Research Express*, 6(11), 112004.
- Maheswari, R. U., Prabha, A. L., Nandagopalan, V., Anburaja, V., 2012, Green synthesis of silver nanoparticles by using rhizome extract of *Dioscorea oppositifolia* L. and their anti microbial activity against human pathogens, *Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences*, 1, 38-42.
- Mallmann, E. J. J., Cunha, F. A., Castro, B. N. M. F., Maciel, A. M., Menezes, E. A., vd., 2015, Antifungal activity of silver nanoparticles obtained by green synthesis, *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo*, 57(2), 165–167.
- Mao, C., Solis, D. J., Reiss, B. D., Kottmann, S. T., Sweeney, R. Y., Hayhurst, A., Georgiou, G., Iverson, B., Belcher, A. M., 2004, Virus-based toolkit for the directed synthesis of magnetic and semiconducting nanowires, *Science*, 303(5655), 213-217.
- Marimuthu, S., Rahuman, A. A., Rajakumar, G., Santhoshkumar, T., Kirthi, vd., 2011, Evaluation of green synthesized silver nanoparticles against parasites, *Parasitology research*, 108(6), 1541-1549.
- Markus, J., Mathiyalagan, R., Kim, Y.-J., Abbai, R., Singh, P., vd., 2016, Intracellular synthesis of gold nanoparticles with antioxidant activity by probiotic *Lactobacillus kimchicus* DCY51 T isolated from Korean kimchi, *Enzyme and Microbial Technology*, 95, 85–93.
- Mata, Y. N., Torres, E., Blazquez, M.L., Ballester, A., Gonzalez, F., Munoz, J.A., 2009, Gold (III) biosorption and bio-reduction with brown alga *Fucus vesiculosus*, *Journal of Hazardous Materials*, 166, 612–618.
- Mickymaray, S., Alturaiki, W., 2018, Antifungal efficacy of marine macroalgae against fungal isolates from bronchial asthmatic cases, *Molecules*, 23(11), 3032.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mody, V., Siwale, R., Singh, A., Mody, H., 2010, Introduction to metallic nanoparticles, Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences, 2(4), 282.
- Mulvaney. P., 1996, Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particle, Langmuir 12(3):788–800
- Mussin, J. E., Roldán, M. V., Rojas, F., Sosa, M., Pellegrini N, Giusiano G., 2019, Antifungal activity of silver nanoparticles in combination with ketoconazole against *Malassezia furfur*, AMB Express 9:131
- Nadeem, M., Abbasi, B. H., Younas, M., Ahmad, W., Khan, T., 2017, A review of the green syntheses and anti-microbial applications of gold nanoparticles, Green Chemistry Letters and Reviews, 10(4), 216-227.
- Narayan Sinha, S., Paul, Halder, D. N., Sengupta, D., Kumar Patra, S., 2015. Green synthesis of silver nanoparticles using fresh water green alga *Pithophora oedogonia* (Mont.) Wittrock and evaluation of their antibacterial activity, Applied Nanoscience. 5, 703–709.
- Nidhin, M., Sanaha. D., Hans, S., Varghese, A., Fatima, Z., vd., 2019, Studies on the antifungal activity of biotemplated gold nanoparticles over *Candida albicans*, Materials Research Bulletin, 110563.
- Noruzi, M., Zare, D., Khoshnevisan, K., & Davoodi, D., 2011, Rapid green synthesis of gold nanoparticles using *Rosa hybrida* petal extract at room temperature, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 79(5), 1461-1465.
- Ouda. M. S., 2014, Antifungal Activity of Silver and Copper Nanoparticles on Two Plant Pathogens, *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*, Research Journal of Microbiology, 9(1):34-42.
- Özer, Y., 2008, Nanobilim ve Nanoteknoloji: Ülke Güvenliği/ Etkinliği Açısından Doğru Modelin Belirlenmesi. (Y. Lisans Tezi), Kara Hava Okulu Savunma Bilimleri Enstitüsü Teknoloji Yönetimi Anabilim Dalı, Ankara.
- Öztürk, B. Y., 2019, Intracellular and extracellular green synthesis of silver nanoparticles using *Desmodium sp.*: their Antibacterial and antifungal effects, Caryologia. International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics, 72(1), 29-43.
- Öztürk, B. Y., Gürsu, B. Y., Dağ, İ., 2019, Antibiofilm and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles using marine red algae *Gelidium corneum*, Process Biochemistry.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Parial, D., Pal, R., 2014, Green synthesis of Gold nanoparticles using cyanobacteria and their characterization, *Indian Journal Of Applied Research*. 4, 69–72.
- Patra, J. K., Baek, K. H., 2017, Antibacterial activity and synergistic antibacterial potential of biosynthesized silver nanoparticles against foodborne pathogenic bacteria along with its anticandidal and antioxidant effects. *Frontiers in microbiology*, 8, 167.
- Patra, S., Mukherjee, S., Barui, A. K., Ganguly, A., Sreedhar, B., vd., 2015, Green synthesis, characterization of gold and silver nanoparticles and their potential application for cancer therapeutics, *Materials Science and Engineering: C*, 53, 298–309.
- Pavani, K. V., Gayathamma, K., Banerjee, A., Suresh, S., 2013, Phyto-synthesis of silver nanoparticles using extracts of *Ipomoea indica* flowers, *American Journal of Nanomaterials*, 1(1), 5-8.
- Pesando, D., Caram, B., 1984, Screening of marine algae from the French Mediterranean coast for antibacterial and antifungal activity, *Botanica marina*, 27(8), 381-386.
- Pandey, P., Packiyaraj, M. S., Nigam, H., Agarwal, G. S., Singh, vd., 2014, Antimicrobial properties of CuO nanorods and multi-armed nanoparticles against *B. anthracis* vegetative cells and endospores, *Beilstein journal of nanotechnology*, 5(1), 789-800.
- Prasad, T. N., Kambala, V. S. R., Naidu, R., 2013, Phyconanotechnology: synthesis of silver nanoparticles using brown marine algae *Cystophora moniliformis* and their characterisation, *Journal of applied phycology*, 25(1), 177-182.
- Pugazhenthiran, N., Anandan, S., Kathiravan, G., Prakash, N. K. U., Crawford, S., vd., 2009, Microbial synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus sp.*, *Journal of Nanoparticle Research*, 11(7), 1811.
- Raghunandan, D., Basavaraja, S., Mahesh, B., Balaji, S., Manjunath, S. Y., Venkataraman, A., 2009, Biosynthesis of stable polyshaped gold nanoparticles from microwave-exposed aqueous extracellular anti-malignant guava (*Psidium guajava*) leaf extract, *Nanobiotechnology*, 5(1-4), 34-41.
- Raghunandan, D., Ravishankar, B., Sharanbasava, G., Mahesh, D. B., Harsoor, V., vd., 2011, Anti-cancer studies of noble metal nanoparticles synthesized using different plant extracts. *Cancer nanotechnology*, 2(1-6), 57-65.
- Ragupathi Raja Kannan, R., Arumugam, Ramya, R.D., Manivannan, K., Anantharama, P., 2013, Green synthesis of silver nanoparticles using marine macroalga *Chaetomorpha linum*, *Applied Nanoscience* 3, 229–233.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rahimi, H., Roudbarmohammadi, S., Delavari H, H., Roudbary, M., 2019, Antifungal effects of indolicidin-conjugated gold nanoparticles against fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* isolated from patients with burn infection, *International Journal of Nanomedicine*, Volume 14, 5323–5338.
- Rahimi, Z., Yousefzadi, M., Noori, A., Akbarzadeh, A., 2014, Green synthesis of silver nanoparticles using *Ulva flexousa* from the Persian Gulf, Iran, *Journal of the Persian Gulf*, 5(15), 9-16.
- Rai M., Yadav A., Gade A., 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials, *Biotechnology advances*, 27 (1), 76–83.
- Rajathi, F.A.A., Parthiban, C., Ganesh Kumar, V., Anantharaman, P., 2012. Biosynthesis of antibacterial gold nanoparticles using brown algae, *Stoechospermum marginatum* (kutzing), *Spectrochim. Acta A* 99, 166–173.
- Rajeshkumar, S., Malarkodi, C., Paulkumar, K., Vanaja, M., Gnanajobitha, G., vd., 2014, Algae mediated green fabrication of silver nanoparticles and examination of its antifungal activity against clinical pathogens, *International journal of Metals*, 2014.
- Rajeshkumar, S., Malarkodi, C., Paulkumar, K., Vanaja, M., Gnanajobitha, G., vd., 2013, Seaweed-mediated synthesis of gold nanoparticles using *Turbinaria conoides* and its characterization, *Journal Of Nanostructure in Chemistry*, 3:44
- Ramage, G., Vandewalle, K., Wickes, B.L., Lopez-Ribot, Jose L., 2001, Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*, *Revista iberoamericana de micología*, 18(4), 163-170.
- Ramaswamy, V.P., Narendhran, S., Sivaraj R., 2016, Potentiating effect of ecofriendly synthesis of copper oxide nanoparticles using brown alga: antimicrobial and anticancer activities, *Bulletin Materials Science*, 39, 361–364.
- Rao, Y.S., Kotakadi, V.S., Prasad, T., Reddy, A., Gopal, DS., 2013, Green synthesis and spectral characterization of silver nanoparticles from Lakshmi tulasi (*Ocimum sanctum*) leaf extract, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 103, 156- 159.
- Rippka, R., 1988, Isolation and purification of cyanobacteria, In *Methods in enzymology* Vol. 167, pp. 3-27, Academic Press.
- Ruparelia, J.P., Chatterjee, A.K., Duttagupta, S.P., Mukherji, S., 2008, Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles, *Acta Biomater*, 4 (3), 707–716.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., Vaca-Garcia, C., 2014, Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265-278
- Salari, Z., Danafar, F., Dabaghi, S., Ataei, S. A., 2016, Sustainable synthesis of silver nanoparticles using macroalgae *Spirogyra varians* and analysis of their antibacterial activity, *Journal of Saudi Chemical Society*, 20(4), 459-464.
- Sangetha, S., Zuraini, Z., Suryani, S., & Sasidharan, S. 2009, In situ TEM and SEM studies on the antimicrobial activity and prevention of *Candida albicans* biofilm by *Cassia spectabilis* extract, *Micron*, 40(4), 439-443.
- Senapati, S., Syed, A., Moeiz, S., Kumar, A., Ahmad, A., 2012, Intracellular synthesis of gold nanoparticles using algae *Tetraselmis kochinensis*, *Materials Letters*. 79, 116–118.
- Seralathan, J., Stevenson, P., Subramaniam, S., Raghavan, R., Pemaiah, B., vd., 2014, Spectroscopy investigation on chemo-catalytic, free radical scavenging and bactericidal properties of biogenic silver nanoparticles synthesized using *Salicornia brachiata aqueous* extract, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 118, 349-355.
- Shankar, P.D., Shobana, S., Karuppusamy, I., Pugazhendhi, A., Ramkumar, vd., 2016, A review on the biosynthesis of metallic nanoparticles (gold and silver) using bio-components of microalgae: formation mechanism and applications, *Enzyme and Microbial Technology*. 95, 28–44.
- Shankar, S. S., Ahmad, A., Sastry, M., 2003, Geranium Leaf Assisted Biosynthesis of Silver Nanoparticles, *Biotechnology Progress*, 19(6), 1627–1631.
- Shanmugam, R., Kanniah, M. P., Mahendran, V., Gnanadas, G., Gurusamy, A., 2014. Algae mediated green fabrication of silver nanoparticles and examination of its antifungal activity against clinical pathogens, *International Journal of Metals* 11, 1–8.
- Sharma, B., Purkayastha, D. D., Hazra, S., Gogoi, L., Bhattacharjee, C. R., Ghosh, N. N., Rout, J., 2014. Biosynthesis of gold nanoparticles using a freshwater green alga, *Prasiola crispa*, *Materials Letters*, 116, 94-97.
- Sharma, P., Sharma, N., 2017, Industrial and Biotechnological Applications of Algae: A Review, *Journal of Advances in Plant Biology*-1(1):01-25
- Schmidt, M., Wilhelm, C., 2014, Green Algae. In *The Structural Basis of Biological Energy Generation*, Springer, Dordrecht. p. 309-333.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Singaravelu, G., Arockiamary, J. S., Kumar, V. G., Govindaraju, K., 2007, A novel extracellular synthesis of monodisperse gold nanoparticles using marine alga, *Sargassum wightii* Greville, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 57(1), 97-101.
- Singh, A. K., Tiwari, R., Singh, V. K., Singh, P., Khadim, S. R., vd., 2019, Green synthesis of gold nanoparticles from *Dunaliella salina*, its characterization and in vitro anticancer activity on breast cancer cell line, *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 51, 164-176.
- Singh, M., Kalaivani, R., Manikandan, S., Sangeetha, N., Kumaraguru, A. K., 2013, Facile green synthesis of variable metallic gold nanoparticle using *Padina gymnospora*, a brown marine macroalga, *Applied Nanoscience*, 3(2), 145-151.
- Sondi, I., Salopek-Sondi, B., 2004, Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram negative bacteria, *Journal of Colloid Interface Science*, 275 (1), 177–182.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., Švabić-Vlahović, M., 2000, A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation, *Journal of microbiological methods*, 40(2), 175-179.
- Subramaniam, V., Subashchandrabose, S. R., Thavamani, P., Megharaj, M., Chen, Z., Naidu, R., 2015, *Chlorococcum* sp. MM11—a novel phyco-nanofactory for the synthesis of iron nanoparticles, *Journal of Applied Phycology*, 27(5), 1861-1869.
- Suriya, J., Bharathi Raja, S., Sekar, V., Rajasekaran, R., 2012, Biosynthesis of silver nanoparticles and its antibacterial activity using seaweed *Urospora* sp., *African Journal of Biotechnology* 11, 12192–12198.
- Swain, S., Barik, S. K., Behera, T., Nayak, S. K., Sahoo, S. K., vd., 2016, Green synthesis of gold nanoparticles using root and leaf extracts of *Vetiveria zizanioides* and *Cannabis sativa* and its antifungal activities. *BioNanoScience*, 6(3), 205-213.
- Thakkar, K. N., Mhatre, S. S., Parikh, R. Y., 2010, Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(2), 257-262.
- Toygun, Ş., Köneçoğlu, G., Kalpaklın Y., 2013, General principles of sol-gel, *Sigma: Journal of Engineering & Natural Sciences/Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 31, 456–476.
- Tunca, E., 2015. Nanoteknolojinin temeli nanopartiküller ve nanopartiküllerin fitoremediasyonu, *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi* 5(2), 23-34.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Velmurugan, P., Anbalagan, K., Manosathyadevan, M., Lee, K. J., Cho, M., vd., 2014, Green synthesis of silver and gold nanoparticles using *Zingiber officinale* root extract and antibacterial activity of silver nanoparticles against food pathogens, *Bioprocess and biosystems engineering*, 37(10), 1935-1943.
- Venkatesan, J., Manivasagan, P., Kim, S.K., Kirthi, A.V., Marimuthu, S., Rahuman, A.A., 2014. Marine algae-mediated synthesis of gold nanoparticles using a novel *Ecklonia cava*, *Bioprocess and Biosystems Engineering* 37, 1591–1597.
- Venkatesh, N., Bhowmik, H., Kuila, A., 2018, Metallic nanoparticle: a review, *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 4(2), 3765-3775.
- Venkatpurwar, V., Pokharkar, V., 2011, Green synthesis of silver nanoparticles using marine polysaccharide: study of in-vitro antibacterial activity, *Material Letters* 65, 999–1002.
- Vigneshwaran, N., Nachane, R.P., Balasubramanya, R.H., Varadarajan, P.V., 2006, A novel one- pot ‘green’ synthesis of stable silver nanoparticles using soluble starch, *Carbohydrate Research* 341, 2012–2018.
- Volesky, B., & Naja, G., 2005, Biosorption: application strategies, In 16th International Biohydrometallurgy Symposium, pp. 25-29.
- Wehr, J.D., Robert, G., Sheath (Eds.), 2003, *Freshwater algae of North America: ecology and classification*, Elsevier
- Wu, Y. H., Li, X., Yu, Y., Hu, H. Y., Zhang, T. Y., vd., 2013, An integrated microalgal growth model and its application to optimize the biomass production of *Scenedesmus* sp. LX1 in open pond under the nutrient level of domestic secondary effluent, *Bioresource technology*, 144, 445-451.
- Xie, J., Lee, J. Y., Wang, D. I., Ting, Y. P., 2007, Identification of active biomolecules in the high-yield synthesis of single-crystalline gold nanoplates in algal solutions, *Small*, 3(4), 672-682.
- Zhang, X. F., Liu, Z. G., Shen, W., Gurunathan, S., 2016, Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches, *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1534.
- Zgoda, J. R., Porter, J. R., 2001, A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi, *Pharmaceutical Biology*, 39(3), 221-225.