

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇEŞİTLİ KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN
BACİLLUS SUŞLARININ GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLÜ
BİYOSENTEZLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nurdan KARTAL

Enstitü Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ
Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ayşe AVCI

Ocak 2022

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇEŞİTLİ KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN
BACILLUS SUŞLARININ GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLÜ
BİYOSENTEZLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nurdan KARTAL

Enstitü Anabilim Dalı

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Bu tez 14.01.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Üye

Üye

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Nurdan KARTAL

14.01.2022

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca hiçbir koşulda benden bilgisini ve desteğini esirgemeyen, araştırma ve laboratuvar çalışmalarımda beni yalnız bırakmayan, teşvik eden ve yönlendiren değerli danışman hocam Doç. Dr. Ayşe AVCI'ya emekleri için çok teşekkür ederim. Ayrıca yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocalarım Fikriye Alev AKÇAY ve Elif SEZER'e teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamımın her anında maddi ve manevi desteklerini hep üzerimde hissettiğim; eğitim hayatım süresince karşılaştığım her zorlukta ve güzellikte benimle birlikte olan başta annem Yaşar Nur TOPRAK olmak üzere, eşim Özgür KARTAL, dayım İlker YILDIZ ve meslektaşım Duygu ÖZMEN'e çok teşekkür ederim.

Ayrıca bu çalışmanın maddi açıdan desteklenmesine olanak sağlayan Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığına (Proje No: 2019-7-24-205) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	ix
ÖZET	x
SUMMARY	xi
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2.	
LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. Nanoteknoloji	3
2.1.1. Nanoteknolojinin tanımı ve tarihçesi.....	3
2.1.2. Nanoteknolojinin kullanım alanları.....	4
2.1.2.1. Nanoteknolojinin gıda endüstrisinde kullanımı.....	5
2.1.3. Nanopartiküller ve üretim yöntemleri.....	6
2.1.4. Nanopartiküllerin mikrobiyal sentezi.....	9
2.1.5. Gümüş nanopartikülleri.....	11
2.2. Yapılan Çalışmalar	12

BÖLÜM 3.

MATERYAL VE YÖNTEM	18
3.1. Materyal	18
3.1.1. Kullanılan mikroorganizmalar	19
3.1.2. Kullanılan araç ve gereçler	19
3.1.3. Kullanılan besiyerler	21
3.1.4. Kullanılan kimyasallar ve çözeltiler	21
3.2. Yöntem	21
3.2.1. Mikroorganizmaların aktifleştirilmesi ve muhafazası	21
3.2.2. Gümüş nanopartikül biyosentezi yapan mikroorganizmaların belirlenmesi	22
3.2.3. Gümüş nanopartikül biyosentezine reaksiyon koşullarının etkisi	23
3.2.3.1. Sıcaklık etkisinin belirlenmesi	24
3.2.3.2. pH etkisinin belirlenmesi	24
3.2.3.3. Konsantrasyonun etkisinin belirlenmesi	24
3.2.4. Gümüş nanopartiküllerin karakterizasyonu	24
3.2.4.1. Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi analizi (EDX)....	24
3.2.4.2. Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu analizi (FESEM)	25
3.2.5. Gümüş nanopartiküllerin saflaştırılması	25
3.2.6. Gümüş nanopartiküllerin antimikrobiyal çalışması	26
3.2.6.1. Disk difüzyon yöntemi	26
3.2.6.2. Optik yoğunluk ile mikrobiyal hücre ölçümü.....	27
3.2.7. Gümüş nanopartiküllerin antioksidan çalışması	27
3.2.8. <i>Bacillus</i> sp. ZGT9 izolatının tanımlanması.....	28

BÖLÜM 4.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	29
4.1. Gümüş Nanopartikül Üreten Mikroorganizmaların Belirlenmesi	29
4.2. <i>Bacillus</i> sp. ZGT9 ile Gümüş Nanopartiküllerinin Üretimi	30

4.2.1. Gümüş nanopartiküllerinin biyosentezine sıcaklığın etkisi	30
4.2.2. Gümüş nanopartiküllerinin biyosentezine pH etkisi	33
4.2.3. Gümüş nanopartiküllerinin biyosentezine konsantrasyonun etkisi	35
4.3. Gümüş Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu	37
4.3.1. FESEM	37
4.3.2. EDX.....	39
4.4. Antimikrobiyal Aktivite	40
4.4.1. Disk difüzyon yöntemi.....	40
4.4.2. Optik yoğunluk ile mikrobiyal hücre ölçümü.....	43
4.5. Gümüş Nanopartiküllerin Antioksidan Çalışması	46
4.6. ZGT9'un Tanımlanması	47
 BÖLÜM 5.	
SONUÇ VE ÖNERİLER	48
 KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	55

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
AgNP	: Gümüş nanopartikül
dak	: Dakika
DPPH	: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
EDX	: Enerji dağılımlı X-ışını
FESEM	: Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu
g	: Gram
HCl	: Hidroklorik asit
mg	: Miligram
MİK	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
M.Ö	: Milattan önce
N	: Normal/Normalite
NA	: Nutrient Agar
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NaOH	: Sodyum hidroksit
NB	: Nutrient Broth
nm	: Nanometre
NP	: Nanopartikül
OD	: Optik yoğunluk
pH	: Pondus hidrojeni

rDNA	: Ribozomal deoksiribo nükleik asit
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
sp.	: Alt tür
Strep.	: Streptomycin
TiO ₂	: Titanyum dioksit
TSA	: Tyryptic Soy Agar
TSB	: Tyryptic Soy Broth
UV-VIS	: Morötesi-görünür bölge
XRD	: X-ışını kırınımı
YPG	: Maya Ekstraktlı Peptonlu Glukoz
YPR	: Yüzey plazmon rezonansı

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Şekil 2.1. Nanopartiküllerin oluşum mekanizması (Ovais ve ark., 2017)	8
Şekil 2.2. Gümüş nanopartiküllerinin biyosentezi için önerilen mekanizma (Golinska ve ark., 2014'ten derlenmiştir)	10
Şekil 3.1. İzole edilmiş farklı suşların TSA besiyerinde gelişimi	22
Şekil 3.2. Mikroorganizmaların 24 saatlik inkübasyondan öncesi ve sonrası	22
Şekil 3.3. Gelişimi sağlanmış mikroorganizmaların santrifüjlenerek süpernatant elde edilme aşaması	23
Şekil 3.4. Biyoreaksiyonun gerçekleşmesinden sonra AgNP elde edilmesi. a) biyosentez çözeltisi b) santrifüjlenmiş AgNP çözeltisi c) AgNP'ün süpernatant kısmından ayrılması d-e) kurutulan AgNP	25
Şekil 4.1. Seçilen 13 farklı izolatların NP biyosentezleri sırasındaki renk değişimi	30
Şekil 4.2. 30 ve 40°C sıcaklıklarda gerçekleştirilen biyosentezlerin 48 saat sonunda renginin kahverengiye dönüşümü arasındaki fark.....	31
Şekil 4.3. Aynı konsantrasyonda AgNP içeren süpernatantların farklı sıcaklıklarda (30, 33 ve 40°C) 24 ve 48 saat sonundaki absorbans değerlerinin grafiği	32
Şekil 4.4. 30, 33 ve 40°C'de 4 mM AgNP konsantrasyondaki süpernatantların 48 saat sonunda UV-VIS spektrum grafiği.....	32
Şekil 4.5. Aynı Konsantrasyon ve sıcaklıkta farklı ortam pH değerlerinde (pH 6, 7 ve 10) renk değişimi.....	33
Şekil 4.6. Farklı ortam pH değerlerindeki absorbans değer grafiği.	34

Şekil 4.7. Farklı pH değerlerinde AgNP üretim ortamlarının 48 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen spektrum grafiği.	34
Şekil 4.8. Farklı AgNO ₃ konsantrasyonlardan elde edilen AgNP biyosentezinin 48. saat sonundaki renk değişimi.....	36
Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlarda (1,2,4,6,8,10 mM) AgNO ₃ eklenen örneklerin 414 nm’de 48. saat sonunda ölçülen absorban değerlerinin grafiği.	36
Şekil 4.10. Farklı AgNO ₃ konsantrasyon (a: 10 mM, 33°C; b: 8 mM, 33°C; c: 4 mM, 33°C; d: 6 mM, 33°C; e: 4 mM, 30°C; f: 4 mM, 40°C) ve sıcaklarda elde edilmiş AgNP’lerin FESEM görüntüleri.	38
Şekil 4.11. AgNP’e ait EDX spektrumu.	40
Şekil 4.12. Agar disk difüzyon yöntemi ile farklı konsantrasyonlarda uygulanan AgNP çözeltilisinin oluşturduğu inhibisyon çapı a) <i>E. coli</i> Tip1, b) <i>E. coli</i> O157:H7, c) <i>B. cereus</i>	42
Şekil 4.13. Bazı patojen bakterilerin farklı konsantrasyonlarda (0-50 µg/ml) 6 saatlik gelişme grafiği a) <i>L. monocytogenes</i> b) <i>P. aeruginosa</i> c) <i>S. Typhimurium</i>	44
Şekil 4.14. Farklı konsantrasyonlardaki (20-100 µg/ml) AgNP’ ün DPPH radikalini giderimi.	46
Şekil 4.15. <i>Bacillus</i> ZGT9 bakterisine ait 16S rDNA gen dizisi analiziyle elde edilen filogenetik ağaç.	47

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 3.1. Çalışma da kullanılan farklı kaynaklardan elde edilmiş izolatlar.....	18
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan araç-gereçler ve markaları	19
Tablo 4.1. Üretilen AgNP'lerinin elementel kompozisyonu	39
Tablo 4.2. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan AgNP çözeltisinin patojen mikroorganizmalar üzerinde oluşturduğu inhibisyon çapı.	41
Tablo 4.3. <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. Typhimurium</i> ve <i>P. aeruginosa</i> 'ın farklı konsantrasyonlardaki AgNP ilavesi ile 6. saat sonundaki % inhibisyon değerleri	44

ÖZET

Anahtar Kelimeler: *Bacillus*, nanopartikül, biyosentez, gümüş, antimikrobiyal

Bu çalışmada bazı toprak ve gıda örneklerinden izole edilen 28 adet bakterinin gümüş nanopartiküllerini (AgNP) sentezleme yetenekleri araştırılarak en iyi üretici izolat seçilmiş ve bu izolatın nanopartikül (NP) üretim koşulları optimize edilmiştir. Üretilen AgNP'lerinin karakterizasyonu yapılmış, antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri incelenmiştir.

Çalışma kapsamında bir toprak örneğinden izole edilmiş olan ve 16S rDNA dizi analizine göre *Bacillus* cinsine ait olduğu belirlenen ZGT9 suşunun AgNP'lerini ürettiği tespit edilmiştir. Bu nedenle çalışmaya ZGT9 olarak kodlanan bakteri ile devam edilmiştir. Nanopartikül üretimine pH (6-10), sıcaklık (30-40°C) ve AgNO₃ konsantrasyonunun (1-10 mM) etkisi belirlenmiştir. Kullanılan parametrelere bağlı olarak uygulamalarda AgNP oluşumu sırasında Nutrient Broth besiyerinin renginin açık sarıdan kahverengiye döndüğü gözlenmiş ve absorbans değerleri UV-VIS spektrofotometrede 414 nm dalga boyunda ölçülerek takip edilmiştir.

Spektrofotometrik ölçümler sonucunda en iyi üretimin 8 mM AgNO₃ konsantrasyonuna sahip, pH 8-9 aralığında olan ortamda, 40°C'de ve 48 saatte olduğu tespit edilmiştir. Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FESEM) analizleri yapılarak NP'lerin 1-50 nm çapında küresel şekilli olduğu saptanmıştır. 40°C'de aglomerasyon gerçekleştiği için 33°C ile analizlere devam edilmiştir. pH 6 ve 7 de, 1 mM ve 2 mM AgNO₃ konsantrasyonlarda ve 24 saatte AgNP biyosentezinin gerçekleşmediği saptanmıştır. Renk değişimi ve yüzey plazmon rezonansı en iyi pH 10'da gözlenmesine rağmen son aşama olan saflaştırmada zorluk yaşanmıştır.

Üretilen nanopartiküller antioksidan ve antimikrobiyal aktivite sergilemişler. DPPH radikalini indirgeme aktivitesi %39,4-%70 aralığındadır. Sıvı kültürde antimikrobiyal analizde 6.saatte %100 inhibisyona ulaşmıştır.

INVESTIGATION OF SILVER NANOPARTICLES BIOSYNTHESIS BY *BACILLUS* STRAINS ISOLATED FROM VARIOUS SOURCES

SUMMARY

Keywords: *Bacillus*, nanoparticle, biosynthesis, silver

In this study, the abilities of 28 bacteria, isolated from some soil and food samples, to synthesize silver nanoparticles (AgNP) were investigated, and the best producer isolate was selected and nanoparticle (NP) production conditions of this isolate were optimized. The produced AgNPs were characterized and their antioxidant and antimicrobial properties were investigated.

Within the scope of the study, it was determined that the ZGT9 strain, which was isolated from a soil sample and determined to belong to the *Bacillus* genus according to 16S rDNA sequence analysis, produced AgNPs. For this reason, the study was continued with the bacterium coded as ZGT9. The effects of pH (6-10), temperature (30-40°C), and AgNO₃ concentration (1-10 mM) on NP production were determined. Depending on the parameters applied, it was observed that the color of the Nutrient Broth medium changed from light yellow to brown during the formation of AgNP, and the absorbance values were measured by UV-VIS spectrophotometer at a wavelength of 414 nm.

As a result of spectrophotometric measurements, it was determined that the best production was at 40°C and 48 hours in the medium with 8 mM AgNO₃ concentration, pH 8-9. Field emission scanning electron microscopy (FESEM) analyzes were performed and NPs were found to be spherical in size having diameters between 1 and 50 nm. Due to agglomeration at 40°C, analyzes were continued at 33°C. It was determined that AgNP biosynthesis did not occur at pH 6 and 7, 1 mM and 2 mM AgNO₃ concentrations and 24 hours. Although the color change and surface plasmon resonance were best observed at pH 10, difficulties were encountered in the final stage of purification.

The produced nanoparticles exhibited antioxidant and antimicrobial activity. DPPH radical reducing activity was in the range of 39,4%-70%. In the antimicrobial analysis in liquid culture, it reached 100% inhibition at the 6th hours.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Çeşitli nanoteknolojik yöntemlerle nano boyuta indirgenen metal partiküller, eşsiz fiziksel, kimyasal, elektronik, mekanik optik dielektrik ve biyolojik aktivite kazanmaktadırlar. Bu özellikleri ile günümüzde pek çok uygulama alanına sahip olan nanopartiküller, biyomedikal, tıp, eczacılık, elektrik-elektronik, tekstil, otomotiv sanayi, gıda sanayi gibi pek çok farklı alanda çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır (Akçay ve Avcı, 2018; Anees Ahmad ve ark., 2020).

Metal nanopartiküllerin üretiminde birçok kimyasal ve fiziksel yöntemler geliştirilse de biyolojik yöntemler daha çok dikkat çekmektedir (Wei ve ark., 2012; Deljou ve Goudarzi, 2016). Kimyasal yöntemlerde toksik kimyasalların kullanılması ve bu atıkların çevreye zarar vermesinden dolayı yerine çevre dostu, güvenli, enerji verimliliği sağlayan, ucuz ve daha az toksik olan biyolojik yöntem tercih edilmeye başlanmıştır. Bitki özleri, bakteri ve mantarlar gibi mikroorganizmalardan yararlanan biyolojik yöntemin sonrasında toksik kimyasal açığa çıkmaması, ortam sıcaklığı ve basıncında gerçekleşmesi de büyük avantaj olarak görülmektedir (Soliman ve ark., 2018; Yılmaz Öztürk, 2019).

Biyolojik yollarla metal NP'lerin üretilmesi durumunda, NP'lerin fiziko-kimyasal özellikleri, kaplama maddeleri olarak işlev gören organik bileşikler tarafından korunur (Deljou ve Goudarzi, 2016; Habibullah ve ark., 2021). Metal NP'lerin fiziko-kimyasal özelliklerinin, hava oksidasyonu üzerine demir NP'lerin manyetik özelliklerinin kaybolması gibi, etkilenebileceği iyi bilinmektedir. Yeşil sentez yoluyla elde edilen metal NP'lerin ekstraksiyonu, verimi ve stabilitesi her zaman ön görülebilmıştır (Prakash ve ark., 2011; Mousavi ve ark., 2018). Farklı metal ve metal oksit NP'leri arasında AgNP'ler, nanotıp, ilaç dağıtımı, nano cihaz üretimi, biyoalgılama, kataliz ve görüntüleme gibi çeşitli

olası biyolojik uygulamalar araştırma gruplarının dikkatini çekmiştir (Wang ve ark., 2012; Saravanan ve ark., 2018; Ijaz ve ark., 2020).

Biyomedikal ve ilaç araştırmalarında insan patojenlerinin antibiyotiklere direnci büyük problem oluşturmaktadır. Bu problem zamanla artmakta ve diğer patojenik bakteriler için de ortaya çıkmaktadır. Çoklu ilaç direnci antibiyotiklerin verimsizliği konusunda endişe oluşturmaktadır. Çalışmalarla gümüş NP'lerin geniş mikroorganizma aralığında etki göstermesi yeni antibiyotiklerin geliştirilmesinde ilgi alanı haline gelmiştir. Nanopartiküllerin kimyasal, fiziksel ve biyolojik olarak farklı metotlarla üretilabiliyor olması da araştırmaların ilgi odağına neden olmuştur (Tsekhmistrenko ve ark., 2020). Endüstriyel ve biyolojik uygulamalar için mikroorganizmaların metal iyonlarına karşı direnci sürekli metal NP üretiminde kullanılabileceği düşünülmektedir (Hsueh ve ark., 2015; Deljou ve Goudarzi, 2016; Fouad ve ark., 2017).

Bu çalışmada, çeşitli yerel kaynaklardan izole edilmiş olan *Bacillus* suşlarının AgNP biyosentez kapasiteleri araştırılmıştır. Tarama çalışması sonucunda *Bacillus* sp. ZGT9 suşu seçilerek bununla NP biyosentez koşullarının (sıcaklık, AgNO₃ konsantrasyonu ve pH) optimizasyonu yapılmıştır. Çalışmanın son aşamasında ise elde edilen NP'lerin karakterizasyonu ile antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri belirlenmiştir.

BÖLÜM 2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Nanoteknoloji

2.1.1. Nanoteknolojinin tanımı ve tarihçesi

Yunancada cüce anlamına gelen nanos sözcüğünden türemiş olan “Nano” fiziksel bir büyüklüğün 10^{-9} katını belirten ve metrenin milyarda birini ifade eden bir ön addır. Nano yapılar 100-1000 tane atomun bir araya gelmesiyle oluşurken, uzunluk olan nanometreye sade 2-3 atom sığabilmektedir. DNA molekülü 2,5 nm genişliğinde, bir protein 50 nm uzunluğunda, grip virüsü yaklaşık 100 nm boyutunda ve insan saçı yaklaşık 10.000 nm kalınlığındadır (Kim, 2008; İlyasoğlu ve El, 2010; Hulkoti ve Taranath, 2014).

Nanoteknolojinin tarihi incelendiğinde başlangıcının hangi zaman aralığında olduğu tam olarak bilmemektedir. Fakat insanların “Nano Çağı”ndan çok öncelerde dahi, nano ölçekteki nesneleri kullandıkları bilinmektedir. M. Ö. yaşamış insanlar yüzyıllar boyunca keten, yün, pamuk ve ipeği kumaş yapımında kullanmışlardır. Dokunan bu kumaşlar 1-20 nm boyutlarındaki nano gözenek ağlarına sahiptir ve böylelikle teri daha iyi emmekte ve çabuk kurumaktadır. Eski çağlara uzanan ekmek, şarap, peynir gibi gıdaların üremi nano seviyede fermentasyon işlemiyle gerçekleştiği bilinmektedir. Nanoteknoloji uygulamaları eski çağlardan beri devam etmesine karşın “nano” ve “nano üretim” kavramı son bir asırdır insanlığın gündemindedir. Bazı maddelerin parçacık boyutlarının küçülmesiyle farklı özellikler kazandığı gözlenirse de bu durumun temel mekanizması yıllarca anlaşılamamıştır. Sonuç olarak, nano üretim uygulamaları bilinçli şekilde gerçekleştirilmese de binlerce yıl nesilden nesile aktarılarak günümüze kadar ulaşmıştır (Tolochko, 2009; Akçay, 2017).

Nanometre kavramı ilk kez 1925'te, kimya dalında Nobel Ödülü sahibi Richard Zsigmondy tarafından ortaya atılmıştır. Zsigmondy, "nanometre" terimini parçacıkların boyutunu ifade etmek için kullanan ilk kişidir (Hulla ve ark., 2015). Günümüzde kullanılan modern nanoteknoloji ise fizik dalında Nobel Ödülü sahibi Richard Feynman sayesinde olmuştur. Feynman 1959 yılında Amerikan Fizik Derneğinde yaptığı konuşmasında, nanoboyutta ürünlerin atomlardan tasarlanabileceği ve maddelerin atomik seviyede işlenip düzenlenebileceği fikrini ortaya atmıştır. Feynman, klasik düşünce tarzının ötesinde doğruluğu ispatlanan görüşleri sebebiyle modern nanoteknolojinin babası olarak görülmektedir. Ardından 1974'te, Japon bilim insanı Norio Taniguchi, "nanoteknoloji" terimini ilk kez bilim camiasına sunmuştur. Maddelerin nanometre hassasiyetinde işlenmesi ve nanoboyutta mekanizmaların oluşturulmasını nanoteknoloji olarak tanımlamıştır (Tolochko, 2009; Hulla ve ark., 2015).

Nanoteknolojinin altın çağı 1980'lerde başlamıştır. IBM Zurich Araştırma Laboratuarı'nda çalışan Gred Binnig ve Heinrich Rohrer, 1981'de taramalı tünel mikroskopunu keşfederek atomlar ve bağların daha önce görülmemiş şekilde görüntülenebilmesine olanak sağlamıştır. Böylelikle bu çalışma Gred Binnig ve Heinrich Rohrer'e fizik dalında Nobel Ödülünü kazandırmıştır (Sekhsaria, 2013). 1991 yılındaki karbon nanotüplerin keşfinden günümüze nanoteknoloji alanında yapılan araştırmalar hızlanarak devam etmiştir. Nanoteknoloji alanındaki yayın sayısı ve projelere ayrılan bütçe önemli ölçüde artış göstermiş ve günlük hayatta nanoteknolojik uygulamalar daha sık yer almıştır (Tolochko, 2009).

2.1.2. Nanoteknolojinin kullanım alanları

Nanoteknoloji uygulamaları, NP'lerin sahip oldukları üstün özellikleri sayesinde tıp, biyoteknoloji, kimya, gıda, tekstil, farmakoloji, elektrik-elektronik, bilişim ve otomotiv sanayi gibi birçok farklı alanda zamanla daha fazla yer almaktadır (Özdoğan ve ark., 2006). Kimya endüstrisinde kir tutmaz boya ve kaplama malzemesi üretimi; dental uygulamalarda çürümeyi önleyici dental kompozitlerin; tekstil endüstrisinde buruşmaz ve

kir tutmaz kumaş üretimi; kozmetik endüstrisinde güneş kremlerinin üretimi gibi birçok farklı alanlarda nanoteknolojik uygulamalarından örnekler verilebilir (Özdoğan ve ark., 2006; Oyar, 2014). Nanopartiküllerin sahip oldukları üstün antimikrobiyal özellikleri medikal uygulamalarında umut vaat etmektedir. İlaç ve gen taşınımı, doku mühendisliği, patojen biyotespiti, floresan etiket üretimi, tümörlerin iyileştirilmesi ve biyolojik molekül ve hücrelerin ayrımı ve saflaştırılması gibi medikal uygulamalarında nanoteknolojinin yer aldığı görülmektedir (Salata, 2004).

2.1.2.1. Nanoteknolojinin gıda endüstrisinde kullanımı

Nanopartiküllerin küçük boyutları ve boyutlarına bağlı olarak değişen özellikleri gıda endüstrisinde gelişmiş özelliklere sahip malzeme ve ürünlerin üretilmesine, gıdaları işleme, muhafaza etme ve paketlenme tekniklerinin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Örneğin, akıllı ambalajların depolama ve taşıma sürecinde takip edilebilme olanağı; son kullanma tarihi geçmiş veya kontamine olmuş gıdalarda bakteriler tarafından üretilen gazlar nedeniyle renk değiştiren sensörlere sahip ambalajlarda nanoteknolojik uygulamalardan yararlanılmaktadır (Akçay, 2017).

Ayrıca, aktif ambalajlama sisteminde ambalaj malzemelerin gümüş, titanyum dioksit gibi nano katkılar ile modifiye edilen ambalaj materyalinin gıda ile temas eden yüzeyinin oksijeni absorbe edecek şekilde modifiye edilmesi ile anaerobik ortam oluşturulmaktadır. Böylece ortamın antibakteriyel ve antifungal özellik kazanarak bozunma reaksiyonlarının azalması sonucu gıdanın raf ömrü uzamaktadır. Nem tutucu, etilen tutucu, tat-koku tutucu özelliklerdeki aktif ambalajlar, nano yapıli malzemelerle modifiye edilerek pek çok meyve ve sebzede, et ve süt ürünlerinde, unlu mamullerin paketlenmesinde kullanılmaktadır (Sürengil ve Kılınç, 2011).

Bariyer teknolojisi kullanılan içecek sektöründe nanokompozitlerden yararlanılmaktadır. Örneğin, plastik malzemenin kil NP'leri ile doldurulmasıyla elde edilen cam kadar sert fakat camdan çok daha sağlam olan bira şişeleri üretilmektedir. Nanopartiküllerin

sağladığı dayanıklılığın yanında şişeye gaz giriş-çıkışını (karbon dioksit çıkışı ve oksijen girişi) engelleyecek şekilde tasarlanmış olması biranın tazeliğini ve raf ömrünü arttırmaktadır (Hays ve ark., 2013). Yapılan bir çalışmada koloit gümüş NP'lerin üzerine kaplandığı kâğıt malzemenin *Escherichia coli* (*E. coli*) ve *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) gibi patojen bakteriler üzerinde antibakteriyal etkisinden dolayı gıda ürünlerinin ambalajlanmasında ve gıdanın raf ömrünün uzatılmasında kullanılabileceği belirtilmektedir (Gottesman ve ark., 2011; Akçay, 2017).

Biyoaktif bileşikler çevresel etkilere korumak ve hedef bölgelerde kontrollü salınımını sağlamak amacıyla gıda bileşenlerine uygulanan nanoenkapsülasyon tekniği gıda endüstrisinde uygulamalara sahiptir (Ezhilarasi ve ark., 2013). Fonksiyonel gıdalara istenilen tat-aroma ve antioksidan özelliklerin kazandırılmasında nanoenkapsülasyon tekniği kullanılırken nanokompozitlerden yararlanılmaktadır (Var ve Sağlam, 2015).

Gıda ürünlerindeki renk maddelerinin indirgenerek giderilmesinde ve gıdaların konsantre edilmesi ve peynir altı suyunun tuz gideriminde nanofiltrasyon teknikleri başarıyla uygulanmaktadır. Sonuç olarak, hedefe yönelik tasarlanabilen nanoteknoloji gıda endüstrisinde başarıyla uygulanmaktadır (Süfer ve Karakaya, 2011).

2.1.3. Nanopartiküller ve üretim yöntemleri

Nanopartiküller organik ve inorganik olarak iki grupta sınıflandırılmaktadır. Organik NP'leri karbondan oluşurken; inorganik NP'ler altın ve gümüş gibi soy metal veya titanyum oksit ve çinko oksit gibi yarı iletken elementlerden oluşmaktadır (Moghaddam ve ark., 2015).

Nanopartiküller şekil ve yapılarına göre nanoçubuk, nanokristal, nanofilm, nanotüp, boşluklu ve çok yüzlü gibi farklı morfolojilerde bulunabilmektedir. Maddeyi oluşturan partiküller kendinden çok daha küçük nano ölçekli forma geçtiğinde maddenin önceki sahip olduğu bazı özelliklerin değiştiği ve geliştiği gözlenmiştir (Gürmen ve Ebin, 2008).

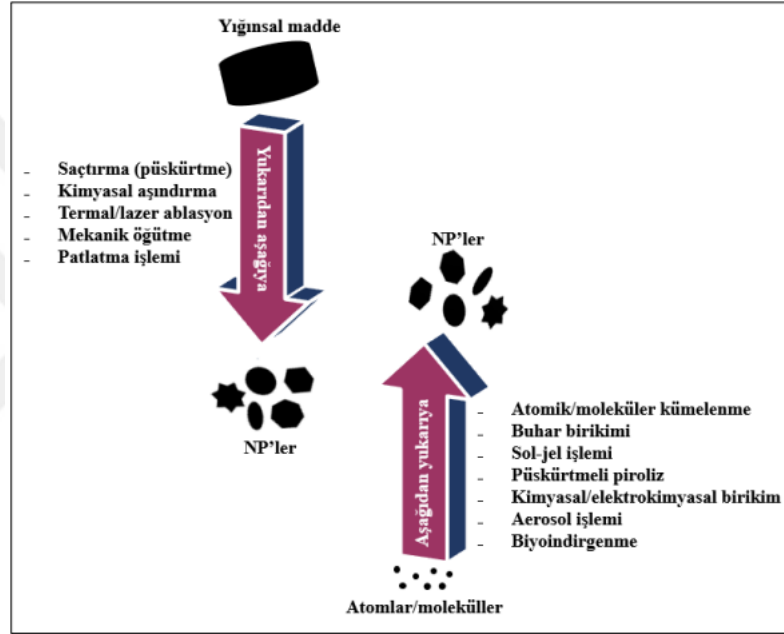
Partiküller nanoboyuttaki yapılarıyla kendilerine özgü fiziksel, kimyasal, mekanik, elektronik, biyolojik, manyetik, dielektrik, optik ve termal özellikler kazanmaktadır. Bu benzersiz özellikler partiküllerin kuantum boyut etkisi, boyuta bağlı elektronik enerji seviyesinin ayarlanabilmesi ve yüzey/kütle oranının artmasına bağlı olarak partiküllerin yüzeyindeki atomların içindeki atomlara göre baskınlık elde etmesiyle meydana gelmektedir (Gericke ve Pinches, 2006; Gürmen ve Ebin, 2008).

Nanopartiküllerin kendine özgü fizikokimyasal özellikleri 100 nm'den küçük boyutlarına, yüzey yapısına, yüzeye bağlı olan gruplara ve kaplamasına, kimyasal kompozisyonun saflığına ve kristallik seviyesine bağlıdır. Elektronik özellikleri ise yüzey morfolojisine, çözünabilirliğine, absorbe ettiği kimyasalların üzerindeki etkisine, şekline ve agregasyona bağlıdır (Hulkoti ve Taranath, 2014).

Nanopartiküllerin üretimindeki başlangıç materyalin türü ve uygulanan yöntemle ilgili olarak partiküllerin şekil, boyut ve kristalite oranları değişkenlik göstermektedir. Yukarıdan aşağıya (top down) ve aşağıdan yukarıya (bottom up) olmak üzere NP'lerin oluşum mekanizmaları iki şekildedir. Yukarıdan aşağıya yaklaşımında maddeler zamana bağlı olarak nanoboyuta indirgenirken, aşağıdan yukarıya yaklaşımda atomlar veya moleküller nanoyapıdaki molekülleri oluşturacak şekilde birleşmektedir (Şekil 2.1.). Nanopartiküllerin kimyasal ve biyolojik sentezinde genellikle aşağıdan yukarıya olan yaklaşım görülmektedir (Narayanan ve Sakthivel, 2010).

Nanopartiküllerin aşağıdan yukarıya ve yukarıdan aşağıya yaklaşımlarıyla oluşumunda çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler uygulanmaktadır (Ovais ve ark., 2017). Kimyasal buhar yoğunlaştırma yöntemi, hidrojen redüksiyonu yöntemi, asal gaz yoğunlaştırma yöntemi, mekanik aşındırma yöntemi uygulanan fiziksel ve kimyasal yöntemlerden bazılarıdır (Gürmen ve Ebin, 2008). Kimyasal yöntemler, NP sentezinde yüksek toksisitedeki kimyasalların kullanımını ve tehlikeli yan ürünlerin oluşumu nedeniyle çok avantajlı yöntemlerden değildir. Fiziksel yöntemler ile NP sentezinde ise yüksek enerji gerektiren pahalı yöntemlerin kullanılması avantajlı görülmemektedir. Tüm

bunlara kıyasla bakteri, bitki, fungus ve alg gibi biyolojik kaynakların kullanımı ile gerçekleşen yeşil teknoloji olarak da adlandırılan biyolojik yöntemler, kimyasal ve fiziksel yöntem ile NP üretimine iyi bir alternatif durumundadır. Biyolojik yöntemler çevre dostu, güvenli, basit, düşük enerji-yüksek verim ve tek adımda üretim ilkesiyle çalışan biyoyumlu yöntemlerdir (Ovais ve ark., 2017).



Şekil 2.1. Nanopartiküllerin oluşum mekanizması (Ovais ve ark., 2017)

Kimyasal sentezde kullanılan toksik maddeler az da olsa NP yüzeylerinde adsorbe edilmekte ve bu da klinik alanlarda kullanımını sınırlamaktadır (Ghiuta ve ark, 2017). Ayrıca, kimyasal yollarla NP üretiminde oluşan NP'lerin stabilizasyonu sağlamak için çeşitli kaplama materyallerinin kullanılması gerekmektedir. Biyolojik yollarla elde edilen NP'lerde ortamdaki enzim, vitaminler ve polisakkaritler gibi biyolojik materyallerin NP'ler için indirgeme yanında kaplama ajanı olarak görev yaptığı belirtilmiştir (Collera ve ark, 2005). Bu da mikrobiyal sentezde, kimyasal yöntemin aksine, kaplama ajanı kullanımını gerektirmemektedir. Tüm bu nedenlerle, biyolojik yöntemlerle NP'lerin üretimi yeşil teknolojik, çevre dostu ve sürdürülebilir bir yaklaşım olarak

değerlendirilmektedir. Dolayısıyla, biyolojik yöntemlerle olan üretime de ilgi son yıllarda oldukça artmıştır (Nayak ve ark., 2016).

2.1.4. Nanopartiküllerin mikrobiyal sentezi

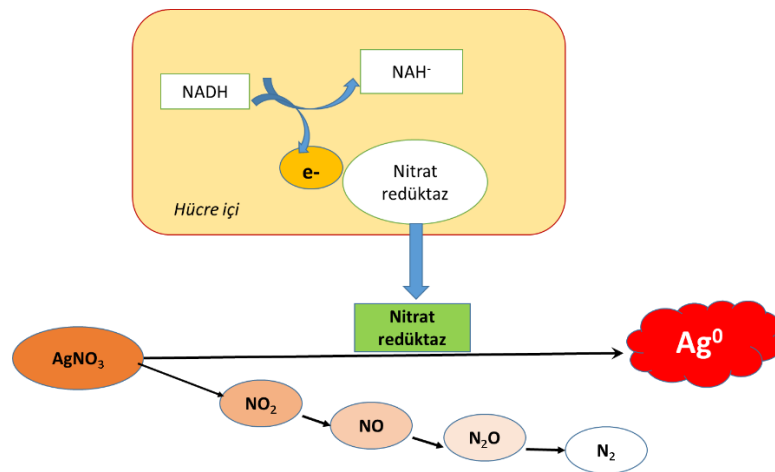
Nanoteknoloji ve mikrobiyal biyoteknolojiyi birbirine bağlayan NP'lerin mikrobiyal yollarla üretimi yeşil teknoloji yaklaşımının bir örneğidir. Farklı boyut ve şekillerdeki monodispers NP'lerin üretimi nanoteknoloji uygulamaları için oldukça önem arz etmektedir (Narayanan ve Sakthivel, 2010).

Güvenli, ekonomik, sürdürülebilir ve çevre dostu olan biyolojik yöntemlerin mikroorganizmaların kültür ortamında gelişmesinde zamana ihtiyaç duyulması ve biyosentezi gerçekleştirmiş NP'lerin boyut, şekil ve kristal yapıları üzerinde tam kontrol sağlanamaması olumsuz yönlerindendir. Buna ek olarak monodispers üretim gerçekleştirmek zordur ve NP'lerin üretim oranı düşüktür. Fakat biyolojik yöntemlerin üretim parametrelerinin; mikroorganizma türünün seçimi, pH, inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon süresi, metal iyonunun konsantrasyonu ve biyolojik materyalin miktarı optimize edilmesi ile ticari olarak geniş alanlarda yer bulabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, üretilecek partiküllerin şekil ve boyutlarında kontrolün sağlanabilmesini kolaylaştırmak için mikroorganizmaların genetik yapısı bazı spesifik indirgeyici maddeleri salgılayacak şekilde değiştirilebilmektedir (Narayanan ve Sakthivel, 2010). Nanopartiküllerin şekil ve boyutunu kontrol altında tutarak, kimyasal yöntemlerle üretilen NP'lerle benzer nanoyapıda sentez yapabilen mikroorganizmalar vardır (Gericke ve Pinches, 2006). Mikroorganizmalar, detoksifikasyon ile toksik ortamda hayatta kalabilmek, kemolitotrofi ile kimyasal enerji elde etmek için NP sentezleme eğilimindedir (Krumov ve ark., 2009; Akçay, 2017).

Nanobiyoteknolojik bir yaklaşım olarak ifade edilen metal NP'lerinin mikrobiyal sentezi bakteri, maya ve küflerlerle gerçekleştirilebilmektedir (Tiwari ve ark., 2016). Bu mikroorganizmalar arasında bakterilerle üretim daha kolay olmakta ve izolasyonlarının da

kolay olması sebebiyle NP üretimi için avantajlıdır (Akçay ve Avcı, 2018). *Bacillus*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Klebsiella*, *Thermoanaerobacter*, *Clostridium*, *Pseudomonas* cinslerine ait bakterilerle altın, gümüş, selenyum, platin, demir, kobalt, kadmiyum gibi pek çok metal NP'lerinin biyosentezi yapılmıştır (Narayanan ve Sakthival, 2010).

Bakterilerle NP sentezi, indirgen özellikteki hücre komponentlerinin hücredeki yerleşime bağlı olarak içi ve hücre dışı olmak üzere iki farklı yolla gerçekleşebilmektedir. Hücre içi sentez sitoplazmada gerçekleşirken, hücre dışı sentezde hücre duvarında lokalize olan indirgen enzimler veya hücre dışına salgılanan çözünür enzimler rol almaktadır (Ghiuta ve ark. 2017). Hücre dışı sentez hücre içi senteze göre daha ekonomik ve basit üretim aşamalarından dolayı daha çok tercih edilmektedir. (Deljou ve Goudarzi, 2016). Nanopartikül sentez mekanizması henüz bilinmemekte birlikte bakterinin salgıladığı nitrat redüktaz gibi enzimlerin bu sentezde rol oynadığı düşünülmektedir (Das ve ark., 2014). Şekil 2.1.'de AgNP sentezi için önerilen mekanizma verilmiştir. Oldukça yüksek bir redoks potansiyeline sahip olan nitrat redüktaz NADH bağımlı bir enzim olup azot çevriminde yer almakta ve nitratı nitrite indirgemektedir. Metal nanopatiküllerinin sentezinde de hücre içinde veya hücre dışına salgılanarak gümüş iyonlarını elementel gümüşe indirgemektedir (Duran ve ark., 2005; Prakash ve ark., 2011; Golinska ve ark., 2014).



Şekil 2.1. Gümüş nanopatiküllerinin biyosentezi için önerilen mekanizma (Golinska ve ark., 2014'ten derlenmiştir).

Bacillus'lar pek çok mikrobiyal ürün üretebilme yeteneğinde mikroorganizmalar olup mezofilik aerobik koşullarda kolay gelişebilmektedirler. Bu nedenle endüstride en çok tercih edilen mikroorganizmalardır. Ayrıca, *Bacillus*'ların ağır metallere adaptasyonu kolay ve farklı özelliklerde metal ve inorganik NP'leri hem hücre içi hem de hücre dışı üretebilme yeteneğindedirler (Dhandapani ve ark., 2012). Nanopartikül üretiminde çeşitli proteinlerin de bulunduğu besiyeri ortamı kullanıldığından bu proteinlerin NP yüzeyinde kaplama ajanı görevi gördüğü böylece uzun süre stabilitelerini koruyabildikleri bildirilmiştir (Duran ve ark., 2011).

2.1.5. Gümüş Nanopartikülleri

Gümüş tuzları ve kolloidal gümüş çözeltileri, antimikrobiyal özellikleri nedeniyle eski çağlardan beri ülser, yaraların tedavisi ve çeşitli enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. 20. Yüzyılda etkili antibiyotiklerin bulunması ve gümüş tuzlarının olumsuz etkileri nedeniyle kullanımı durmuştur. Son yıllarda nanogümüşün keşfi ile gümüşün tıpta kullanımı yeniden önem kazanmıştır (Singh ve ark., 2015). Günümüzde nanogümüş, iletkenlik, kimyasal stabilite, katalitik, antioksidan ve antimikrobiyal etkileri gibi üstün özellikleri nedeniyle en çok kullanılan NP'lerden biri haline gelmiştir. AgNP'leri antibakteriyal olarak sağlıkta (ameliyat maskelerinde, bandajlarda, dezenfektanlarda), gıda depolamada, tekstil kaplamada, çevre ve tıpta antikanser ajanı üretimi gibi pek çok alanda kullanılmaktadır (Niraimathi ve ark., 2013; Gurunathan ve ark., 2015). Gümüş nanopartiküllerini kan pıhtılaşmasını önleyici etkisinin olduğunu anti-pıhtılaşma formülasyonlarında kullanılabileceğini bildirilmiştir (Lateef ve ark., 2016). Bunların dışında *Bacillus*'lar ile üretilen AgNP'lerinin enzim immobilizasyonunda (Sinha ve ark., 2015), ilaç taşınımında (Dey ve ark., 2016) ve antikanser ajanı (Gurunathan ve ark., 2015; Rajeshkumar ve ark., 2016) olarak da kullanımına ilişkin çalışmalar literatürde yer almaktadır.

Geleneksel yöntemler kullanılarak AgNP sentezi, çözeltide kimyasal indirgeme, sonokimyasal yöntem, mikroemülsiyon yöntemi veya mikrodalga destekli yöntemi içerir.

Bu yöntemlerle hazırlanan AgNP'ler, su gibi polar ortamlarda süspansiyon halinde Ag(I) iyonlarına hızlı çözünme için çok kararsızdır ve NP'ler TiO_2 , bakteriyal ekzopolisakkaritler (EPS), biyolojik parçalar/ biyomoleküller vb. kaplama molekülleri, çözünme hızını yavaşlatarak parçacığın daha uzun bir yarı ömrüne neden olur. Bu nedenle, yeşil sentez yöntemleri kullanılarak AgNP üretimi, bu sorunlardan kaçınmak için çeşitli araştırma gruplarının dikkatini çekmiştir. NP'lerin yeşil sentezi için kullanılan biyolojik varlıkların, metal iyonlarını element metal kristallerine indirgeyen ve sırasıyla nano boyutlarda indirgenmiş metal kristallerinin boyutunu kontrol eden enzimler ve proteinler olduğu bildirilmektedir. Nanoparçacıkta bulunan proteinler, Ag(I) iyonlarının AgNP'lere biyo-indirgenmesinde ve bunların dağılımlarında önemli bir rol oynamaktadır (Nayak ve ark., 2016).

Ek olarak, bakteri üreme hızı ve düşük bakım koşulları, çeşitli biyolojik uygulamalar için bakterileri kullanan metalik NP'lerin üretimine dikkat çekmiştir. Ağır metal açısından zengin ortamlarda büyüyen bakterilerin, ağır metal iyonlarını azaltma konusunda dikkate değer bir yeteneğe sahip oldukları da gösterilmiştir; bu, onların NP sentezi ve toksik metal iyonlarının biyolojik olarak iyileştirilmesi için kullanımlarına katkıda bulunan bir özelliktir (Nayak ve ark., 2016).

2.4. Yapılan Çalışmalar

Son zamanlarda AgNP'lerinin biyosentezi ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça yaygınlaşmıştır. Farklı çalışmalarda kullanılan mikroorganizma türleri, AgNO_3 konsantrasyonu, ortam sıcaklığı ve elde edilen AgNP'ler ile yapılan antimikrobiyal ve antioksidan analizler özetlenmiştir.

Deljou ve Goudarzi (2016) tarafından yapılan çalışmada; kültür ortamında üretilen AgNP'lerinin, patojen bir bakteri üzerine minimum inhibitör konsantrasyonu belirlenmiştir. NP'lerin üretimi, UV-VIS absorbans spektrumları, Fourier dönüşümü kızılötesi spektrumları, zeta analizi ve alan emisyon tarama elektronu mikroskobu

kullanılarak doğrulanmıştır. IR ile NP'lerin yüzeyinde protein kalıntıları olduğu saptanmıştır. AgNP'lerin patojen *Escherichia coli*'ye ticari olarak temin edilebilen AgNP'lerden daha güçlü bir antibakteriyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Endüstriyel ve biyolojik uygulamalar için mikroorganizmaların metal iyonlarına karşı direnci sürekli metal NP üretiminde kullanılabileceği bildirilmiştir. Termofilik *Bacillus* sp. AZ1 16S rRNA dizi analizi sonucu *B. licheniformis* ile arasında %99'luk benzerlik elde edilmiştir. Hücre dışı biyosentez sonucu elde edilen AgNP TEM analizinde 7-31 nm boyutunda küresel şekilde olduğu belirtilmiştir. 1 mM konsantrasyonda, 37°C inkübasyon sıcaklığı sonucu 24 saatte gözlenen renk değişimi ile 425 nm'de UV-VIS spektrofotometrede AgNP'lerin formasyonunu gösteren güçlü bir yüzey plazmon rezonans ölçülmüştür. Antimikrobiyal analiz *E. coli*, *S. typhi*, *S. aureus* ve *S. epidermis* patojenleri üzerinde yapılmıştır. 10 µg/ml konsantrasyonda en yüksek inhibisyon etki patojen *E. coli* ve *S. typhi*'de gözlenmiş ve inhibisyon çapları sırasıyla 22 ve 19 mm olarak ölçülmüş (Deljou ve Goudarzi, 2016).

Nayak ve arkadaşları (2016) bakterilerin gelişmesi sırasında NP'leri sentezleme yani sürekli NP üretimi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Ag(I) iyonunun çok düşük konsantrasyonlarda bile canlı bakterilerde toksik eğiliminde olmasından dolayı bakterileri öldürüp sürekli NP üretimi zorlaştırabilmektedir. Bu nedenle, ağır metal iyonlarına dirençli veya özellikle Ag(I) iyonu açısından zengin bir alanda gelişebilen bakterilerin bu amaç için kullanılabilme potansiyeli araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Bu amaçla, *B. thuringiensis* bakterisi ile saf ve sürekli AgNP üretimi 37°C'de 0,15 mM gibi düşük konsantrasyonda 24 saat inkübasyon ile gerçekleşmiştir ve maksimum absorbanans değeri 414 nm de ölçülmüştür. FESEM ile elde edilen küresel şekilli 10-30 nm boyutlarda AgNP elde edilmesi TEM analizleriyle de doğrulanmıştır. Patojen *E. coli* ile yapılan antibakteriyal çalışmada 9,2 µg/ml konsantrasyonda %45'lik inhibisyon sağlandığı bildirilmiştir. Ticari AgNP'den nispeten daha iyi antibakteriyal aktivite gösterdiği vurgulanmıştır. Bu çalışmada 500 ml bakteri kültüründen saf şekilde 98,75 mg AgNP elde edilmiştir (Nayak ve ark., 2016).

Lateef ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, *Bacillus safensis* LAU 13 suşunun hücresiz özütünün, daha düşük maliyetli, güvenilir, güvenli ve çevre dostu olan AgNP'lerin yeşil sentezlenme potansiyeli incelenmiştir. Maksimum absorbans değeri 419 nm'de ölçülmüştür. AgNP boyutlarının TEM ölçümlerine göre 5-95 nm aralığında küresel şekilli olduğu görülmüştür. Biyolojik olarak sentezlenen AgNP'lerinin, *S. aureus*, *Klebsiella granulomatis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* gibi patojenik bakteri suşları ile *A. flavus* ve *A. fumigatus* gibi mantar suşlarına karşı mükemmel antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir. 10-100 µg/ml konsantrasyonda 11-19 mm aralığında inhibisyon çapı ölçülmüştür. En iyi antimikrobiyal etki 60, 80 ve 100 µg/ml'de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *K. granulomatis* suşlarında kaydedilmiştir. Bu nedenle AgNP'lerinin bu patojen organizmaların kontrolünde kullanımı kullanışlı bulunmuştur. Bu nedenle sentezlenen AgNP'lerin antibiyotiklerle birlikte kullanımı, çoklu ilaca dirençli bakterilere karşı antibiyotiklerin antimikrobiyal aktivitelerini güçlendirdiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca, DPPH-radikal süpürücü etki, ferrik iyon azaltıcı etki ve larvisidal aktivite göstermiştir. 20-100 µg/ml konsantrasyonlarında %40,56-89,40'lık yüksek DPPH radikal indirgeme aktivitesi sergilemiştir.

Du ve Yi (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, *Variovorax guangxiensis* THG-SQL3 suşundan biyosentez yoluyla elde edilen AgNP'lerin antimikrobiyal potansiyelleri incelenmiştir. Yüzey plazma rezonansının (YPR) sonucu olarak 24 saatlik hücre dışı sentez sonucunda görünür şekilde renk değişimi gözlenmiştir ve maksimum absorbans değeri 418 nm'de ölçülmüştür. AgNP boyutu FE-TEM ölçümlerine göre 10-40 nm aralığında düzensiz küresel şekilli olduğu görülmüştür. Gümüş iyonlarının varlığı yaklaşık olarak 3 keV'dedir ve bu çalışmada varlığı gözlenmiştir. Sentezlenen AgNP'lerin, *S. aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. subtilis* ve *B. cereus* gibi patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite sergilediği bildirilmiştir. Ek olarak, AgNP'ler, *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *E. coli* ve *Vibrio parahaemolyticus* gibi mikroorganizmalara karşı geliştirilmiş ticari antibiyotiklerle kombine olarak antimikrobiyal aktivite gösterdikleri de bildirilmiştir. *V. guangxiensis* THG-SQL3 suşundan sentezlenen AgNP'lerin, nispeten

basit, yeşil, uygun maliyetli olduğu ve potansiyel antimikrobiyal ajan olarak hizmet verebileceği görülmüştür.

Rajeshkumar ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, biyosentez yoluyla elde edilen AgNP'lerin antikanser özelliği ve klinik patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite özellikleri araştırılmıştır. AgNP'leri 24 saatlik taze hazırlanmış *Enterococcus* sp. kültür süpernatantının 100 ml'sine 1 mM gümüş nitrat eklenerek hazırlanmıştır. Bu çalışmada AgNP'lerin *Enterococcus* sp. kullanılarak hücre dışı sentezlendiği belirlenmiş ve 400 nm'de SPR bandı gösteren UV-VIS spektroskopi tarafından karakterize edilmiştir. Kristal yapısı XRD ve SAED desenleri ile karakterize edilmiştir, TEM görselleri NP'lerin 10-80 nm boyutlarındaki küresel şeklini göstermiştir. AgNP'lerin antikanser özelliği üzerine yapılan in vitro deneylerde hücre yaşam gücünü inhibe etmede büyük potansiyele sahip olduğu görülmüştür. *Enterococcus* sp. proteinlerinin amid bağlantıları ve karboksilat grupları gümüş iyonlara bağlanıp NP'lere dönüştürebildiği ve stabilizasyon ajanı gibi davrandığı belirtilmiştir. Böylece istikrarlı AgNP'ler karaciğer kanser hücre dizilerinin (HepG2) ve akciğer kanser hücre dizilerinin (A549) yaşam gücünü inhibe ettiği tespit edilmiştir. Hücre inhibisyonu farklı konsantrasyonlardaki AgNP'ler analiz edilerek belirlenmiştir. Bu nedenle, sentezlenen AgNP'ler kanser hücre dizilerine karşı antimikrobiyal aktivite ve antikanser aktivite geliştirme potansiyeli göstermiştir ve kanser ve hastalıkların tedavisinde kullanılabilir sonucuna ulaşılmıştır. Bununla birlikte ticari antibiyotiklerin aktivitesinin, AgNP kaplaması tarafından artırıldığı bildirilmiştir.

Shanthi ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, probiyotik *Bacillus licheniformis* hücresiz ekstraktı ile (BLCFE) AgNP'leri sentezlenmiş (BLCFE-AgNP) ve karakterize edilmiştir. Bu NP'lerin antibiyofilm aktivitesi ve *Ceriodaphnia cornuta* üzerindeki toksik etkileri araştırılmıştır. BLCFE-AgNP'ler UV-VIS spektrofotometre, XRD, EDX, FTIR, TEM ve AFM tarafından karakterize edilmiştir. 422 nm'de UV-VIS spectrumda AgNP'lerin formasyonunu gösteren güçlü bir yüzey plazmon rezonans oluşmuştur. AgNP'ler 2θ değerinde gümüş nanokristale eşdeğer XRD spektrumu gözlenmiştir. TEM ve AFM AgNP'lerin küresel şekilde olduğunu ve 18,69-63,42 nm

aralığında olduğunu göstermiştir ve EDX analizi gümüş varlığını doğrulamıştır. Işık ve Eş Odaklı Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM) görüntüsünde kontrol ile kıyaslandığında BLCFE-AgNP'ler ile işlem görmüş *Vibrio parahaemolyticus* Dav1 parçalanmış biyofilm formasyonu gözlemlenmiştir (100 mg/ml). Bu sonuç AgNP'lerin antibiyofilm aktivitesini ortaya koymaktadır. BLCFE-AgNP'ler, biyomedikal alanda biyofilm oluşturan bakteriyal popülasyonun kontrolünde kullanılabileceği bildirilmiştir. Ek olarak, akut toksisite sonuçlarına göre, AgNO₃ (22 mg/ml) ile karşılaştırıldığında tatlı su kabuklusu *Ceriodaphnia cornuta* (580 mg/ml) için BLCFE-AgNP'ler daha az toksik bulunmuştur.

El-Dein ve arkadaşları (2021) yaptıkları çalışmada *Escherichia coli* D8 suşu aracılığıyla hücre dışı şekilde üretilen ve maksimum absorbans değeri 429 nm'de ölçülen AgNP'lerinin pH'ını 7,0, sıcaklığını 35°C ve optimum konsantrasyonunu 1,5 mM olarak belirlemişlerdir. 72 saat inkübasyonun ardından yapılan analizlerde partiküllerin küresel şekilde ve 6-17 nm boyutlarda olduğu bildirilmiştir. NP'lerin agregasyonu, biyolojik potansiyellerini azaltan yaygın bir sorun olarak kabul edilmiş ve dış kaplama ajanları, agregasyonlarını önleyerek NP'lerin boyutunu ve morfolojisini belirlediği düşünülmektedir. *E. coli* D8'in tarafından biyosentezlenen AgNP'ler, tüm patojenik suşlara karşı güçlü inhibitör aktiviteler sergilemiştir. AgNP'lerin en yüksek antibakteriyal aktivitesi sırasıyla *S. aureus*, *E. coli*, çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ve *B. cereus* üzerinde olmuştur. Ayrıca, AgNP'ler, *C. albicans* 'a karşı önemli bir antifungal aktivite göstermiştir. AgNP'ler, *A. niger*'e karşı güçlü bir toksik etki göstermiş ve bunu *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. alternata* ve *F. oxysporum* izlemiştir. AgNP'lerinin Fluconazole'ün antifungal aktivitesini de artırdığı belirlenmiştir. Bu sinerjik etki özellikle *A. niger*, *A. flavus* ve *F. oxysporum* üzerinde etkili olmuştur. Antimikrobiyal potansiyel doza bağlı olarak konsantrasyon (50, 100 ve 150 µg/ml) arttıkça artmıştır. *S. aureus* ve *C. albicans* için MİK değerleri sırasıyla 6.25 µg/ml ve 50 µg/ml olarak ölçülmüştür.

Yurtluk ve arkadaşları (2018) *Bacillus* sp. SBT8 ile AgNP biyosentezi üzerine çalışmıştır. Gümüş nanopartikülleri üzerine AgNO₃ konsantrasyonunun (1-10 mM), pH (5-10) ve

sıcaklığın (30-40°C) etkisi araştırılmıştır. Gümüş nanopartikülün varlığını gösteren YPR ile oluşan pik sadece 4 ve 6 mM konsantrasyonda gözlenmiştir. Optimum konsantrasyon 6 mM'dır ve en yüksek verim pH 10'da elde edilmiştir. Biyosentez için optimum sıcaklıklar 33 ve 37°C'dir. 416 nm'de absorbans piki ölçülmüştür. Elde edilen AgNP'leri, Gram pozitif ve Gram negatif patojenlere karşı antibakteriyal özellik göstermiştir.



BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan mikroorganizmalar

Bu çalışmada kullanılan 28 izolat Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Bu izolatların bazıları tanımlı *Bacillus* suşlarıdır ve farklı kaynaklardan izole edilmişlerdir. İzolatlar Tablo 3.1.'de listelenmiştir.

Tablo 3.1. Çalışma da kullanılan farklı kaynaklardan elde edilmiş izolatlar.

Mikroorganizma	İzole edildiği kaynak
HTA1, 2	Tarhana, Düzce
BAST2	Turşu, Sakarya
BAT3	Toprak, Akyazı/Sakarya
SBT1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12	Toprak, Sakarya
EBTA1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	Tarhana, İstanbul
BMZE4	Zeytin, Sakarya
GİT2	Toprak, İstanbul
ZBP4, 10	Toprak, Geyve/Sakarya
ZGT5, 9	Toprak, Geyve/Sakarya

Antimikrobiyal testler için Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonunda bulunan 9 farklı patojen mikroorganizma kullanılmıştır.

Antimikrobiyal testler de kullanılan patojen mikroorganizmalar;

Listeria monocytogenes ATCC 7644
Staphylococcus aureus ATCC 25923
Escherichia coli Tip-1
Salmonella Typhimurium
Salmonella enteritidis ATCC 13076

Bacillus cereus
Escherichia coli O157:H7 NCTC 12900
Pseudomonas aeruginosa
Candida albicans

3.1.2. Kullanılan araç ve gereçler

Yapılan çalışmada kullanılan araç-gereçler ve markaları Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan araç-gereçler ve markaları

ARAÇ- GEREÇLER	MARKA
Hassas terazi	Radwag AS 220.R2
Su banyosu	WiseBath WSB- 30
pH metre	Mettler- Toledo Seven Compact S210
Etüv	Microtest min
Çalkalamalı inkübatör	Benchmark Incu- Shaker Mini
UV-VIS spektrofotometre	Shimadzu UV mini-1240
Vorteks	VELP Scientifica ZX3
Masaüstü santrifüj	Hettich Universal 320 R
Otomatik pipet	Hamilton
Otoklav	WiseClave WAC-80
Isıtıcı manyetik karıştırıcı	IKA C-MAG HS 7
Damıtık su cihazı	Nüve ND8
-65°C dondurucu	NUVE DF 590

3.1.3. Kullanılan besiyerler

Nutrient Agar (NA): İzolatların petride geliştirmesinde ve aktifleştirilmesi aşamasında kullanılmıştır. 1 litre saf su için 8 g Nutrient Broth (Merck, Darmstadt, Almanya) besiyeri ve 12 g Agar-Agar (Merck, Darmstadt, Almanya) karışımı ısıtmalı manyetik karıştırıcıda

sıcaklık yardımı ile çözündürülmüştür, sonrasında 121°C’ de 15 dakika sterile edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra su banyosuna alınarak 50°C’lere kadar soğutulup ve ardından petri kaplarına 15-20 ml hacminde olacak dökülmüştür.

Nutrient Broth (NB): İzolatların gelişimi ve AgNP biyosentezinde kullanılmıştır. 1 litre saf su için 8 g NB (Merck, Darmstadt, Almanya) besiyeri manyetik karıştırıcıda çözündürülmüştür. 121°C’ de 15 dak steril edilmiştir.

Tryptic Soy Agar (TSA): Antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılmıştır. 40 g TSA (Merck, Darmstadt, Almanya) 1 litre saf su içerisinde ısıtmalı manyetik karıştırıcı da sıcaklık ile çözündürülmüştür. 121°C’ de 15 dak steril edildikten sonra su banyosunda 50°C’lere soğutulup petri kaplarına 15-20 ml hacminde dökülmüştür.

Tryptic Soy Broth (TSB): Antimikrobiyal aktivite deneylerinde patojenlerin geliştirilmesinde kullanılmıştır. 30 g TSB (Merck, Darmstadt, Almanya) 1 litre saf su içerisinde manyetik karıştırıcıda çözündürülmüştür. Deney tüplerine 9’ar ml eklenerek 121°C’ de 15 dak steril edilmiştir.

Yeast Extract Peptone Glukoz (YPG) Agar: Antimikrobiyal aktivite testlerinde mayanın (*Candida albicans*) gelişimi için kullanılmıştır. 1 litre saf su içerisinde 20 g pepton (Merck, Darmstadt, Almanya), 10 g Yeast Extract (Merck, Darmstadt, Almanya), 20 g glukoz (Merck, Darmstadt, Almanya) ve 13 g Agar-Agar (Merck, Darmstadt, Almanya) karıştırılmıştır ve ısıtmalı manyetik karıştırıcıda sıcaklık ile çözündürülmüştür. 121°C’de 15 dak steril edildikten sonra su banyosunda 50°C’ye soğutulup petri kaplarına 15-20 ml hacminde dökülmüştür.

Yeast Extract Peptone Glukoz (YPG) Broth: Antimikrobiyal aktivite testlerinde mayanın (*Candida albicans*) gelişimi için kullanılmıştır. 1 litre saf su içerisinde 20 g pepton, 10 g Yeast Extract ve 20 g glukoz karıştırılarak manyetik karıştırıcıda çözündürülmüştür. Deney tüplerine 9’ar ml eklenerek 121°C’ de 15 dak steril edilmiştir.

3.1.4. Kullanılan kimyasallar ve çözeltiler

0,1M'lık AgNO_3 çözeltisi: 4,2468 g AgNO_3 (Merck, Darmstadt, Almanya) tartılarak balon jojede 250 ml'ye tamamlanmıştır. Siyah cam şişeye aktararak saklanmıştır.

AgNP çözeltisi: 20 mg AgNP üzerine 2 ml steril saf su ilave edilmiş ve içine cam bilye eklenerek çözünene kadar vortekslenmiştir. Konsantrasyonu 10 mg/ml'dir.

2N NaOH: pH ayarlamak için kullanılmıştır. 8 g NaOH (Merck, Darmstadt, Almanya) saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

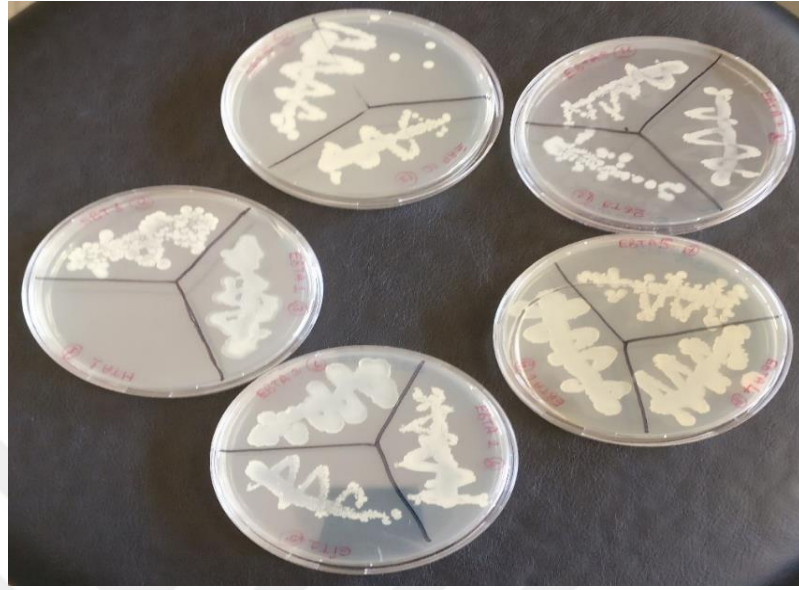
2N HCl: pH ayarlamak için kullanılmıştır. 16,7 ml %37'lik HCl'den (Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya) alınarak saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

%2'lik DPPH çözeltisi: 1 mg DPPH (Sigma-Aldrich, Amerika) tartılarak 35 ml metanolde (Merck, Almanya) çözündürülmüş ve ardından balon jojede 50 ml'ye saf su ile tamamlanmıştır (%70 alkol çözeltisi).

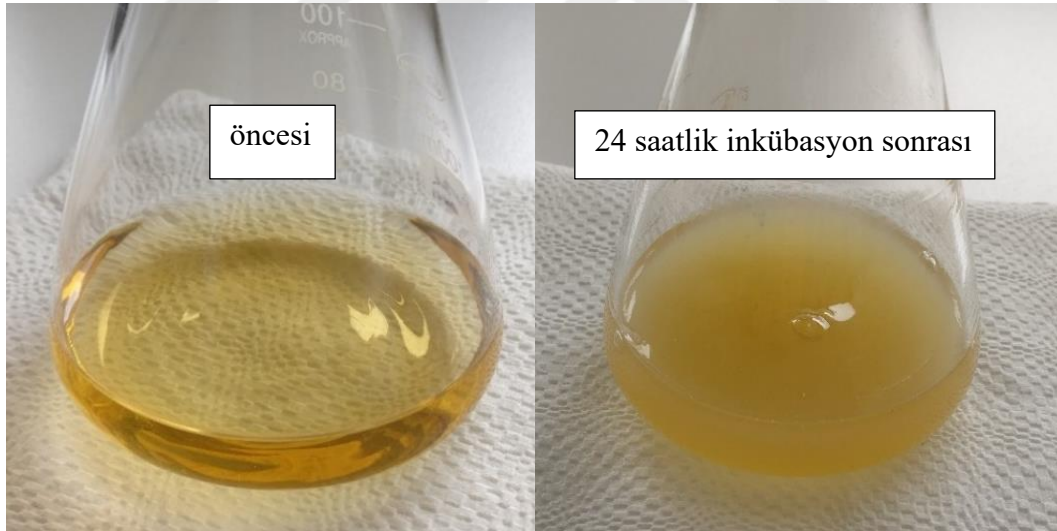
3.2. Yöntem

3.2.1. Mikroorganizmaların aktifleştirilmesi ve muhafazası

Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar %50 gliserol içeren NB içerisinde -50°C 'de muhafaza edilmiştir. İzolatlardan öze ile alınarak NA besiyerine Şekil 3.1.'de görüldüğü gibi çizme plak yöntemi ile ekimi yapılarak 33°C 'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Gelişen mikroorganizma kolonisinden öze ile alınarak NB içeren erlenlere aşılanmış ve 33°C 'deki çalkalamalı inkübatörde (120 rpm) 24 saat geliştirilmiştir. Aşılama öncesi ve inkübasyon sonrası gözlenen değişim Şekil 3.2.'deki gibidir. Bu aşamada elde edilen kültürler NP biyosentezinde aşı kültür olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.1. İzole edilmiş farklı suşların TSA besiyerinde gelişimi



Şekil 3.2. Mikroorganizmaların 24 saatlik inkübasyondan öncesi ve sonrası

3.2.2. Gümüş nanopartikül biyosentezi yapan mikroorganizmaların belirlenmesi

Çalışmada 28 adet *Bacillus* izolatının AgNP biyosentez yetenekleri araştırılmıştır. Bunun için, -50°C’de muhafaza edilen izolatlar sırası ile NA ve NB besiyerlerinde 33°C de 24 saat geliştirildikten sonra sıvı kültür içeriklerinin tamamı 4°C’de 9000 rpm’de 10 dak boyunca santrifüjlenerek hücreler uzaklaştırılmıştır. Şekil 3.3.’de gelişimi sağlanmış

mikroorganizmaların santrifüjlenerek süpernatant elde edilmesi aşamaları gösterilmiştir. Santrifüj ile ayrılan hücresiz sıvı (süpernatant) steril erlenlere alınarak üzerlerine son konsantrasyon 4 mM olacak şekilde AgNO_3 çözeltisi eklenmiştir. Erlenler NP biyosentezi için 120 rpm’de çalkalamalı inkübatörde 33°C’de reaksiyona bırakılmıştır. Reaksiyon sırasında ortamdaki renk değişiminin gözlenerek açık sarı renkten koyu kahverengi renklerde olması beklenmiştir. Takip edilen renk değişimlerine göre 24. ve 48. saatte alınan örneklerde UV-VIS spektrofotometrede 350-700 nm dalga boyu aralığında spektrum taraması yapılarak yüzey plazmon rezonansından kaynaklanan karakteristik pik oluşumu incelenmiştir. 400-450 nm dalga boyunda elde edilen absorbans değerleri karşılaştırılmıştır. Buna göre, en yüksek absorbansı veren *Bacillus* izolatu olan ZGT9 seçilerek çalışmalara devam edilmiştir. Tüm çalışmalar iki paralel olarak yapılmış elde edilen sonuçların ortalaması alınmıştır.



Şekil 3.3. Gelişimi sağlanmış mikroorganizmaların santrifüjlenerek süpernatant elde edilme aşaması

3.2.3. Gümüş nanopartikül biyosentezine reaksiyon koşullarının etkisi

En iyi oranda biyosentezin gerçekleştiği koşulların belirlenmesi amacıyla *Bacillus* sp. ZGT9 izolatının AgNP biyosentezine AgNO_3 konsantrasyonu, sıcaklık ve pH’nın etkisi belirlenmiştir.

3.2.3.1. Sıcaklık etkisinin belirlenmesi

İzolatın geliştirilmesi ve NP sentezi Bölüm 3.2.2.'de açıklandığı şekilde yapılmıştır. Biyosentez sırasında farklı sıcaklıklarda (30, 33 ve 40°C) reaksiyonlar gerçekleştirilmiş. 24 ve 48. saatlerde renk değişimi gözlenerek alınan örneklerin UV-VIS spektrofotometrede 350-700 nm dalga boyu aralığında spektrum taraması yapılmış ve en yüksek absorbands pikinin elde edildiği dalga boyundaki absorbands değerleri okunmuştur.

3.2.3.2. pH etkisinin belirlenmesi

İzolatın geliştirilmesi Bölüm 3.2.2.'de açıklandığı şekilde yapılmıştır. Elde edilen süpernatantlara 4 mM AgNO₃ eklendikten sonra 2 N HCl veya 2 N NaOH ile farklı pH'lara (pH 6, 7, 8, 9, 10) ayarlanmış ardından 33°C' de çalkalamalı inkübatörde (120 rpm) reaksiyona bırakılmıştır. 24 saat ve 48. saatlerde alınan örneklerin UV-VIS spektrofotometrede 350-700 nm dalga boyu aralığında spektrum taraması yapılmıştır.

3.2.3.3. Konsantrasyonun etkisinin belirlenmesi

İzolatın geliştirilmesi Bölüm 3.2.2.'de açıklandığı şekilde yapılmıştır. Elde edilen süpernatantlara farklı konsantrasyonlarda AgNO₃ (1, 2, 4, 6, 8, 10 mM) eklendikten sonra 33°C' de çalkalamalı inkübatörde (120 rpm) reaksiyona bırakılmıştır. 24, 48 ve 120. saatlerde UV-VIS spektrofotometrede 350-700 nm dalga boyu aralığında spektrum taraması yapılmıştır.

3.2.4. Gümüş nanopartiküllerin karakterizasyonu

3.2.4.1. Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi analizi (EDX)

Enerji dağılımlı X-ışını (EDX) spektroskopisi maddelerin elementel kompozisyonunu belirlemede kullanılan bir yöntemdir. AgNP'lerinin EDX analizi Sakarya Üniversitesi

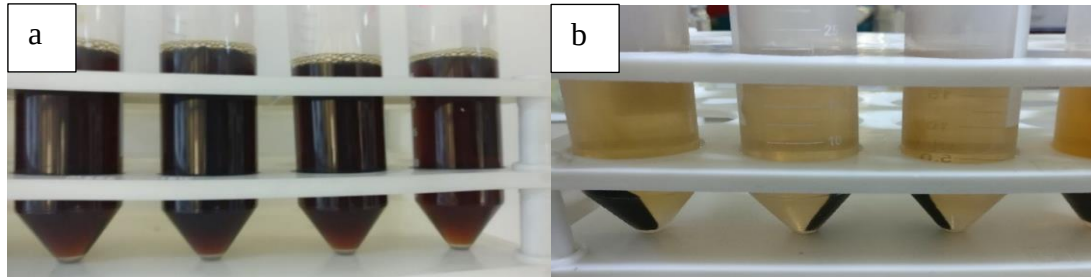
Araştırma Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (SARGEM)’ne yaptırılmıştır, analizde EDX spektrometresi (EDAX, Octane Plus) kullanılmıştır. Elde edilen AgNP’ler 15,00 kV’ta elementel olarak tanımlanmıştır.

3.2.4.2. Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu analizi (FESEM)

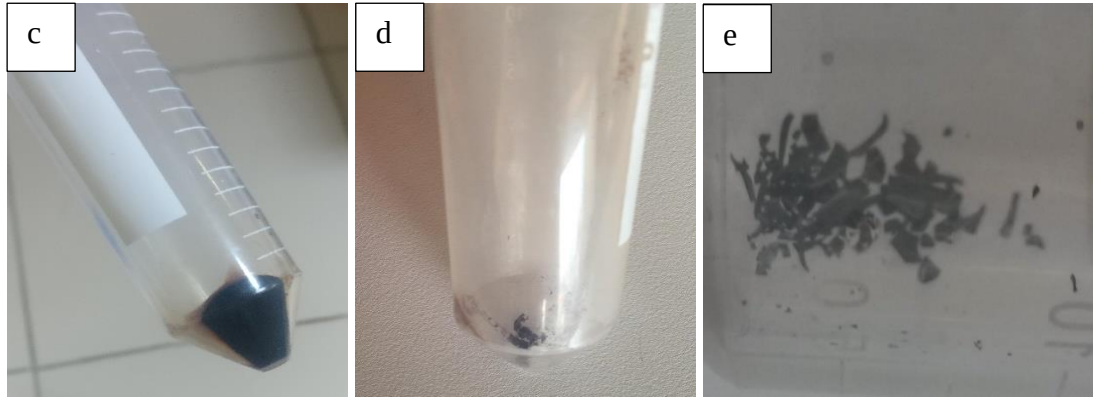
Gümüş nanopartiküllerinin şekil ve büyüklüklerinin belirlenmesinde alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FESEM) ile analiz yaptırılmıştır. Analiz Sakarya Üniversitesi Araştırma-Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (SARGEM) laboratuvarında bulunan FESEM (FEI Quanta, FEG 450) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen AgNP’ler 50.000 kat büyütme ile 15,00 kV’ta görüntülenmiştir.

3.2.5. Gümüş nanopartiküllerin saflaştırılması

İzolatın geliştirilmesi ve NP sentezi 33°C sıcaklıkta, pH 8-9 ve 4 mM AgNO₃ konsantrasyonunda gerçekleştirilmiştir. 72 saatlik reaksiyon süresi sonunda örnekler 4°C de 9000 rpm’de 10 dak santrifüj uygulanmıştır ve ardından 3 kez 20 ml’lik steril saf su ile yıkama yapılmıştır. Yıkanan örnekler 37°C’de 24 saat kurutulmuştur. AgNP örnekleri ağzı kapalı şekilde oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Şekil 3.4.’te biyoreaksiyonun gerçekleşmesinden sonra AgNP’ün elde edilme aşamaları gösterilmektedir.



Şekil 3.4. Biyoreaksiyonun gerçekleşmesinden sonra AgNP elde edilmesi. a) biyosentez çözeltisi b) santrifüjlenmiş AgNP çözeltisi c) AgNP’ün süpernatant kısmından ayrılması d-e) kurutulan AgNP



Şekil 3.4. Devamı

3.2.6. Gümüş nanopartiküllerin antimikrobiyal çalışması

Gümüş nanopartiküllerinin antimikrobiyal aktiviteleri Bölüm 3.1.1.'de belirtilen patojenler üzerinde disk difüzyon yöntemi ve sıvı kültürde McFarland cinsinden mikrobiyal gelişme ölçümü ile değerlendirilmiştir.

3.2.6.1. Disk difüzyon yöntemi

Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır (Bauer, 1966). Soğuk depoda (-50°C) muhafaza edilen patojen mikroorganizmalar 9 ml TSB ve YPG-broth besiyerleri bulunan cam tüplere aşılınmış ve ardından *L. monocytogenes* 30°C ve diğer tüm mikroorganizmalar 37°C de 24 saat inkübe edilmiştir. Bu tüplerden alınan kültürler TSA ve YPG-Agar besiyerlerine yayma yöntemi ile ekilmiştir. Üzerine 6 mm çapında steril diskler (Whatman No.1) yerleştirilerek farklı konsantrasyonlarda hazırlanan AgNP (0.1, 1, 2.5, 5, 10 mg/ml) çözeltilerden disk üzerine 10 μl emdirilmiştir. *L.monocytogenes* 30°C ve diğer patojen mikroorganizmalar 37°C 'de 24 saat inkübe edilmiştir ardından zon çapları cetvel ile ölçülmüştür. Antimikrobiyal aktivite testinde negatif kontrol olarak su; pozitif kontrol olarak da geniş spektrumlu bir antibiyotik olan Streptomycin ile 5 farklı konsantrasyonda hazırlanan AgNP çözeltisi kullanılmıştır (El-Dein ve ark., 2021).

3.2.6.2. Optik yoğunluk (OD) ile mikrobiyal hücre ölçümü

Bu amaçla, bir adet Gram pozitif (*L. monocytogenes*) ve iki adet Gram negatif (*P. aeruginosa* ve *S. Typhimurium*) patojen seçilmiştir. Stok kültürden alınan mikroorganizmalar 4 ml TSB ve YPG-broth besiyerleri bulunan cam tüplere aşılanmış, ardından üzerine farklı miktarlarda (0, 1, 5, 10, 20, 35 ve 70 µL) AgNP çözeltisi (10 mg/ml) eklenmiştir. Vorteksledikten sonra Bölüm 3.2.6.1.' de belirtilen sıcaklıklarda inkübasyona bırakılmıştır. Ayrıca bakteri içermeyen taze besiyerlerine de yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda AgNP çözeltisi eklenerek kontrol olarak kullanılmıştır. Belirli saat aralıklarıyla (0-6.saat) McFarland cihazında 600 nm' de ölçüm yapılmıştır. Elde edilen sonuçların inhibisyon oranı (%) hesaplanmıştır (Nayak ve ark., 2016).

3.2.7. Gümüş nanopartiküllerin antioksidan çalışması

Üç ml DPPH (2,2-difenil1-pikrilhidrazil) çözeltisi eklenen cam tüplerin üzerine 100 µl farklı miktarlarda (20, 40, 60, 80, 100 µg/ml) AgNP çözeltisi eklenerek 30 saniye vorteksledikten sonra 30 dak karanlık ortamda bekletilmiştir. Reaksiyon sonunda UV-VIS spektrofotometrede 517 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Nanopartikül çözeltisinden kaynaklanan absorbans artışını belirlemek için aynı konsantrasyonlarda 100 µl NP çözeltileri 3 ml distile su ile aynı koşullarda bekletilerek absorbans değerleri ölçülmüştür. Kontrol olarak 100 µl distile su içeren DPPH çözeltisi kullanılmıştır (Elegbede ve ark., 2019). Sonuçlar % DPPH radikalini giderim aktivitesi olarak eşitlik (Denklem 3.1) hesaplanmıştır.

$$DPPH\ radicalinin\ giderim\ oranı\ (%) = \left[1 - \frac{(A_{\bar{o}} - A_a)}{A_k} \right] \times 100 \quad (3.1)$$

A_k: kontrol absorbansı (DPPH + su)

A_a: nanopartikül + su absorbansı

A_ö: nanopartikül + DPPH absorbans

3.2.8. *Bacillus* sp. ZGT9 izolatının tanımlanması

Bakterinin moleküler düzeyde tanımlaması 16s rDNA genotiplendirme yöntemi ile yapılmıştır. Suşun 16S rDNA gen sekansının (dizisinin) tespiti Sentegen Biyoteknoloji (Ankara, Türkiye) firması tarafından yapılmıştır. Gene ait 16S rDNA amplifikasyonunda (çoğaltılmasında) üniversal primer (Forward primer 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3') kullanılmıştır. Edilen ürün PCR sonrası otomatik bir sekanslayıcı (Genetic Analyzer 3130, Applied Biosystems) tarafından sekanslanmıştır. Çoğaltılan gen sekansı Blastn programı kullanılarak veri tabanı bankasındaki genomik (GenBank) bakteri türleri ile karşılaştırılmıştır. Bakterinin *Bacillus* türleri ile olan benzerlik oranı filogenetik olarak saptanmıştır (Akçay, 2017).

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Gümüş Nanopartikülü Üreten Mikroorganizmaların Belirlenmesi

Bu tez çalışmasının ilk aşamasında, daha önce çeşitli gıda ve toprak örneklerinden izole edilmiş olan 28 adet *Bacillus* izolatının AgNP üretimleri araştırılmıştır.

Bacillus, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas* ve *Klebsiella* gibi çeşitli bakteri suşları Ag^+ iyonlarını Ag^0 elemental forma indirgeyebilmektedir. Böylelikle AgNP elde edilmektedir. Bu mekanizma bakteriler tarafından salgılanan NADH ve NADH'ye bağımlı nitrat redüktaz gibi enzimlerin gümüş iyonlarını indirgeyerek AgNP'leri oluşturduğu öne sürülmüştür. Nitrat redüktaz, $AgNO_3$ nitrat iyonları tarafından indüklenir. Enzim, NADH'den bir elektron alır, bu NAD^+ 'ya oksitlenir ve daha sonra elektronu Ag^+ 'ya aktarır, bu da nanoparçacıkların oluşumuna yol açar. Nitrat redüktaza ek olarak, diğer bazı peptitler/proteinler de Ag^+ iyonlarının AgNP'lere indirgenmesine katkıda bulunur (Yurtluk ve ark., 2018). Böylelikle eklenen $AgNO_3$ konsantrasyonuna, ortam sıcaklık ve pH'a ve biyosentezin gerçekleşme süresine bağlı olarak açık sarı renkten kahverengiye renk değişimi gözlenir (Lateef ve ark., 2015). İzolatların NP biyosentezleri sırasındaki renk değişimi (açık sarıdan kahverengiye) görsel olarak takip edilebilmiştir. Şekil 4.1.'de 13 farklı izolatın 4 mM konsantrasyon, 33°C ortam sıcaklığı, ortam pH'ı 8-9 ve 48 saatlik biyosentez koşullarıyla elde edilen sarıdan kahverengiye olan renk değişimi gözlenmektedir. Bunun yanında, reaksiyon ortamından 24 ve 48. saatlerde alınan örneklerin UV-VIS spektrofotometre ile absorbans spektrumları ölçülmüştür.

Yapılan tarama çalışması sonucunda en iyi NP üreticisi mikroorganizmanın *Bacillus* sp. ZGT9 olduğu anlaşılmış ve çalışmalara bu mikroorganizma ile devam edilmiştir.



Şekil 4.1. Seçilen 13 farklı izolatların NP biyosentezleri sırasındaki renk değişimi.

4.2. *Bacillus* sp. ZGT9 ile Gümüş Nanopartiküllerinin Üretimi

Çeşitli izolatların AgNP üretim oranları belirlendikten sonra *Bacillus* sp. ZGT9 ile üretim çalışmalarına devam edilmiştir. Bakterinin hücre dışı NP biyosentezine reaksiyon sıcaklığı, başlangıç pH'ı, AgNO_3 konsantrasyonu ve sürenin etkisi belirlenmiştir.

4.2.1. Gümüş nanopartiküllerinin biyosentezine sıcaklığın etkisi

Hücre dışı NP biyosentezi, 4 mM AgNO_3 konsantrasyonunda 3 farklı ortam sıcaklık değerinde (30, 33 ve 40°C) çalışılmıştır. 48 saat sonunda artan sıcaklıkla birlikte renk değişiminin arttığı gözlenmiştir. Şekil 4.2.'de 30 ve 40°C sıcaklıklarda gerçekleştirilen üretimlerdeki renk değişimleri verilmiştir. UV-VIS spektrofotometre ile 350-700 nm arası spektrum taraması yapılarak yüzey plazmon rezonansı kontrol edilmiştir. Metal NP'lerde yüzey plazmon rezonans (YPR) karakteristiktir ve elektromanyetik ışık uygulamalarında kendine has dalga boyunda partiküllerin iç kısmındaki elektronlar uyarılarak NP'ün dış

kısmında salınırlar. Bu olay sonucunda iki kutuplu (dipol) yapı oluşur. Yüzeyde salınan elektronlar, salınma neden olan spesifik dalga boyundaki ışığı absorbe eder ve NP'ün miktarı absorbe edilen ışığın miktarı ile orantılıdır (Akçay ve Avcı, 2018).

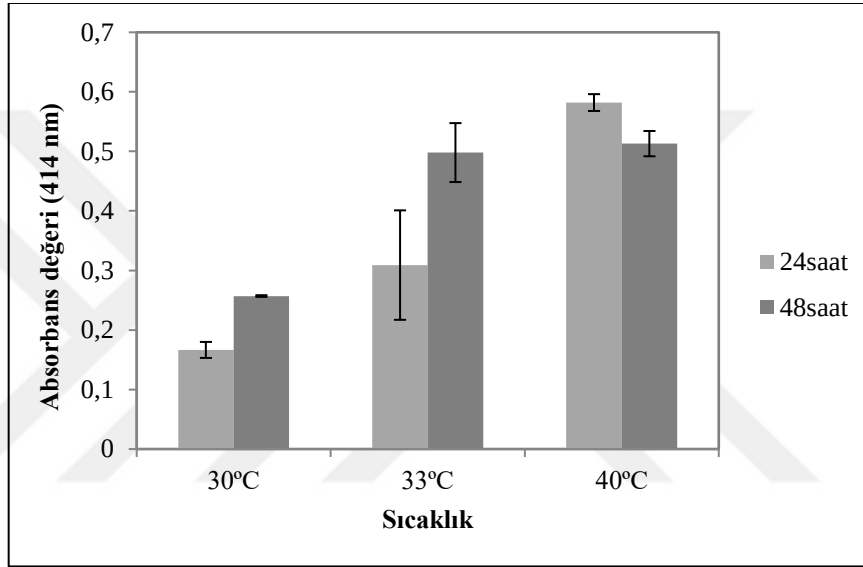
Yapılan biyosentezlerin 48 saat sonunda alınan örnekleri ile 414 nm dalga boylarında elde edilen absorbans değerleri Şekil 4.3.'te verilmiştir. Şekil 4.4.'te 30, 33 ve 40°C sıcaklıklarda NP'lerin yüzey plazmon rezonansından kaynaklanan UV-VIS spektrumları görülmektedir. En yüksek absorbans piki 410-420 nm'de, 40°C'de elde edilmiştir. Bunun yanında, 30°C'de diğer sıcaklıklarda olduğu gibi belirgin bir absorbans piki oluşmamıştır. Bu da renk değişiminde de gözlendiği gibi bu sıcaklıkta biyosentezinin düşük olduğunun belirtisidir. Spektrofotometrik ölçümlerde 40°C'de elde edilen değerler en yüksek olmasına karşın, kurutulmuş örneklerin FESEM görüntülerinde (Şekil 4.11.f) bu sıcaklıkta yoğun aglomerasyon gözlendiğinden biyosentez için en uygun sıcaklığın 33°C olduğuna karar verilmiştir.



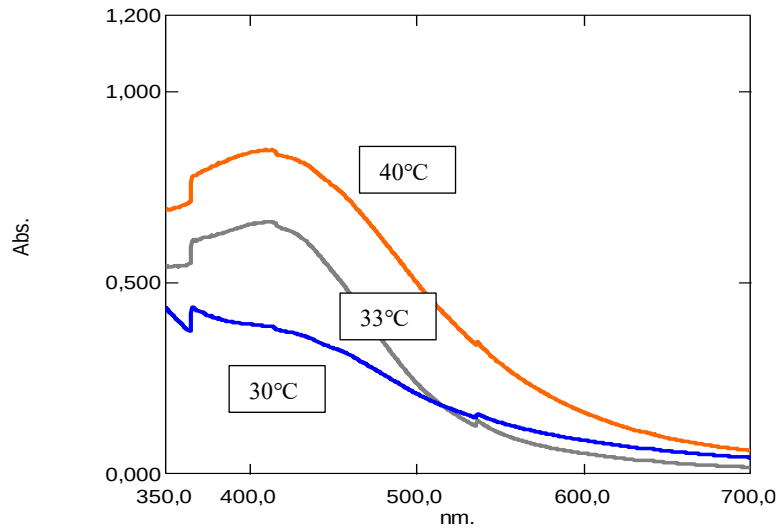
Şekil 4.2. 30 ve 40°C sıcaklıklarda gerçekleştirilen biyosentezlerin 48 saat sonunda renginin kahverengiye dönüşümü arasındaki fark

Yapılan bir çalışmada *E. coli* D8 ile 72 saatlik hücre dışı biyosentezle elde edilen AgNP için 25-40°C aralığında çalışılmış ve optimum sıcaklık 35°C olarak belirlenmiştir ve maksimum absorbans değeri 429 nm'de elde edilmişti (El-Dein ve ark., 2021).

B. thuringiensis ve *B. lieheniformis* (AZ1) ile elde edilen AgNP 37°C ve 24 saat inkübasyonu gerçekleşmiştir ve maksimum absorbens değerleri sırasıyla 414 ve 425 nm olarak ölçülmüştür (Deljou ve Goudarzi, 2016; Nayak ve ark., 2016). Bu çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir ve maksimum absorbens değeri 414 nm olarak okunmuştur. Çalışmamıza 33°C ile devam edilmektedir.



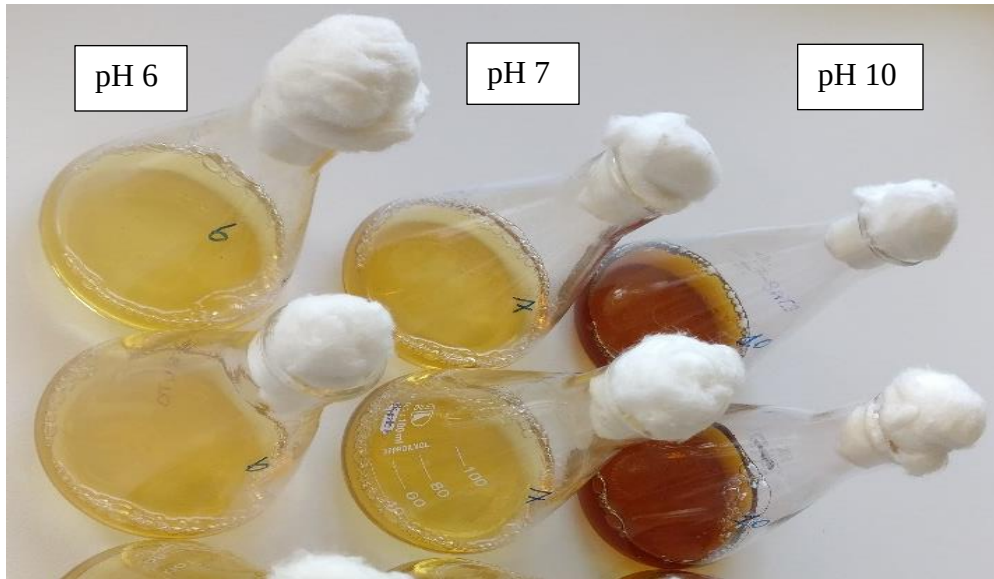
Şekil 4.3. Aynı konsantrasyonda AgNP içeren süpernatantların farklı sıcaklıklarda (30, 33 ve 40°C) 24 ve 48 saat sonundaki absorbens değerlerinin grafiği (Absorbans değerleri 1/10 oranında seyreltilmiş örneklerde okunmuştur).



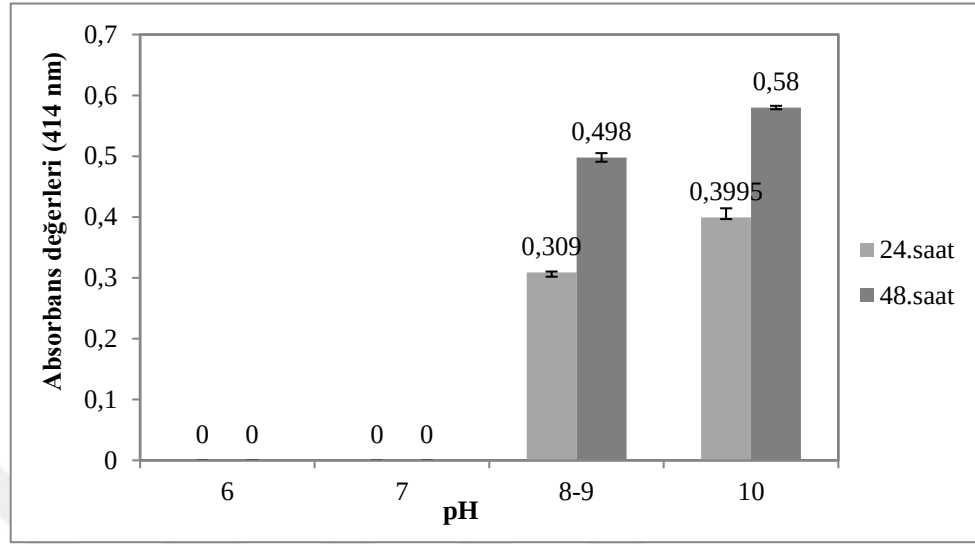
Şekil 4.4. 30, 33 ve 40°C’de 4 mM AgNP konsantrasyondaki süpernatantların 48 saat sonunda UV-VIS spektrum grafiği.

4.2.2. Gümüş nanopartiküllerinin biyosentezine pH etkisi

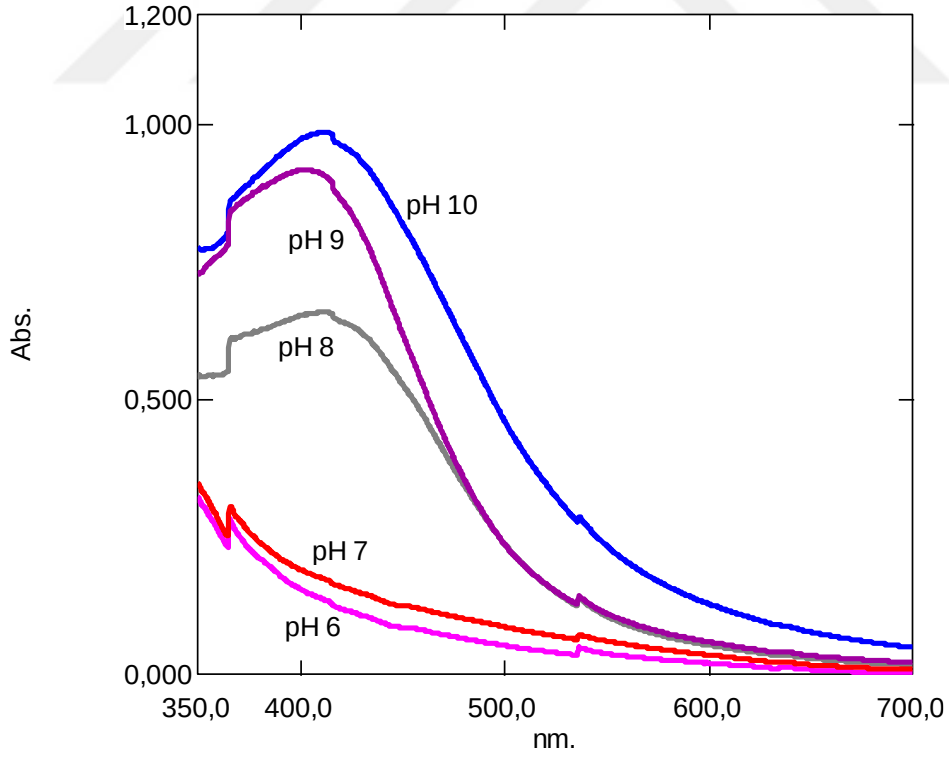
Biyoreaksiyonun gerçekleştirildiği ortam pH'ının AgNP biyosentezine etkisi 5 farklı pH'da (6,7,8-9,10) 24 ve 48 saat sonunda alınan örneklerde incelenmiştir. Yapılan çalışmada, AgNP biyosentezi için pH'nın kritik olduğu anlaşılmıştır. pH 6 ve 7'de reaksiyon ortamında hiçbir renk değişimi olmamıştır. Şekil 4.5.'de pH 6, 7 ve 10'daki reaksiyon ortamına ait renk değişimine ait resimler verilmiştir. Buradan açıkça pH 6 ve 7'de NP sentezinin olmadığı anlaşılmaktadır. Benzer şekilde bu pH'larda yapılan spektrum taramasında karakteristik AgNP pikinin de olmadığı anlaşılmış ve 410-420 nm aralığında absorbans değeri de ölçülememiştir. Öte yandan, pH 8'den itibaren NP üretiminin ilk göstergesi olan renk değişimi oluşmuş ve yüzey plazmon resonanslarından kaynaklanan karakteristik pikler de elde edilmiştir (Şekil 4.7.). pH 10 en yüksek absorbans pikinin elde edildiği değer olsa da bu pH da elde edilen AgNP'lerinin elde edilmesi (saflaştırma) aşamasında sorun yaşanmıştır. Bu nedenle, üretim için optimum ortam pH değeri 8-9 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.5. Aynı Konsantrasyon ve sıcaklıkta farklı ortam pH değerlerinde (pH 6, 7 ve 10) renk değişimi



Şekil 4.6. Farklı ortam pH değerlerindeki absorbans değer grafiği.



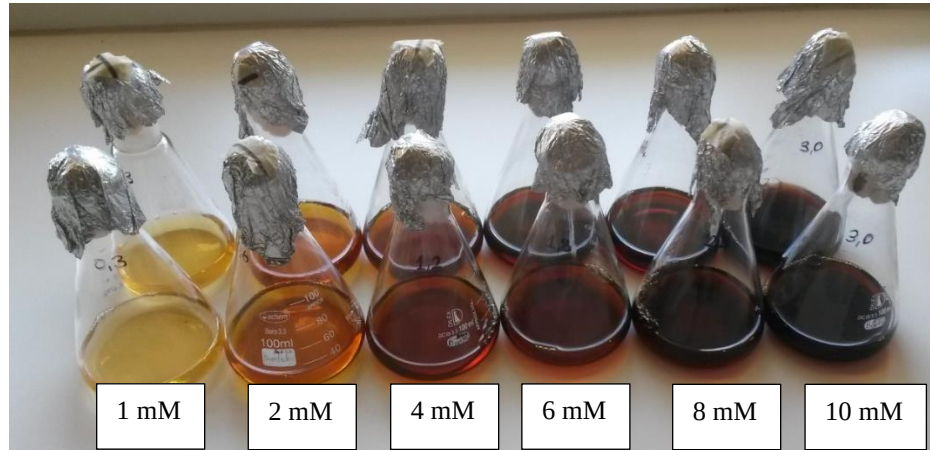
Şekil 4.7. Farklı pH değerlerinde AgNP üretim ortamlarının 48 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen spektrum grafiği.

E. coli D8 ile yapılan çalışmada pH 5-10 aralığında çalışılmış ve pH değeri arttıkça elde edilen absorbans değerleri de artmış fakat en yüksek değer pH 7 elde edilmiştir (El-Dein ve ark., 2021). *Bacillus sp.* ZGT9 çalışmasında benzer sonuçlar elde edilmiş pH arttıkça renk değişimi daha belirgin gözlenmiş ve yüzey rezonanstan elde edilen absorbans piki daha iyi sonuç vermiştir. Fakat pH 10'da çalışıldığı zaman AgNP elde edilmesi güçleşmiştir. Bu yüzden optimum pH aralığı 8-9 olarak belirlenmiştir.

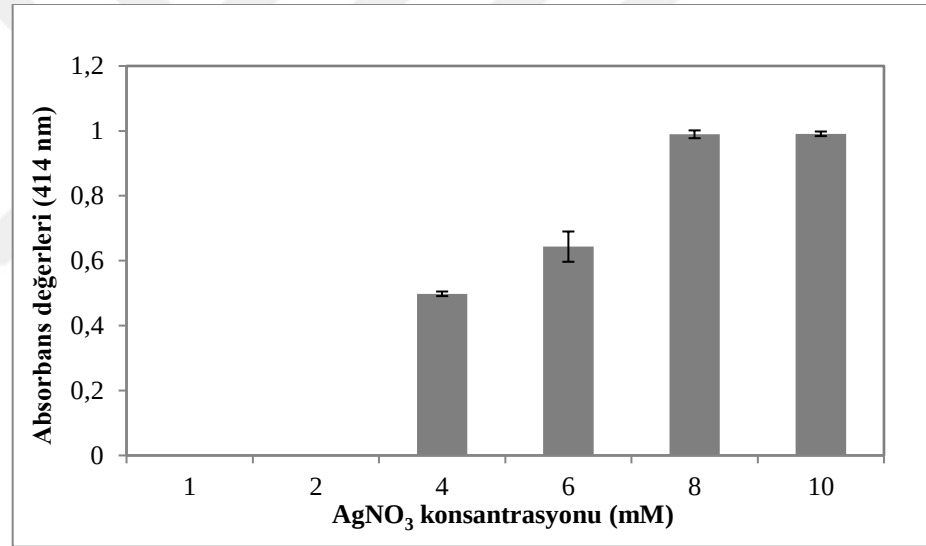
4.2.3. Gümüş nanopartiküllerinin biyosentezine konsantrasyonun etkisi

İnkübasyon sıcaklığı, süpernatantın pH'ı ve eklenen AgNO_3 çözeltisinin konsantrasyonuna bağlı olarak renk dönüşümü süresi değişmektedir. Nanopartikül üretilirken mikroorganizmaların kullanıldığı biyosentezde indirgeyici enzimler çalıştığı için kimyasal yöntemin kullanılmasına göre ortam renginin daha hızlı dönüştüğü bildirilmiştir (Akçay, 2017).

Gümüş nanopartikülü biyosentezine ortama eklenen AgNO_3 konsantrasyonunun etkisini belirlemek için 1 ve 10 mM arasında değişen 6 farklı konsantrasyonda çalışma yapılmıştır. Şekil 4.8.'de farklı konsantrasyonlarda yapılan 48 saat sonundaki biyosentez ortamlarına ait fotoğraflar verilmiştir. Görüldüğü gibi, 1 mM konsantrasyonda renk değişimi olmamış 2 mM konsantrasyondan itibaren renk değişimi başlamış ve konsantrasyonla birlikte renk yoğunluğunda da artış olmuştur. Yapılan spektrum taramasında 1 mM ve 2 mM konsantrasyonlarda yüzey plasmon rezonansından kaynaklanan absorbans piki elde edilememiş. En yüksek absorbans piki 8 mM AgNO_3 konsantrasyonunda elde edilmiştir. Absorbans değerleri 4 mM'dan 8 mM'a doğru artarken 10 mM'da azalma eğilimi göstermiştir.



Şekil 4.8. Farklı AgNO_3 konsantrasyonlardan elde edilen AgNP biyosentezinin 48. saat sonundaki renk değişimi.



Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlarda (1,2,4,6,8,10 mM) AgNO_3 eklenen örneklerin 414 nm’de 48.saat sonunda ölçülen absorbans değerlerinin grafiği.

24. saatte renk değişimi olmakla birlikte pik oluşumu gözlenmemiştir. Yapılan benzer çalışmalarda biyosentez süresileri 24-72 saat aralığında olduğu bildirilmektedir. *Variovorax quangxiensis* THG-SQL3, *Bacillus* sp. SBT8, termofilik *Bacillus* sp. AZ1 ve *B. thuringiensis* ile yapılan çalışma da renk değişiminin gözlenerek gerçekleşen hücre dışı biyosentez süresi 24 saat; *E. coli* D8’nin kullanıldığı çalışmada AgNP biyosentezi 72 saat

olarak bildirilmiştir (Du ve Yi, 2016; Deljou ve Gouderzi, 2016; Nayak ve ark., 2016.; Yurtluk ve ark., 2018; El-Dein ve ark., 2021).

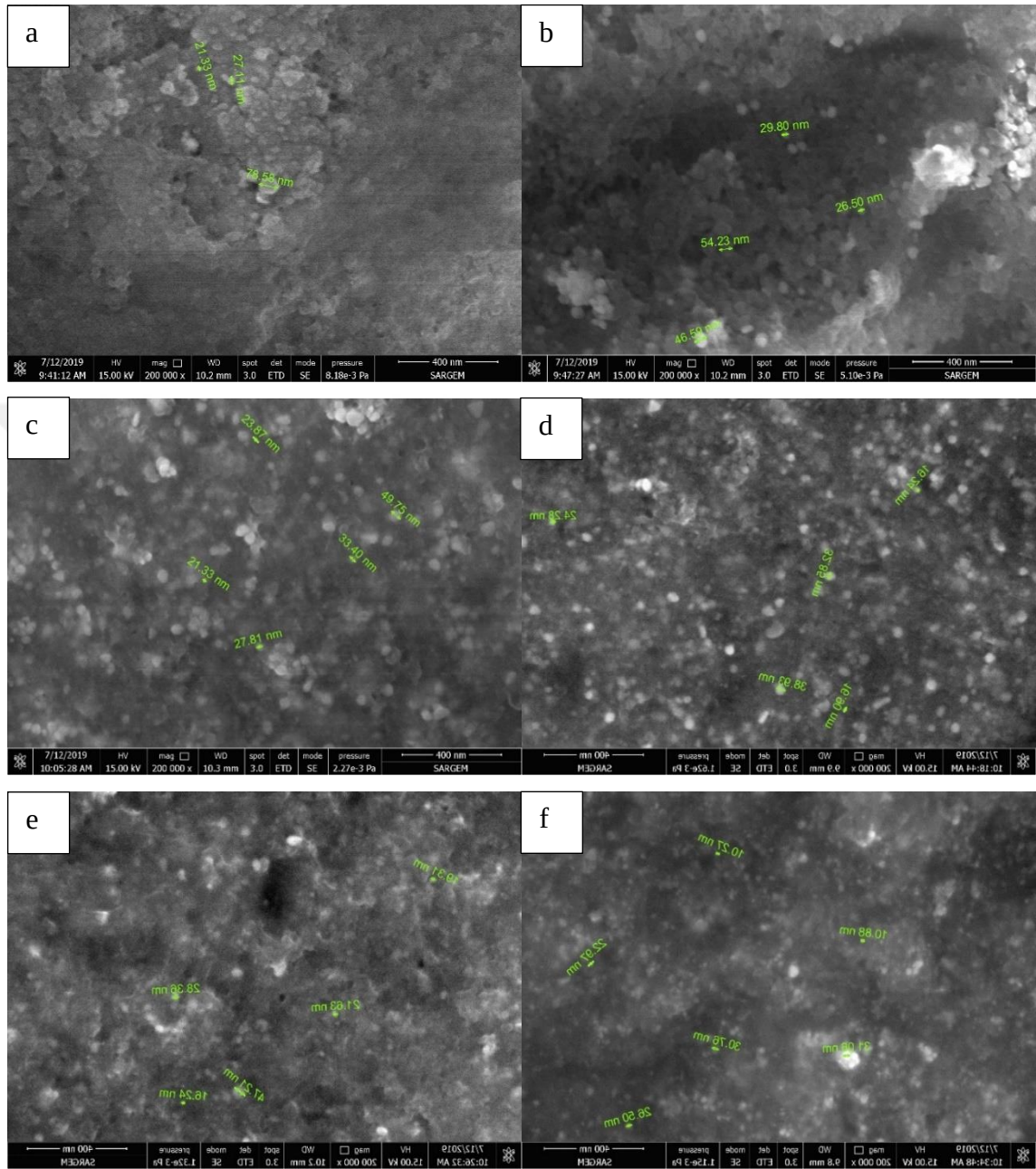
E. coli D8'in biyosentezi ile elde edilen AgNP 0,5-4 mM konsantrasyon aralığında çalışılmış ve optimum konsantrasyon değeri 1,5 mM olarak bildirilmiştir (El-Dein ve ark., 2021).

B. thuringiensis bakterisi ile saf ve sürekli AgNP üretimi 0,15 mM gibi düşük konsantrasyonda 24 saat inkübasyon ile gerçekleşmiştir. 24 saat sonunda gözlenen renk değişimi ile 414 nm'de pik elde edilmiştir (Nayak ve ark., 2016). Termofilik *Bacillus lieheniformis* (AZ1) ile yapılan bir çalışmada 1 mM konsantrasyonla çalışılmıştır (Deljou ve Gouderzi, 2016).

4.3. Gümüş Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

4.3.1. FESEM

FESEM analizinde seçilen 6 örnek üzerinde çalışılmıştır. Bunlardan en iyi sonuç 33°C'deki 4 mM konsantrasyonda gözlenmiştir. 40°C'de iyi sonuç gözlenmesine rağmen bulanıklık daha fazladır. Küresel yapıda ve partikül büyüklüğü 1-50 nm olarak ölçülmüştür. Şekil 4.10.'de farklı AgNO₃ konsantrasyon ve sıcaklarda elde edilmiş AgNP'lerin FESEM görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.10. Farklı AgNO₃ konsantrasyon (a: 10 mM, 33°C; b: 8 mM, 33°C; c: 4 mM, 33°C; d: 6 mM, 33°C; e: 4 mM, 30°C; f: 4 mM, 40°C) ve sıcaklarda elde edilmiş AgNP'lerin FE-SEM görüntüleri

FE-TEM ile yapılan analizde *Variovorax guangxiensis* THG-SQL3 ile üretilen AgNP büyüklüğü 10-40 nm ve küresel şekilli olduğu bildirilmiştir (Du ve Yi, 2016). *Bacillus safensis* LAU13'ün biyosenteziyle elde edilmiş AgNP'ler TEM'de analiz edilmiş ve 5-95 nm aralığında küresel şekilli olduğu ifade edilmiştir (Lateef ve ark., 2015). *E. coli* D8'in

kullanıldığı AgNP yeşil hücre dışı biyosentezinde TEM ile 6-12 nm boyutlarında olduğu ölçülmüştür (El-Dein ve ark., 2021). Termofilik *Bacillus* sp. AZ1'in (Deljou ve Goudarzi, 2016). TEM analizinde 7-31 nm boyutta küresel iken diğer bir çalışma olan *B. thuringiensis*'in (Nayak ve ark., 2016). FESEM ve TEM ortak analiz sonucunda 10-30 nm boyutlu küresel AgNP'ler elde edildiği bildirilmiştir.

ZGT9 ile elde edilmiş AgNP FESEM ölçümleri sonucu elde edilen boyut ve şekil olarak diğer çalışmalarla uyumaktadır ve benzerlik göstermektedir.

4.3.2. EDX

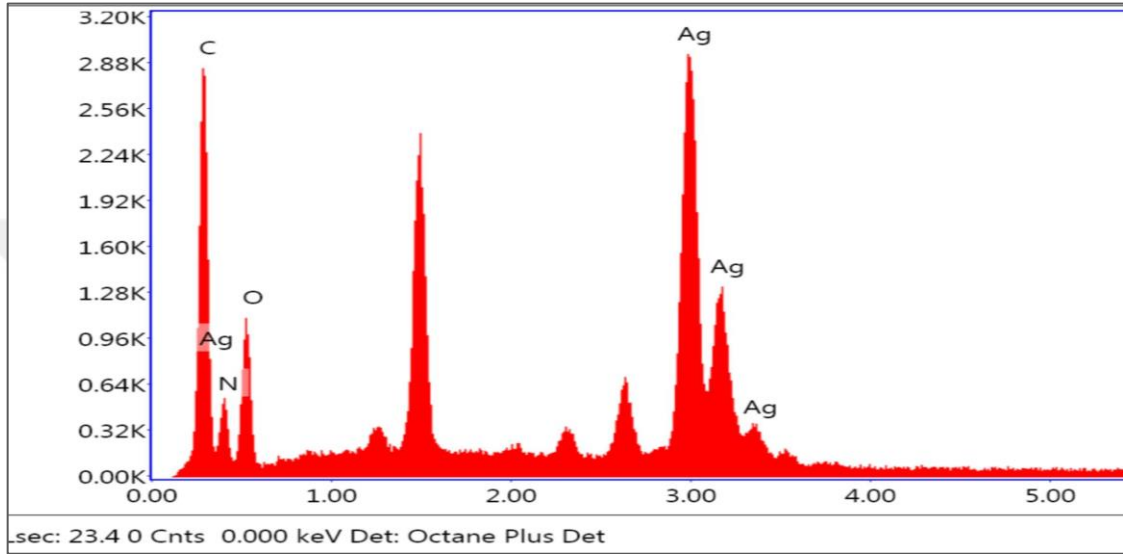
Elde edilen AgNP'lerinin bileşimindeki C, O, N ve Ag elementlerinin ağırlıkça yüzdesi Tablo 4.1.'de gösterilmiştir. Elementel analize göre ürünün ağırlıkça %51,11'i gümüş, %20,49'u karbon, %10,54'ü azot ve %17,86'sı oksijen elementine aittir. C, O, N varlığı partiküllerin etrafını saran ve stabilize edici ajan olarak görev alan *Bacillus* 'a ait biyolojik moleküllerin varlığının göstergesidir.

Tablo 4.1. Üretilen AgNP'lerinin elementel kompozisyonu.

Element	Ağırlık (%)	Atomik (%)	Net Yoğunluk
C	20,49	42,13	658,14
N	10,54	18,59	98,92
O	17,86	27,57	238,72
Ag	51,11	11,70	1275,87

3 keV'ta gümüşe ait olduğu belirlenmiş karakteristik absorpsiyon piki ortamda elementel gümüşün olduğunu ifade etmektedir (Du ve Yi, 2016; Nayak ve ark., 2016; Ghiuță ve ark.,

2018; Yurtluk ve ark., 2018; El-Dein ve ark., 2021). Şekil 4.11.'te *Bacillus* sp. ZGT9 bakterisinden elde edilmiş ve gümüşün varlığını gösteren AgNP'e ait EDX spektrumu verilmiştir.



Şekil 4.11. AgNP'e ait EDX spektrumu.

4.4. Antimikrobiyal Aktivite

4.4.1. Disk difüzyon yöntemi

Farklı konsantrasyondaki AgNP'lerin bazı Gram pozitif (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*) ve Gram negatif (*E. coli* O157:H7, *E. coli* Tip-1, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* ve *P. aeruginosa*) bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkisi agar disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Belirlenen konsantrasyon aralığında 0,1 mg/ml haricinde çalışılan tüm patojenlerde diskler etrafında inhibisyon zonu oluşumu gözlenmiştir. Tablo 4.2.'de çalışılan patojenlere karşı farklı konsantrasyonlardaki AgNP'lerin oluşturduğu zonlar ölçülerek gösterilmiştir. Şekil 4.12.'de petrilerde oluşan Gram negatif (*E. coli* Tip-1, *E. coli* O157:H7) ve Gram pozitif (*B. cereus*) bakterilerin etrafında oluşan zonlar görsellenmiştir. Düşük konsantrasyonda (0,1 mg/ml) etkinliğini gösterebildiği patojen bakteriler sırasıyla *E. coli* O157:H7, *P. aeruginosa* ve *S. enteritidis*'tir. Streptomycine ile

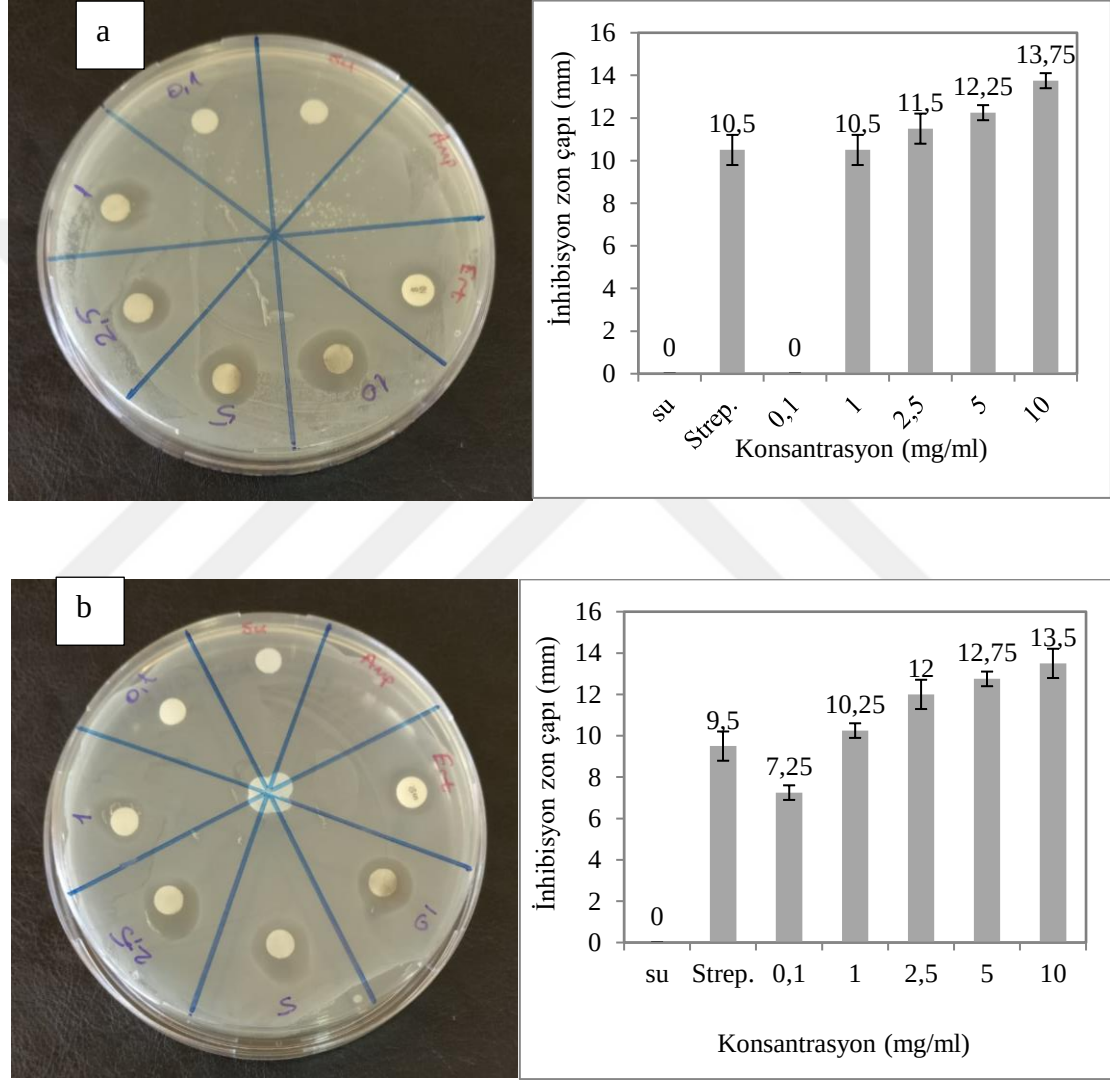
kıyaslandığında da çalışılan tüm patojenleri değerlendirdiğimizde rekabet edebilecek kadar antibakteriyal etkisi ile iyi sonuçlar vermiştir.

Tablo 4.2. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan AgNP çözeltilisinin patojen mikroorganizmalar üzerinde oluşturduğu inhibisyon çapı.

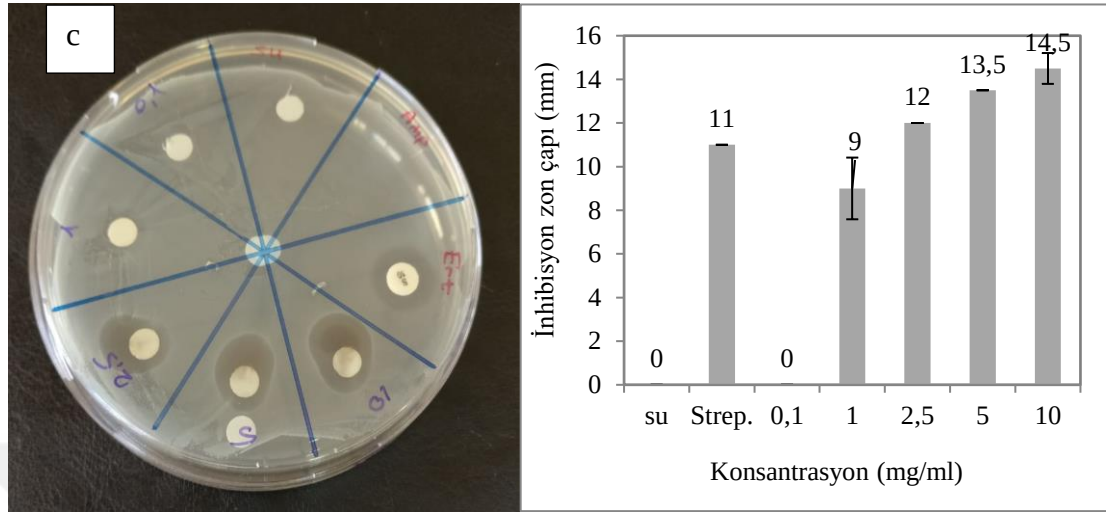
AgNP (mg/ml)	İnhibisyon zon çapı (mm)								
	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i> Tip-1	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. Typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Strep. (10 µg)	0	10,5	9,5	9,5	11	15	10	22	9,5
0,1	0	0	7,25	0	0	0	7	7	0
1	6	10,5	10,25	9,5	9	7	8	8	8,5
2,5	8	11,5	12	10,25	12	9,25	9	10,25	10,25
5	9,5	12,25	12,75	10,5	13,5	9,5	9	11	10,25
10	9,5	13,75	13,5	11	14,5	10	11,5	12	11,5

Yapılan çalışmalarda farklı yöntemlerle elde edilen AgNP'lerinin farklı özellikte antimikrobiyal etki gösterdikleri belirlenmiştir. El-Dein ve arkadaşlarının (2021) yaptığı çalışmada *E. coli* D8 tarafından üretilen AgNP 50 µg/ml konsantrasyonda *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. cereus* ve *C. albicans* uygulandığında inhibisyon çapı sırasıyla 17, 20, 12 ve 11 mm'dir. Yapılan başka bir çalışmada *Bacillus safensis* LAU13 ile üretilen AgNP'lerin 10-100 µg/ml konsantrasyon aralığında *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *S. aureus* gibi patojenler üzerinde çalışıldığında 11-19 mm inhibisyon çapı elde edilmiştir (Lateef ve ark., 2015). Du ve Yi'nin (2016) *Variovorax quangxiensis* THG-SQL3 ile hücre dışı biyosentez çalışmasında elde edilen AgNP'lerin patojen mikroorganizmalar olan *S. aureus*, *Candida albicans*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *B. cereus* üzerinde antimikrobiyal aktivite sergilediği bildirilmiştir. Deljou ve Gouderzi (2016) patojen *E. coli*, *S. typhi*, *S. aureus* ve *S. epidermis* ile 10 µg/ml konsantrasyonda antimikrobiyal analiz yapmıştır. En iyi antibakteriyal aktivite sırasıyla *E. coli* ve *S. typhi*' de 22 ve 19 mm inhibisyon çapı olarak ölçülmüştür.

Bu çalışmada, elde edilen minimum inhibisyon konsantrasyonlarının düşük olmasının nedeni aglomerasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, bu çalışmada yapılan analizde diskler üzerine uygulanan örnek miktarı (10 µl) düşüktür.



Şekil 4.12. Agar disk difüzyon yöntemi ile farklı konsantrasyonlarda uygulanan AgNP çözeltisinin oluşturduğu inhibisyon çapı a) *E. coli* Tip1, b) *E. coli* O157:H7, c) *B. cereus*



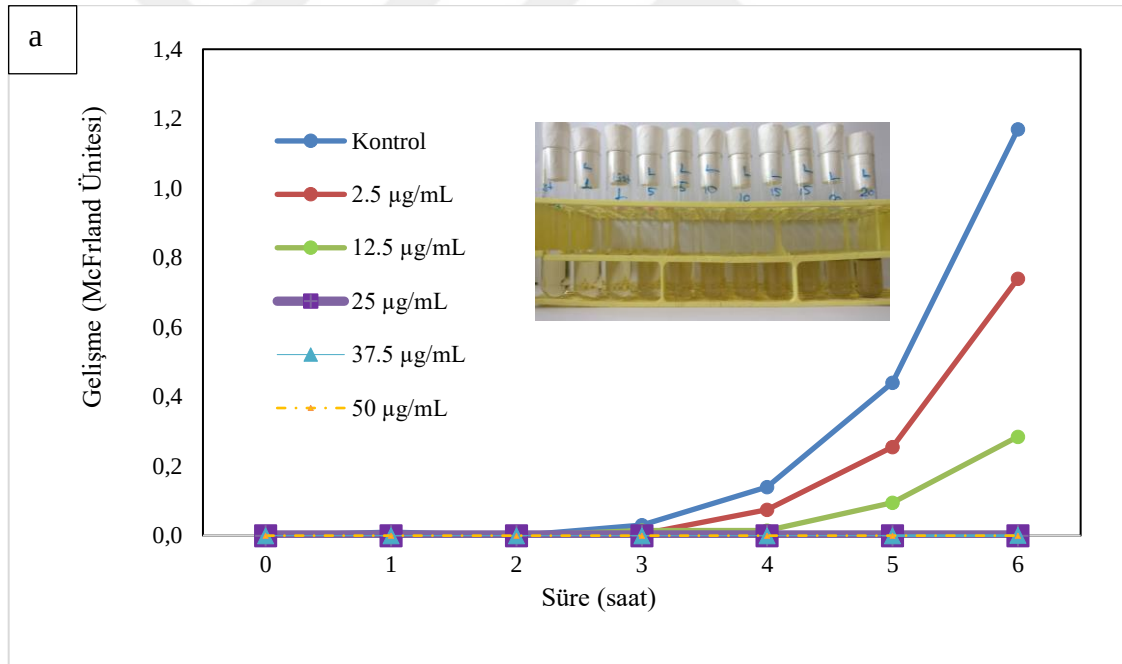
Şekil 4.12. (Devamı)

4.4.2. Optik yoğunluk (OD) ile mikrobiyal hücre ölçümü

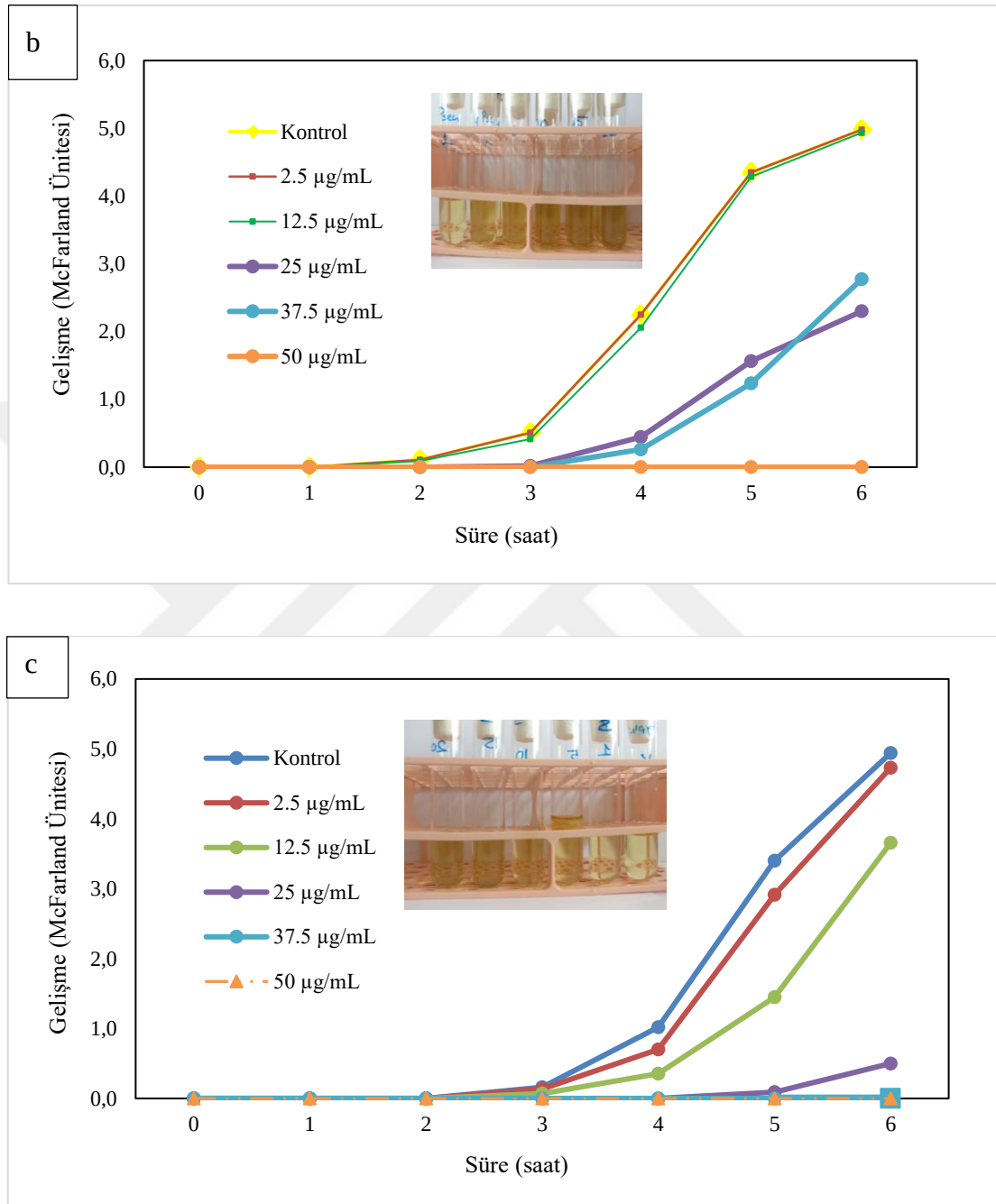
Farklı konsantrasyonlarda AgNP çözeltisi eklenen patojenlerin 6 saat sonunda gelişme oranı ve 6.saatteki inhibisyon yüzdeleri Tablo 4.3.'te gösterilmiştir. Çalışılan mikroorganizmalarda yüksek konsantrasyonlarda bulanıklık gözlenmemiş ve inhibisyon yüzdesi %100 olarak hesaplanmıştır. Daha düşük konsantrasyonlarda inhibisyon AgNP çözeltisi *Listeria monocytogenes* üzerinde en yüksek etkiyi göstermiştir. Şekil 4.13.'te bazı patojen bakterilerin farklı konsantrasyonlarda (0-50 $\mu\text{g/ml}$) 6 saatlik gelişme grafiği verilmiştir.

Tablo 4.3. *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* ve *P. aeruginosa*'ın farklı konsantrasyonlardaki AgNP ilavesi ile 6. saat sonundaki % inhibisyon değerleri.

AgNP ($\mu\text{g/mL}$)	% İNHİBİSYON (6. saatte)		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Kontrol	0	0	0
2,5	36,8	4,3	0
12,5	75,6	26	0,9
25	100	89,9	53,8
37,5	100	100	44,3
50	100	100	100



Şekil 4.13. Bazı patojen bakterilerin farklı konsantrasyonlarda (0-50 $\mu\text{g/mL}$) 6 saatlik gelişme grafiği a) *L. monocytogenes* b) *P. aeruginosa* c) *S. Typhimurium*.



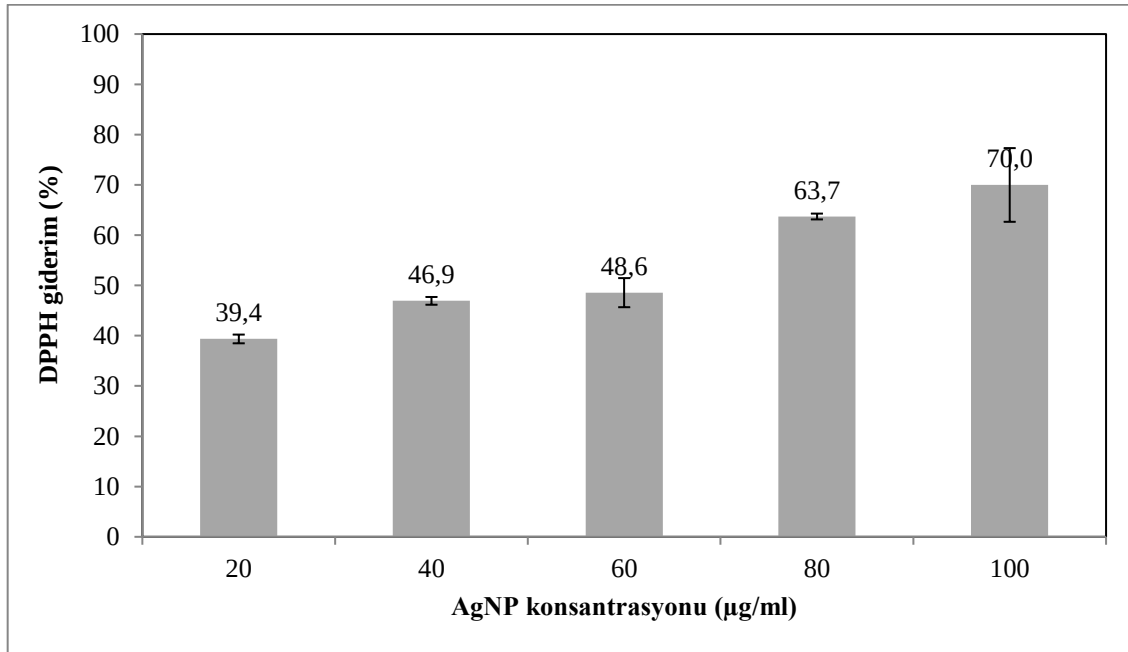
Şekil 4.13. (Devamı)

5 farklı konsantrasyonda ölçümü yapılan *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* ve *P. aeruginosa* 6 saat sonunda %100 inhibisyona ulaşmıştır. İnhibisyon konsantrasyonları sırasıyla 25 µg/ml, 37,5 µg/ml ve 50 µg/ml' dir. *Bacillus* ZGT9 en iyi etkiyi *L. monocytogenes*'te vermiştir. Nayak ve arkadaşları (2016) *B. thuringiensis* tarafından

üretile 0,15 mM konsantrasyondaki AgNP'ün %42 inhibisyona ulaştığı ifade edilmiştir. Disk difüzyon yöntemi ile belirlenen MİK'in aksine sıvı antimikrobiyal aktivite analizinde daha düşük AgNP'lerinin antimikrobiyal etki gösterdiği saptanmıştır. Bunun nedeni de, yukarıda da belirtildiği gibi disk difüzyon yönteminde kullanılan az miktardaki örnek olduğu düşünülmektedir.

4.5. Gümüş Nanopartiküllerin Antioksidan Çalışması

Bacillus ZGT9'dan elde edilen AgNP'lerin farklı konsantrasyonlarının (20-100 µg/ml) DPPH radikalini giderimi belirlenmiştir. Konsantrasyon arttıkça DPPH giderim yüzdesi de artmıştır ve %39,4 ile %70,0 aralığında değişmiştir. Şekil 4.14.'te değişen konsantrasyona göre DPPH radikalini giderim yüzdesi verilmiştir. En düşük konsantrasyon olan 20 µg/ml ve en yüksek konsantrasyon olan 100 µg/ml' de DPPH radikalini indirgeme yüzdesi sırasıyla %39,4 ve %70,0 olarak hesaplanmıştır.



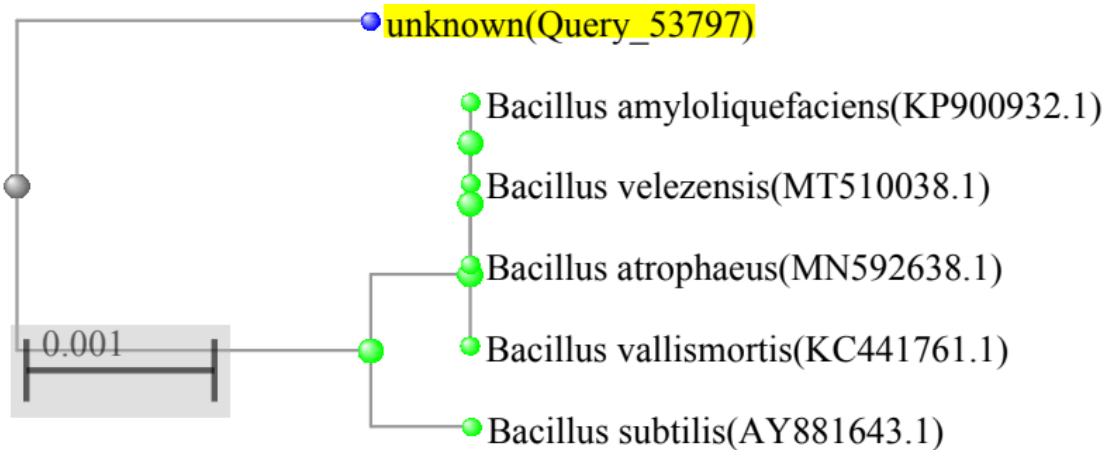
Şekil 4.14. Farklı konsantrasyonlardaki (20-100 µg/ml) AgNP' ün DPPH radikalini giderimi.

Bhakya ve arkadaşları (2016) *Helicteres isora* kök ekstraktı ile elde edilen AgNP'lerin DPPH radikalini indirgemesi ile antioksidan analizinde değerler bizim çalışmamıza benzer sonuçlar vermiştir. 10-100 µg/ml konsantrasyon aralığında çalışmışlar ve konsantrasyon arttıkça % inhibisyon değeri artmıştır. En yüksek konsantrasyon olan 100 µg/ml' de %90 inhibisyon değerlerine ulaşmıştır.

Bacillus safensis LAU13 suşu ile yapılan bir çalışmada DPPH radikali indirgeme aktivitesi 20-100 µg/ml konsantrasyon aralığında %40,56-89,40 gibi yüksek değerler elde edilmiştir (Lateef ve ark., 2015). Bu çalışmada aynı konsantrasyonlarla benzer değerler elde edilse de *Bacillus* sp. ZGT9 ile elde edilen AgNP'lerin daha az indirgeme kapasitesinin olduğu sonucuna varılmaktadır.

4.6. ZGT9'un Tanımlanması

16S rDNA gen dizi analizine göre *Bacillus* cinsi mensubu olduğu ve %98,9 oranında *Bacillus amyloliquefaciens* ile akraba olduğu Şekil 4.15.'te verilmiştir. Çalışmada kullanmak üzere izole edilen mikroorganizmanın çubuk şeklinde, Gram pozitif, katalaz pozitif ve spor oluşturabilen *Bacillus* cinsi bakteri olduğu bilinmektedir.



Şekil 4.15. *Bacillus* ZGT9 bakterisine ait 16S rDNA gen dizisi analiziyle elde edilen filogenetik ağaç.

BÖLÜM 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, gıda ve toprak örneklerinden izole edilmiş olan 28 adet *Bacillus* izolatının AgNP sentezi araştırılmıştır. Yapılan tarama çalışmasında Sakarya'dan alınan bir toprak örneğinden izole edilen *Bacillus* sp. ZGT9 suşunun yüksek oranda AgNP sentezleme yeteneğinde olduğu belirlenmiştir. Bu izolat ile NP üretim koşullarının optimizasyonu yapılmış ve üretilen NP'lerin çeşitli özellikleri belirlenmiştir. Ayrıca, izolatın 16S rDNA dizi analizine göre tanımlaması da yapılmıştır.

Yapılan optimizasyon çalışması sonucunda, nötr ve asidik ortamlarda AgNP sentezinin olmadığı, ancak ortam pH'sı alkali olduğunda gerçekleştiği anlaşılmıştır. Biyosentez için en uygun pH'nın da 8-9 olduğu belirlenmiştir. pH 10'da, AgNP sentezinden kaynaklanan renk değişimi en yoğun düzeyde olsa da, bu koşulda elde edilen NP'ler saflaştırılmadığından bu pH değerinde çalışmanın uygun olmadığı anlaşılmıştır.

Nanopartikül biyosentezine sıcaklığın etkisinin belirlendiği çalışmada düşük, sıcaklıkların biyosentez için uygun olmadığı gözlenmiş olup 30°C sıcaklıkta çok az renk dönüşümü olmuş, ancak UV-VIS spektumda belirgin pik oluşmamıştır. Artan sıcaklıkla birlikte biyosentez de artmış ve en iyi biyosentezin çalışılan maksimum sıcaklık olan 40°C'de olduğu saptanmıştır. FESEM görüntülerine bakıldığında 40°C'de aglomerasyon olduğu gözlenmiştir.

Gümüş nitrat konsantrasyonunun AgNP biyosentezine etkisi de belirlenmiş ve biyosentez oranının konsantrasyonla birlikte arttığı gözlenmiştir. Ancak, 8 mM konsantrasyondan daha yüksek konsantrasyonların biyosentezi artırmadığı anlaşılmıştır. Bunun sonucunda optimum konsantrasyon 8 mM olarak belirlenmiştir.

Belirlenen optimum koşullarda elde edilen AgNP saflaştırılarak kurutulmuş ve morfolojik özellikleri belirlenmiştir. FESEM görüntülerine göre, NP'lerin 1-50 nm çapında küresel/düzensiz küresel yapıda oldukları belirlenmiştir. EDX spektrometresi ile NP'lerin elementel yapısı incelenmiş ve %51,1 oranında Ag atomu olduğu saptanmıştır. Elementel analizde ayrıca belirlenen C, H ve N atomları reaksiyon ortamında bulunan protein gibi organik maddelerin NP'ler için kaplama ajanı görevi gördüğünü doğrulamaktadır.

Elde edilen NP'lerin antimikrobiyal etkileri hem Gram negatif hem de Gram pozitif özellikteki 8 farklı patojen bakteri ve 1 adet patojen maya üzerinde test edilmiş ve çalışılan bütün mikroorganizmalar için antimikrobiyal etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır. Bu bakteriler üzerine minimum inhibisyon konsantrasyonu 0,1-1,0 mg/ml arasında değişmiştir. En iyi etki ise *E. coli* O157:H7'de gözlenmiştir. *Bacillus* sp. ZGT9 ile üretilen AgNP'nin farklı özellikteki patojenlere etkisinin olması bu NP'lerin iyi bir alternatif antimikrobiyal ajan olduğunun bir göstergesidir. Ayrıca, NP'lerin antioksidan özellikleri de belirlenmiş olup DPPH radikalini giderme aktivitesinin %70'e kadar (100 µg/ml) çıkabildiği belirlenmiştir.

Bacillus sp. ZGT9 izolatu 16S rDNA gen dizisine göre tanımlanmış ve *Bacillus* cinsine ait olduğu tespit edilmiştir. Bu cins içinde en yakın akraba olduğu bakteri ise %98,9 oranla *Bacillus amyloliquefaciens* olmuştur.

Sonuç olarak, yerel bir izolat olan *Bacillus* sp. ZGT9 ile hem geniş spektrumlu antimikrobiyal hem de antioksidan aktiviteye sahip olan AgNP'leri sentezlenebilmiştir. Bu da bu izolatın endüstriyel önemini arttırmaktadır

KAYNAKLAR

- Akçay, F. A., Avcı, A. 2018. “Bakteriyel Yollarla Metal Nanopartiküllerin Sentezi,” Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology, 6(4), 408.
- Akçay, F.A. 2017. Bazı *Bacillus* suşlarının Bakır, Çinko ve Selenyum Nanopartikül Üretimlerinin Araştırılması, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği, Yüksek Lisans Tezi.
- Anees Ahmad, S., Sachi Das, S., Khatoon, A., Tahir Ansari, M., Afzal, M., Saquib Hasnain, M., Kumar Nayak, A. 2020. “Bactericidal activity of silver nanoparticles: A mechanistic review,” Materials Science for Energy Technologies, 3, 756–769.
- Bauer, A. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Am J clin pathol 45, 149-158
- Bhakya, S., Muthukrishnan, S., Sukumaran, M., Muthukumar, M. 2016. “Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their antioxidant and antibacterial activity,” Applied Nanoscience (Switzerland), 6(5), 755–766.
- Collera-Zúñiga, O., Jiménez, F. G., Gordillo, R. M. 2005. “Comparative study of carotenoid composition in three mexican varieties of *Capsicum annuum* L.”, Food Chemistry, 90(1), 109-114.
- Das, V. L., Thomas, R., Varghese, R. T., Soniya, E. V., Mathew, J., Radhakrishnan, E. K. 2014. “Extracellular synthesis of silver nanoparticles by the *Bacillus* strain CS 11 isolated from industrialized area”, 3 Biotech, 4(2), 121-126.
- Deljou, A., Goudarzi, S. 2016. “Green extracellular synthesis of the silver nanoparticles using Thermophilic *Bacillus* Sp. AZ1 and its antimicrobial activity against several human pathogenetic bacteria,” Iranian Journal of Biotechnology, 14(2), 25–32.
- Dey, B., Mukherjee, S., Mukherjee, N., Mondal, R. K., Satpati, B., Senapati, D., Babu, S. S. 2016. “Green silver nanoparticles for drug transport, bioactivities and a bacterium (*Bacillus subtilis*)-mediated comparative nano-patterning feature”, RSC Advances, 6(52), 46573-46581.
- Dhandapani, P., Maruthamuthu, S., Rajagopal, G. 2012. “Bio-mediated synthesis of TiO₂ nanoparticles and its photocatalytic effect on aquatic biofilm”, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 110, 43-49.
- Du, J., Yi, T. H. 2016. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Variovorax guangxiensis* THG-SQL3 and their antimicrobial potential, Materials Letters, 178, 75–78.

- Durán, N., Marcato, P. D., Durán, M., Yadav, A., Gade, A., Rai, M. 2011. “Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(5), 1609-1624.
- El-Dein, M. M. N., Baka, Z. A. M., Abou-Dobara, M. I., El-Sayed, A. K. A., El-Zahed, M. M. 2021 “Extracellular Biosynthesis, Optimization, Characterization and Antimicrobial Potential of *Escherichia coli* D8 Silver Nanoparticles,” *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 10(4), 648–656.
- Elegbede, J. A., Lateef, A., Azeez, M. A., Asafa, T. B., Yekeen, T. A., Oladipo, I. C., ... Gueguim-Kana, E. B. 2019. "Silver-gold alloy nanoparticles biofabricated by fungal xylanases exhibited potent biomedical and catalytic activities". *Biotechnology Progress*, 35(5).
- Ezhilarasi, P. N., Karthik, P., Chhanwal, N., Anandharamakrishnan, C. 2013. Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: A review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3): 628-647.
- Fouad, H., Hongjie, L., Yanmei, D., Baoting, Y., El-Shakh, A., Abbas, G., Jianchu, M. 2017. “Synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* to control filarial vector *Culex pipiens pallens* and its antimicrobial activity,” *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 45(7), 1369–1378.
- Gericke, M., Pinches, A. 2006. Biological synthesis of metal nanoparticles. *Hydrometallurgy*, 83(1): 132-140.
- Ghiuță, I., Cristea, D., Croitoru, C., Kost, J., Wenkert, R., Vyrides, I., Anayiotos, A., Munteanu, D. 2018. “Characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles biosynthesized using *Bacillus* species,” *Applied Surface Science*, 438, 66–73.
- Gottesman, R., Shukla, S., Perkas, N., Solovyov, L. A., Nitzan, Y., Gedanken, A. 2011. Sonochemical coating of paper by microbiocidal silver nanoparticles. *Langmuir*, 27(2): 720-726.
- Gurunathan, S., Park, J. H., Han, J. W., Kim, J. H. 2015. “Comparative assessment of the apoptotic potential of silver nanoparticles synthesized by *Bacillus tequilensis* and *Calocybe indica* in MDA-MB-231 human breast cancer cells: targeting p53 for anticancer therapy”, *International Journal of Nanomedicine*, 10, 4203.
- Gürmen, S., Ebin, B. 2008. Nanopartiküller ve üretim yöntemleri-1. *Metallurji Dergisi*, 150: 31-38.
- Habibullah, G., Viktorova, J., Ruml, T. 2021. “Current Strategies for Noble Metal Nanoparticle Synthesis,” *Nanoscale Research Letters*.
- Hays, S. A., Robert, J. S., Miller, C. A., Bennett, I. 2013. Nanotechnology in Cambridge: What do you think? In *nanotechnology, the brain, and the future*, Springer, 3: 357-371.

- Hsueh, Y. H., Lin, K. S., Ke, W. J., Hsieh, C. te, Chiang, C. L., Tzou, D. Y., Liu, S. T. 2015. "The antimicrobial properties of silver nanoparticles in *Bacillus subtilis* are mediated by released Ag⁺ ions," *PLoS ONE*, 10(12).
- Hulkoti, N. I., Taranath, T. C. 2014. Biosynthesis of nanoparticles using microbes—a review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 121: 474-483.
- Hulkoti, N. I., Taranath, T. C. 2014. Biosynthesis of nanoparticles using microbes—a review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 121: 474-483.
- Hulla, J. E., Sahu, S. C., Hayes, A. W. 2015. Nanotechnology: History and future. *Human and Experimental Toxicology*, 34(12): 1318-1321.
- Ijaz, I., Gilani, E., Nazir, A., Bukhari, A. 2020. "Detail review on chemical, physical and green synthesis, classification, characterizations and applications of nanoparticles," *Green Chemistry Letters and Reviews*, 59–81.
- İlyasoğlu, H., El, S. N. 2010. Nanoemülsiyonlar: Oluşumları, yapıları ve kollodial salınım sistemleri olarak gıda sektöründe kullanım alanları. *Gıda*, 35(2): 143- 150.
- Kim, E. S. 2008. Directed evolution: A historical exploration into an evolutionary experimental system of nanobiotechnology. *Minerva*, 46(4): 463-484.
- Lateef, A., Ojo, S. A., Akinwale, A. S., Azeez, L., Gueguim-Kana, E. B., Beukes, L. S. 2015. "Biogenic synthesis of silver nanoparticles using cell-free extract of *Bacillus safensis* LAU 13: Antimicrobial, free radical scavenging and larvicidal activities," *Biologia (Poland)*, 70(10), 1295–1306.
- Moghaddam, A. B., Namvar, F., Moniri, M., Md. Tahir, P., Azizi, S., Mohamad, R. 2015. Nanoparticles biosynthesized by fungi and yeast: A review of their preparation, properties, and medical applications. *Molecules*, 20(9): 16540- 16565.
- Mousavi, S. M., Hashemi, S. A., Ghasemi, Y., Atapour, A., Amani, A. M., Savar Dashtaki, A., Babapoor, A., Arjmand, O. 2018. "Green synthesis of silver nanoparticles toward bio and medical applications: review study," *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, S855–S872.
- Narayanan, K. B., Sakthivel, N. 2010. "Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes", *Advances in Colloid and Interface science*, 156(1), 1-13.
- Narayanan, K. B., Sakthivel, N. 2010. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Advances in Colloid and Interface Science*, 156(1): 1-13.
- Nayak, P. S., Arakha, M., Kumar, A., Asthana, S., Mallick, B. C., Jha, S. 2016. "An approach towards continuous production of silver nanoparticles using *Bacillus thuringiensis*," *RSC Advances*, 6(10), 8232–8242.
- Niraimathi, K. L., Sudha, V., Lavanya, R., Brindha, P. 2013. "Biosynthesis of silver nanoparticles using *Alternanthera sessilis* (Linn.) extract and their antimicrobial, antioxidant activities", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 288-291.

- Ovais, M., Raza, A., Naz, S., Islam, N. U., Khalil, A. T., Ali, S., Shinwari, Z. K. 2017. Current state and prospects of the phytosynthesized colloidal gold nanoparticles and their applications in cancer theranostics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(9): 3551-3565.
- Oyar, P. 2014. Dış hekimliğinde nanopartiküllerin kullanım alanları. *Atatürk Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 24: 49-55.
- Özdoğan, E., Demir, A., Seventekin, N. 2006. Nanoteknoloji ve Tekstil Uygulamaları. *Tekstil ve Konfeksiyon*, 3: 159-168.
- Prakash A, Sharma S, Ahmad N, Ghosh A, Sinha P. 2010. Bacteria Mediated Extracellular Synthesis of Metallic Nanoparticles. *International Research Journal of Biotechnology*, 1(5): 071-079.
- Prakash, A., Sharma, S., Ahmad, N., Ghosh, A., Sinha, P. 2011. "Synthesis of AgNPs by *Bacillus cereus* bacteria and their antimicrobial potential," *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 02(02), 155–161.
- Rajeshkumar, S., Malarkodi, C., Vanaja, M., Annadurai, G. 2016. Anticancer and enhanced antimicrobial activity of biosynthesized silver nanoparticles against clinical pathogens. *Journal of Molecular Structure*, 1116, 165-173.
- Salata, O. V. 2004. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology*, 2(1): 3.
- Saravanan, M., Barik, S. K., MubarakAli, D., Prakash, P., Pugazhendhi, A. 2018. "Synthesis of silver nanoparticles from *Bacillus brevis* (NCIM 2533) and their antibacterial activity against pathogenic bacteria," *Microbial Pathogenesis*, 116, 221–226.
- Sekhsaria, P. 2013. The making of an indigenous scanning tunneling microscope. *Current Science*, 104(9): 1152–1157.
- Shanmugasundaram, T., Radhakrishnan, M., Gopikrishnan, V., Pazhanimurugan, R., Balagurunathan, R. 2013. "A study of the bactericidal, anti-biofouling, cytotoxic and antioxidant properties of actinobacterially synthesised silver nanoparticles", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111, 680-687.
- Singh, R., Shedbalkar, U. U., Wadhwani, S. A., Chopade, B. A. 2015. "Bacteriogenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism, and applications", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(11), 4579-4593.
- Sinha, R., Khare, S. K. 2015. "Immobilization of halophilic *Bacillus* sp. EMB9 protease on functionalized silica nanoparticles and application in whey protein hydrolysis", *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(4), 739-748.
- Soliman, H., Elsayed, A., Dyaa, A. 2018. "Antimicrobial activity of silver nanoparticles biosynthesized by *Rhodotorula* sp. strain ATL72" *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(3), 228–233.

- Süfer, Ö., Karakaya, S. 2011. Gıda endüstrisi ve nanoteknoloji: Durum tespiti ve gelecek. Akademik Gıda, 9(6): 81-88.
- Süfer, Ö., Karakaya, S. 2011. Gıda endüstrisi ve nanoteknoloji: Durum tespiti ve gelecek. Akademik Gıda, 9(6): 81-88.
- Sürengil, G., Kılınç, B. 2011. Gıda-ambalaj sektöründe nanoteknolojik uygulamalar ve su ürünleri açısından önemi. Journal of Fisheries Sciences.com, 5(4): 317-325.ü
- Tiwari, M., Jain, P., Hariharapura, R. C., Narayanan, K., Bhat, U., Udupa, N., Rao, J. V. 2016. "Biosynthesis of copper nanoparticles using copper-resistant *Bacillus cereus*, a soil isolate", Process Biochemistry, 51(10), 1348-1356.
- Tolochko, N. 2009. History of nanotechnology. Nanoscience and Nanotechnology. Encyclopaedia of Life Support Systems (EOLSS), SEolss Yayıncılık, Oxford.
- Tsekhmistrenko, S. I., Bityutskyy, V. S., Tsekhmistrenko, O. S., Horalskyi, L. P., Tymoshok, N. O., Spivak, M. Y. 2020. "Bacterial synthesis of nanoparticles: A green approach," Biosystems Diversity, 9–17.
- Var, I., Sağlam, S. 2015. Gıda endüstrisinde nanoteknoloji uygulamaları. Gıda, 40(2): 101-108.
- Wang, W. X., Geng, L., Ding, S. ve Xu, S. K. 2012. "Facile synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial activity against several representative microbial species," Proceedings- 2012 International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology, iCBEB 2012, 287–290.
- Wei, X., Luo, M., Li, W., Yang, L., Liang, X., Xu, L., Kong, P., Liu, H. 2012. "Synthesis of silver nanoparticles by solar irradiation of cell-free *Bacillus amyloliquefaciens* extracts and AgNO₃" Bioresource Technology, 103(1), 273–278.
- Yılmaz Öztürk, B. 2019. "Intracellular ve extracellular green synthesis of silver nanoparticles using *Desmodesmus* sp.: Their antibacterial and antifungal effects," Caryologia, 72(1), 29–43.
- Yurtluk, T., Akçay, F. A., Avcı, A. 2018. "Biosynthesis of silver nanoparticles using novel *Bacillus* sp. SBT8," Preparative Biochemistry and Biotechnology, 48(2), 151–159.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nurdan KARTAL

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Sakarya Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Gıda Mühendisliği	2022
Lisans	Ege Üniversitesi / Mühendislik Fakültesi / Gıda Mühendisliği	2016
Lise	Figen Sakallıoğlu Anadolu Lisesi	2011

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer	Görev
2017-2018	Sakarya Üniversitesi	Proje Bursiyeri

YABANCI DİL

İngilizce

ESERLER (makale, bildiri, proje vb.)

1. Avcı A, Toprak N, Akçay F.A. Bir *Bacillus* izolatu ile gümüş nanopartikülü biyosentezine reaksiyon koşullarının etkisi. Türkiye 13. Gıda Kongresi, Ekim 2020, Çanakkale. p.245 (Sözlü sunum).

2. Avcı A, Toprak N. Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles Produced Extracellularly by *Bacillus* sp. ZGT9. 1st International Congress of TURJAF, 8-10 Nov 2019, Antalya Turkey (Poster).

