T.C.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ

KOORDİNASYON BİRİMİ

Gümüş Nanopartiküllerinin Mikrobiyal Sentezi, Yapısal Analizi, Antimikrobiyal ve Antikanser Özelliklerinin Belirlenmesi

Proje No: THD-2016-6466

Hızlı Destek Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Dr. Berrak ALTINSOY

Eczacılık Fakültesi/ Farmasötik Teknoloji Bölümü

Araştırmacı:

Yrd.Doç.Dr. Gökçe ŞEKER KARATOPRAK

Yrd.Doç.Dr. İsmail ÖÇSOY

EKİM 2016

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde araştırmacılara maddi destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje (ERÜ BAP) Koordinasyon birimine teşekkürlerimizi sunarız.

İÇİNDEKİLER

KAPAK.....1
BOŞ SAYFA 2
TEŞEKKÜR 3
İÇİNDEKİLER 4
ŞEKİLLER LİSTESİ 6
TABLOLAR LİSTESİ 7
ÖZET…… 8
ABSTRACT…… 9
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....10
2. GENEL BİLGİLER 12
2.1. Gümüş Nanopartikülleri.....13
2.1.1. Gümüş Nanopartikül Sentezi 14
2.1.1.1. Kimyasal ve fiziksel yöntemler 14
2.1.1.2 Biyolojik yöntemler 15
2.1.1.2.2 Gümüş nanopartiküllerinin mantarlarla sentezi 17
2.1.2. Gümüş Nanopartiküllerinin Antimikrobiyal Özellikleri 18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....21
S. cerevisiae Kültürü.....21
AgNp'nin Biyosentezi.....21
AgNp Karakterizasyonu 21
Antimikrobiyal Aktivitenin Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) Belirlenmesi 21
Disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal etkinin test edilmesi 23
Sitotoksik Etkinin Sulforhodamin B (SRB) Kolorimetrik Gelişme İnhibisyonu
Testi ile Belirlenmesi…… 23
4. BULGULAR.....23
4.1. Ag Nps'Lerin Sentez ve Karakterizasyonu.....23
4.1.1.Zeta sizer ile boyut analizi.....25
4.1.2. SEM analizi 26
4.2. AgNPs'lerin *In vitro* antimikrobiyal aktivitesi.....27
4.3. AgNPs'lerin MCF-7 Hücre Hattındaki Sitotoksitesi……. 30

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 31

6.KAYNAKLAR.....36

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil. 2.1: Kimyasal sentez (A), bakteri kullanılarak yapılan biyolojik sentez (B)……16

Şekil4.1: Bakteriyel hücre kültürüne $AgNO_3$ çözeltisi ile muamele öncesi (A) ve 1 mM $AgNO_3$ sonrası (B), 5 mM $AgNO_3$ sonrası (C)……..23

Şekil 4.2: *S. cerevisiae* kültüründen sentezlenen AgNp'nin absorbsiyon spektrumu.1 mM $AgNO_3$ sonrası (A), 5 mM $AgNO_3$ sonrası (B)……..24

Şekil 4.3: Partikül büyüklük dağılımı. 1 mM $AgNO_3$ sonrası (A), 5 mM $AgNO_3$ sonrası (B) ……..26

Şekil 4.4: *S. cerevisiae* ekstraktı ile elde edilen AgNPs'nin SEM görüntüleri. 1 mM $AgNO_3$ sonrası (A), 5 mM $AgNO_3$ sonrası (B)……..27

Şekil 4.5: *S. cerevisiae* ekstraktı ile elde edilen AgNPs'nin MİK sonuçları. 1 mM $AgNO_3$ sonrası (AgNPs-1), 5 mM $AgNO_3$ sonrası (AgNPs-2)……...28

Şekil 4.6: Sentezlenen AgNP'lerin MCF-7 hücre hattına karşı canlılık etkisi……31

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: Mantarlardan gümüş sentezi ve sentezlenen gümüş boyutları 17

Tablo4.1: Sentezlenen AgNPs'lerin disk difüzyon sonuçları. 1 mM $AgNO_3$ sonrası (A), 5 mM $AgNO_3$ sonrası (B) 29

GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİNİN MİKROBİYAL SENTEZİ, YAPISAL ANALİZİ VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

ÖZET

Nanogümüş (AgNp)' ün tanı, tedavi, ilaç salınımı, tıbbi cihaz kaplama ve kişisel sağlık bakımı dahil pekçok biyomedikal uygulamada geniş kullanım alanına sahip olması diğer nanomateryaller arasında onu en dikkat çekici kılmaktadır. Fiziksel ve kimyasal metotlar AgNp sentezi için kullanılan başlıca yöntemlerdir. Kimyasal ve fiziksel yöntemlerdeki sorun sentezin pahalı olması ve toksik maddeleri adsorbe etmeleridir. Bu yöntemlerin aksine, AgNp'nin biyosentezi (yeşil sentez), protein, peptid, karbohidrat ve çeşitli türlerde bakteri, mantar, maya, alg ve bitkileri kullanan çevre dostu bir sentez metodu olmasından dolayı büyük ilgi görmektedir. Başlıca biyolojik sistemler bakteri, maya ve bitki özütlerini içermektedir. AgNp'nin tıp alanındaki temel kullanımı tanı ve terapötik uygulamaları içermektedir. Çoğu terapötik uygulama bu partiküllerin antimikrobiyal özelliğini araştırmaya yöneliktir.

Bu çalışmada, AgNp *Saccharoyces cerevisiae'*dan biyosentezi biyolojik metoda göre yapılmış ve elde edilen nanopartikülün kalitesi, morfolojisi ve boyutu UV-visible (UV–vis) absorption spektroskopisi, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve zeta potansiyel (ZT) ile karakterize edilmiştir. Ek olarak, Bu nanopartikülün insan patojenlerine karşı antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Sentezlenen nanopartiküller UV–vis spektorskopisi sonuçlarına göre 256 nm ve 251 nm'de maksimum absorbans göstermiştir (sırasıyla 1 mM $AgNO_3$, 5 mM $AgNO_3$). Gümüş nanopartikülleri ve küresel şekilleri 1 mM $AgNO_3$ için ortalama 323 nm ve 5 mM $AgNO_3$ için 3505 nm boyutunda elde edilmiştir. Ayrıca sentezlenen gümüş nanopartikülleri menenjit etkeni patojenlere karşı güçlü antibakteriyel aktivite ve meme kanser hücre hattı olan MCF-7 hücrelerine karşı antikanser etki göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: gümüş nanopartikülleri, biyosentez, antimikrobiyal aktivite, antikanser aktivite

MICROBIAL SYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES, STRUCTURAL ANALYSIS AND DETERMINATION OF ANTIMICROBIAL PROPERTIES

ABSTRACT

AgNp, are among the most attractive nanomaterials, and have been widely used in a range of biomedical applications, including diagnosis, treatment, drug delivery, medical device coating, and for personal health care. The major methods used for AgNp synthesis are the physical and chemical methods. The problem with the chemical and physical methods is that the synthesis is expensive and can also have toxic substances absorbed onto them. Biosynthesis (green synthesis) of nanosilver has received extensive attention due to the growing need for environmentally friendly synthesis methods that use eco-friendly reducing agents, such as protein, peptides, carbohydrate, various species of bacteria, fungi, yeast, algae and plants. The major biological systems involved in this are bacteria, fungi, and plant extracts. The major applications of silver nanoparticles in the medical field include diagnostic applications and therapeutic applications. In most of the therapeutic applications, it is the antimicrobial property that is being majorly explored.

In this study, biosynthesis of nanosilver from *Saccharomyces cerevisiae* was done according to the biological extraction method and the obtained AgNp will be characterized by means of UV-visible (UV–vis) absorption spectroscopy scanning electron microscopy (SEM) and zeta potential (ZT) to evaluate their quality, morphology and size. In addition, its in vitro antibacterial activity was tried against human pathogenic bacteria. The nanoparticles exhibited maximum absorbance at 256 and 251 nm in UV–vis spectroscopy (respectively 1 mM $AgNO_3$, 5 mM $AgNO_3$). The synthesized Ag NPs were found to be spherical in shape with average size of 323 nm for 1 mM $AgNO_3$ and 3505 nm for 5 mM $AgNO_3$. Moreover, the synthesized Ag NPs showed antibacterial activity against meningitidis pathogens and anticancer activity against MCF-7 cells which are breast cancer cell line.

Keywords: silver nanoparticles, biosynthesis, antimicrobial activity, anticancer

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nanopartiküller fiziksel, biyolojik ve farmasötik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle gümüş nanopartikülleri hücre zarından çabuk geçebilmesi, antibakteriyel, antivirüs ve antifungal etkilerinden dolayı, dokumacılık, tekstil ve halı sanayisinden, ilaç endüstrisine kadar sayısız birçok sahada kullanılmaktadır. Pek çok literatürde gümüş nanopartiküllerinin fiziksel, kimyasal ve biyolojik sentez metotları tanımlanmıştır. Oldukça pahalı ve potansiyel çevresel ve biyolojik risk oluşturabilecek tehlikeli kimyasalların kullanımı gümüş nanopartikül sentezinde fiziksel ve kimyasal metotların tercih edilmemelerinin en temel faktörleridir. Ayrıca kimyasal sentez metotları çoğu durumda bazı toksik maddelerin yüzey üzerinde emilimine yol açarak onların tıbbi kullanımlarını engelleyebilir. Gümüş nanopartiküllerin biyosentez ile eldesi, yeşil sentezinden ve stabil yapısından dolayı kimyasal üretime alternatiftir. Kimyasal ve fiziksel metotlar ile sentezlenen gümüş nanopartiküllerinin pahalı olması ve üretim esnasında çeşitli toksik kimyasalların kullanımının aksine uygulama kolaylığı, toksik olmaması ve hızlı sentezi biyolojik üretimi daha tercih edilir bir seçenek haline getirmektedir. Biyojenik gümüşün piyasada kimyasal üretilen nano gümüş ile rakabet edebilmesi için aynı fiyatta ya da daha ucuz üretilmesi gerekir. Bu da biyojenik gümüş üretimini en iyi verim ile sağlayabilecek doğru biyolojik sistemi seçerek gerçekleştirilebilir. Nanopartikülün işlevselliğini, şeklini ve boyutunu ve üretilen nanopartikülün antimikrobiyal, toksikolojik ve katalitik özelliklerini bu biyolojik sistem belirlemektedir. Bu yüzden mikroorganizma ve bitkilerin kullanıldığı biyolojik metotlar gümüş nanopartikül sentezi için uygulanabilir alternatif bir metottur. Önerilen projede, *S. cerevisiae* kültür süpernatantı kullanılarak AgNp sentezi amaçlanmıştır. *S. cerevisiae'*nın, büyük ölçekli ve pahalı olmayansıvı kültür ortamlarında üreme yeteneğine sahip olması, kolayca inoküle edilebilir ve hızlı üreme potansiyelinden ötürü istenilen ürünü kısa zamanda üretebileceği düşünülmektedir. Ayrıca *S. cerevisiae'*nın, özellikle insanlara ve ekonomik önemi olan bitki ve hayvanlara patojenik olmaması bu mikroorganizmanın çalışmadaki önemini ortaya koymaktadır. Bu partiküllerin karakterizasyonu ve biyolojik aktivitelerinin değerlendirilmesi için çeşitli yöntemler kullanılmıştır. AgNp'nin zamana bağlı oluşumu UV-vis spektrofotometre, boyut ve morfolojikyapısı SEM, etkin boyutu ve yüzey yükü zeta potansiyel (ZT) kullanılarak tespit edilmiştir. Beyin omurilik zarının ya da merkezi sinir sisteminin iltihaplanması sonucu oluşan bakteriyel menenjit gibi hastalıklarda patojen

türüne bağlı olarak çeşitli antibiyotik tedavileri uygulanmasına rağmen buantimikrobiyal ajanların enfeksiyon bölgesi olan beyin-omurilik sıvısına etkili oranda geçmesitedavinin uygulanabilmesi bakımından çok önemlidir. Bu nedenle bakteriyel menenjit tedavisinde kullanılacak antimikrobiyal ajanın bakterisidal konsantrasyonlara ulaşması gerekir. Bakterisidal konsantrasyonun sağlanmasında kan-beyin engelini geçiş en önemli etkendir. *S.cerevisiae*'dan biyosentez ile elde edilen AgNp'nin antimikrobiyel aktivitesi, menenjit etkeni olduğu bilinen patojen mikroorganizmalar üzerinde araştırılmıştır. Ayrıca bu partiküllerin antikanser aktivitesi MCF7 (ATCC HTB-22) hücrelerine karşı Sulforhodamin B (SRB) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Nano öneki yunanca cüce anlamındaki nanos kelimesinden türetilmiş ve herhangi bir ölçünün milyarda biri anlamına gelmektedir. Bir nanometre, metrenin milyarda birini (1nm=0,000000001 m) ifade etmektedir. Nanoteknoloji kavramı Richard Feynman'ın 1959 yılında Amerikan Teknoloji Enstitüsünde ki "There is Plenty of Room at the Bottom" başlıklı konuşmasında atomlar ve moleküllerin çok hassas aletler kullanarak, çok küçük boyutlarda işlem yapılabileceğini tanımlamasıyla ortaya çıkmıştır.

Nanoteknoloji kelimesini Japon bilim adamı Norio Taniguchi: "Nanoteknoloji genel olarak, maddelerin bir atomla veya bir molekülle ayrılma, birleştirilme, şekil bozulma ve sağlamlaştırılma işlemidir" ifadesiyle tanımlamıştır. Son yıllarda nanoteknoloji araştırmaları fizik, kimya, biyoloji, malzeme bilimi ve tıbbı içine alan disiplinler arası bir teknoloji olarak ortaya çıkmaktadır (1).

Günümüzde gelişmiş materyallerin atomik veya moleküler ölçekten makroskobik ölçeğe sentez süreci atomların ve moleküllerin düzenli, oluşumunu ön plana çıkarmaktadır. Genellikle 1- 100 nm arasındaki fiziksel boyut, yüzey ve arayüzey ile karakterize edilen nano yapılı materyaller; bilinen materyaller ile karşılaştırıldığında ispat edilmiş veya ümit edilen eşsiz özelliklerinden dolayı çok fazla ilgi çekmektedir. Nanopartikül sentezi genellikle iki farklı yaklaşımla gerçekleştirilir ve bu yaklaşımlar ya yukarıdan aşağıya ya da aşağıdan yukarıya doğrudur. Nano yapılı materyaller "yukarıdan aşağıya" yaklaşımı ile makro ölçekten nano ölçeğe doğru iri taneli materyallerin aşındırılması ile yani yığın malzeme kademeli bir şekilde nanoboyuta indirilir veya tam zıttı şekilde "aşağıdan yukarıya" yaklaşımı ile atomların veya parçacıkların bir araya gelmesi ile nanometre mertebesinde yapılar oluşturulur (1). Nano ölçekten makro ölçeğe atomların düzenlemesinin kontrolü materyalin kimyasal karakteri ile doğrudan orantılıdır (2).

Nanomateryaller nanokristal, nanotanecik, koloidal kuantum noktaları gibi birçok şekilde adlandırılmaktadır. Faraday'ın 1800'lerin ortasında koloidal altın araştırmalarına başlaması ile metal nonotaneciklerin üstün optik özellikleri fizik ve kimya çevrelerince araştırılmaya devam eden bir konu olmuştur (3). Metal nanotaneciklerin özellikleri yığın yapının özeliklerine benzememektedir ve sahip oldukları bu yeni özelikler sayesinde günümüzde metal nanotanecikleri özellikle elektronik (Bilgisayar teknolojisi, hafıza kartları, Televizyon teknolojisi, elektronik cihazlar, mobil iletişim sistemleri, Optik sistemler, Sensörler,

dedektörler, lazerler, Tıpta görüntüleme teknolojileri), malzeme bilimi (Hidrojen üretimi ve bataryalar, Filtre sistemleri, yapıştırıclar, parlatıcı maddeler, boyalar, Biyoanaliz sistemleri, ayrıştırma teknolojileri, Nanotüp içeren bileşikler, kimyasal kaplamalar, alaşımlar, akıllı malzemeler), nanotıp gibi yeni teknolojilerde geniş kullanım alanına sahip olmaktadır ve bilim adamlarının oldukça ilgisini çekmektedir (4).

2.1. Gümüş Nanopartiküllerî

Gümüşün özellikleri, 2000 yıldan fazla süredir bilinmektedir. Gümüş bazlı bileşikler antimikrobiyal uygulamalarda 19. yüzyıldan beri kullanılmaktadır. Bu nanopartiküllerin sayısız fiziksel, biyolojik ve farmasötik uygulamalarda kullanıldığı bilinmektedir. Gümüş nanopartikülleri Çin'de demiryolu istasyonları, asansörler gibi birçok toplumsal alanda antimikrobiyal ajan olarak kullanılmakta ve iyi antimikrobiyal etki gösterdikleri literatürde ifade edilmiştir (5,6). Gümüşün bu yönü onu tıp alanında birçok rol oynayan mükemmel bir seçim yapmaktadır. Antimikrobiyal etki için gümüşün genellikle nitrat formları kullanılır ama gümüş nanopartikülleri kullanıldığında maruz kalınan mikrop için mevcut yüzey alanında büyük bir artış vardır. Birçok antibakteriyel uygulamada kullanımları bulunmuş, mikroplardaki etkisi tam olarak bilinmemektedir. Hücrelerde lizis hücre transdüksiyonunu inhibe ettiği varsayılmaktadır. Hücre lizizi ve büyüme inhibisyonuna dair çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır (7).

Gümüş nanopartiküllerinin birçok alanda kullanımı keşfedilmiştir. Kullanılan başlıca uygulamalar katalizörler, optik sensörlerde zeptomol 10^{-21} konsantrasyonunda, tekstil mühendisliğinde, elektronik aletlerde, optik sektöründe ve en önemlisi tıbbi alanda baktesidal ve terapötik ajan olarak kullanılırlar. Gümüş iyonları dental reçine kompleks formülasyonlarında, tıbbi cihaz kaplamalarında, su filtrelerinde bakteriyel tabaka amacıyla, hava dezenfekte edici spreylerde antimikrobiyal ajan olarak, yastıklarda, solunum cihazlarında, ıslak mendillerde, çoraplarda, deterjanlarda, sabunlarda, diş macunlarında, bulaşık makinelerinde ve çok sayıda tüketici ürününde kemik dolgu maddesi olarak ve yara pansumanında kullanılmaktadır. Gümüş nanopartiküllerinin birçok avantajı olmasına rağmen aynı zamanda nanotoksisite problemi de bulunmaktadır. Birçok literatür gümüş nanopartiküllerinin birçok çevresel ve sağlıksal problemlere yol açabileceğini öne sürmektedir. Gümüş nanopartikkülleri ile alakalı geçek bir sorun olup olmadığına dair daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (7).

2.1.1. Gümüş Nanopartikül Sentezi

Gümüş nanopartiküllerin (AgNps) değişik boyut, yük ve özelliklere sahip olması onları farklı uygulamalar için kullanılır hale getirmiştir. İstenen karaktere sahip AgNps, farklı kimyasal ve fiziksel yöntemler kullanılarak sentezlenmektedir (Şekil 2.1). Fiziksel ve kimyasal yöntemler çok sayıdadır, çoğu pahalıdır ve toksik maddelerdir. Bu sebepler sentezin tercih edilmeme nedenleridir. Bu yöntemlere alternatif olarak bitkilerin ve mikroorganizmaların kullanıldığı biyolojik yöntemler daha tercih edilebilir hale gelmiştir.

2.1.1.1. Kimyasal ve fiziksel yöntemler

Gümüş nanopartiküllerin sentezi için farklı kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Gümüş nanopartikülleri 'top down' ve 'bottom-up' denilen iki yöntemle de elde edilebilir. Top-down metodu mekanik olarak metallerin öğütülmesi ve nano metal parçacıkların kolloidal koruyucu ajanların eklenmesiyle stabilizasyonunu içerir (8,9). Bottom-up metodu metallerin redüksiyonu, elektrokimyasal yöntemleri ve kısa süreli ayrışmayı içerir. Genel olarak ıslak kimyasal adı verilen yöntemler arasında, farklı indirgeyici kimyasalların kullanımı sırasında, gümüş nitrat tuzlarında indirgenme ortaya çıkmaktadır. Bu indirgenme sırasında gümüş iyonları belli bir kristal yapısında bir araya gelince, küresel yapıda gümüş nanopartiküller elde edilir. Birçok kimyasal ve fiziksel yöntemlerin bulunmasının yanında en basit kimyasal metot metalik $AgBF_4$, $NaBH_4$ tuzlarının redüksiyonuyla gerçekleşir. 3-40 nm aralığındaki nanopartiküllerin transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) ve UV-görünür (UV-vis) absorbsiyon spektroskopisi ile karakterizasyonu ile kaliteleri değerlendirilir (10). Borohidrit, sodyum sitrat, R-COH: glikoz, laktoz, maltoz ve galaktoz, polietilen glikol AgNps sentezi için kullanılan indirgeyici ajanlardandır (11).

Sono ayrışma gümüş nanopartikül ürünleri verir. Bu olay ultrasonik dalgaların kullanımı ile kavitasyonu indükleyerek ultrasonik dalgaların sulu çözeltiden geçişi ve mikroskobik kabarcıkların oluşumu ile bu karbarcıkların genişleyip patlamasıyla gerçekleşir. Gümüş nanopartiküllerinin sentezi bir sulu $AgNO_3$ çözeltisinin sonokimyasal redüksiyonu ile argon-hidrojen atmosferinde gerçekleşir. TEM, X-ray kırınımı, absorbsiyon spektroskopisi, differansiyel tarama kalorimetrisi ve EPR spektroskopisi ile karakterize edilen gümüş nanopartikülleri 20 nm çapında bulunmuşlardır. Sonokimyasal redüksiyonun mekanizması sonikasyon sürecinde hidrojen radikallerinin üretimine dayanmaktadır (12).

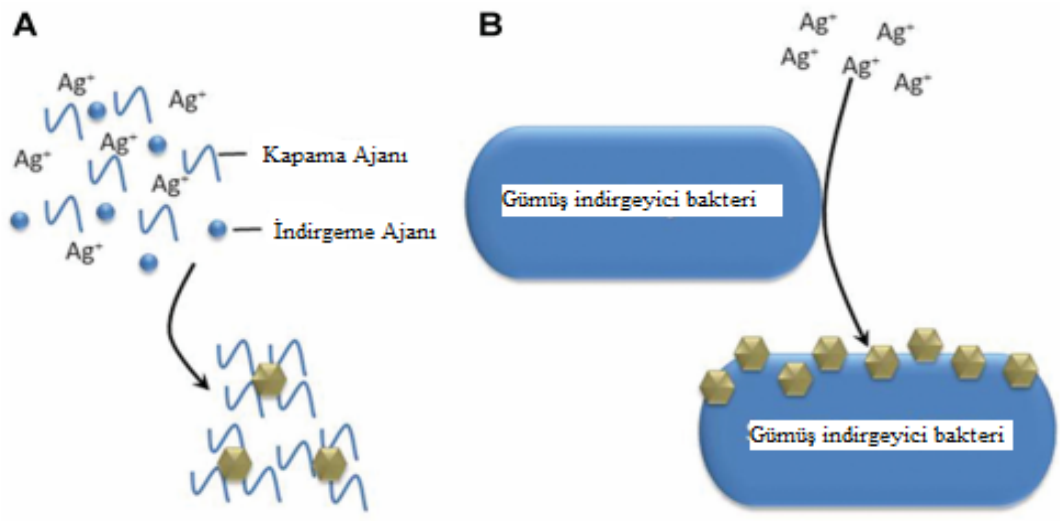
Nanopartiküllerin sentezi aynı zamanda şablonal olarak sulu köpük yapılarının içerisinde de gerçekleşir. Metot gümüş iyonlarının elektrostatik kompleksle anyonik bir sürfaktan aeresolle birlikte yüksek kararlılıkta sıvı form içerisinde gerçekleşir. Köpük daha sonra akıtılır ve sodyum borohidrid katılmasıyla indirgenir. Bu gümüş nanopartikülleri solüsyon içerisinde son derece stabildir. Bahsedilen aeresol bunları stabilize eder. Bu metot 5 ila 40 nm çapında nanopartikülleri verir (13).

Gümüş nanopartiküllerinin mikrodalga ile sentezi nanopartiküllerin değişken frekanslı mikrodalga radyasyonun konvansiyonel ısıtma yöntemine karşı olarak kullanılması sonucunda nanopartiküllerin redüksiyonu ile gerçekleşir. Bu metot aynı sıcaklıkta daha hızlı reaksiyon verir ve daha yüksek konsantrasyonda partiküller verir. Aynı zamanda poly(N-vinylpyrrolidone) konsantrasyonunun yükseltilmesiyle nanopartikül boyutunun daha küçük olduğu (15-25 nm) (14) yüksek konsantrasyonda gümüş nitrat kullanıldığı, reaksiyon zamanının daha uzun olduğu, sıcaklığın yüksek olduğu, partiküllerin daha büyük olduğu tespit edilmiştir.

Bunun yanında gümüş nanopartiküllerinin organik solventlerde termal ayrıştırma (15), ters misellerdeki kimyasal ve fotolitik yöntem (16,17), kıvılcım deşarjı (18) ve radyokimik sentez (19) gibi birçok teknikle de sentezi gerçekleştirilebilmektedir. Sonucunda 5-80 nm çapında nanopartiküller elde edilebilmektedir (7).

2.1.1.2 Biyolojik yöntemler

Biyosentez, biyolojide canlı organizmalardaki kimyasal süreçleri belirten terimdir ve enerji kullanılarak gerçekleştirilen bu süreçler basit yapıdaki maddelerden daha karmaşık ürünler elde edilmesini sağlar. Nanoteknolojideki tanımı ise bitki ekstraktı ya da bakteri, mantar, maya, alg, virüs v.b. canlı organizmaları kullanarak nanopartikül sentezlemektir (Şekil 2.1) (20).



Şekil 2.1. Kimyasal sentez (A), bakteri kullanılarak yapılan biyolojik sentez (B).

Kimyasal sentezde, gümüş iyonları gümüş çekirdeğini oluşturan bir kimyasal indirgeme ajanı (reducing agent) ile sıkıştırılmıştır. Partiküller kümeleşmeyi önleyen bir kapama ajanı (capping agent) tarafından kontrol edilir. Biyolojik sentezde, indirgeme ve kapama ajanının her ikiside mikroorganizma tarafından sağlanır. İyonların çöktürülmesi ve stabilize edilmesi bakteri hücre duvarı üzerinde bulunan fonksiyonel gruplar tarafından yapılır (20).

Çoğu kimyasal ve fiziksel yöntemlerde ki problem nanopartikül üretiminin oldukça pahalı olması ve birçok çevresel ve biyolojik risklere potansiyel oluşturan zehirli ve tehlikeli kimyasalların kullanımıdır. Gümüş nanopartiküllerinin sentezinin daha ucuza gerçekleştirilmesi, çevresel ve ekonomik olarak daha iyi şartlarda üretim ihtiyacı kaçınılmazdır. Bu tarz yöntemlerin arayışı biyomimetik üretimle biyolojik yöntemlere yönelimi karşımıza çıkarmaktadır. Artan ihtiyaç çevreye zarar vermeyen ve daha ekonomik malzemeler için uygun teknolojik materyal sentezi biyomimetik sentez yöntemlerinin araştırılmasına yol açmıştır (21). Çoğu durumda kimyasal sentez metotları toksik maddelerin yüzeyde emilmeleri doğrultusunda tıbbi uygulamalardaki kullanımlarını engelleyebilir (22). Bakteri, mantar ve bitki özütleri gümüş nanopartiküllerin biyolojik sentezinde kullanılan üç temel kaynaktır. Gümüş nanopartiküllerinin biyosentezinde bottom-up yaklaşımında çoğunlukla redüksiyon/oksidasyon reaksiyonu gerçekleşir. Mikrobiyal enzimler ya da bitkisel fitokimyasallar istenilen nanopartiküller için kullanılan indirgeyici ve antioksidan özellikteki bileşenlerdir. Nanopartikül hazırlamada kullanılan üç ana bileşenle yapılan sentez yöntemlerinde çevre dostu redükleyici ajan ve toksik olmayan stabilize edici ajan kullanılmaktadır (7).

2.1.1.2.1 Gümüş nanopartiküllerinin mantarlarla sentezi

Bakterilerle sentezle karşılaştırıldığında mantarlar daha büyük miktarlarda partikül üretebilmektedir. Çünkü mantarlar yüksek verimlilikte nanopartikül üretimi yapan daha büyük miktarlarda protein salgılarlar (23). Mantarlarla nanopartikül sentezi şu aşamalar takip edilerek gerçekleştirilir: mantar hücre yüzeyinde Ag^+ iyonları yakalanır ardından fungal sistemlerdeki enzimlerin varlığında gümüş iyonları indirgenir (24). Naftokinonlar ve antrakinonlar gibi ekstraselüler enzimler redüksiyonu kolaylaştırır. *F. oxysporum* örneği göz önüne alındığında NADPH-bağımlı nitrat redüktaz enziminin ve ektraselüler kinin transfer prosesinin, nanopartikül formasyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir (25). Mantarlarla nanopartikül sentezi tam olarak deşifre edilmiş değildir. Yukarıda bahsedilen olgunun prosesten sorumlu olduğuna inanılmaktadır. Mikroorganizmların gümüş nanopartiküllerini sentezlemede kullanmanın en büyük dezavantajı bitki özütleri ile karşılaştırıldığında prosesin daha yavaş işlemesidir. (Tablo 2.1)

Tablo 2.1. Mantarlardan gümüş sentezi ve sentezlenen gümüş boyutları

	Organizma	Partikül boyutu (nm)	Kaynak
1	*Verticillium* sp.	25	(41)
2	*Phoma* sp. 3.2883	70	(42)
3	*F. oxysporum*	20-50	(43)
4	*Phanerochaete chrysosporium*	100	(44)
5	*Aspergillus fumigatus*	5-25	(45)
6	*Aspergillus flavus*	7-10	(46)
7	*Fusarium semitectum*	10-60	(47)
8	*Coriolus versicolor*	350-600	(48)
9	*Fusarium solani*	5-35	(49)
10	*Aspergillus clavatus*	10-25	(50)

2.1.2. Gümüş Nanopartiküllerinin Antimikrobiyal Özellikleri

Gümüş nanopartiküllerinin antimikrobiyal etki mekanizmaları tam olarak bilinememektedir ve bu konu ile ilgili pekçok teori bulunmaktadır.

Gümüş nanopartiküllerinin bakteri hücre duvarı ile etkileşime girerek sonradan nüfus edici bir yeteneği vardır. Böylece hücre zarında membran geçirgenliği ve hücre ölümü gibi yapısal

değişikliklere sebep olabilmektedir. Nanopartiküllerin hücre yüzeyinde 'çukur' oluşumu ve birikimi gözlenebilmektedir. Serbest radikal formları hücrenin ölümüne yol açabilecek farklı bir mekanizmaya yol açabilirler. Serbest radikallerin bakteri ile temasında hücre membran ve porlarında hücre ölümüne götüren zarar yeteneğini öne süren elektron spin rezonans spektroskopi çalışmaları mevcuttur (26,27).

Ayrıca nanopartiküllerden gümüş iyonlarının salınabileceği ileri sürülmüştür (28). Bu iyonlar birçok hayati enzimin tiyol gruplarıyla etkileşime girebilir ve enzimleri inaktive edebilir (29). Gümüşe maruz kalan bakteri hücrelerinin çeşitli fonksiyonları inhibe olur ve hücre zarar görür. Reaktif oksijen tür jenerasyonları bulunmaktadır. Bunlar muhtemelen gümüş iyonlarının solunum enzimlerini inhibe ederek hücreye saldırmasıyla ortaya çıkar. Gümüş zayıf asittir. Asit ve baz arasında doğal bir reaksiyona girme eğilimi vardır. Bu durumda zayıf asit zayıf baz ile reaksiyona girer (30). Hücreler zayıf baz olan sülfür ve fosfat yapıları içermektedir. Nanopartiküllerin hücrelerdeki etkisi reaksiyon sonrasında hücre ölümüne götürür. Başka bir olgu ise DNA ana bileşenleri olarak sülfür ve fosfor bileşenleri içerir. Nanopartiküller bu zayıf bazlarla DNA'yı parçalayabilir ve hücre ölümüne götürebilir (31). Gümüş nanopartikülleri bakteri DNA'sındaki sülfür ve fosfor bileşikleriyle etkileşimi bakteride DNA replikasyonunda problemlere neden olarak mikroorganizmaları öldürebilir.

Nanopartiküllerin aynı zamanda bakterilerdeki sinyal transdüksiyonunu azaltıcı etki gösterildiği de keşfedilmiştir. Bakteride protein substratlarının fosforilasyonu bakterideki sinyal transdüksiyonunu etkilediği bilinen bir gerçektir. Defosforilasyonun sadece gram (-) bakterilerin tirozin kalıntılarında olduğu belirtilmiştir. Bakteriyel peptidlerin fosfotirozin profili nanopartiküller ile değiştirilir ve bu nanopartiküller, tirozin kalıntılarındaki peptid substratlarını defosforile ederler. Sonuç olarak sinyal iletimi inhibe olur ve hücre büyümesi durdurulur (32).

2.1.3. Gümüş nanopartiküllerinin tıbbi uygulamaları

Gümüş nanopartiküllerinin çeşitli özellikleri nedeniyle insan yaşamında günden güne farklı kullanım alanları keşfedilmektedir. Ev temizliğinde kullanılan kimyasallarda, kumaş temizleyicilerde, kaplamalarda, solar enerji kollektörlerindeki ısı transferini arttırmak için yakıt tanklarında, yüksek performanslı hassas elektronik cihaz üretimlerinde ve diğer yüzlerce uygulamada kullanımları mevcuttur.

Gümüş nanopartikülleri ile ilgili genel görüş küçük boyuttaki nanopartiküllerin, parçacığın daha geniş bir yüzey alanında etki göstererek etkisinin artması yönündedir. Partiküllerin nano boyutu aynı zamanda gümüş partiküllerinin penetrasyon potansiyelini artırır, böylece metalin özelliklerinden daha iyi yararlanılmasına neden olur. Sadece boyut faktörüne dayanarak nanopartiküller, dolaşım sistemine nüfuz etme hatta insan sisteminde kan-beyin bariyerine bile geçiş yeteneğine sahiptir.

Gümüş nanopartikülleri tıbbi alanda doğal antibakteriyel etkisinin yanında antienflamatuar özelliği de en çok kullanılan özellikleri arasındadır. İlk çalışmalar lokal matriks metalloproteinaz (MMP) aktivitesi redüksiyonu ve yaradaki nötrofil apoptozisini arttırarak nanopartiküllerin varlığında yara iyileşmesini hızlandırdığını ortaya koymaktadır. MMP'nin iyileşemeyen yaralarda enflamasyonu indüklediği rapor edilmiştir (33). Başka bir çalışmada, farelerdeki yanık yaralarında kullanılan gümüş nanopartiküllerinin proenflamatuar sitokin seviyelerini azalttığı gözlenmiştir (34). Gümüş nanopartiküllerinin aynı zamanda enflamasyonla alakalı olan tümör nekroz faktör alfa (TNF-α) ve interferon gamma (IFN γ) aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir (35). Bu çalışmalar gümüş nanopartiküllerinin anti-enflamatuar etkisini göstermektedir. Antienflamatuar etki nano gümüşü birçok tedavide kullanılabilen iyi bir aday yapmaktadır. Dr. Robert Burrell dünyanın ilk nanogümüş bazlı yara pansumanını 1995'te geliştirdiklerini söylemektedir. İyileşme sürecini hızlandıran ve yara izlerini kaldıran Acticoat'ları geliştirmiştir (36). Acticoat yara pansumanında en son kullanılan materyal haline gelmiştir. Bu alanda kullanılan birçok farklı uygulama da bulunmaktadır. Yaraya bulaşma eğiliminde olan ve vücut sıvılarına kolayca nüfus edebilen bakterilere karşı etkili nanogümüşün dünya çapında satışı Smith & Nephew plc. tarafından yapılmıştır. En çok kullanılan gümüş bazlı yara iyileştiriciler Acticoat 7, Acticoat Moisture Control, Acticoat Absorbent, Silvercel, Aquacel Ag, Contreet F, Urgotol SSD ve Actisorb gibi yara iyileştiricilerdir. 2010 yılında Bath Üniversitesi ve Bristol'de ki Frenchay Hastanesinde ki South West UK pediatrik yanık merkezinin yanık timindeki bilim adamları patojen bakteri varlığındaki nanokapsüllerden antibiyotik salan gelişmiş bandajlar üzerinde çalışmışlardır. Pansuman malzemesi antibiyotik salındığında renk değişimi göstermektedir. Bu renk değişimi yarada bir enfeksiyon olduğunu belirtmektedir. Uzmanlar bu pansumanın yanık olgularında, toksik şok sendromlarında iyi bir tedavi edici potansiyele sahip olduklarını söylemektedir. Böyle bir sistemin gelişiyle antibiyotik rezistansında azalmalar gözlenebiliceği literatürde ifade edilmiştir (37). 2012'de sunulan çalışmalarda bu pansuman sistemlerinin

yakında ticari olarak piyasaya sunulacağını göstermektedir. Piyasaya tanıtılan daha yeni, etkili ve güvenilir nanopartikül bazlı yara kaplamaları bulunmaktadır.

Gümüş nanopartikülleri yapay eklem protezlerinde kemik tutkalı olarak da kullanılmaktadır. Nano gümüş yüklü polimetil metakrilat kemik tutturucu olarak kullanılmakta ve antimikrobiyal etki göstermektedir (38). Yüksek molekül ağırlıktaki polietilen eklem değiştirme bileşenleri olarak insert üretimlerinde tercih edilirler fakat başlıca dezavantajları olarak aşınmaya ve yıpranmaya karşı duyarlıdırlar. Bunun üstesinden gelmek için gümüş nanopartiküllerinin kullanılmasıyla polimerlerin aşınması ve yıpranmasının önüne geçilir (39). Cerrahi enfeksiyonu engellemek için kullanılan yöntemler antibiyotik ve antiseptik içerirler. Cerrahi elekler büyük yaralar arasında köprü kurmak ve doku onarımı için kullanılırlar. Bu elekler mikrobiyal enfeksiyonlara karşı duyarlı ve etkilidirler. Nanoparçacık kaplı polipropilen yapıları iyi bir antibakteriyel etkiye sahiptir ve cerrahi kullanımlar için ideal yapılardır (40). Gümüş nanopartiküllerinin antimikrobiyal özellikleri sayesinde dezenfektanlarda muazzam bir kullanım potansiyelleri vardır (41). Nano gümüşün aynı zamanda biyosensörlerde de kullanım kapasitesi bulunmaktadır. Nano gümüşün plazmonik özellikleri şekli, büyüklüğü ve çevreleyen dielektrik ortamı ile belirlenir. Dielektrik ortamın özellikleri biyosentezde avantaj sağlamaktadır. Nano gümüş biyosensörleri normal biyosensörlerin zorlukla bulabileceği proteinleri etkili bir şekilde bulabilmektedir. Nano gümüşün bu avantajı çeşitli anormalliklerin tespiti için kullanılması ve kanser de dahil olmak üzere insandaki hastalıkları tespit edebilmesidir (42). Nano gümüşün plazmonik özellikleri aynı zamanda yaygın olarak kullanılan floresan boyaların aksine biyo görüntülemede iyi bir aday yapar. Görüntüde ağartma yapmazlar ve uzun süreli dinamik olayların görüntülenmesinde kullanılabilirler (43). Nano gümüşün plazmonik yapısı istenmeyen hücrelerin yok edilmesinde de kullanılabilir. Hedef hücrelere konjuge olabilen hücreler ışığı absorblayarak termal enerjiye çevirir ve termal enerji hedef hücrelerde termal çıkarmaya neden olabilir (44).

Yıllardır süregelen çalışmalar vücutta yerleşim gösteren gümüşün uzaklaştırılmasının zor olduğunu kanıtlamaktadır. İnsan ve hayvan çalışmaları gümüşün çoğunluka saç, idrar ve feçesle atılabildiğini göstermektedir (45). Ancak ana atılım kaynağı safradır. Ağızdan alınan gümüş partikülleri karaciğerden geçer, safra içine alınır ve feçesle dışarı atılır. İnhalasyonla alındığında akciğere girerler ve kan akışına, diğer organlara girerler ve sonrasında idrar veya feçes ile atılırlar.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

***S. cerevisiae* ATCC 9763 Kültürü**

Amerikan tip kültür koleksiyonundan (ATCC) temin edilen *S. cerevisiae* ATCC 9763 suşu uygun besiyerinde (Yeast Extract Peptone Dextrose), aerobik şartlarda (200 rpm) 30 °C'de 24 saatlik inkübasyonda geliştirilmiştir.

AgNp'nin Biyosentezi

Hücre süpernatantı elde edilen *S. cerevisiae* değişen konsantrasyonlarda (1-5 mM) $AgNO_3$ ile muamele edildikten sonra 220 rpm'de 30 °C'de 24 saatlik inkübasyonlara bırakılacaktır (pH:5-10). Inkübasyon sonrası her grup 45 saniye aralıklarla 15 saniyelik 3 periyot halinde ultrasonik işleme maruz bırakılmıştır. Sonike edilen örnekler hücre kalıntılarından arındırılmak için 0,22 µm filtre ile süzüldükten sonra 15.000 rpm'de 30 dakika oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir (46).

Ag Np Karakterizasyonu

Biyosentezlenen AgNp'nin karakterizasyon çalışmaları Yrd. Doç. Dr. İsmail ÖÇSOY tarafından ERNAM (Erciyes Üniversitesi Nanoterknoloji Araştırma Merkezi)'da yapılmıştır. AgNp'nin zamana bağlı oluşumu UV-vis spektrofotometre, boyut ve morfolojik yapısı SEM, etkin boyutu ve yüzey yükü dinamik ışık saçılım (DLS) ve zeta potansiyel (ZT) kullanılarak tespit edilmiştir.

Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) ile Antimikrobiyal Aktivitenin Değerlendirilmesi

Listeria monocytogenes, Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae mikroorganizmaları gelişimleri için uygun olan Brain Heart İnfusion Broth/Agar besiyerinde ve *Streptococcus pneumoniae* 24 saat, *Neisseria meningitidis* ve *Haemophilus influenzae* 48 saat %5'lik CO2 ortam şartlarında geliştirilecektir. *Listeria monocytogenes* gelişimi için uygun olan 24 saat aerobik şartlarda geliştirilecektir. *Klebsiella pneumoniae* gelişimi için uygun olan Nutrient Broth/Agar besiyerinde ve 24 saat aerobik şartlarda geliştirilecektir. Çalışmada kullanılan olan test mikroorganizmaları 5 ml'lik uygun sıvı besiyerinde aktifleştirildikten sonra 1-20 µg/ml AgNp içeren 0,2 ml nutrient sıvı besiyerine % 1 oranında bakteri ekilip, 24-36 saat 30°C-37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bulanıklığın bittiği konsantrasyon bakteri canlılığının bittiği nokta olarak kabul edilerek MİK olarak belirlenmiştir. Tüm analizler 3 paralelli olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (47, 48).

Disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal etkinin test edilmesi

L. monocytogenes, S. pneumoniae, N. meningitidis, H. influenzae mikroorganizmaları gelişimleri için uygun olan Brain Heart İnfusion Broth/Agar besiyerinde ve *S. pneumoniae* 24 saat*, N. meningitidis* ve *H. influenzae* 48 saat %5'lik CO2 ortam şartlarında geliştirilmiştir. *L. monocytogenes* gelişimi için uygun olan 24 saat aerobik şartlarda geliştirilmiştir. *K. pneumoniae* gelişimi için uygun olan Nutrient Broth/Agar besiyerinde ve 24 saat aerobik şartlarda geliştirilmiştir.

Besiyerlerinin inokülasyonu

0,5 MCfarland bulanıklığında ayarlanan mikroorganizma süspansiyonundan steril şartlarda 100 µL alınarak ve hazırlanan katı besiyeri ortamına drigalski özesi ile ekilmiştir.

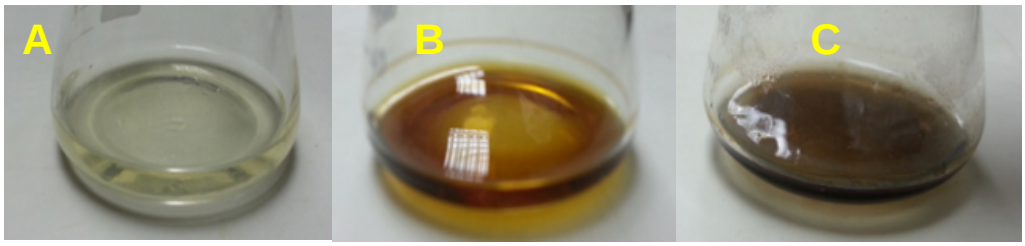
Sitotoksik Etkinin Sulforhodamin B (SRB) Kolorimetrik Gelişme İnhibisyonu Testi ile Belirlenmesi

%70'lik metanol*, %*11'lik etanol, etil asetat ve butanol ekstreleri MCF-7 (İnsan meme bezi karsinoma hücresi) hücreleri üzerindeki sitotoksisitesi sülforhodamin B (SRB) kolorimetrik yöntemle belirlenecektir. MCF-7 hücreleri DMEM besi yerinde çoğaltılmıştır. Hücreler 96 kuyucuklu mikroplakta trikloroasetikasit ile fikse edilerek SRB'nin protein komponentlerine bağlanması sağlandıktan sonra çalışmadan 24 saat önce flasktaki hücreler sayılarak 96 kuyucuklu mikroplağa kuyucuk başına 100 µL' de 25 000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 saat sonunda plağa yapışmış olan hücrelerin üstündeki besi yerleri atılacak ve hazırlanan ekstreler çeşitli konsantrasyonda 100 µL alınarak plağa eklenerek ve 37 ºC'de karbondioksitli etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda +4 ºC'de bekletilen %40'lık soğuk TCA çözeltisi kuyucuklara ilave edilerek ve plak +4 ºC'de 1 saat inkübe edildikten sonra İnkübasyon sonrası kuyuların içeriği uzaklaştırılarak 5 defa deiyonize su ile yıkanmıştır. Kuyular kurutulduktan sonra %1 asetik asit içinde hazırlanmış % 0,4 SRB boyası kuyulara 50 µL eklenerek 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Kuyuların içeriği uzaklaştırıldıktan ve 5 defa %1 asetik asit çözeltisi ile yıkandıktan sonra kuyular kurutulmuş, daha sonra 10 nM Tris bazı 100 µL eklenerek 5 dk çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Mikroplaka okuyucuda 490 nm'de absorbanslar ölçülmüştür (49, 50).

4. BULGULAR

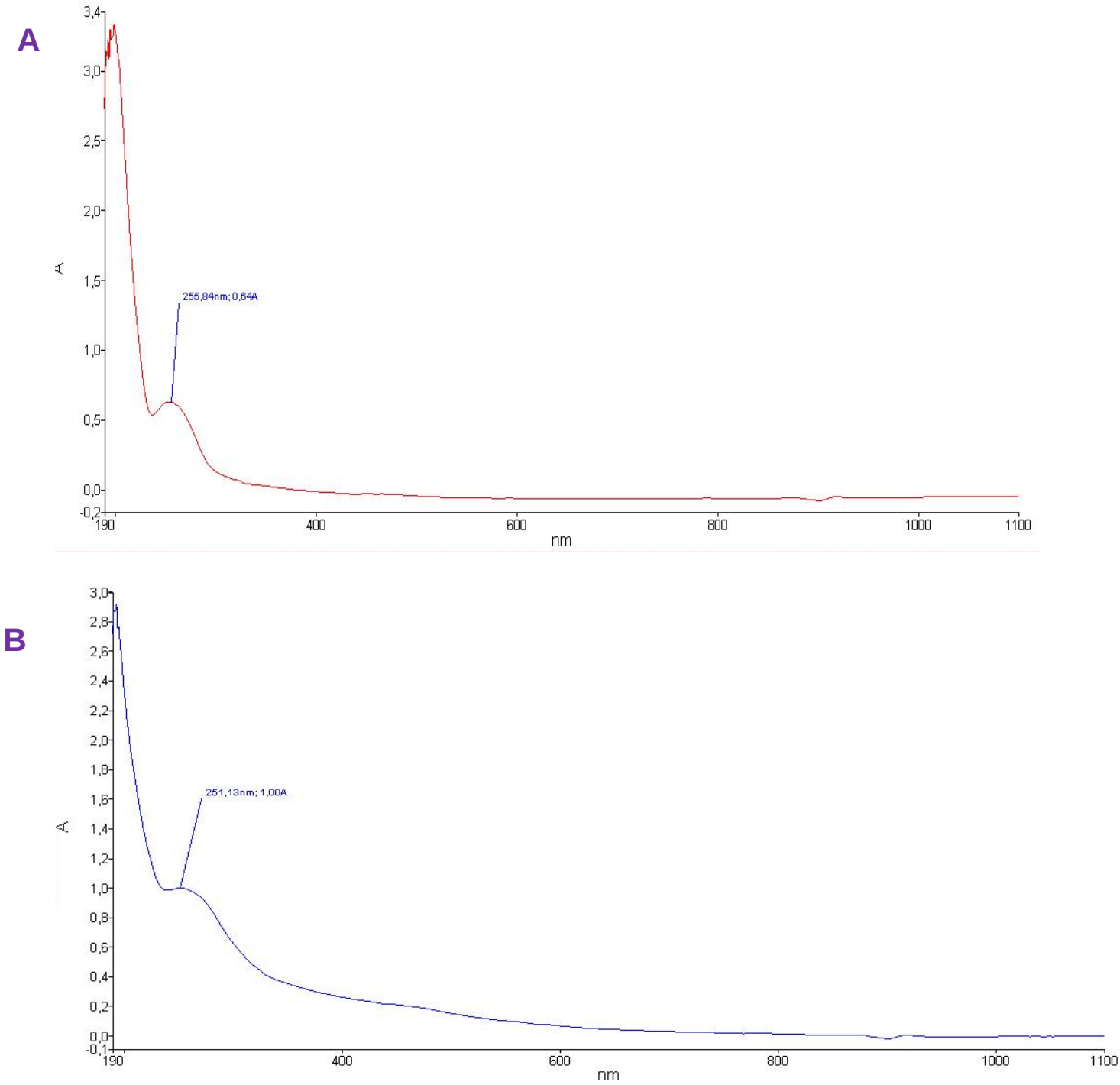
4.1. Ag Nps'Lerin Sentez ve Karakterizasyonu

Maya ekstraktı ile gümüş nanopartiküllerin oluşumu incelenmiştir. Bu aşamada $AgNO_3$ tuzunun 2 farklı konsantrasyonun 24 saatlik bakteri ile etkileşmesinden sonra partikül oluşumu üzerindeki etkileri Uv-vis spektrometre cihazı ile incelenmiştir. AgNp'nin *S. cerevisiae* mikroorganizmasından sentezi ve elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir. Nanopartikül sentezi ilk olarak 1 mM $AgNO_3$ konsantrasyonda kahverengi bir renk görünümü ve 256 nm'de verdiği pik ile 5 mM $AgNO_3$ konsantrasyonda ise daha koyu kahverengi bir renk görünümüm ve 251 nm'de verdiği pik ile karakterize edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Maya hücre kültürüne $AgNO_3$ çözeltisi ile muamele öncesi (A) ve 1 mM $AgNO_3$sonrası (B), 5 Mm $AgNO_3$ sonrası (C)

UV-vis spektrum sonuçları, $AgNO_3$'ın hücre ekstraktına eklendikten sonra gümüş nanopartiküllerin oluşumlarını göstermektedir. Şekil 4.1'de verilen değerler, 24 saat içinde nanopartiküllerin oluşumunu göstermektedir.

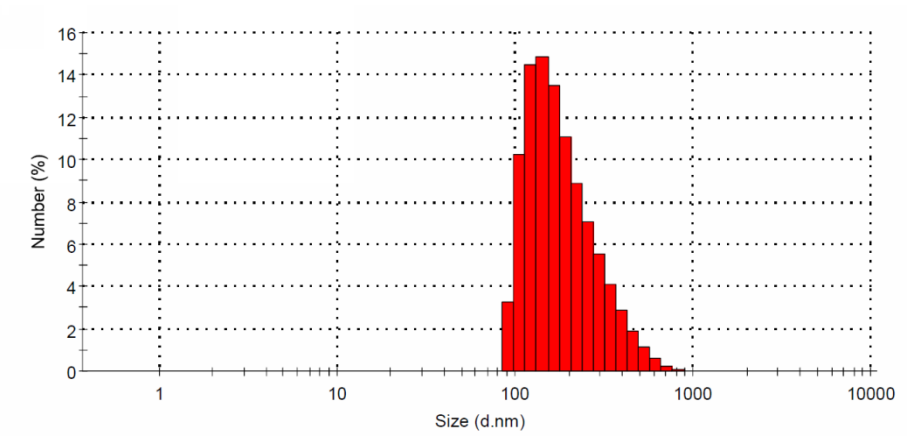


Şekil 4.2. *S. cerevisiae* kültüründen sentezlenen AgNp'nin absorbsiyon spektrumu.1 mM $AgNO_3$ sonrası (A), 5 Mm $AgNO_3$ sonrası (B**)**

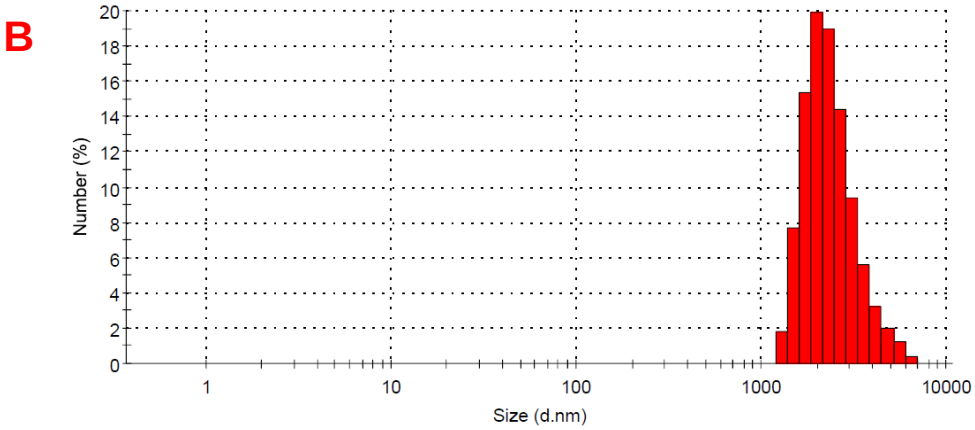
4.1.1.Zeta sizer ile boyut analizi

Elde edilen partiküllerin boyutunu ölçmek için zeta sizer cihazı kullanılmıştır. Ön hazırlık sürecinden hemen sonra, partiküller zeta sizer cihazı ile analiz edilmektedirler. Biyolojik sistemler ile hazırlanan nanopartiküllerin dışında, nanometre seviyesinde ki bakteri bileşikleri de aynı ortamda bulunmaktadır. Bu nedenle, zeta sizer ile boyut analizi gerçekleştirilirken, diğer birleşikler de analize dâhil olmakta ve nano-partiküllerin boyut analizin de sonuçların yanlış çıkmasına neden olabilmektedir. Hazırlanan örneklerdeki partikül hariç diğer bileşikleri ortamdan uzaklaştırmak için, partiküller 2 ml'lik ependorf tüplerine paylaştırılmış ve 10000 rpm de, 15 dakika santrifüj edilmiştir. Çöktürme işlemi gerçekleştirildikten sonra süpernatant atılmış, eşit miktarda distile su ilave edilmiştir. Saf gümüş nano-partiküllerin elde edilebilmesi için bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Ayrıca, santrifüjleme yapılmadan önce çökmüş olan partiküller 5 dakika sonikatör de bekletilerek partiküllerin çözelti içerisinde daha iyi dağılması sağlanmıştır (102). 2 farklı konsantrasyonda $AgNO_3$ ilavesi ile elde edilen AgNPs boyut analizi sonuçları Şekil 4.3 de verilmektedir.1 mM $AgNO_3$ için Maksimum yoğunluk 300-400 nm arasında tespit edilmiştir. Ortalama partikül büyüklüğü 323 nm bulunmuştur. 5 mM $AgNO_3$ için Maksimum yoğunluk 3000-3600 nm arasında tespit edilmiştir. Ortalama partikül büyüklüğü 3505 nm bulunmuştur. Literatürde bulunan sonuçlara göre, $AgNO_3$ konsantrasyonunun artmasıyla birlikte, partikül boyutunun arttığı görülmektedir. Zeta-sizer ile alınan sonuçların literatür ile uyumlu olduğu belirlenmiştir (51, 52).

A



Zeta Potential (mV): -25,7

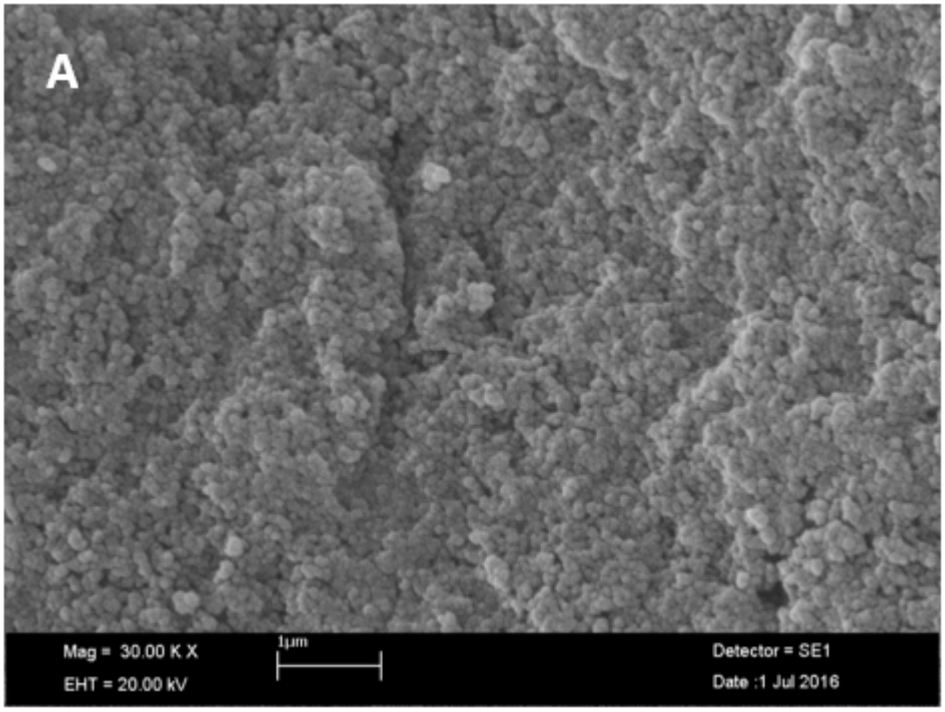


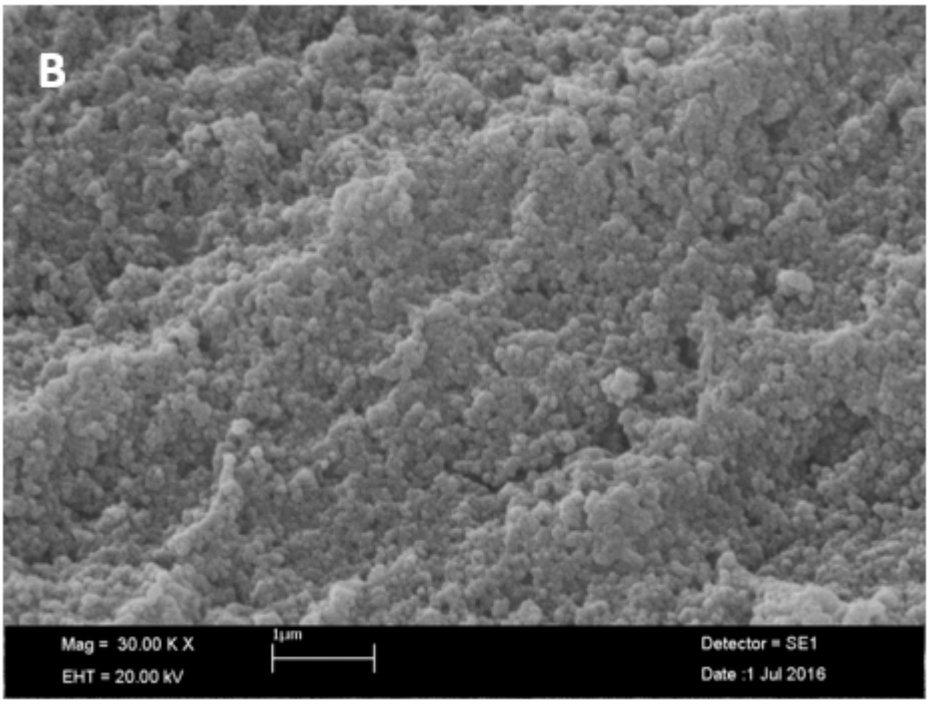
Zeta Potential (mV): -19,4

Şekil 4.3.Partikül büyüklük dağılımı. 1 mM $AgNO_3$ sonrası (A), 5 mM $AgNO_3$ sonrası (B)

4.1.2. SEM analizi

SEM analizi ile elde edilen görüntüler şekil 4.4'de verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre küresel şekilli partiküllerin oluşumu ve $AgNO_3$ konsantrasyonu arttıkça partikül boyutunun değiştiği gözlenmiştir.

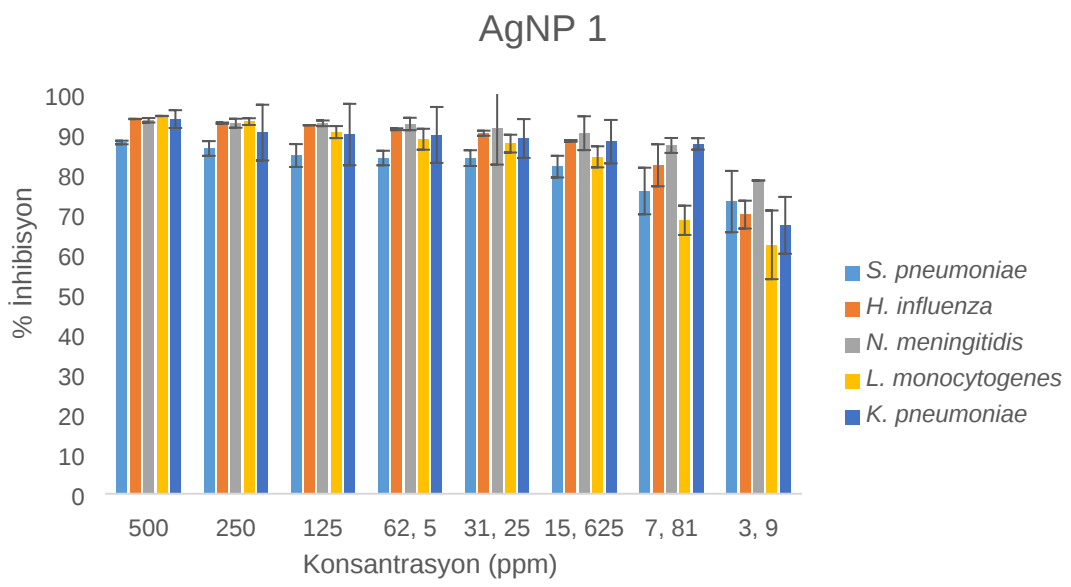


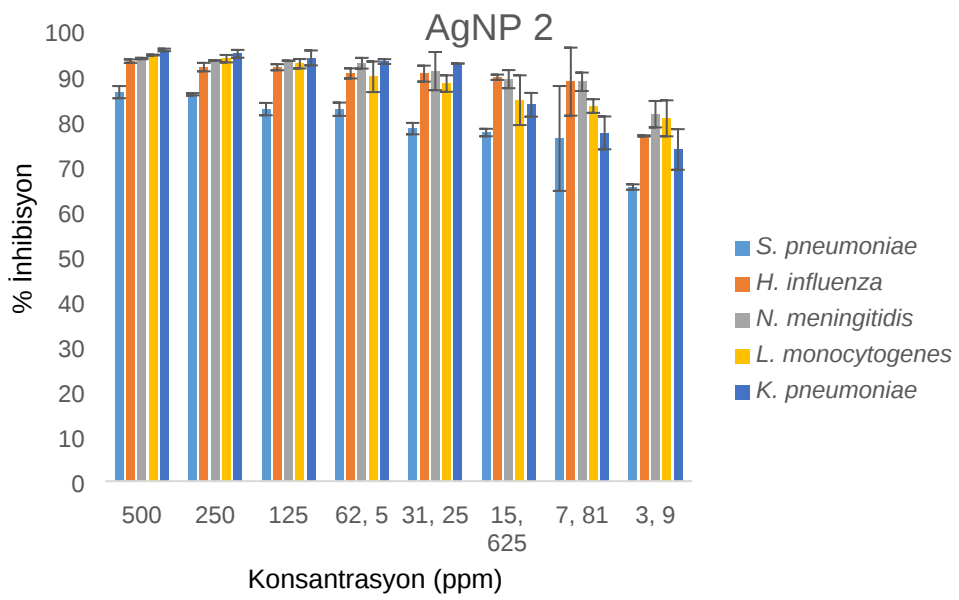


Şekil 4.4 *S. cerevisiae* ekstraktı ile elde edilen AgNPs'nin SEM görüntüleri. 1 mM $AgNO_3$ sonrası (A), 5 mM $AgNO_3$ sonrası (B)

4.2. AgNPs'lerin *In vitro* antimikrobiyal aktivitesi

Disk difüzyon ve MİK testlerine göre tespit edilen antimikrobiyal aktivite sonuçları Şekil 4.5 ve Tablo 4.1'de verilmiştir. MİK sonuçlarına göre 2 farklı $AgNO_3$ konsantrasyonlarında hazırlanan gümüş nanopartikülleri 500 ppm konsantrasyonda çalışılan tüm mikroorganizmalara karşı % 85'den daha fazla inhibisyon etki göstermiştir. Özellikle *N. meningitidis, L. monocytogenes, K. pneumoniae* suşlarına karşı inhibe edici etki çalışılan en düşük konsantrasyon olan 3,9 ppm'de %60'ın üzerinde gözlenmiştir. Disk difüzyon testine göre genel olarak bakıldığında 5 mM $AgNO_3$ ile hazırlanan naopartikülün antimikrobiyal etkisinin 1 mM $AgNO_3$ ile hazırlanan nanopartikülden daha yüksek olduğu dikkat çekmektedir. 5 mM $AgNO_3$ ile hazırlanan naopartikül çalışılan mikroorganizmalara karşı daha büyük zon çapı göstererek daha yüksek antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Tablo 4.1).





Şekil 4.5 *S. cerevisiae* ekstraktı ile elde edilen AgNPs'nin MİK sonuçları. 1 mM $AgNO_3$ sonrası (AgNP 1), 5 mM $AgNO_3$ sonrası (AgNP 2)

Tablo 4.1 *S. cerevisiae*'dan sentezlenen AgNPs'lerin disk difüzyon sonuçları. 1 mM AgNP 1 (A), 5 mM AgNP 2 sonrası (B)

A

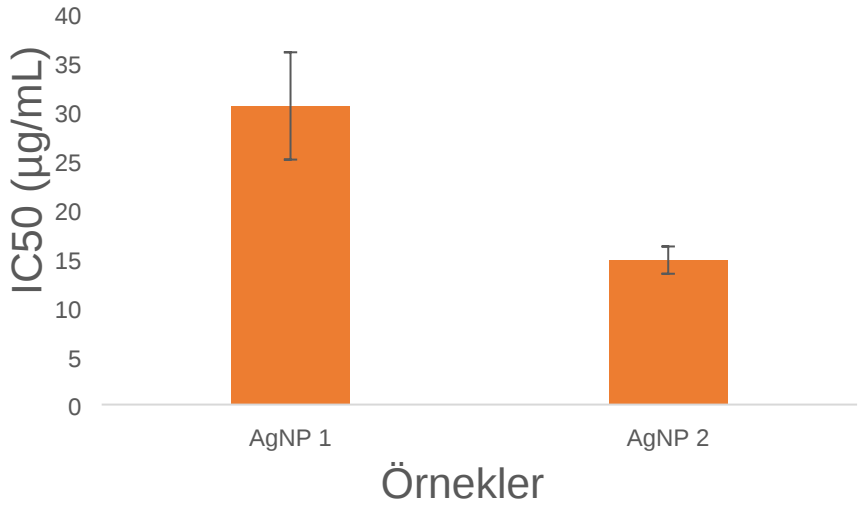
Konsantrasyon (µg/mL)	***S. pneumoniae***	***H. influenza***	***N. meningitidis***	***L. monocytogenes***	***K. pneumoniae***
4,812	-	-	-	-	-
9,625	-	-	-	-	-
19,25	-	-	-	-	-
37,5	11±0,0	12±1,0	-	-	12±1,0
75	12,5±0,5	12,5±0,5	15±1,0	10,5±0,5	16,5±1,5
150	16,5±0,5	17±1,0	15,5±0,5	13±1,0	18±1,0
Penisilin	16,5±1,5	15±1,0	15±0,0	15±1,0	14,5±0,5

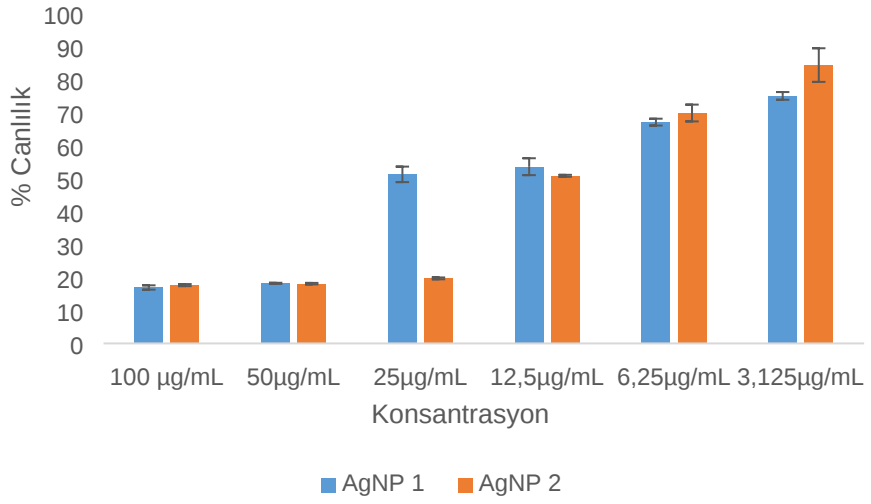
B

Konsantrasyon (µg/mL)	***S. pneumoniae***	***H. influenza***	***N. meningitidis***	***L. monocytogenes***	***K. pneumoniae***
4,812	-	-	-	-	-
9,625	-	-	-	-	-
19,25	-	-	-	-	-
37,5	12,5±1,5	13±1,0	-	-	16,5±0,5
75	14±1,0	14,5±0,5	16±1,0	11,5±0,5	18,5±1,5
150	18,5±0,5	19±1,0	17,5±0,5	14,5±0,5	19±1,0
Penisilin	15,5±1,5	15±1,0	15±0,0	15±1,0	14,5±0,5

4.3. AgNPs'lerin MCF-7 Hücre Hattındaki Sitotoksitesi

2 farklı $AgNO_3$ konsantrasyonlarında hazırlanan gümüş nanopartikülleri 100 ve 50 µg/mL konsantrasyonda MCF-7 hücrelerine karşı yaklaşık % 90 öldürücü etki göstermiştir. Özellikle AgNP 2, 25 µg/mL konsantrasyonda da aynı etkiyi göstermiştir. MCF- 7 hücrelerine karşı sitotoksik etki ve IC_{50} değerleri Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *S. cerevisiae* mayasına sentezletilen gümüş nanopartiküllerinin meme kanser hücre hattı MCF-7'ye karşı antikanser etkisi gözlenmiştir.





Şekil 4.6. Sentezlenen AgNP'lerin MCF-7 hücre hattına karşı canlılık etkisi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

21. yüzyılın başından bu yana, AgNp fiziksel, biyolojik ve farmasötik uygulamalarda yaygın olmak üzere hemen hemen her alanda kullanılmaktadır (53). Özellikle AgNp hücre zarından çabuk geçebilmesi, antibakteriyel,antivirüs ve antifungal etkilerinden dolayı, onları tıp alanında pek çok amaç için kullanılabilecek mükemmel bir aday haline getirmiştir. Ancak bu nanopartiküllerin insanlar ve çevre üzerinde olumsuz etkilere sahip olabileceği literatürler de rapor edilmiştir (54-56). AgNp'nin pek çok literatürde fiziksel, kimyasal ve biyolojik sentez metotları tanımlanmıştır. Gümüş nanopartikül sentezinde çoğu fiziksel ve kimyasal metotlarda potansiyel çevresel ve biyolojik risk oluşturabilecek tehlikeli kimyasalların kullanımı bu metotların tercih edilmemelerinin en temel faktörleridir (54). Ayrıca kimyasal sentez metotları çoğu durumda bazı toksik maddelerin yüzey üzerinde emilimine yol açarak onların tıbbi kullanımlarını engelleyebilir (57). Metal nanopartiküller klasik sentez yöntemleri ile istenilen büyüklük ve morfolojide sentezlenebilmelerine rağmen bu yöntemlerin sahip oldukları dezavantajların üstesinden gelebilmek için biyosentez gibi basit ve zararlı madde içermeyen yöntemler araştırılmaya başlanmıştır. AgNp'nin daha ucuz etkin kullanımı ele alınması gereken bir konu olduğundan bu nanopartiküllerin sentezlenmesi için uygun çevresel ve ekonomik yollara başvurulmalıdır. Bu tip bir yöntem arayışı AgNp'nin biomimetik üretim ihtiyacını doğurmuştur. Bu yüzden mikroorganizma ve bitkilerin kullanıldığı biyolojik metotlar gümüş nanopartikül sentezi için uygulanabilir alternatif bir metottur. Bu nanopartiküller tekstil mühendisliği, elektronik, optik ve en önemlisi medikal alanlarda bakterisit ve terapötik ajan olarak kullanılır (54). Nanopartiküllerin biyosentezi genellikle indirgeme/oksidasyon reaksiyonlarına bağlıdır. Mikrobiyal enzimler antioksidan ve indirgeme özellikleri ile istenilen nanopartikülleri verir (58).

AgNp sentezleyen bakteriler ilk kez gümüş madeninden izole edilen *Pseudomonas stutzeri* AG 259 suşunda tespit edilmiştir (59). Metal iyon konsantrasyonlarında hayatta kalabilen veya bu şartlar altında gelişebilen bazı mikroorganizmalar düşük konsantrasyonlarda gelişebilir veya yüksek konsantrasyonlara maruz kaldıklarında toksisiteyi indükleyebilir (60). Gümüş biyosentezinin en yaygın kabul edilen

mekanizması nitrat redüktaz enziminin varlığında nitratın nitrite dönüşmesidir. Bakteri kullanılarak gümüşün *in vitro* sentezi α-nikotinamid adenin dinükleotid fosfatın (NADPH) indirgenmiş formu olan (NADPH) - bağımlı nitrat redüktaz varlığında, reaksiyonun bir sonraki adımı ortadan kaldırılır. Indirgenme boyunca nitrat nitrite dönüştürülür ve gümüş iyonlarına elektron transfer edilir. Böylece gümüş iyonu gümüşe indirgenir ($Ag^{+}\rightarrow Ag^{0}$).NADPH ve NADPH-bağımlı nitrat redüktaz salgıladığı bilinen *Bacillus licheniformis*'in gümüş iyonunu gümüşe indirgediği rapor edilmiştir (61). *Fusarium oxysporum* ile yapılan başka bir çalışmada NADPH ile birlikte gümüş nitratın kahverengi rengine dönüşmesi ve yapılan ileri analizlerle bu karışımın gümüş nanopartikülü içerdiği gözlenmiştir (62).Ayrıca bu enzim olmadan AgNp sentezlendiğini gösteren bulgularda mevcuttur. *Lactobacillus sp*. A09'un kuru hücrelerinin gümüş iyonlarının mikrobiyal hücre duvarı ile etkileşime girmesi ile indirgenebildiği literatürde belirtilmiştir (63).

Biyolojik metotlar kullanılarak nanopartiküllerin hazırlanması çözücü madde, çevre dostu indirgeyici madde ve toksik olmayan stabilize edici madde olmak üzere 3 temel bileşeni içerir (54). AgNp'nin kimyasal üretimi ile karşılaştırıldığında biyosentezin en önemli avantajı, toksik ajanlardan uzak sentez oluşudur. Üstelik bu nanopartiküllerin biyolojik üretimi gümüş içeren atıkların geri dönüşümünü sağlar (64-68). Gümüşün geri dönüşümü, geri kazanımı ve yenilenmesi kaynakların sınırlı olmasından ötürü ekonomik açıdan önemlidir. Ayrıca gümüş içeren atıkların geri dönüşümü ile biyosit, katalizör ve biyosensör gibi katma değeri olan ürünlerin oluşumu sağlanır (69). Biyolojik üretimin bir diğer avantajı, sentezde mikrobiyal hücreler ve toksik olmayan konsantrasyonları kullanıldığında hücreler ölmeden AgNp sentezlerler ve böylece sürekli bir üretim sürecini oluştururlar (70). Kimyasal yolla sentezlenen nanopartiküller çok stabil değillerdir, kısa sürede agregasyon oluşturur (71). Bu da yüksek spesifik yüzey alanını, katalitik ve antimikrobiyal aktivitisesini azaltır.Biyosentez ile sentezlenen AgNp ise uzun zaman periyotlarında stabil kalabilir. Bfilainsa ve D'Souza (2006), *Aspergillus fumigates*'tan ekstrasellüler üretilen nanopartiküllerin 4 ay stabil kaldığını, Saifuddin et al. (2008) ise *B. subtilis'ten* sentezlenen partiküllerin 6 ay stabil kaldığını rapor etmişlerdir (70, 71). Bu nanopartiküllerin bakteri matriksi ile ilişkili olduğu bu yüzden bakteri hücre duvarı yapılarının nanopartiküllerin agregasyonunuönlediği ve bununda dahafazla

antimikrobiyal aktiviteye sahip olmalarını sağladığı bildirilmiştir (72).Biyolojik moleküllerin stabilizasyonu nanopartiküllerin diğer moleküllerle daha kolay işlevselleşmesini ve bunun sonucu olarak mikroorganizmalarla etkileşimlerini geliştirerek antimikrobiyal aktivitesinin artmasını sağlar (55,70).

AgNp'nin antimikrobiyal aktivitesi partikül büyüklüğüne bağlıdır. Nanopartikül ne kadar küçükse o kadar yüksek spesifik yüzey alanına ve dolayısıyla o kadar yüksek aktiviteye sahiptir. Bununla birlikte nanopartikül şeklinin de aktivite üzerinde etkili olduğu rapor edilmiştir (73, 74). Bu yüzden her bir biyojenik gümüşün partikül boyu, şekli ve diğer biyomoleküllerle etkileşimi kendine özgüdür.Bundan dolayı, nanopartiküllerin biyoaktivitelerine yönelik çalışmalarda bu partiküllerin karakterizayonu en etkili konsantrasyonu formule edebilmek için önemlidir (55).

Nanopartiküller ile ilgili genel görüşe göre, nano boyuttaki parçacıklar gümüş partiküllerine daha geniş yüzey alanı sağlayarak bu partiküllerin nüfuz etme potansiyelini ve metal etkinliklerini artırır. Yalnızca boyut faktörüne dayanarak nanopartiküller dolaşım sistemine ve kan beyin bariyerine bile nüfuz etme kabiliyetine sahiptir. Bu özelliği ile de AgNp'nin medikal alanda antimikrobiyal madde olarak kullanımından antienflamatuar madde özelliğine kadar pek çok alanda kullanılabilirliğini gösteren çalışmalar mevcuttur (75, 76).

Mikroorganizmaların keşfi ile bunların biyoteknolojik açıdan önemli biyomateryalleri üretmelerine yönelik çalışmalar yoğunluk kazanmıştır.Bacillus cinsi mikroorganizmalar diğer mikroorganizmalarla karşılaştırıldıklarında basit besiyerlerinde kolay üretilebilmelerinden dolayı biyoteknolojik olarak büyük bir potansiyele sahiptirler (77). Bu mikroorganizmalar temel ekstrasellüler polisakkaritleri, amilaz, selülaz, ksilanaz ve proteaz gibi ekzoenzimleri ve kanser araştırmalarında kullanılan proteinleri ihtiva ederler (78, 79). Bacilluslar organik maddelerin parçalanması ve petrolün biyoremediasyonu dahil olmak üzere elektronik, gıda, tıp ve birçok biyokimyasal ve biyofiziksel çalışmalarda biyoteknolojik potansiyele ve uygulamalara sahiptirler (80).

AgNp'nin biyosentezi stabil yapısından dolayı kimyasal üretime alternatiftir.Kimyasal ve fiziksel metotlar ile sentezlenen AgNp'nin üretimi esnasında çeşitli toksik kimyasalların kullanımının aksine uygulama kolaylığı, toksik olmaması

ve hızlı sentezi biyolojik üretimi daha tercih edilir bir seçenek haline getirmektedir.AgNp üretimini en iyi verim ile sağlayabilecek doğru biyolojik sistemin seçilmesi nanopartikülün işlevselliğini, şeklini ve boyutunu ve üretilen nanopartikülün antimikrobiyal, toksikolojik ve katalitik özelliklerini belirleyici faktördür. AgNp'nin mikroorganizmalardan biyosentezi ile ilgili araştırmalar mevcuttur (57, 59, 81-96)

Gümüş yıllarıdır mükemmel bir antimikrobiyal ajan olarak kullanılmaktadır. Gümüş nanopartiküllerinin kendilerine has kimyasal ve fiziksel özellikleri sadece gümüşün etkinliğini arttırmaktadır. Antimikrobiyal aktivite için birçok mekanizma ileri sürülmektedir. En güvenilir mekanizma tam anlamıyla anlaşılamamış ve farklı organizmalara farklı şekillerde etki ettiğinden genellenememiştir. Gümüş nanopartikülünün kimyasal ve fiziksel sentez yöntemleri yıllarca takip edilmiş ancak pahalı oldukları ve çeşitli toksik kimyasallar kullanıldığı için biyosentez daha fazla tercih edilmiştir. Bakteri, mantar ve bitki özütleri sentez için kullanılabilirdir. Kolay bulunabilirlikleri, toksik olmayan doğal yapıları, birçok seçeneğinin bulunması ve sentezi kısa sürede gerçekleştirebilmeleri bitki özütlerini sentezde en iyi seçenek haline getirmektedir. Gümüş nanopartiküllerinin kullanılan birçok yönü vardır. Ancak en çok arzulanan yönleri antimikrobiyal ve antienflamatuar kapasiteleri üzerinedir. Tıbbi alanda pekçok uygulamada kullanılabilirler ve kolaylıkla istismar edilebilirler. Gümüş nano partiküllerinin olumsuz yönü toksisiteyi çeşitli derecelerde indükleyebilmeleridir. Endüstriyel atıklar ile tonlarca gümüşün doğaya salındığı tahmin edilmekte ve gümüş toksisitesinin sulu fazdaki serbest gümüş iyonlarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Yüksek konsantrasyonlarda gümüş nanopartiküllerinin toksik etkili oldukları ve birçok sağlık problemine sebebiyet verebilecekleri öne sürülmüştür. Serbest gümüş iyonları insanlar ve tüm canlılar üzerinde olumsuz etkilere sahiptir. Gümüş iyonlarına maruz kalmak karaciğer ve böbrek hasarı, göz, deri, solunum ve bağırsak sistemi tahrişleri ve kan hücrelerinde istenmeyen değişimlere neden olabilir (81).Gümüş nanopartiküllerinin doğaya salındıklarında birçok ekolojik probleme sebep olabileceği ve ekosistemi bozabileceklerini kanıtlayan çalışmalar da bulunmaktadır. Bu nedenle gümüş kullanım limitleri dikkate alınarak etkili, verimli, dikkatlice, özen göstererek, herhangi bir bireye veya çevreye karşı zarar vermeden ve yararlı bir şekilde

kullanılmalıdır. Eğer kullanımı uygun bir şekilde yapılırsa gümüş nano partikülleri zararsızdır, ancak rastgele kullanımında zararlı hale gelebilir. Non-toksik nanopartiküllerin sentezi için çevre dostu bir yaklaşım olan biyolojik üretimin kullanılmasına doğru yaklaşımlar ve buna yönelik araştırmalar artmaktadır. Bu nedenle, nanopartiküllerin mikrobiyal sentezi, nanobiyoteknolojinin önemli bir dalını oluşturmaktadır. Nanopartiküllerin sentezi için doğuştan potansiyele ve zengin tür sayısına sahip mikroorganizmalar bu partiküllerin sentezi için potansiyel biyo-fabrika olarak kabul edilirler.

Sonuç olarak, AgNps'nin *S. cerevisiae'*dan biyosentezi, kimyasal ve fiziksel metotlar kullanılarak sentezlenen AgNp'ye alternatif olabileceği ve bu AgNp'nin olası antimikrobiyal etkinliğinin gösterilmesi, bu alandaki bilimsel birikime önemli bir katkı sağlayabilir. Ayrıca AgNp'nin fiziksel ve kimyasal mevcut yöntemlere göre temininin daha kolay olması, yüksek verimli, daha kaliteli, uzun süre stabil kalabilen ve daha az maliyetli eldesi sağlanarak çeşitli sanayii kollarına katkı sağlayacağı düşünülebilir. Özellikle farmasötik alanda önemli, yeni ilaçların tasarımı konusunda oldukça önem arz etmektedir.Ayrıca büyük çevre kirliliğine yol açan kimyasal yöntemlerle üretim yerine biyolojik metot kullanılarak yapılan üretim ülkemiz açısından çevresel anlamda önemli kazanımlara yol açabilecektir.

6.KAYNAKLAR

1. Narayanan KB, Sakthivel N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes.Adv. Colloid Interface Sci. 2010; 156: 1–13
2. Bulut E. Nanopartiküllerin Polifenollerle Sentezi ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Sakarya 2007
3. Kelly KL, Coronado E, Zhao LL, and Schatz GC. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. J. Phys. Chem. B.2003; 107(3): 668–677
4. Bar H, Bhui DKr, Sahoo GP, Sarkar P, De SP, Misra A, Green synthesis of silver nanoparticles using lateks of Jatropha curcas, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. 2009; 339: 134-139
5. Slawson RM, Trevors JT, Lee H. Silver accumulation and resistance in Pseudomonas stutzeri. Arch. Microbiol. 1992; 158: 398–404
6. Zhao, GJ, Stevens, SE. Multiple parameters for the comprehensive evaluationof the susceptibility of Escherichia coli to the silver ion. Biometals 11.1998; 27–32
7. Sukumaran P, Eldho KP.Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects.Int. Nano. Lett.2012; 2: 32
8. Gaffet E, Tachikart M, El KO, Rahouadj R. Nanostructural materials formation by mechanical alloying: morphologic analysis based ontransmission and scanning electron microscopic observations. Mater.Charact. 1996; 36: 185 - 190
9. Amulyavichus A, Daugvila A, Davidonis R, Sipavichus C. Study of chemical composition of nanostructural materials prepared by laser cutting of metals. Fizika Met. Met. 1998; 85: 111–117
10. Thirumalai AV, Prabhu D, Soniya M. Stable silver nanoparticlesynthesizing methods and its applications. J. Bio. Sci. Res. 2010; 1: 259–270

11. Yu AK, Kudrinskiy A, Yu O, Lisichkin V.Synthesis and properties of silver nanoparticles: advances and prospects, Russ. Chem. Rev. 2008; 77(3): 233-257
12. Salkar RA, Jeevanandam P, Aruna ST, Koltypin Y, Gedanken A. The sonochemical preparation of amorphous silver nanoparticles. J. Mater. Chem. 1999; 9: 1333–1335
13. Mandal S, Arumugam S, Pasricha R, Sastry M. Silver nanoparticles of variable morphology synthesized in aqueous foams as novel templates. Bull. Mater. Sci. 2001; 28: 503–510
14. Jiang H, Moon K, Zhang Z, Pothukuchi S, Wong CP. Variable frequency microwave synthesis of silver nanoparticles. J. Nanopart. Res. 2006; 8: 117–124
15. Esumi K, Tano T, Torigue K, Meguro K. Preparation and characterization of bimetallic Pd-Cu colloids by thermal decomposition of their acetate compounds in organic solvents. Chem. Mater. 1990; 2: 564–56
16. Pileni MP. Fabrication and physical properties of self-organized silver nanocrystals. Pure Appl. Chem. 2000;72: 53–65
17. Sun YP, Atorngitjawat P, Meziani MJ.Preparation of silver nanoparticles via rapid expansion of water in carbon dioxide microemulsion into reductant solution. Langmuir, 2001; 17: 5707–5710
18. Tien DC, Tseng KH, Liao CY, Tsung TT.Colloidal silver fabrication using the spark discharge system and its antimicrobial effect on Staphylococcus aureus. Med. Eng. Phys. 2007; 30: 948–952
19. Sergeev MB, Kasaikin AV, Litmanovich AE. Cryochemical synthesis and properties of silver nanoparticle dispersions stabilised by poly (2-dimethylaminoethyl methacrylate). Mendeleev. Commun. 1999; 9: 130–132.
20. Sintubin L, Verstraete W, Boon N. Biologically produced nanosilver: current state and future perspectives,Biotechnol. Bioeng.2012; 109(10): 2422-2436
21. Kalishwaralal K, Deepak V, Ramkumarpandian S, Nellaiah H, Sangiliyandi G. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by the culture supernatant of Bacillus licheniformis. Mater. Lett. 2008; 62: 4411–4413

22. Parashar UK, Saxena SP, Srivastava A. Bioinspired synthesis of silver nanoparticles. Dig. J. Nanomat. Biostruct. 2009; 4: 159–166
23. Mohanpuria P, Rana KN, Yadav SK. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. J. Nanopart. Res. 2008; 10: 507–517
24. Mukherjee P, Ahmad A, Mandal D, Senapati S, Sainkar SR, Khan MI, Parischa R, Ajaykumar PV, Alam M, Kumar R, Sastry M. Fungus mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: a novel biological approach to nanoparticle synthesis. Nano. Lett. 2001; 1: 515–519
25. Ahmad A, Mukherjee P, Senapati S, Mandal D, Khan MI, Kumar R, SastryM. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus Fusarium oxysporum.Colloid. Surface. B. 2003; 28: 313–318
26. Danilcauk M, Lund A, Saldo J, Yamada H, Michalik J. Conduction electron spin resonance of small silver particles. Spectrochimaca. Acta. Part A. 2006; 63: 189–191
27. Kim JS, Kuk E, Yu K, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, Kim SH, Park YK, Park YH, Hwang C-Y, Kim YK, Lee YS, Jeong DH, Cho MH. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine. 2007; 3: 95–101
28. Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. J. Biomed. Mater. Res. 2008; 52: 662–668
29. Matsumura Y, Yoshikata K, Kunisaki S, Tsuchido T. Mode of bacterial action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. Appl. Environ. Microbiol. 2003; 69: 4278–4281
30. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, Yacaman MJ. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology. 2005; 16: 2346–2353
31. Hatchett DW, Henry S. Electrochemistry of sulfur adlayers on low-index faces of silver. J. Phys. Chem. 1996; 100: 9854–9859

32. Shrivastava S, Bera T, Roy A, Singh G, Ramachandrarao P, Dash D.Characterisation of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. Nanotechnology. 2007; 18: 1–9
33. Kirsner R, Orsted H, Wright B. Matrix metalloproteinases in normal and impaired wound healing: a potential role of nanocrystalline silver. Wounds. 2001; 13: 5–10
34. Tian J, Wong KK, Ho CM, Lok CN, Yu WY, Che CM, Chiu JF, Tam PK. Tropical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. Chem.Med. Chem. 2007; 2: 129–136
35. Shin SH, Ye MK, Kim HS, Kang HS. The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells. Int. Immunopharmacol. 2007; 7: 1813–1818
36. Burrell RE, McIntosh CL, Morris LR. Process of activating anti-microbial materials. 1995; Patent 5454886: 3
37. Nano Bio Technology: Revolutionary medical bandage usingnanotechnology to fight infection. http://nanobiotechnews.com/revolutionary-medical-bandage-using-nanotechnology-to-fight-infection.html (15.09.2012)
38. Alt V, Bechert T, Steinrücke P, Wagener M, Seidel P, Dingeldein E,Scheddin D, Domann E, Schnettler R. Nanoparticulate silver. A newantimicrobial substance for bone cement. Orthopade. 2004; 33: 885–892
39. Morley KS, Webb PB, Tokareva NV, Krasnov AP, Popov VK, ZhangJ, Roberts CJ, Howdle SM. Synthesis and characterisation of advanced UHMWPE/silver nanocomposites for biomedical applications. Eur. Polym. J. 2007; 43: 307–314
40. Cohen MS, Stern JM, Vanni AJ, Kelley RS, Baumgart E, Field D, LibertinoJA, Summerhayes IC. In vitro analysis of a nanocrystalline silver-coated surgical mesh. Surg. Infect. 2007; 8: 397–403
41. Brady MJ, Lissay CM, Yurkovetskiy AV, Sarwan SP. Persistent silver disinfectant for environmental control of pathogenic bacteria. Am. J. Infect. Control. 2003; 31: 208–214

42. Zhou W, Ma YY, Yang HA, Ding Y, Luo XG. A label-free biosensor based on silver nanoparticles array for clinical detection of serum p53 in head and neck squamous cell carcinoma. Int. J. Nanomed. 2011; 6: 381–386

43. Lee KJ, Nallathamby PD, Browning LM, Osgood CJ, Xu XHN. In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebra fish embryos. ACS Nano. 2007; 1: 133–143

44. Loo C, Lowery A, HalasN, West J, Drezek R. Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy. Nano Lett. 2005; 5: 709–711

45. Di Vincenzo GD, Giordano CJ, Schriever LS. Biologic monitoring of workers exposed to silver. Int. Arch. Occup. Environ. Health. 1985; 56: 207–215

46. Smirnov, A., Suzina, N., Chudinova, N., Kulakovskaya, T., & Kulaev, I. Formation of insoluble magnesium phosphates during growth of the archaea Halorubrum distributum and Halobacterium salinarium and the bacterium Brevibacterium antiquum, FEMS microbiology ecology, 2005; 52(1): 129-137.

47. Shivaji, S., Madhu, S., & Singh, S. Extracellular synthesis of antibacterial silver nanoparticles using psychrophilic bacteria, Process Biochemistry, 2011; 46(9): 1800-1807.

48. Tan, J. W., Tham, C. L., Israf, D. A., Lee, S. H., & Kim, M. K.. Neuroprotective effects of biochanin a against glutamate-induced cytotoxicity in PC12 cells via apoptosis inhibition, Neurochemical research, 2013; 38(3): 512-518.

49. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. Nat Protoc 2006; 1: 1112-116.

50. Houghton P, Fang R, Techatanawat I, et al. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. Methods 2007; 42: 377–387.

51. Dizaji AN. Rhodopseudomunas palustris Kullanılarak Gümüş Nanopartiküllerin Üretimi. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı 2012

52. Ahmad N, Sharma S, Shamsi SN, Mehta A. Biosynthesis of silver nanoparticles from desmodium triflorum: a novel approach towardsweed utilization, Biotechnol. Res. Int.vol. 2011;1-8

53. Allsopp M, Walters A, Santillo D.Nanotechnologies and nanomaterials in electrical and electronic goods: a review of uses and health concerns, Green.Res. Lab. London 2007

54. Prabhu S, Poulose EK. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects,Int. Nano. Lett. 2012; 2(1): 1-10

55. Saifuddin N, Wong CW, Yasumira AAN. Rapid Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Culture Supernatant of Bacteria with Microwave Irradiation, E-J Chem. 2009; 6(1): 61–70

56. Narayanan KB, Sakthivel N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes,Adv. Colloid. Interfac. 2010; 156(1): 1-13

57. Parashar UK, Saxena SP, Srivastava A. Bioinspired synthesis of silver nanoparticles, Dig. J. Nanomat. Biostruct. 2009; 4: 159–166

58. Kalishwaralal K, Deepak V, Ramkumarpandian S, Nellaiah H, Sangiliyandi G. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by the culture supernatant of *Bacillus licheniformis*, Mater. Lett. 2008; 62(29): 4411-4413

59. Haefeli C, Franklin C, Hardy K. Plasmid-determined silver resistance in *Pseudomonas stutzeri* isolated from a silver mine, J. Bacteriol. 1984; 158(1): 389-392

60. Husseiny MI, El-Aziz MA, Badr Y, Mahmoud MA. Biosynthesis of gold nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa*,Spectrochim. Acta. A.2007; 67(3): 1003-1006

61. Vaidyanathan R, GopalramS, Kalishwaralal K, Deepak V, Pandian SRK, Gurunathan S. Enhanced silver nanoparticle synthesis by optimization of nitrate reductase activity,Colloid. Surface. B. 2010; 75(1): 335-341

62. Kumar SA, Abyaneh MK, Gosavi SW, Kulkarni SK, Pasricha R, Ahmad A, Khan MI. Nitrate reductase-mediated synthesis of silver nanoparticles from $AgNO_3$, Biotechnol. Lett. 2007; 29(3): 439-445

63. Fu JK, Liu YY, Gu PY, Tang DL, Lin ZY, Yao BX, Weng SZ. Spectroscopic characterization on the biosorption and bioreduction of Ag (I) by Lactobacillus sp. A09, Acta Physico-Chimica Sinica. 2000; 16(9): 770-782
64. Kononova ON, Kholmogorov AG, Danilenko NV, Goryaeva NG, Shatnykh KA, Kachin SV. Recovery of silver from thiosulfate and thiocyanate leach solutions by adsorption on anion exchange resins and activated carbon, Hydrometal. 2007; 88(1–4):189–195
65. Toscalı D, Nıslı G. A novel silver recovery method from waste photographic films with NaOH stripping, Turk J chem. 2003; 27: 127-133
66. Nowack B. Nanosilver revisited downstream, Science Washington. 2010; 330(6007): 1054-1055
67. Veglio F, Beolchini F. Removal of metals by biosorption: A review, Hydrometal. 1997; 44(3):301–316
68. Wang XW, Zhang LM, C.L, Song RY, Hou HB, Li DL. Enrichment and separation of silver from waste solutions by metal ion imprinted membrane, Hydrometal. 2009; 100(1–2):82–86
69. Hennebel T, De GussemeB, Boon N, Verstraete W. Biogenic metals in advanced water treatment, Trends Biotechnol. 2009; 27(2):90–98
70. Mukherjee P, Ahmad A, Mandal D, Senapati S, Sainkar SR, Khan MI, et al. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: a novel biological approach to nanoparticle synthesis, Nano Letters. 2001; 1(10): 515-519
71. Mafuné F, Kohno JY, Takeda Y, Kondow T, Sawabe H. Structure and stability of silver nanoparticles in aqueous solution produced by laser ablation,J. Phys. Chem. B.2000; 104(35): 8333-8337
72. Bhainsa KC, D'souza SF. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus Aspergillus fumigatus,Colloid. Surface. B. 2006; 47(2): 160-164
73. Sintubin, L, De Gusseme B, Van der Meeren P, Pycke BF, Verstraete W, Boon N. The antibacterial activity of biogenic silver and its mode of action,Appl. Environ. Microb. Biotech. 2011; 91(1): 153-162

74. Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, et al. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities,J Biol Inorg Chem. 2007; 12(4): 527-534

75. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, Yacaman MJ. The bactericidal effect of silver nanoparticles, Nanotechnology. 2005; 16(10): 2346

76. Pal S, Tak YK, Song JM. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*,Appl. Environ. Microb. 2007; 73(6): 1712-1720

77. Kirsner R, Orsted H, Wright B. Matrix metalloproteinases in normal and impaired wound healing: a potential role of nanocrystalline silver, Wounds. 2001; 13: 5–10

78. Özcan B, Türkiye'den Halofilik Arkebakterilerin İzolasyonu Ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2004

79. Mormile MR, Biesen MA, Gutierrez MC, Ventosa A, Pavlovich JB, Onstott TC, Fredrickson JK. Isolation of Halobacterium salinarum retrieved directly from halite brine inclusions,Environ. Microb. 2003; 5(11): 1094-1102

80. Shin SH, Ye MK, Kim HS, Kang HS. The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells, Int. J. Immunopharmaco. 2007; 7(13): 1813-1818

81. Hassanshahian M, Mohamadian J. Isolation and characterization of Halobacterium salinarum from saline lakes in Ira,.Jundishapur J Microbiol. 2011; 4(1): 59-65

82. Castillo PM, Herrera JL, Fernandez-Montesinos R, Caro C, Zaderenko AP, Mejías JA, Pozo D. Tiopronin monolayer-protected silver nanoparticles modulate IL-6 secretion mediated by Toll-like receptor ligands, Nanomedicine. 2008; 3(5): 627–635

83. Lengke MF, Fleet ME, Southam G. Biosynthesis of silver nanoparticles by filamentous cyanobacteria from a silver (I) nitrate complex, Langmuir. 2007; 23(5): 2694-2699

84. Minaeian S, Shahverdi AR, Nohi AS, Shahverdi HR. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by some bacteria, J. Sci. IA. 2008; 17(66): 1-4

85. El-Shanshoury AERR, ElSilk SE, Ebeid ME. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using Escherichia coli ATCC 8739, Bacillus subtilis ATCC 6633, and Streptococcus thermophilus ESh1 and their antimicrobial activities, ISRN Nanotechnology. 2011; 1–7

86. Kalimuthu K, Babu RS, Venkataraman D, Bilal M, Gurunathan S. Biosynthesis of silver nanocrystals by Bacillus licheniformis, Colloid. Surface. B.2008; 65(1): 150-153

87. Samadi, N, Golkaran D, Eslamifar A, Jamalifar H, Fazeli MR, Mohseni FA. Intra/Extracellular Biosynthesis of Silver Nanoparticles by an Autochthonous Strain of Proteus mirabilis Isolated fromPhotographic Waste,J. Biomed. Nanotechno.2009; 5(3): 247-253

88. Kalishwaralal K, Deepak V, Pandian SRK, Kottaisamy M, BarathManiKanth S, Kartikeyan B, Gurunathan S. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using Brevibacterium casei, Colloid. Surface. B.2010; 77(2): 257-262

89. Mohanpuria P, Rana NK, Yadav SK. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications,J. Nanopart. Res. 2008; 10(3): 507-517

90. Ahmad A, Mukherjee P, Senapati S, Mandal D, Khan MI, Kumar R, Sastry M. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*, Colloid. Surface. B.2003; 28(4): 313-318

91. Durán N, Marcato PD, Durán M, Yadav A, Gade A, Rai M. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants,Appl. Environ. Microb. Biotech. 2011; 90(5): 1609-1624

92. Bhainsa KC, D'souza SF. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus Aspergillus fumigatus, Colloid. Surface. B.2006; 47(2): 160-164

93. Basavaraja S, Balaji SD, Lagashetty A, Rajasab AH, Venkataraman A. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus Fusarium semitectum,Mater. Res. Bull. 2008; 43(5): 1164-1170

94. Huang J, Li Q, Sun D, Lu Y, Su Y, Yang X, et al. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried Cinnamomum camphora leaf, Nanotechnology. 2007; 18(10): 105-104

95. Ahmad N, Sharma S, Singh VN, Shamsi SF, Fatma A, Mehta BR. Biosynthesis of silver nanoparticles from Desmodium triflorum: a novel approach towards weed utilization, Biotech. Res. Int. 2010;1–8

96. Sathyavathi R, Krishna MB, Rao SV, Saritha R, Rao DN. Biosynthesis of silver nanoparticles using Coriandrum sativum leaf extract and their application in nonlinear optics, Adv. Sci. Lett.. 2010; 3(2): 138-143