

Gümüş Nanopartiküllerin Mikobiyosentezi: Optimizasyon ve Karakterizasyon

Gamze Tunca

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Haziran 2021

Mycobiosynthesis of Silver Nanoparticles: Optimization and Characterization

Gamze Tunca

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

June 2021

Gümüş Nanopartiküllerin Mikobiyosentezi: Optimizasyon ve Karakterizasyon

Gamze Tunca

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Semra İlhan

Bu tez ESOGÜ BAP tarafından '2020-2800' no'lu proje çerçevesinde desteklenmiştir.

Haziran 2021

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre Prof. Dr. Semra İlhan danışmanlığında hazırlamış olduğum ‘Gümüş Nanopartiküllerin Mikobiyosentezi: Optimizasyon ve Karakterizasyon’ başlıklı tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 13/08/2021

Gamze Tunca

ÖZET

Nanopartikül sentezi için çevre dostu ve düşük maliyetli yöntemlere duyulan ihtiyaç dolayısıyla biyolojik (yeşil sentez) yaklaşımlara ilgi artmaktadır. Nanopartiküllerin yeşil sentezinde bitkiler, funguslar ve bakterilerin kullanıldığı çok sayıda çalışmalar yapılmıştır. Her organizmanın avantajı ve dezavantajı bulunmakta fakat, funguslar ile biyokütle uygulamalarının basitliği, hücre içi metal emilimi ve hızlı büyümeleri ve çok çeşitli hücre içi ve dışı enzim üretmeleri nanopartikül biyosentezinde onları öne çıkarmaktadır.

Bu çalışmada hipersalin ortamdan izole edilen *Aspergillus flavus*, *A. clavatus* ve *A. fumigatus* biyokütelleri kullanılarak gümüş nanopartiküllerin (AgNP) biyosentez koşulları Box-Behnken Deney tasarımı ile optimize edilmiştir. Sentezlenen AgNP'ler UV-vis spektroskopisi, Dinamik ışık saçılımı (DLS), Zeta potansiyeli, Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ve X-ışını kırınımı (XRD) kullanılarak karakterize edildi. Antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon yöntemi ile antoksidan aktivitesi ise DPPH ile değerlendirilmiştir.

PDI, zeta potansiyeli ve partikül boyutu verilerine göre yapılan deney tasarımı analizi, AgNP sentezinde en verimli koşulların *A. flavus* için 27°C/9pH/0,1mM, 27°C/9pH/0,5mM ve 37°C/9pH/0,3mM, *A.fumigatus* için 27°C/9pH/0,1mM ve 37°C/7pH/0,5mM olduğu belirlenmiştir. UV-vis spektroskopisinde yapılan ölçümlerde AgNP'ler, 420nm ile 430nm arasında karakteristik yüzey plazmon rezonansı göstermiştir. *A. flavus* ve *A. fumigatus* ile sentezlenen AgNP'ler 50-100nm arasında değişen, küresel morfolojiye sahipti. Kullanılan test organizmaları *E. coli*, *S. aureus* ve *C. albicans* ın sentezlenen Ag nanopartiküllere duyarlı olduğu belirlenmiştir. Yapılan optimizasyon ve karakterizasyon sonucunda fungusların yeşil sentez ile AgNP üretiminde potansiyel araçlar olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Yeşil sentez, Funguslar, Gümüş Nanopartikül, Box-Behnken Deney Tasarımı, Optimizasyon, Karakterizasyon, Biyoaktivite

SUMMARY

There is increasing interest in biological (green synthesis) approaches due to the need for environmentally friendly and low-cost methods for nanoparticle synthesis. Numerous studies have been conducted using plants, fungi and bacteria in the green synthesis of nanoparticles. Each organism has advantages and disadvantages, but the simplicity of biomass applications with fungi, their intracellular metal absorption and rapid growth, and the production of a wide variety of intracellular and extracellular enzymes make them stand out in nanoparticle biosynthesis.

In this study, biosynthesis conditions of silver nanoparticles (AgNP) were optimized by Box-Behnken Experiment design by using *Aspergillus flavus*, *A. clavatus* and *A. fumigatus* biomass isolated from hypersaline medium. The synthesized AgNPs were characterized using UV-vis spectroscopy, Dynamic light scattering (DLS), Zeta potential, Transmission Electron Microscopy (TEM), X-ray diffraction (XRD) and. Its antimicrobial activity and antioxidant activity were evaluated by disc diffusion method and DPPH, respectively.

Experimental design analysis based on PDI, zeta potential and particle size data showed that the most efficient conditions for AgNP synthesis were 27°C/9pH/0.1mM, 27°C/9pH/0.5mM, and 37°C/9pH/0.3mM for *A. flavus*. It was determined that 27°C/9pH/0.1mM and 37°C/7pH/0.5mM for *A.fumigatus*. In measurements made in UV-vis spectroscopy, AgNPs showed characteristic surface plasmon resonance between 420nm and 430nm. AgNPs synthesized by *A. flavus* and *A. fumigatus* had spherical morphology ranging from 50-100nm. It was determined that the used test organisms *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans* were sensitive to the synthesized Ag nanoparticles. As a result of the optimization and characterization, it was concluded that fungi can be potential tools in the production of AgNP by green synthesis.

Keywords: Green synthesis, Fungi, Silver Nanoparticle, Box-Behnken Experimental Design, Optimization, Characterization, Bioactivity

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	V
SUMMARY	VI
TEŞEKKÜR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	3
ÇİZELGELER DİZİNİ	5
1. GİRİŞ VE AMAÇ	7
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	1
2.1 Nanoteknoloji	1
2.1.1. Tanımı ve tarihçesi	1
2.1.2. Uygulama alanları	3
2.2. Nanopartiküllerin Sınıflandırılması.....	5
2.3. Metal Nanopartiküller	6
2.4. Nanopartiküllerin Sentezlenme Yöntemleri.....	7
2.4.1. Fiziksel ve kimyasal yöntemler	9
2.4.2. Biyosentez (Yeşil Sentez)	9
2.5. Mikrofunguslar	12
2.6. Box-Behnken Deney Tasarımı	14
2.7. Sentezlenen Gümüş Nanopartiküllerin Karakterizasyon Yöntemleri	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM	1
3.1. Materyal	1
3.1.1. Mikroorganizmalar	1
Nanopartikül Üreticisi Fungal Kültürler	1
3.1.2. Kullanılan Besiyeri ve Çözeltiler	2
3.1.3. NP Karakterizasyonunda Kullanılan Cihazlar	4
3.2. Yöntem.....	5
3.2.1. Fungal biyokütle üretimi.....	5
3.2.2. Gümüş nanopartikül sentezlenmesi	5
3.3. Box-Behnken Deney Tasarımı ile Optimizasyon.....	6
3.4. Gümüş Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	7

4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	10
4.1. Gümüş Nanopartiküllerin Sentezlenmesi	10
4.2. BBD ve Optimizasyon	10
4.2.2. <i>Aspergillus flavus</i> aracılığıyla AgNP sentezinin BBD ile optimizasyonu....	13
4.2.3. <i>Aspergillus clavatus</i> aracılığıyla AgNP sentezinin BBD ile optimizasyonu	23
4.2.4. <i>A. fumigatus</i> aracılığıyla AgNP sentezinin BBD ile optimizasyonu	24
4.3. AgNP'lerin UV-Vis Spektrumu ile Karakterizasyonu	33
4.3.1. <i>A. flavus</i> ile sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrum karakterizasyonu	34
4.3. <i>A. fumigatus</i> ile sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis Karakterizasyonu.....	36
4.4. AgNP'lerin Zeta Potansiyeli DLS Karakterizasyonu	38
4.5. AgNP'lerin TEM ile Karakterizasyonu	43
4.6. AgNP'lerin XRD ile Karakterizasyonu	46
4.7. AgNP'lerin Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktiviteleri	51
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	54
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Lycurgus kupası	2
2.2. Nanopartiküllerin sentezlenme yolları	8
3.1. Nanopartikül sentez basamakları, optimizasyon, karakterizasyon	6
4. 1. <i>Aspergillus flavus</i> ile AgNP sentezi sonucunda oluşan renk değişimi	12
4. 2. <i>Aspergillus clavatus</i> ile AgNP sentezi sonucunda oluşan renk değişimi	12
4.3. <i>Aspergillus fumigatus</i> ile AgNP sentezi sonucunda oluşan renk değişimi.....	13
4. 4. <i>A. flavus</i> ile AgNP sentezine ait tepki yüzey ve kontur grafiği	15
4.5. <i>A. flavus</i> ile AgNP sentezine ait tepki yüzey ve kontur grafiği	19
4. 6. <i>A. flavus</i> ile AgNP sentezine ait tepki yüzey ve kontur grafiği	21
4. 7. <i>A. fumigatus</i> ile AgNP sentezine ait tepki yüzey ve kontur grafiği	25
4. 8. <i>A. fumigatus</i> ile AgNP sentezine ait tepki yüzey ve kontur grafiği	28
4. 9. <i>A. fumigatus</i> ile AgNP sentezine ait tepki yüzey ve kontur grafiği	31
4.10. <i>A. flavus</i> ile 27°C / 9 pH / 0,1mM AgNO ₃ koşullarında gerçekleşen AgNP sentezine ilişkin UV-Vis spektrumu.	35
4.11. <i>A. flavus</i> ile 27°C / 9 pH / 0,5 mM AgNO ₃ koşullarında gerçekleşen AgNP sentezine ilişkin UV-Vis spektrumu	35
4.12. <i>A. flavus</i> ile 37°C / 9 pH / 0,3 mM AgNO ₃ koşullarında gerçekleşen AgNP sentezine ilişkin UV-Vis spektrumu	36
4.13. <i>A. fumigatus</i> ile 27°C / 9 pH / 0,1 mM AgNO ₃ koşullarında gerçekleşen AgNP sentezine ilişkin UV-Vis spektrumu.	37
4.14. <i>A. fumigatus</i> ile 37°C / 7 pH / 0,5 mM AgNO ₃ koşullarında gerçekleşen AgNP sentezine ilişkin UV-Vis spektrumu.	37
4.15. <i>A. flavus</i> 27°C/9pH/0,1mM AgNO ₃ koşullarında sentezlenen AgNP'lerin zeta potansiyel grafiği	38
4.16. <i>A. flavus</i> 27°C/ 9 pH/ 0,5 mM AgNO ₃ koşullarında sentezlenen AgNP'lerin zeta potansiyel grafiği	39
4.17. <i>A. flavus</i> 37°C/ 9 pH/0,3 mM AgNO ₃ koşullarında sentezlenen AgNP'lerin zeta potansiyel grafiği	39

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.18. <i>A. fumigatus</i> 27°C/9 pH /0,1 mM AgNO ₃ koşullarında sentezlenen AgNP'lerin zeta potansiyel grafiği	40
4.19. <i>A. fumigatus</i> 37°C/ 7 pH /0,5 mM AgNO ₃ koşullarda sentezlenen AgNP'lerin zeta potansiyel grafiği	40
4.20. <i>A.flavus</i> , 27°C / 9pH / 0,1mM için DLS analizi	41
4.21. <i>A.flavus</i> , 27°C / 9pH / 0,5mM AgNO ₃ koşullarında partikül boyutu dağılımı	42
4.22. <i>A.flavus</i> , 37°C / 9pH / 0,3mM için DLS analizi	42
4.23. <i>A.fumigatus</i> , 27°C / 9pH / 0,1mM için DLS analizi	42
4.24. <i>A.fumigatus</i> , 37°C / 7pH / 0,5mM için DLS analizi	43
4.25. <i>A.flavus</i> ile sentezlenen AgNP'lerin (27°C/9pH/0,1mM) TEM analizi	44
4.26. <i>A.flavus</i> ile sentezlenen AgNP'lerin (27°C/9pH/0,5mM) TEM analizi	44
4.27. <i>A.flavus</i> ile sentezlenen AgNP'lerin (37°C/9pH/0,3mM) TEM analizi	45
4.28. <i>A.fumigatus</i> ile sentezlenen AgNP'lerin (27°C/9pH/0,1mM) TEM analizi	45
4.29. <i>A.fumigatus</i> ile sentezlenen AgNP'lerin (37°C/7pH/0,5mM) TEM analizi	46
4.30. <i>A. flavus</i> 27°C/ 9pH/ 0,1mM AgNO ₃ koşullarında sentezlenen AgNP'lerin XRD deseni	47
4.31. <i>A. flavus</i> 27°C/ 9pH/ 0,5mM AgNO ₃ koşullarında sentezlenen AgNP'lerin XRD deseni	48
4.32. <i>A. flavus</i> 37°C/ 9pH/ 0,3mM AgNO ₃ koşullarında sentezlenen AgNP'lerin XRD deseni	48
4.33. <i>A. fumigatus</i> 27°C/ 9pH/ 0,1mM AgNO ₃ koşullarında sentezlenen AgNP'lerin XRD deseni	49
4.34. <i>A. fumigatus</i> 37°C/ 7pH/ 0,5mM AgNO ₃ koşullarında sentezlenen AgNP'lerin XRD deseni	50
4.35. Biyosentezlenen AgNP'lerin <i>E.coli</i> üzerindeki duyarlılığı	52
4.36. Biyosentezlenen AgNP'lerin <i>S.aureus</i> üzerindeki duyarlılığı.....	53
4.37. Biyosentezlenen AgNP'lerin <i>C.albicans</i> üzerindeki duyarlılığı.....	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3. 1. Çalışmada kullanılan cihazlar, kullanım amacı ve bulunduğu birim	4
3. 2. Denemeler için seçilen değişkenlerin düzeyleri	7
3. 3. Seçilen değişkenlerin Box-Benkhen deney tasarımında belirlenen kombinasyonları ...	7
4. 1. Box-Behnken tasarımına göre yapılan 15 deney ve sonuçları (X1, X2 ve X3 sırasıyla sıcaklık, pH ve AgNO ₃ miktarı).....	14
4. 2. <i>A. flavus</i> ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin ortalama çap boyutu üzerine kodlanmış katsayılar	16
4. 3. <i>A. flavus</i> ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin ortalama çap boyutu üzerine R ² ve düzeltilmiş R ² değerleri.....	16
4. 4. <i>A. flavus</i> ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin ortalama çap boyutu üzerine varyans analizi	17
4. 5. <i>A. flavus</i> ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin DLS üzerine etkilerinin kodlanmış katsayılar	18
4. 6. <i>A. flavus</i> ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin DLS üzerine etkilerinin R ² ve düzeltilmiş R ² değerleri.....	20
4. 7. <i>A. flavus</i> ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin DLS üzerine etkilerinin Varyans analizi	20
4. 8. <i>A. flavus</i> ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin zeta potansiyeli üzerine etkilerinin kodlanmış katsayılar	22
4. 9. <i>A. flavus</i> ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin zeta potansiyeli üzerine etkilerinin R ² ve düzeltilmiş R ² değerleri	22
4. 10. <i>A. flavus</i> ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin zeta potansiyeli üzerine etkilerinin varyans analizi	23
4. 11. Box-Behnken tasarımına göre yapılan 15 deney ve sonuçları (X1, X2 ve X3 sırasıyla sıcaklık, pH ve AgNO ₃ miktarı)	23

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4. 12. Box-Behnken tasarımına göre yapılan 15 deney ve sonuçları (X1, X2 ve X3 sırasıyla sıcaklık, pH ve AgNO ₃ miktarı).	24
4. 13. <i>A. fumigatus</i> ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin ortalama çap boyutu üzerine etkilerinin kodlanmış katsayıları.....	26
4. 14. <i>A. fumigatus</i> ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin ortalama çap boyutu üzerine etkilerinin R ² ve düzeltilmiş R ² değerleri.....	26
4. 15. <i>A. fumigatus</i> ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin ortalama çap boyutu üzerine etkilerinin varyans analizi	27
4. 16. <i>A. fumigatus</i> ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin DLS üzerine etkilerinin kodlanmış katsayıları	29
4. 17. <i>A. fumigatus</i> ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin DLS üzerine etkilerinin R ² ve düzeltilmiş R ² değerleri.....	29
4. 18. <i>A. fumigatus</i> ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin DLS üzerine etkilerinin varyans analizi	30
4. 19. <i>A. fumigatus</i> ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin zeta potansiyeli üzerine etkilerinin kodlanmış katsayılar.....	32
4. 20. <i>A. fumigatus</i> ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin zeta potansiyeli üzerine etkilerinin R ² ve düzeltilmiş R ² değerleri.....	32
4. 21. <i>A. fumigatus</i> ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin zeta potansiyeli üzerine etkilerinin varyans analizi	33
4. 22. Sentezlenen AgNP'lerin XRD toz kırınım desenine ilişkin veriler	50
4. 23. Biyosentezlenen AgNP'lerin agar kuyucuk yöntemi ile belirlenen inhibisyon zon çapları (mm)	52

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nanoteknoloji terimi, 1-100 nm boyutundaki materyallerin üretimi ve kullanımını ifade eder. Nanoteknoloji; fizik, kimya, biyoloji, elektronik, malzeme, uzay, endüstri ve mekanik gibi birçok alanda kullanılan disiplinler arası bir bilimdir (Ahmed vd, 2016).

Nanopartiküllerin fiziksel ve kimyasal özellikleri, nano boyutta olmalarından dolayı farklılıklar gösterir. Nanopartiküller, elektron tutucu etkisi, geçici mıknatıslık özelliği, yüzey plazmon rezonansı, kuantum boyut etkileri, elektronik yapısının boyut bağımlılığı, yüzey atomlarının karakterleri, yüksek yüzey/hacim oranı gibi özellikleri ile özgün materyallerdir. Çeşitli nanopartikül (NP) türleri malzeme içeriklerine göre ayrılabilir; organik NP'ler (lipozomlar, polimerik, miseller ve katı lipitler), inorganik NP'ler, biyopolimerlere (aljinat, albümin, kitosan vb.) dayanan NP'ler gibi (Dorcheh ve Vahabi, 2016). Nanopartiküller iki genel yaklaşımla üretilir; yukarıdan aşağıya (top to bottom) ve aşağıdan yukarıya (bottom to up) olarak (Ahmed vd., 2016). Yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya teknikler kullanılarak sentezlenen nanopartiküllere uygulanan farklı yöntemler şekil 2.4.'de özetlenmiştir. Kimyasal yöntemler fiziksel yöntemlere göre yüksek verimliliğe sahiptir ancak üretim aşamasında toksik etkisi çoktur ve iki yöntemde üretim açısından yüksek maliyete sahiptir. Çevre dostu (biyosentez / yeşil sentez) yöntemler ise hem düşük maliyette hem de çevresel olarak daha güvenilir üretim yöntemleridir. Nanopartiküllerin biyolojik olarak sentezi kimyasal yöntemlere göre daha çevre dostu ve düşük maliyetli olmasına rağmen henüz endüstriyel boyutta üretim için ideal değildir (Skiba, Vorobyova, Pivovarov ve Makarshenko, 2020).

Yeşil sentez; nanopartiküllerin mikroorganizmalar (bakteri, maya, fungus, alg) ve bitkiler ile üretimini içeren, üretim aşamasında toksik etkisi olmayan, düşük maliyetli ve çevre dostu bir üretimdir. Nanopartikül sentezini; bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunan enzimler, proteinler, aminoasitler, polisakkaritler ve vitaminlerin rol aldığı indirgeme mekanizması üzerinden gerçekleştirir. Mikroorganizmalar ile NP üretimi bitkilerle

üretimine göre yüksek performans, metal iyonlarının seçici absorpsiyonu, çevre koşullarının geniş aralıkta kullanılabilirliği, düşük maliyet, kolay ulaşılabilirlik, yüksek miktarda üretilebilirlik gibi avantajlara sahiptir. Nanopartikül sentezinde biyolojik, fizyolojik ve moleküler özelliklerinin çeşitliliğinden dolayı özellikle funguslar muazzam organizmalardır. Biyokütle uygulamalarının basitliği, hücre içi metal emilimi ve hızlı büyüme oranları, kolay yayılma özellikleri ve çok miktarda hücre içi ve dışı enzim üretimi özellikleri ile funguslar yeşil sentezle üretimde tercih edilen mikroorganizmalar olmuştur (Honary, Barabadi, Gharaei-Fathabad ve Naghibi, 2013; Saravanan ve Nanda, 2010).

Metal nanopartiküllerin sentezi, elektriksel, optik, manyetik ve kimyasal özelliklerinden dolayı önemlidir. Metal nanopartiküller, geniş yüzey alanı ve hacim oranlarına bağlı olarak dikkate değer antibakteriyel özelliklere sahiptir. Tüm bu metal nanopartiküller arasında gümüş nanopartikül, kimyasal stabilite, iyi iletkenlik, katalitik etki ve antibakteriyel, anti-viral, antifungal gibi özellikleri nedeniyle nanoteknoloji alanında tercih edilmektedir (Ahmed vd., 2016). Mikroorganizmalar ve bitkiler kullanılarak biyosentezlenen gümüş nanopartiküller üzerine çok fazla çalışma bulunmaktadır (E. Abbasi vd., 2016; Barabadi vd., 2019; Hashmi vd., 2019; Honary vd., 2013; Saravanan ve Nanda, 2010; Yazdi vd., 2020; Zia vd., 2017).

Bu çalışmada, daha önce gümüş nanopartikül (AgNP) sentezinde başarılı olduğu tespit edilen 3 fungal tür (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus fumigatus*) ile üstün özelliklere sahip AgNP'lerin sentezlendiği optimum koşulların belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda yapılan optimizasyon çalışmasında Box-Behnken Tasarımı (Box-Behnken Design, BBD) kullanılmıştır. AgNP'ler karakterize edilerek antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri değerlendirilmiştir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1 Nanoteknoloji

Nano ‘cüce’ anlamına gelen Yunanca kökenli bir kelimedir ve metrenin binde birine karşılık gelir. Nanoteknoloji terimi, 1-100 nm ölçeğinde materyal üretimi ve kullanımını ifade eder (Bayda vd., 2020). Fiziksel özelliklerdeki farklılıklar nedeniyle, nanometrik ölçekli malzeme orijinal özelliklerinden farklı özellikler gösterir. Nanopartiküller, bilim, teknoloji, tıp, endüstri ve çevre gibi hayatımızın farklı yönlerinde geniş uygulama alanına sahiptir. Farklı fiziksel ve kimyasal özelliklerin çeşitliliği, nanopartikül üretimine diğer nanomateryal sektörlerinden daha fazla dikkat çekmiştir (Barabadi, 2017).

2.1.1. Tanımı ve tarihçesi

Modern bir kavram olarak nanoteknoloji fikri ilk kez, Kaliforniya Teknoloji Enstitüsü'nden (Caltech) fizikçi Richard Feynman'ın 29 Aralık 1959'da malzeme ve cihazların moleküler boyutlarda üretilmesi üzerine yaptığı bir konuşmada 'aşağıda (küçük boyutlarda yapılabilecek) çok şey var' (There's plenty of room at the bottom) ifadesiyle ortaya çıkmıştır. 1974 yılında Norio Taniguchi ‘nanoteknoloji’ terimini; ‘Nanoteknoloji temel olarak malzemelerin bir atom veya bir molekül tarafından ayrılması, birleştirilmesi ve deformasyonunun işlenmesinden oluşur’ diyerek tanımladı ve ‘nanoteknoloji’ terimini kullanan ilk bilim insanı oldu (Bayda vd., 2020).

Modern bir kavram olan nanoteknolojinin kullanımı antik çağlara kadar dayanmaktadır. M.S. 4. yüzyılda Roma’da antik cam endüstrisinde ‘Lycurgus kupası’ nın nanoteknoloji alanında başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Lycurgus kupası dikroik camdan yapılmış dekoratif bir bardaktır. Dikroik camın özelliği ise, doğrudan ışık geldiğinde yeşil ve camdan ışık parladığında kırmızı-mor görünmesidir (Şeki 2.1). Camın bu özelliği,

yapısında bulunan altın-gümüş alaşımlı NP'lerin varlığıdır. Lycurgus kupası, en eski sentetik nanomalzemelerden biri olarak tarihteki yerini almaktadır (Bayda vd., 2020).



Şekil 2.1 Lycurgus kupası (Bayda vd., 2020)

9. – 17. yüzyıllarda İslam dünyasında ve daha sonra Avrupa'da kullanılan ışıltılı parlak seramik sırları AgNP, CuNP ve benzer diğer nanopartikülleri içeriyordu (Pradell vd., 2007). 16. yüzyılda ise İtalya'da Rönesans çanak çömleğini oluşturmak için nanopartiküller kullanılmıştır (Poole Jr ve Owens, 2003).

1981 yılında atomların doğrudan görüntülerini veren taramalı tünelleme (STM) mikroskopunun keşfi ile birlikte bilim adamları nanometre boyutunda çalışmalara yönelmiştir. 20. yüzyılda ise doğada bulunmayan nano yapılar atomsal düzeyde tasarlanarak sentezlenmeye başlanmıştır (Drexler, Peterson ve Pergamit, 1991).

1990'ların başında, Rice Üniversitesi'nden Richard Smalley ve ekibi 60 karbon (C₆₀) atomunun simetrik biçimde sıralanmasıyla elde edilen küresel biçimdeki "fullerene" moleküllerini geliştirmişlerdir. Bu molekül yaklaşık bir nanometre büyüklüğünde, aynı miktardaki çelikten daha güçlü, plastikten daha hafif, elektrik ve ısı geçirgen bir yapıya sahiptir. Yaptıkları bu çalışma ile araştırmacılar 1996 yılında Nobel Kimya Ödülü'nü almışlardır (Binnig, Quate ve Gerber 1986). Nanomalzemeler, daha sağlam, hafif, düşük hata seviyesi ve dayanıklılık güçleri ile endüstride çığır açan yenilikler getirmektedir. 1991

yılında Japonya'da yapılan bir çalışmada karbon nanotüpler bulunmuştur ve çelikten 100 kat daha güçlü, ağırlığı çeliğin ağırlığının 1/6'sı kadar hafiftir (Pratt vd., 2008).

21. yüzyılın başında nanobilim ve nanoteknoloji alanlarına ilgi arttı. Amerika Birleşik Devletleri'nde, Feynman'ın atom düzeyinde maddenin manipülasyonu kavramı, ulusal bilim önceliklerini şekillendirmede önemli bir rol oynadı. 21 Ocak 2000'de Başkan Bill Clinton Caltech'te yaptığı bir konuşmada, nanoteknoloji alanındaki araştırmaların finanse edilmesini savundu. Üç yıl sonra, Başkan George W. Bush, 21. yüzyıl Nanoteknoloji Araştırma ve Geliştirme Yasasını imzaladı. Mevzuat, nanoteknoloji araştırmalarını ulusal bir öncelik haline getirdi ve Ulusal Teknoloji Girişimi'ni (NNI) oluşturdu (Bayda vd., 2020).

Son zamanlarda biyotıp alanında nanoteknolojinin potansiyeli artmakta ve hastalıkların teşhisi ve tedavisi üzerine birçok çalışma yapılmaktadır (Weissig, Pettinger ve Murdock, 2014). Birçok uzman biyo-nanoteknolojiyi, nanobilimin en ilgi çekici uygulama alanlarından biri olarak kabul etmektedir. Nanoteknoloji biyotıp alanında, tanı, tedavi, ilaç dağıtımı ve moleküler görüntüleme gibi alanlarda uygulamaları artmaktadır. ABD'de nanomalzemelerden üretilmiş birçok tıbbi ürün, nanofarmasötikler, rejeneratif tıp için nanomateryaller, antibakteriyel aktiviteye sahip nanopartiküller veya nanobioçipler, nanoelektrotlar, nanobiyosensörler piyasada kullanılmaktadır (Kinneer, Moore, Rodriguez-Lorenzo, Rothen-Rutishauser ve Petri-Fink, 2017).

2.1.2. Uygulama alanları

Nanopartiküllerin ve nanomalzemelerin yeni uygulamaları farklı alanlarda hızla büyümektedir. Sağlık hizmetleri, kozmetik, biyomedikal, gıda ve yem sanayii, ilaç-gen dağıtımı, çevre, sağlık, mekanik, optik, kimya endüstrisi, elektronik, uzay endüstrisi, enerji bilimi gibi alanlarda ve ışık yayıcılar, tek elektronlu transistörler, doğrusal olmayan optik cihazlar ve foto-elektrokimyasal gibi uygulamalarda nanoteknoloji kullanılmaktadır (Ahmed vd., 2016).

Günümüzde, nanoteknolojideki ilerlemeyle, enfeksiyonları ve hastalıkları daha kesin, hızlı ve düşük yan etkilerle tespit etmek ve iyileştirmek mümkündür. Bu nanoyapılar

üzerinde ilaç ve teşhis paketleri birleştiren ve spesifik doku ve hücreleri hedef alan karmaşık tekniklerin geliştirilmesi ile mümkündür. Nanoteknoloji bazlı ilaçlar, sadece daha güçlü ve kırılmaz antimikrobiyal maddeler için değil, aynı zamanda çok düşük dozlarda hücre ve dokuya yönelik ilaç paketleri için de insan gereksinimlerini karşılayabilir (Dorcheh ve Vahabi, 2016; Prabhu ve Poulouse, 2012b).

Spesifik dokuyu hedeflemek için dağıtım ajanları olarak kullanılan Pt, Al, Zn, Ti, Pa, Fe, Cd, Si ve Cu gibi birçok inorganik NP'ler vardır. İnorganik NP'ler ilaç taşıyıcı olarak yüksek kapasitelerinden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, silika nanoseramikleri biyouyumlu yapıları nedeniyle tıbbi ve terapötik uygulamalar için çok iyi adaylardır. Cu NP'ler, stabilizatör varlığında aglomerasyon ve oksidasyonu azaltmak için kullanılan iyi bir seçenektir ve Cu NP'ler ucuz, hazırlanmaları kolay ve iyi bir antimikrobiyal aktiviteye sahiptirler. Fe NP'ler, mikrobiyal enfeksiyonun hızlı ve kesin teşhisi için, Zn ve Cd NP'ler ise daha çok optikle ilgili ürünlerde kullanılacak kuantum noktalarının üretimi için kullanılır. Medikal, gıda ve ilaç uygulamalarının yanı sıra, Au ve Ag gibi asil metal NP'leri elektron mikroskopu, analiz, biyosensörler, elektronik, boya, iletken kaplama, optik, elektronik katalizör ve temel araştırmalar gibi farklı bilim alanlarında da kullanılmaktadır. NP bazlı ilaçların geleneksel ilaçlara göre avantajı, daha yüksek tedavi etkinliği ve daha az sağlık sorunu sağlamaktır. NP'lerin onkoloji, enfeksiyon, kardiyovasküler, alzheimer ve oküler patoloji gibi farklı hastalıkların tedavisinde etkili olduğu ispatlanmıştır (Dorcheh ve Vahabi, 2016; Khabat ve Sedigheh, 2014)

Gümüş nanopartiküller antimikrobiyal özellikleri ile öne çıkmaktadır. Ayrıca antikanser, antiinflamatuvar ve yara tedavisi uygulamalarında kullanılmaktadır. Bunların dışında AgNP'ler, biyosensör materyaller, kompozit fiberler, kriyojenik süperiletken materyaller, kozmetik ürünler ve elektronik bileşenlerde kullanılan eşsiz özelliktedir. AgNP'lerin inhibitör ve bakterisidal etkilere sahip olduğu bilinmektedir. AgNP'ler tıbbi cihazlar, dental aletler, kemik çimentosu, kanser tedavisi ve görüntüleme de uygulanır (Elham Abbasi vd., 2016; Khabat ve Sedigheh, 2014; Singh, Kim, Zhang ve Yang, 2016).

2.2. Nanopartiküllerin Sınıflandırılması

NP'lerin fiziksel ve kimyasal özellikleri, nano ölçekli yapıları nedeniyle farklılık gösterir. Çeşitli NP türleri malzeme içerikleriyle ayırt edilebilir.

Organik NP'ler çoğunlukla biyobozunurdur, düşük toksisite oranına sahiptirler ve biyolojik sistemlerle uyumludurlar. Bunlara örnek olarak, lipozomlar, miseller, katı lipitler ve polimerik NP'ler verilebilir. Miseller, boyutları 5-100 nm aralığında olan, belirli bir çözücüye zıt ilgileri olan iki ayrı bölgeden oluşan, belirli konsantrasyon ve sıcaklıkta amfifilik olarak meydana gelen birleşme koloitleridir ve göğüs kanseri gibi birçok kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Lipozom NP'lerin boyutları 20-100nm arasında değişir, küresel şekillidir ve iki fosfolipit katmanından oluşur. Lipozom NP'leri, Ambisome gibi antimikrobiyaller olarak kullanılmaktadır. Polimerik nanopartiküllerin, boyutları 10-1000 nm arasında değişir ve doğal ya da sentetik yapıdaki polimerler ile hazırlanır. Polimerik NP'ler etkin maddenin partikül içinde çözündürüldüğü, hapsedildiği veya yüzeye adsorbe edildiği (bağlandı) matris sistemlerdir. Doğal, polisakkarit yapıda ve sentetik polimerler kullanılarak hazırlanan polimerik NP'ler ilaç dağıtım sistemlerinde kullanılmaktadır (Khabat ve Sedigheh, 2014).

İnorganik NP'ler, nanoteknolojide en önemli yere sahip olan metal nanopartiküllerden oluşmaktadır. Boyutları 1-100nm arasında değişmektedir. Metal NP'lerin biyolojik yolla sentezlenmesine indirgeyici moleküller aracılık eder. Metal NP'ler iki yaklaşımla sentezlenir; aşağıdan yukarı ve yukarıdan aşağı olarak(Ahmed vd., 2016). Yukarıdan aşağı yaklaşımlara, mekanik sentez kimyasal muamele ve sıcaklık/lazer ablasyonu örnek verilebilir. Aşağıdan yukarı yaklaşımlar ise kimyasal çöktürme, ısıyla bozunma, aerosol piroliz ve nanoteknolojinin en önemli yaklaşımlarından biri olan biyosentez örnek verilebilir (Şekil 2. 4). Aljinat, albümin veya kitosan gibi biyopolimerlere dayanan NP'ler, sentetik polimerlere kıyasla düşük immünojeniklikleri nedeniyle, ilaç verme sistemi olarak insan vücudu ile daha uyumludur (Khabat ve Sedigheh, 2014).

NP'lerin biyolojik temelli sentezi, yalnızca ekonomi ve çevre açısından önemli değildir ayrıca, eczanelerde ve tıbbi uygulamalarda NP'lerin biyo-uyumluluğunu etkiler. Biyolojik olarak uyumlu bir indirgeyici molekül kullanmak ilaç dağıtımını amacıyla kullanılan NP'ler için çok önemli bir yere sahiptir. Çünkü bu indirgeyici moleküller ilaç ve NP'ler arasında bağlayıcı bir rol oynamaktadır. Ayrıca, bazı biyomoleküller, sitotoksisite, antimikrobiyal ve kontrollü ilaç salımı gibi NP'lerin diğer önemli özellikleri üzerinde sinerjistik etkilere sahiptir (Khabat ve Sedigheh, 2014).

2.3. Metal Nanopartiküller

Son yıllarda yapılan nanoteknoloji çalışmalarında metal nanopartiküllere olan ilgi artmıştır. İnorganik bazlı metal NP'lerin biyolojik yolla sentezi öne çıkmaktadır ve hem tıbbi biyoloji alanında hem de endüstride önemli yere sahiptir. Metal nanopartiküller, antimikrobiyal, antikanser, katalitik aktivite ve optik özellikleri nedeniyle geniş çapta araştırılmaktadır. Metal nanopartiküllerin en önemli özelliği ise diğer moleküller ile etkileşimlerini artıran geniş yüzey alanı / hacim oranıdır (Gahlawat ve Choudhury, 2019).

Tüm asil metal nanopartiküller arasında gümüş nanopartikülün, kimyasal stabilitesi, iyi iletkenlik, katalitik etkisi, antibakteriyel, antiviral, antifungal gibi benzersiz özellikleri nedeniyle nanoteknoloji alanında diğer bütün metal nanopartiküllerden daha öne geçmektedir (Ahmed vd., 2016). Gümüşün tıbbi özellikleri 2000 yılı aşkın süredir bilinmektedir. Gümüşün en önemli ve nanobilimde en çok kullanılan özelliği antimikrobiyal aktivitesi olmuştur. 19. yüzyıldan bu yana, gümüş bazlı bileşikler birçok antimikrobiyal uygulamada kullanılmıştır ve kullanılmaya devam etmektedir (Prabhu ve Poulouse, 2012a).

AgNP'ler geniş bir antimikrobiyal aktivite spektrumuna sahiptir ve hem gram-pozitif (*Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* vb.) hem de gram-negatif bakterileri (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* vb) öldürebilirler (Liu vd, 2012). AgNP'lerin antibakteriyel etki mekanizması tam bilinmemekle birlikte bununla ilgili bazı varsayımlar ve çalışmalar yapılmıştır. AgNP'ler bakteri hücre zarında yapısal değişikliklere sebep olarak bakteriyi öldürebilir. Bunun yanı sıra, yapılan bir çalışmada elektron spin rezonans

spektroskopisi ile AgNP'lerin bakteri hücre zarına temas ettikten sonra serbest radikal oluşturduğu ve bu nedenle bakterinin öldüğü görülmüştür (Prabhu ve Poulouse, 2012a). Diğer yandan yapılan başka çalışmalarda ise, AgNP'lerin bir çok hayati enzime tutunarak inaktive ettiği görülmüştür (Matsumura, Yoshikata, Kunisaki ve Tsuchido, 2003).

AgNP'lerin en ilgi çekici başka bir özelliği ise olağanüstü optik özellikleridir. Bu özelliği ile optik biyosensörler ve kemosensörlerde kullanılmıştır. Yüzey Plasmon rezonans etkisi kullanılarak, gümüş nanopartiküller çok yüksek bir hassasiyet kazanır ve yüzey plazmon rezonans (SPR) etkisine bağlı olarak spesifik spektrum bantları oluşturur (Elham Abbasi vd., 2016).

AgNP'lerin fiziksel, kimyasal ve biyosentez yolu ile üretimi yapılabilir. Yani AgNP'ler her iki yaklaşımla da, yukarıdan-aşağıya ve aşağıdan-yukarıya üretilir. Yukarıdan aşağıya yönteminde, külçe metallerin mekanik olarak öğütülmesiyle oluşan nanomalzemelerin koloidal koruyucu ajanların eklenmesiyle stabilize edilmesini içerir. Aşağıdan yukarıya yöntemler ise metallerin indirgenmesi, elektrokimyasal yöntemleri içerir (Prabhu ve Poulouse, 2012a).

2.4. Nanopartiküllerin Sentezlenme Yöntemleri

Feynman, nanoyapıların sentezi için farklı olasılıkları tanımlayan iki yaklaşım geliştirildi; yukarıdan aşağıya (Top to bottom) ve aşağıdan yukarıya (Bottom to up) (Şekil 2.4) (Bayda vd., 2020).

Top to bottom = kütle \longrightarrow nanopartikül

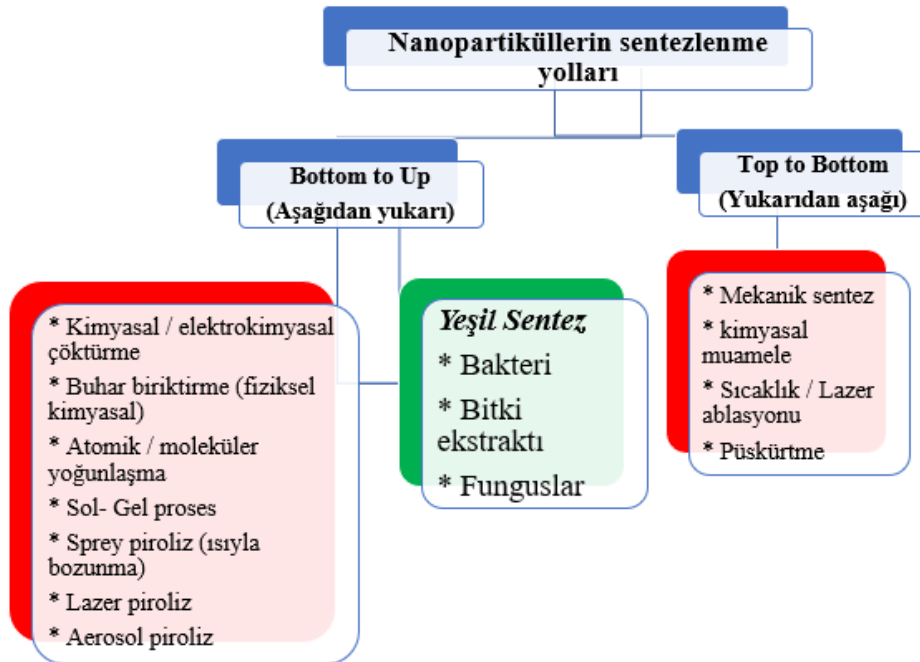
Bottom to up = molekül / atom \longrightarrow agregat \longrightarrow nanopartikül

Yukardan aşağıya yaklaşım, nano boyutta parçacıklar oluşturmak için külçe malzemenin parçalanması yoludur. Yukarıdan aşağıya yaklaşım daha çok hassas mühendislik, litografi ve mikro elektronik endüstrisi gibi alanlarda kullanılmaktadır. Bu

yaklaşım; dağlama, öğütme, püskürtme, lazerle ablasyon, litografi, termal ayrışma örnek verilebilir (Bayda vd., 2020).

Aşağıdan yukarıya doğru yaklaşımlar, atomik veya moleküler boyuttaki yapıları kimyasal reaksiyonlar veya biyolojik sentez ile büyütürken partikül oluşumunun gerçekleştirilmesi olarak tanımlanmaktadır. Bu yaklaşıma, yeşil sentez, eğirme, piroliz, sol-gel işlemleri, süper kritik akışkan sentezi, kimyasal buhar biriktirme gibi yöntemler örnek verilebilir (Gürmen ve Ebin, 2008).

Aşağıdan yukarıya doğru yaklaşımlar daha yüksek verimlilik ve hassasiyet sağlamaktadırlar. Kimyasal yöntemler, fiziksel olanlara göre yüksek verime sahiptir, ancak nanoparçacıkları stabilize etmek için toksik madde kullanımını içerdiğinden dezavantajlara sahiptir ve bu sebeplerle yüksek ölçekli üretim için tercih edilmezler. Yüksek maliyet ve toksik atık üretimi olmaksızın büyük ölçeklerde nanomalzemelerin sürdürülebilir üretiminde çevre dostu üretim yöntemleri zorlu bir adım olmuştur. Çevresel olarak kimyasal yöntemlerden daha güvenli olsa da NP'lerin biyolojik sentezi endüstriyel açıdan henüz hedefine ulaşmamıştır (Bayda vd., 2020).



Şekil 2.2. Nanopartiküllerin sentezlenme yolları

2.4.1. Fiziksel ve kimyasal yöntemler

Fiziksel yöntemler, nanopartiküllerin yukarıdan aşağı yaklaşımı ile üretilen yöntemlerdir. Bunlar dökme malzemelerin nanoboyuta parçalanması işlemleridir. Bu yöntemler genellikle mühendislik alanında kullanılmaktadır. Fiziksel yöntemlere, mekanik sentez, kimyasal muamele, sıcaklık/lazer ablasyonu, ve püskürtme örnek verilebilir. Atmosferik basınçta bir tüp fırını ile buharlaşma-yoğunlaşma tekniği kullanılarak Ag, Au ve PbS gibi nanopartiküllerin üretimi fiziksel yöntemlere örnek verilebilir. Fiziksel yöntemlerin içinde lazer ablasyonu diğer yöntemlere kıyasla daha avantajlı bir tekniktir. Lazer ablasyonu tekniğinde kimyasal reaktifler kullanılmadığı için saf metal kolloidler üretilebilir (Elham Abbasi vd., 2016).

Kimyasal yöntemler aşağıdan yukarı yaklaşımı ile nanopartikül üretilen tekniklerdir. Bunlara, kimyasal ve elektrokimyasal çöktürme, buhar biriktirme, ısıyla bozunma ve lazer piroliz gibi teknikleri örnek verebiliriz. Kimyasal yöntemlerde en çok kullanılan teknik ise organik ya da inorganik ajanlar kullanılarak kimyasal indirgeme yolu ile nanopartikül sentezidir. Kimyasal indirgeme yöntemine örnek olarak AgNP üretimini verebiliriz; bunun için genel olarak sodyum sitrat, askorbat, sodyum borohidrit, elementel hidrojen gibi farklı indirgeme ajanları kullanılır. Bu indirgeme ajanları Ag^+ iyonlarını azaltır ve metalik gümüş (Ag^0) oluşumuna yol açar, akabinde Ag^0 aglomerasyona uğrayarak AgNP'leri oluşturur (Elham Abbasi vd., 2016).

2.4.2. Biyosentez (Yeşil Sentez)

Yeşil sentez, aşağıdan yukarı yaklaşımın, toksik olmayan, çevre dostu, düşük maliyetli ve canlı organizmalar; bitkiler ve mikroorganizmalar (bakteriler, funguslar) ile nanopartikül üretimini içerir.

Bitkiler ile nanopartikül sentezinde indirgeyici ajan olarak fitokimyasallar (terpenoidler, flavonlar, ketonlar, aldehitler, amidler ve karboksilik asitler) kullanılır. Bitkiler ile biyosentezi üç ana aşamadan oluşur; indirgeyici ajanların seçimi, çözücü maddenin seçimi ve stabilize edici reaktiflerin seçimi. Genellikle bitki özütü, hem bir

indirgeyici ajan hem de stabilize edici bir ajan olarak sentez işleminde görev alır. Metal nanopartiküllerin sentezi için yapraklar, meyveler, saplar ve kökler gibi bitki özleri kullanılmıştır. Sıcaklık, pH ve tuz konsantrasyonu bitkilerde biyosentezi etkileyen önemli faktörlerdir (Singh vd., 2016).

Altın ve gümüş nanopartiküller ilk olarak bitkilerle biyosentezlenmiştir. *Acalypha indica*, *Aloe barbadensis*, *Datura metel*, *Nelumbo nucifera* ve *Rhododendron dauricum* gibi bitkiler AgNP üretmek için kullanılmıştır. AuNP'lerin biyosentezinde ise *Aloe barbadensis* Miller, *Medicago sativa*, *Magnolia Kobus* ve *Pelargonium graveolens* yaprağı kullanılmıştır. Nikel, kobalt, çinko ve bakır gibi nanopartiküllerin sentezi için *Brassica juncea*, *Medicago sativa* ve *Helianthus annuus* gibi bitkiler kullanılmıştır (Jeevanandam, Chan ve Danquah, 2016).

Mikroorganizmalar, yüksek performans, metal iyonlarının seçici absorpsiyonu, çevre koşullarının geniş aralıkta kullanılabilirliği, kolay ulaşılabilirlik, yüksek miktarda üretilebilirlik gibi özelliklerinden dolayı 'nano fabrikalar' olarak görülmektedir. Mikroorganizmalar, metal tuzlarının redüktaz enzimleri ile indirgenmesi sonucu metal nanopartikülleri oluşturur. Bakteriler, funguslar ve mayalar başta olmak üzere mikroorganizmalar hem hücre içi hem hücre dışı sentez ile metal nanopartikülleri üretmektedir (Singh vd., 2016).

Bakteriler, metalik iyonları nanopartiküllere indirgeme konusunda kullanım kolaylığı ve yüksek büyüme oranları nedeniyle nanopartikül sentezi için en uygun adaylardan biridir. Bakteriler ağır metal iyonlarına karşı, hücre içi ayırma, dışarı akış pompaları, metal iyon konsantrasyonundaki değişim ve hücre dışı çökeltme gibi çeşitli doğal savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir ve bu savunma mekanizmaları, nanopartiküllerin sentezi için bakteriler tarafından verimli bir şekilde kullanılabilir olması bir avantajdır. Bakterilerin genellikle metal nanopartikülleri hücre dışı veya hücre içi mekanizmalarla sentezledikleri bilinmektedir (Gahlawat ve Choudhury, 2019).

Gümüş nanopartikülleri sentezleyen bakterilerin ilk kanıtı, gümüş madeninden izole edilen *Pseudomonas stutzeri* AG259 suşu kullanılarak oluşturuldu ve bu AgNP hücre içi

redüktaz enzimleri kullanılarak üretildi (Prabhu ve Poulouse, 2012a). Ağır metalle kirlenmiş topraktan izole edilen *Bacillus cereus* kullanılarak 24 saat içinde ortam sıcaklığında AgNP'lerin hücre dışı sentezi çalışıldı. Sentezlenen AgNP'ler, yüzey plazmon rezonans özelliği göstererek başka çalışmalar için öncü olmuştur. *Bacillus subtilis* ile yapılan bir diğer çalışmada hücre dışı sentez ile altın nanopartiküller (AuNP) üretilmiştir. Başka bir çalışmada ise *Pseudomonas aeruginosa*'nın Pd, Ag, Rh, Ni, Fe, Co, Pt ve Li nanopartikülleri hücre içi sentezleme ile ürettiği görülmüştür. Son raporlarda, metal nanopartikül sentezi için *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Alteromonas* ve *Ochrobactrum* vb. gibi farklı bakteri türlerinin yaygın olarak kullanıldığı tespit edilmiştir (Gahlawat ve Choudhury, 2019; Jeevanandam vd., 2016; Prabhu ve Poulouse, 2012a).

1,5 milyona kadar tahmin edilen potansiyel fungus türleri arasında yaklaşık 100.000 fungus türü tanımlanmıştır. Bu popülasyon biyolojik, fizyolojik ve moleküler özellikler açısından muazzam çeşitlilik gösterir. Funguslar nanopartiküllerin biyosentezi ve özellikle metal nanopartikül sentezi için en çok tercih edilen mikroorganizmalardır (Khabat ve Sedigheh, 2014). Bakterilerle karşılaştırıldığında, funguslar daha yüksek miktarlarda nanopartikül üretebilirler çünkü daha fazla miktarlarda protein salgırlar. Ayrıca funguslar, biyokütle uygulamalarının basitliği, hücre içi metal emilimi, hızlı büyüme oranları, kolay yayılma özellikleri ve çok miktarda hücre içi ve dışı enzim üretimi özellikleri ile biyolojik yolla nanopartikül üretiminde tercih edilen mikroorganizmalar olmuştur (Prabhu ve Poulouse, 2012a). *Fusarium*, *Aspergillus*, *Verticillium* ve *Pencillium* gibi fungus türleri nanopartikül üretimi için ümit verici kaynaklar olmuştur (Alghuthaymi, Almoammar, Rai, Said-Galiev ve Abd-Elsalam, 2015). Funguslar ile metal nanopartikül sentezinde muhtemel indirgeme mekanizması redüktaz enzimleri (nitrat redüktaz, sülfat redüktaz gibi) ile olmaktadır (Singh vd., 2016). Ayrıca funguslar diğer mikroorganizmalara göre, geniş ekolojik parametrelerde (pH konsantrasyonu, sıcaklık ve tuz konsantrasyonu ve inkübasyon süresi), daha verimli sayıda ve morfolojide metal nanopartikül üretme özelliğine sahiptir (Honary vd., 2013).

Mikobiyosentez için üç olası mekanizma çalışılmaktadır bunlar; nitrat redüktaz etkisi, elektron mekik kinonları ve her ikisi. Nitrat redüktaz etkisi, nitritin 2,3-

diaminoftalen ile reaksiyonu ile gerçekleştirilen bir çalışma yapıldı (Durán, Marcato, Alves, De Souza ve Esposito, 2005; Kumar vd., 2007). Nitrat redüktazın birçok fungus tarafından NP oluşumunu başlattığı öne sürülürken, bir dizi araştırmacı NP'lerin hücre dışı sentezi için nitrat redüktazı destekledi (Alghuthaymi vd., 2015). Honary ve arkadaşları, topraktan izole edilen *Penicillium citrinum* kullanarak hücre dışı üretim ile AgNP sentezledi. Oluşan AgNP'ler 109nm boyutunda, küresel ve tekdüze boyuttaydı (Honary vd., 2013). Yapılan başka bir çalışmada *Penicillium citrinum* kullanılarak AgNP'lerin biyosentezi için optimum koşullar (pH konsantrasyonu, sıcaklık, inkübasyon süresi ve hızı, AgNO₃ miktarı) bulundu (Barabadi vd., 2019).

2.5. Mikrofunguslar

Fungusların yaklaşık 1,5 milyar yıl önce ökaryotlar içerisinde evrimleştiği düşünülmektedir ve tahmin edilen 1,5 milyon kadar fungustan, yaklaşık 100.000 fungus türü tanımlanmıştır (Hawksworth, 2001). Funguslar, çok hücreli veya tek hücreli olabilen, klorofil taşımayan, heteretrof, çoğu parazit ya da saprofit olan, ökaryotik alemdir. Bakterilerin peptidoglikan hücre duvarları aksine fungusların hücre duvarları kitin, mannan ve glukandan oluşur ve bu özellikleri sayesinde mikroorganizmalar arasında farklı ve önemli bir yere sahiptirler. Funguslar çok geniş habitatlarda yaşayabilirler. Bazı fungus türleri sucul olup daha çok tatlı sularda yaşar ancak bazıları ise tuzlu sularda bulunur. Ancak fungusların çoğunluğu karasal ortamlarda bulunur. Karasal funguslar, toprak ya da ölü bitki materyalleri üzerinde yaşarlar ve organik karbonun mineralizasyonunda önemli rol oynarlar. Karasal fungusların büyük kısmı bitkilerin parazitleridir. Hayvan parazitlerine bakıldığında funguslar diğer patojenlere göre daha azdır (Azbukina, 1985; Sigler, 1986; Warnock, 2007).

Funguslar doğada geniş dağılım gösteren, ekosistemdeki enerji döngülerinin genel düzenleyicisi olarak görev yaparlar. Funguslar biyosferde önemli bir rol oynar; burada organik materyalin ayrışması, karbon, nitrojen, fosfor ve mineraller gibi substratların biyosfere geri dönmesini sağlar. Fungusları parazit ve saprofit olarak ikiye ayırırlar;

saprofit funguslar ölü organik maddelerin parçalanmasına neden olurken, parazit funguslar üzerinde yaşadıkları canlılara zarar verirler (Rokem, 2010).

Endüstride funguslar büyük ekonomik öneme sahiptir. Funguslar ile üretilen ürünler benzersizdir ve genellikle bu ürünleri üretmenin başka bir ekonomik yolu yoktur ve böylece endüstride vazgeçilmez bir yeri vardır. Funguslar, gıda endüstrisinde, yararlı metabolitlerin üretiminde ve çeşitli başka işlemlerde kullanılmaktadır. Funguslar, gıdalara aroma vermek amacıyla; *Penicillium raqaforti* rokfor peyniri üretiminde, ekmek yapımında; *Saccharomyces cerevisiae*, bira, şarap gibi gıda ve içeceklerin yapımında ve ilaç yapımında; antibiyotiklerde *Penicillium notatum* kullanılmaktadır. Funguslar tarafından üretilen, vitaminler, polisakkaritler, enzimler, immünosupresif ajanlar, hiperkolesterolemik ajanlar, pigmentler, antibiyotikler ve organik asitler dahil olmak üzere çok çeşitli metabolitler de endüstride kullanılmaktadır (Adrio ve Demain, 2003; Bennett, 1998; Rokem, 2010).

Fungusların habitatları çok çeşitlilik gösterir. Çoğunluğu karasal ortamlarda, toprakta veya ölü bitki kalıntılarında yaşarlar, bazıları insan ve hayvanlarda parazittir. Bazı funguslar ise sucül ortamlarda çoğunlukla tatlı sularda yaşarlar. Ayrıca funguslar ekstrem koşullara uyum sağlayan ökaryotik canlılar olarak dikkat çekmektedirler. Funguslar ekstrem ortamlar arasında en çok termofilik ve hipertermofilik ortamlarda yaşarlar. Aynı zamanda funguslar, maden bölgelerindeki asidik ve metal zengini sularda, alkali ortamlarda, Ölü Deniz gibi hipersalin bölgelerde, sıcak ve soğuk çöllerde, derin denizlerde vb. ortamlarda gelişebilirler (Ramesh vd., 2021).

Hipersalin çevreler tuz konsantrasyonunun doyma noktasına yakın ya da doyma noktasında olduğu ortamlardır. Bunlara; Büyük Tuz Gölü Utah, Ölü Deniz İsrail, Türkiye de ise Tuz Gölü ve Acıgöl'ü örnek verebiliriz. Birçok *Aspergillus* türü hipersalin ortamlarda üreyebilmektedir. *Aspergillus* dünyada yaklaşık 300-350 türden oluşan bir fungus türüdür. *Aspergillus* türleri, nişastalı yiyeceklerin, ekmek ve patates gibi, yaygın kirleticileridir ve birçok bitki ve ağaç yüzeyinde de büyürler. (Ahmet, 2004). *Aspergillus* türleri tıbbi ve ticari açıdan önemlidir ve hem birincil hem ikincil metabolitlerin üretimi

nedeniyle ticari önemi en büyük olan fungus türü sayılabilir (Adams ve Timberlake, 1990; Ahmet, 2004).

2.6. Box-Behnken Deney Tasarımı

Bir yanıt yüzey metodolojisi (RSM) tasarımı olan Box-Behnken, metal NP optimizasyonunda farmasötik alanda başarıyla kullanılan bir deney tasarımıdır. Bu tasarım, üretimi etkileyen fiziksel ve kimyasal parametrelere ilişkin hassas sonuçlar veren kesirli bir faktör tasarımıdır. Çeşitli kontrol değişkenlerinin eşzamanlı optimizasyonuna izin veren çok değişkenli deneysel tasarımı, geleneksel değişken olmayan yaklaşımlardan daha hızlı ve daha düşük maliyetlidir. BBD tasarımı, kritik deneysel koşulların üç seviyeli faktöriyel tasarımına dayanan, ikinci dereceden çok değişkenli bir tekniktir (Alam vd., 2017; Barabadi vd., 2014; Khajeh, 2010; Krupa vd., 2016; Lung vd., 2018).

2.7. Sentezlenen Gümüş Nanopartiküllerin Karakterizasyon Yöntemleri

Malzemeler nano boyuta indiğinde özellikleri çarpıcı bir şekilde değişmektedir. Sentezlenen nanopartiküllerin morfolojisini, boyutunu ve dağılımını, yüzey alanını karakterize etmek için özel yöntemler kullanılmaktadır.

AgNP'lerin optik özellikleri külçe (bulk) metalinkinden farklı olması, onların UV-Vis ile karakterize edilmesine imkanı sunar. Tipik olarak, bir UV-Vis spektrumunda maksimum absorpsiyon dalga boyu ortalama partikül büyüklüğü ile ilişkilidir, yarı genişlikte tam genişliği partikül dispersiyonu hakkında bilgi verebilir (Liu vd., 2012). Ucuzluğu ve kullanım kolaylığından dolayı, kaliteyi arttırmak ve AgNP'lerin varlığını tespit etmek için ek bir yöntem olarak da tercih edilir (Leopold ve Lendl, 2003).

Gümüş nitratin gümüş nanopartiküle indirgenmesi ultraviyole-görünür spektrofotometre (Uv-vis spektrofotometre) ile tespit edilebilir. Uv-vis spektrometresi, bir numune tarafından emilen ve yayılan ışığı ölçmek için kullanılan bir tekniktir. NP'lerin UV-vis taraması 200-800nm aralığında yapılmaktadır. AgNP'lerde plazmon rezonansı dikkat çekici optik özelliklerinden biridir. AgNP'lerin tipik olarak yüzey plazmon

rezonansı 420-430nm bandındadır. Bir nanopartikül ile ilişkili plazmon rezonansının büyüklüğü, tepe dalga boyu ve spektral bant genişliği, partikülün boyutu, şekli ve malzeme kompozisyonuna bağlıdır (Joshi, Bhattacharyya ve Ali, 2008).

Nanopartiküller optik mikroskoplarla görülemeyecek boyutlarda olduğu için taramalı elektron mikroskopy (SEM), transmisyon elektron mikroskopy (TEM) ve atomik kuvvet mikroskopy (AFM) gibi tekniklerle görüntülenebilir. Geleneksel ışık mikroskoplarında ışık dalgaları ile numune bakılırken, SEM’de numune yüzeyi yüksek enerjili elektron ışınıyla taranarak görüntüleme yapılır. AFM, nano boyuttaki yüzey pürüzlülüğünü nicel olarak ölçmek ve yüzey nano dokusunu polimer nanokompozitler gibi malzeme yüzeyinde görselleştirmek için kullanılır. TEM, bir elektron demetinin ultra ince bir numuneden iletildiği ve numuneden geçerken etkileşime girdiği bir mikroskopi tekniğidir. Numune yoluyla iletilen elektronlardan bir görüntü oluşturulur, büyütülür ve objektif bir mercekle odaklanır ve bir görüntüleme ekranında görünür (Joshi vd., 2008).

Dinamik ışık saçılımı (DLS), tipik olarak nano ölçekli moleküllerin ve partiküllerin boyutunu ölçmek için invazif olmayan tekniktir. DLS, koloidal çözümden geçirilen bir lazerden saçılan ışığı ölçer. DLS ile yapılan ölçümde, çözümdaki parçacığın büyüklüğü hakkında bilgi edinilebilir. DLS, seyreltik çözelti içerisindeki NP’lerden saçılan ışığın şiddetinin ve değişiminin ölçülmesidir. Saçılan ışığın şiddetindeki değişim, parçacığın hareketine, büyüklüğüne, ortamın viskozitesine, sıcaklığa ve tuzluluk gibi faktörlere bağlıdır. AgNP’lerin DLS analizi için çözücü saf sudur. Bu çözücü içinde yüzen ya da askıda kalan NP’ler ölçülmektedir. DLS ile NP’lerin polidispersite indekleri (PDI)’de belirlenir. PDI, NP’lerin molekül ağırlığı dağılımının yaygınlığının bir ölçüsüdür. PDI, tek dispersiyonlu partiküller için 0,01 değerinden 0,5-0,7 değerlerine kadar değişen partikül boyutu dağılım genişliğini açıklar ve 0,7’nin üzerindeki değerler, önemli ölçüde geniş boyut dağılımına sahip örnekleri ifade eder. DLS analizi nanopartiküllerin karakterize edilmesinde önemli bir tekniktir (Barabadi vd., 2019; Joshi vd., 2008; Mehmet, 2018).

Zeta potansiyeli ölçümleri, elektrostatik stabilizasyon nedeniyle bir nanopartikül sisteminin stabilitesini değerlendirebilir. Zeta potansiyeli, NP yüzeyindeki elektrik

yükünün ölçüsüdür ve koloidal NP'lerin yük kararlılığının miktarını belirtir. Zeta potansiyeli parçacık kararlılığı hakkında bilgi sağlar, AgNP'ler için +30 mV'den yüksek veya -30mV'den düşük zeta potansiyeli, dağılımın elektrostatik olarak kararlı olduğunu, sıfır zeta potansiyelinin ise dağılımın kararsız olduğunu gösterir. Ayrıca, zeta potansiyeli büyük ölçüde pH ve dağılmış parçacıkların elektrolit konsantrasyonuna bağlıdır (Barabadi vd., 2019; Mehmet, 2018).

X ışını kırınımı (XRD) NP'lerin mikro ve kristal yapıları ile kimyasal bileşimleri hakkında ayrıntılı bilgi veren çok yönlü ve tahribatsız bir yöntemdir. XRD, tek başına veya polimer, sıvı ya da biyomalzeme gibi farklı matrislerin içinde dağılmış nanopartiküllerin analizinde kullanılabilir. Ayrıca düşük kristalliğe sahip karbon materyallerin nano yapıları da analiz edilebilir. XRD bir toplu analiz cihazıdır ve başta toz formu olmak üzere nanomalzemelerin karakterizasyonu için kullanılacak bir yöntemdir (Ersöz vd., 2018).

Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektroskopi (FTIR), NP oluşum sürecinde metal NP'lerin indirgenmesinde görev alan fonksiyonel grupların yapısal ve kompozisyonel bilgilerinin elde edilmesi tekniğidir. Genel prensibi, kızılötesi ışığın bir dipol momente sahip madde ile etkileşmesi sonucu yapısı içerisindeki bağların titreşim hareketinden yola çıkarak fonksiyonel grupların incelenmesidir (Mehmet, 2018).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Mikroorganizmalar

Nanopartikül Üreticisi Fungal Kùltürler

Fungal kùltürler Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü Endüstriyel Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı fungal kùltür koleksiyonundan temin edilmiştir. Bu izolatlar lisansüstü tez çalışmaları kapsamında İzmir Çamaltı Tuzlasından (hipersalin çevrelerden) izole edilmiş olup laboratuvarımızda muhafaza edilmektedir. Bu çalışmada kullanılan fungal kùltürler; ‘Halotolerant-halofilik funguslar kullanılarak gümüş nanopartikül biyosentezi ve biyoaktivitelerinin belirlenmesi (561483)’ tez çalışmasında gümüş nanopartikül sentezi için seçilen izolatlardır.

- *Aspergillus flavus* (CT 11.17)
- *Aspergillus clavatus* (CT 5.4)
- *Aspergillus fumigatus* (CT 9.13)

Bu kùltürler gliserol çözeltisinde -80 °C’de muhafaza edilmektedir. Kùltürler kullanılacağı zaman, PDA besiyerine 3 nokta ekim yapıp 27°C de 7 gün inkübasyona bırakılarak aktiflenmiştir.

Antimikrobiyal aktivite deneyinde kullanılan test organizmaları;

- *Escherichia coli* (Gram-negatif / ATTC 25922)
- *Staphylococcus aureus* (Gram-pozitif / ATCC 29213)
- *Candida albicans* (maya / ATCC 90028).

Bu organizmalar MHA ve SDA plaklarında aktiflendikten sonra kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Besiyeri ve Çözeltiler

Besiyerleri:

Besiyeri 1: Potato Dextrose Agar (PDA)

Patates füzyonu	4g
Dekstroz	20g
Agar	15g
Distile Su	1000ml

121 C°'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Besiyeri 2: Malt Glikoz Yeast Pepton (MGYP)

Malt Ekstrakt	3g
Yeast Ekstrakt	3g
Peptit Digest (Pepton)	5g
Dekstroz (Glukoz)	10g
Distile Su	1000ml

121 C°'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Besiyeri 3: Mueller-Hinton Agar (MHA)

Enzimatik parçalanmış hayvan dokusu	2g
Kazein hidrolizat	17,5g
Nişasta	1,5g
Agar	13g
Distile Su	1000ml

121 C°'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Besiyeri 4: Sabouraud Dekstroz Agar (SDA)

Pepton	10g
Dekstroz	40g
Agar	15g
Distile Su	1000ml

121 C°'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

Çözeltiler:

Çözelti 1: %0,2'lik Tween 80 çözeltisi (spor süspansyonu)

Tween 80	200 µl
Saf Su	100ml

121 C°'de 15 dakika otoklavda sterilize edilir.

Çözelti 2: DPPH (2,2 difenil 1 pikrilhidrazil)

250 ml metanole 5 mg DPPH eklenerek 30dk karanlıkta bekletilerek hazırlanmıştır.

Çözelti 3: Bütil Hidroksi Toluen (BHT)

1 ml etanol ile 0,5 mg BHT karıştırılarak hazırlanmıştır.

Çözelti 4: Askorbik Asit Konsantrasyonları

İki farklı konsantrasyonda; 0,1 ve 0,7 mg/ml (askorbik asit/etanol) askorbik asit kullanılmıştır.

3.1.3. NP Karakterizasyonunda Kullanılan Cihazlar

Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılan cihazlar, kullanım amacı ve bulunduğu birim

Kullanılan Cihaz	Marka/Model	Kullanım Amacı	Bulunduğu Birim
Otoklav	Hırayama HG-80 (Japonya)	Sterilizasyon	ESOGÜ Endüstriyel Mikrobiyoloji Laboratuvarı
Ultraviyole Görünür Spektroskopi (UV- VIS Spektroskopy)	Perkin Elmer (İngiltere)	AgNO ₃ 'ün AgNP'lere indirgenmesi teyit edildi.	ESOGÜ Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı
Dinamik Işık Saçılım Spektrometresi (DLS)	Malvern ALV/CGS-3 (İngiltere)	AgNP'lerin parçacık boyutu ve Poli dispersite indeksi (PDI) 'nin belirlenmesi.	ESOGÜ Kimya Bölümü Polimer Araştırma Laboratuvarı
Zetasizer (Zeta Potansiyel Cihazı)	Malvern Nano ZS90(İngiltere)	AgNP'lerin elektrostatik stabilizasyonunun belirlenmesi.	ESOGÜ Kimya Bölümü Polimer Araştırma Laboratuvarı
Geçirilmiş Elektron Mikroskopu (TEM)	Hitachi HT7800 TEM (Japonya)	AgNP'lerin boyutu ve morfolojik analizi.	ESOGÜ Merkezi Araştırma Laboratuvarı / ARUM
X-Işını Difraktometresi (XRD)	Panalytical Empyrean (İngiltere)	AgNP'lerin kristal yapısının belirlenmesi ve kimyasal analizi.	ESOGÜ Merkezi Araştırma Laboratuvarı / ARUM

3.2. Yöntem

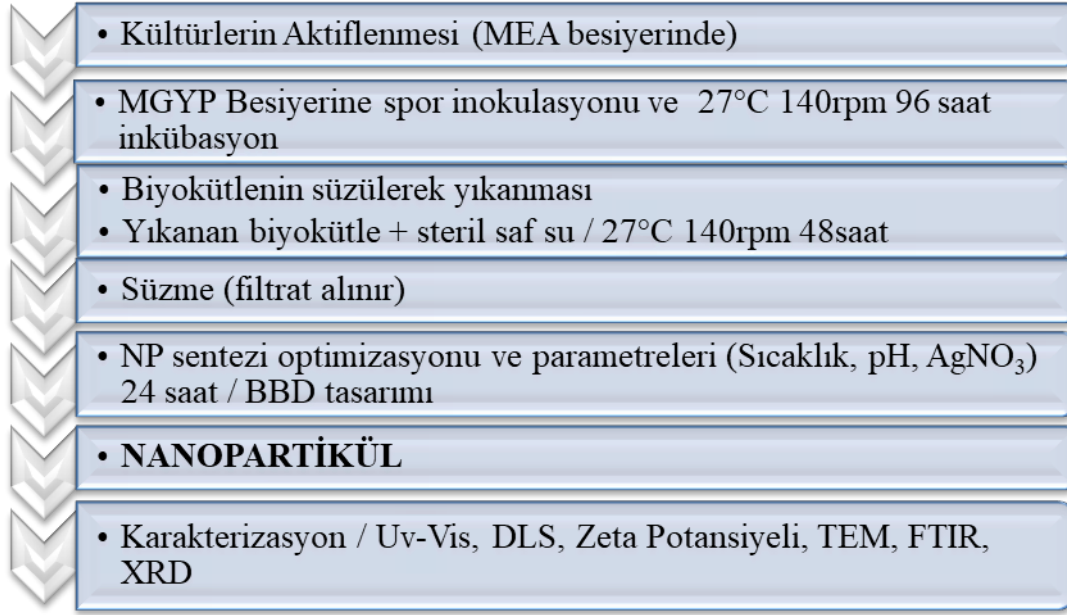
3.2.1. Fungal biyokütle üretimi

Fungal biyokütle üretimi için 200ml MGYP (Besiyeri 2) besiyeri içeren 500ml'lik erlenler kullanılmıştır. Her erlen aktif kültür yüzeyinden %0,02'lik tween 80 ile toplanan sporlar ile inoküle edilmiştir. Eşit miktarda inokulum ilave edilen erlenler daha sonra 140rpm'e ayarlı çalkalayıcıda 27°C'de 96 saat inkübe edilmiştir.

Oluşan biyokütle filtre kağıdı ile süzülüp 3 defa steril saf su ile yıkandıktan sonra filtre kağıdı içinde sıkılarak fazla suyu alınmıştır. 250ml'lik erlenlere 10g biyokütle + 100ml steril saf su eklenerek 27°C de 140rpm de 48 saat boyunca çalkalanmıştır. İnkübasyon sonunda yine filtre kağıdı ile süzme yapıp biyokütle uzaklaştırılmıştır. Elde edilen filtrat AgNP sentezinde kullanılmıştır.

3.2.2. Gümüş nanopartikül sentezlenmesi

AgNP sentezi 250ml'lik erlenlerde 25'er ml filtrat ve belirlenen miktarlarda AgNO₃ bir araya getirilerek 24 saat belirlenen sıcaklıklarda inkübasyona bırakılarak gerçekleştirilmiştir. Çözeltinin (filtrat) başlangıç pH konsantrasyonu 1N HCL ve 1N NaOH ile ayarlanmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde çözeltiler UV-Vıs Spektrometrede 200 ila 800 nm bandında tarama yapılmış ve 420-430nm arasında oluşan pikler AgNP varlığını işaret etmiştir.



Şekil 3.1. Nanopartikül sentez basamakları, optimizasyon, karakterizasyon

3.3. Box-Behnken Deneş Tasarımı ile Optimizasyon

NP üretiminde optimum parameteleri belirlemek için Box-Behnken deneş (BBD) tasarımı ve bu istatiksels analiz için Minitab 7 programı kullanılmıştır (Barabadi vd., 2019). BBD tasarımı kısmi faktöriyel dizaynları içermeyen tam ya da bağımsız bir karesel dizayndır. BBD tasarımında optimize edilecek faktörler en az 3 düzeyli olmalıdır (Değirmencioğlu ve Yazgı, 2006).

AgNO₃ konsantrasyonu, pH ve sıcaklık olmak üzere üç faktörün AgNP sentezine etkisi incelenmek üzere her bir değişken için üç düzey belirlenmiştir (Çizelge 3.2). BBD tasarımı ile belirlenen kombinasyonlar ise Çizelge 3.3'de verilmiştir. 15 deneş seti aynı anda kurularak AgNP sentezi gerçekleştirilmiş ve her bir deneş için DLS ve Zeta potansiyeli değerleri yanıt (response) olarak alınarak analiz edilmiştir. Üç tekrarlı yapılan deneşlerin yanıt değerlerinin ortalaması alınarak kullanılmıştır.

Çizelge 3. 2. Denemeler için seçilen değişkenlerin düzeyleri

Düzye	AgNO ₃ (mM)(X3)	pH (X2)	Sıcaklık(°C)(X1)
1	0,1(-1)	5(-1)	17 (-1)
2	0,3(0)	7(0)	27(0)
3	0,5(+1)	9(+1)	37(+1)

Çizelge 3. 3. Seçilen değişkenlerin Box-Benken deney tasarımında belirlenen kombinasyonları

Deney sayısı	AgNO ₃ (mM)	pH	Sıcaklık(°C)
1	0	-1	-1
2	0	-1	+1
3	0	+1	-1
4	0	+1	+1
5	-1	0	-1
6	-1	0	+1
7	+1	0	-1
8	+1	0	+1
9	-1	-1	0
10	-1	+1	0
11	+1	-1	0
12	+1	+1	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

3.4. Gümüş Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

UV-Vis spektrofotometrede, sıvı ortamda oluşan AgNP'lerin 200 ila 800 nm dalga boyu aralığında spektrumunu belirlemek için absorbans değerleri ölçülmüştür. AgNP'lerin 420-430 nm dalga boyu aralığında verdiği spektrum bandı incelenmiştir. Ölçümler oda sıcaklığında UV-VIS (Perkin Elmer) cihazı ile yapılmıştır.

AgNP'lerin ortalama parçacık boyutu ve polidispersite indeksi (PDI), bir çoklu saçılma tekniği olan dinamik ışık saçılım (DLS) tekniği kullanılarak belirlenmiştir.

Deiyonize suda seyreltilen AgNP'lerin DLS alışmaları 25°C de Malvern ALV/CGS-3 (İngiltere) cihazında ölçülmüştür.

Zeta potansiyeli ile AgNPlerin elektrostatik stabilizasyonları belirlenmiştir; parçacıklar arasındaki itme-çekme kevveti ve toplam elektrostatik yük değerlerinin bir ölçümüdür. Zeta potansiyel çalışmaları 3 tekrarlı şekilde 25°C de Malvern Nano ZS90 (İngiltere) cihazı kullanılarak ölçülmüştür.

Biyolojik yolla sentezlenen AgNP'lerin TEM mikrografları için 100 kV hızlanma voltajında çalışan bir Hitachi TEM HT 7800 kullanıldı. Numuneler karbon kaplı bakır ızgara üzerine damlatıldı ve kurutuldu. Ultra ince kesitler (60 nm kalınlıkta) Leica Ultracut ultramikrotom ile kesilmiştir. Örnekler TEM altında analiz edildi (ztrk, Gürsu, ve Dağ, 2020).

XRD ile AgNP'lerin kristal yapıları ve toz kırınım desen analizi yapılmıştır. Örneklerin toz X-işını kırınımı (XRD) deseni, bir gonyometre algılama cihazı (45-kV anot ve 40-mA filament akımı) ile donatılmış Panalytical Emperian difraktometre ile karakterize edildi. 0,1542 nm dalga boyuna sahip nikel filtreli Cu K radyasyonu örneklerine yönde yönlendirilmiştir. Gonyometrenin tarama hızı, 0.01°lik bir adım boyutu ile 0.133°/s idi. X-işınlarını 2θ 10-90° aralığında kırındı. Perkin Elmer Spectrum Two ile Diamond ATR tekniği ile 4 cm-1 çözünürlükte FT-IR spektrumları 4000 cm-1 ile 450 cm-1 aralığında toplanmıştır.

3.5. AgNP'lerin antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi

Karakterizasyon sonucunda seçilen koşullarda biyosentezlenen AgNP'lerin antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri.

AgNP'lerin antioksidan aktivitesi, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikali (DPPH) kullanılarak belirlenmiştir. Yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır ve standart olarak askorbik asit ve btil hidroksi tolüen (BHT) kullanılmıştır (Arıduru ve Arabacı, 2013).

100µl AgNP içeren örneklerin üzerine DPPH'nin metanoldeki çözeltisinden (5mg/250ml) 2,9ml ilave edilmiştir. Örneklere DPPH eklendikten sonra oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 30dk bekletilmiş ve 517nm 'de absorbansları ölçülmüştür. Örneklerin absorbans değerleri kontrole göre değerlendirilmiştir.

Serbest radikal giderim aktivitesi hesaplanması;

$$DPPH \text{ giderim aktivitesi (\% inhibisyon)} = \frac{\text{Kontrol absorpsiyonu} - \text{Örneğin absorpsiyonu}}{\text{Kontrol absorpsiyonu}} \times 100$$

(Arıduru ve Arabacı, 2013).

AgNP'lerin Antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi için agar kuyucuk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde Müller Hinton Agar (MHA) ve Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) ile hazırlanan petrilere Mcfarland standartına göre 24 saatlik ekim yapılan test organizmaları; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans* yayma yöntemi ile ekimi yapılmıştır ve petrilere kuyucuklar açılıp bu kuyucuklara biyosentezlenen AgNP'ler konulup ve 24 saat 37 °C'ta inkübe edildikten sonra zon çapları ölçülmüştür. Petrilere ekimler iki paralel olacak şekilde yapılmıştır. Pozitif kontrol için iki antibiyotik, flukonazol ve ampisilin, negatif kontrol için ise filtrat kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Gümüş Nanopartiküllerin Sentezlenmesi

Aspergillus flavus, *A. fumigatus* ve *A. clavatus* fungal biyokütlelerinden elde edilen çözeltiler kullanılarak gümüş nanopartiküllerinin sentezini etkileyen üç değişkenin BBD tasarımı ile optimizasyonu çalışılmıştır. Ardından sentezlenen AGNP'ler karakterize edilmiştir. Günümüze kadar biyolojik yolla AgNP sentezinde çeşitli gruplarına ait organizmalar kullanılmıştır (Dağhoğlu ve Öztürk, 2019; Singh, Kim, Zhang, ve Yang, 2016; Suja, Senthil, Anu Priya, Shiny Preethi, ve Renu, 2016; Sulaiman, Hussien, ve Saleem, 2015). AgNP sentezinde kullanılan fungus türleri daha çok *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinslerine ait türlerdir (Alani, Moo-Young, ve Anderson, 2012; Jain, Bhargava, Majumdar, Tarafdar, ve Panwar, 2011; Saravanan ve Nanda, 2010; Shahzad et al., 2019; Sulaiman, Hussien, ve Saleem, 2015).

AgNP sentezi birkaç aşamadan oluşmaktadır (Şekil 3.1). Bu aşamalardan filtrata $AgNO_3$ ilavesinin yapıldığı süreç üstün özelliklere sahip AgNP'lerin sentezi için optimum koşulların sağlanması gereken aşamadır. Bu nedenle BBD ile optimizasyon bu aşamaya uygulanmıştır. Literatürde daha önce yapılan çalışmalarda da aynı aşama optimizasyon için tercih edildiği görülmektedir (Barabadi vd., 2019; Barabadi vd., 2014; Camas, Celik, Camas, ve Ozalp, 2019; Değirmencioğlu ve Yazgı, 2006; Khajeh, 2010; Priya vd., 2020)

4.2. BBD ve Optimizasyon

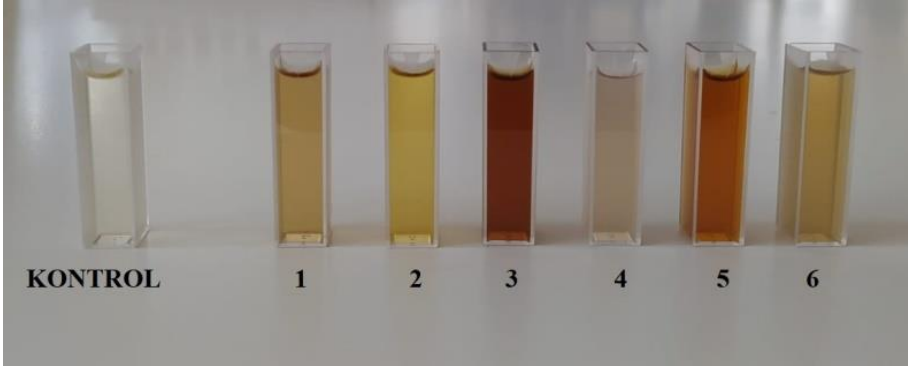
Funguslar metal NP üretiminde çok önemli bir yere sahiptirler. AgNP'ler, katalitik etkisi, optik ve antimikrobiyal gibi özelliklerinden dolayı endüstride en çok tercih edilen metal NP'lerdir. AgNP biyosentezinde kolay uygulanabilirliğinden dolayı funguslar ön plana çıkmaktadır. AgNP'lerin mikobiyosentezi hücre içi ya da hücre dışı üretim ile

yapılmaktadır. AgNP'ler, hücre içi yolda mikrobiyal hücre yoluyla üretilirken, hücre dışı yolda enzimatik prosedürlerle üretilir. AgNP üretiminde nitrat redüktaz mekanizmasıyla sentez dikkat çekmektedir.

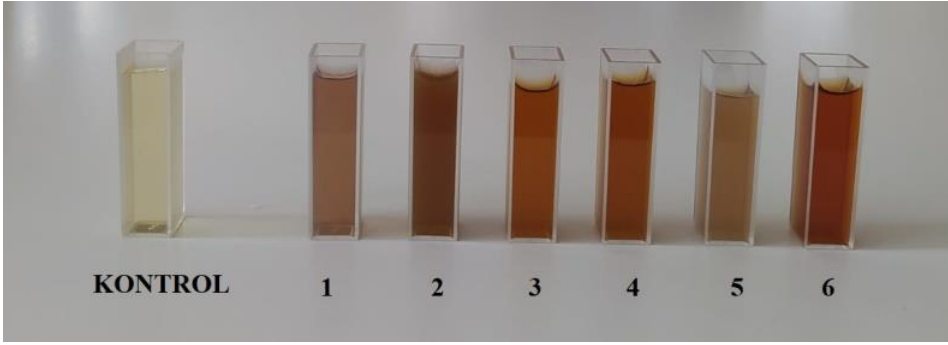
Funguslar AgNP üretiminde her ne kadar yetenekli olsa da bu NP'lerin endüstride kullanılabilmesi için optimize edilmeleri gerekir. AgNP'lerin verimliliği, şekil, boyut ve sayılarına bağlı olarak değişir. Bu faktörleri, sıcaklık, pH, AgNO₃ konsantrasyonu, kullanılan enzim miktarı ve inkübasyon süresi gibi parametreler önemli ölçüde etkiler. AgNP üretimi optimizasyonunda bu parametreleri incelemek için geleneksel optimizasyon yöntemleri yetersiz kalmaktadır çünkü, geleneksel optimizasyon yöntemlerinde faktörler arası etkileşim göz ardı edilmektedir. Bu nedenle, optimum sentez koşulları üzerinde faktörlerin etkisi toplu olarak incelenmelidir. Yanıt yüzey metodolojisi (RSM), faktörlerin etkisinin ve faktörler arası etkileşiminin etkili bir şekilde optimizasyonunu sağlayan istatistiksel bir modelleme tekniğidir. RSM NP üretiminde ve optimizasyonunda, zaman ve maliyeti düşürmekte ve aynı zamanda endüstri açısından daha kesin sonuçlar vermektedir. Bir RSM tasarımı olan Box-Behnken, metal NP optimizasyonunda farmasötik alanda başarıyla kullanılan bir deney tasarımıdır (Almeida vd., 2019; Barabadi vd., 2019; Camas, Celik, Camas ve Ozalp, 2019; Krupa, Abigail, Santhosh, Grace ve Vimala, 2016).

Gümüş Nanopartikül sentezlenen reaksiyonlarda örneklerde kahverengi ve tonları renk değişimi olarak görülmüştür. Renk değişimi, gümüş nanopartiküllerinin yüzey plazmon rezonansı (SPR) özelliğinden dolayı görülmektedir (Honary vd., 2013).

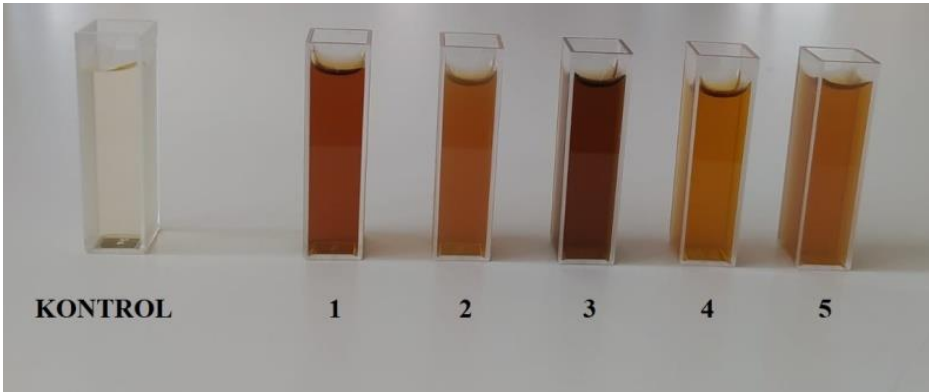
AgNP'lerin hazırlanması BBD'ye göre tasarlanmış 15 deney yapılarak incelenmiştir (Çizelge 3.2). Deneyler, üç ayrı değişkenin değerlerinin farklı kombinasyonları ile gerçekleştirildi; sıcaklık (17°C / 27°C / 37°C), pH konsantrasyonu (5 / 7 / 9) ve AgNO₃ (0,1mM / 0,3mM / 0,5mM) miktarları.



Şekil 4. 2. *Aspergillus flavus* ile AgNP sentezi sonucunda oluşan renk değişimi (1;17°C/9pH/0,3mM, 2;27°C/9pH/0,1mM, 3;27°C/9pH/0,5mM, 4;27°C/7pH/0,3mM, 5;37°C/9pH/0,3mM, 6;37°C/7pH/0,5mM)



Şekil 4. 2. *Aspergillus clavatus* ile AgNP sentezi sonucunda oluşan renk değişimi (1;17°C/7pH/0,5mM, 2;27°C/9pH/0,1mM, 3;27°C/9pH/0,5mM, 4;17°C/9pH/0,3mM, 5;37°C/7pH/0,5mM, 6;37°C/9pH/0,3mM)



Şekil 4.3. *Aspergillus fumigatus* ile AgNP sentezi sonucunda oluşan renk değişimi (1;17°C/9pH/0,3mM, 2;27°C/9pH/0,1mM, 3;27°C/9pH/0,5mM, 4;37°C/9pH/0,3mM, 5;37°C/7pH/0,5mM)

4.2.2. *Aspergillus flavus* aracılığıyla AgNP sentezinin BBD ile optimizasyonu

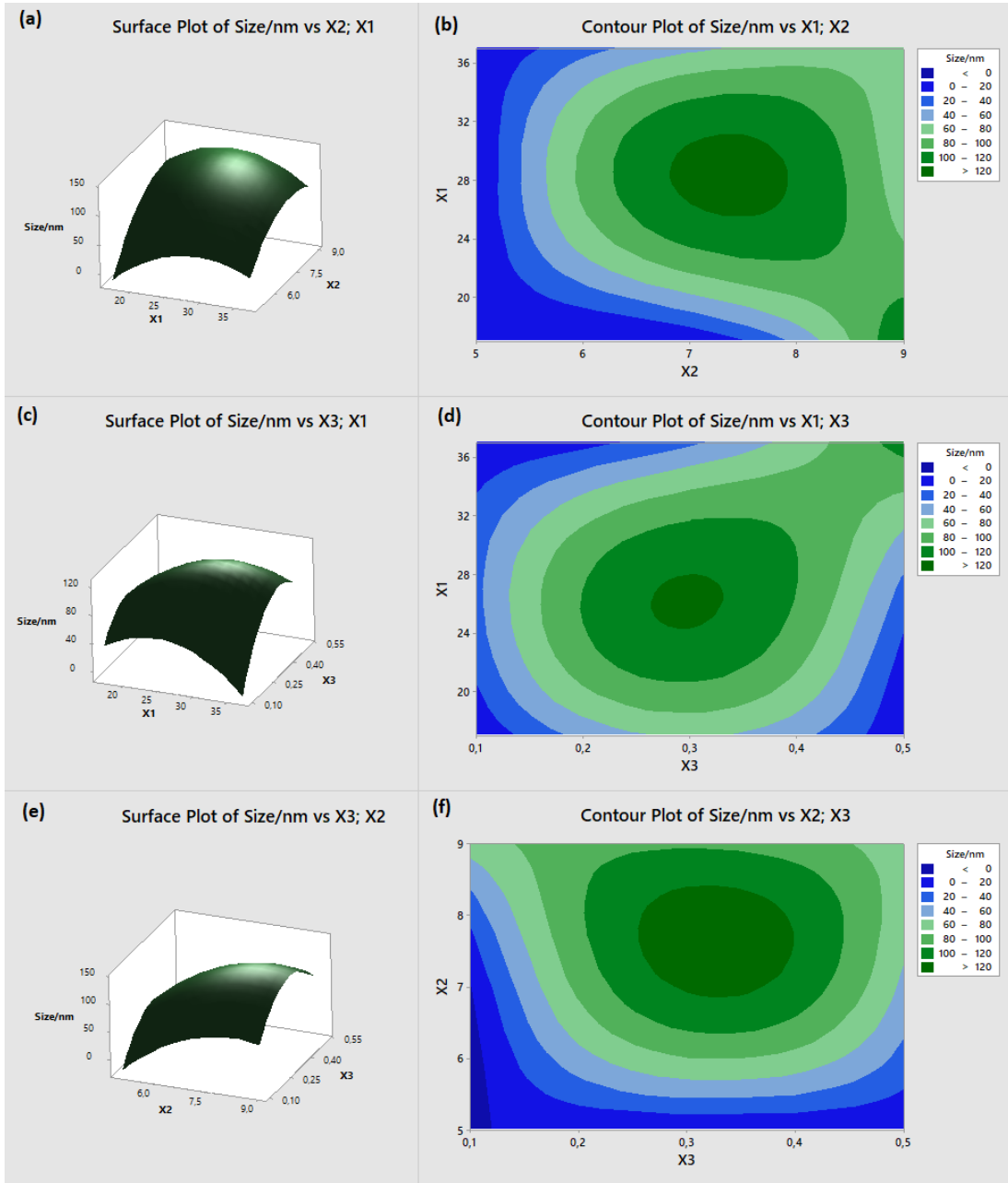
A. flavus ile sentezlenen AgNP'lerin, sentezlenme aşamasını etkileyen 3 değişkenli 3 faktörün optimizasyonu BBD'ye göre 15 deney yapılarak incelenmiştir. Bu 3 faktörün optimizasyonu sentezlenen AgNP'nin morfolojik özelliklerini etkilemektedir. BBD'de yanıt olarak, AgNP'lerin zeta potansiyeli, polidispersite indeksi ve partikül boyutuna bakılmıştır. Bu yanıtlar en verimli morfoloji ve boyutta AgNP sentezini belirlemektedir. Çizelge 4.1, deney koşullarını ve sentezlenen AgNP'lerin zeta potansiyeli, DLS ve partikül boyutu sonuçlarını vermektedir.

Çizelge 4. 1. Box-Behnken tasarımına göre yapılan 15 deney ve sonuçları (X1, X2 ve X3 sırasıyla sıcaklık, pH ve AgNO₃ miktarı).

Deney	X1	X2	X3	ZetaPotansiel (mV)	DLS/PDI	Partikül boyutu (nm)
1	27	5	0,5	0	0	0
2	27	7	0,3	-22,4	0,448	122
3	17	7	0,1	0	0	0
4	17	5	0,3	0	0	0
5	37	7	0,1	0	0	0
6	27	7	0,3	-22,6	0,445	122
7	27	7	0,3	-22,5	0,449	122
8	17	7	0,5	0	0	0
9	27	5	0,1	0	0	0
10	27	9	0,1	-25,9	0,426	70
11	27	9	0,5	-31,8	0,464	68
12	37	9	0,3	-30,2	0,420	72
13	17	9	0,3	3,86	0,359	122
14	37	5	0,3	0	0	0
15	37	7	0,5	-24,4	0,372	110

Şekil 4.4 biyosentezlenen AgNP'lerin ortalama çap boyutu üzerine değişkenlerin etkisini tepki yüzey ve kontur grafiği ile göstermektedir. Her bir tepki yüzeyi grafiğinin ve kontur grafiğinin köşelerindeki ve merkezindeki noktalar, deneysel tasarım noktalarını temsil etmektedir.

A.flavus ile biyosentezlenen AgNP'lerin sentez aşamasında sıcaklık ve pH'ın birbirini etkilemeyen değişkenler olduğu görülmektedir (Şekil 4.4 a, b). Sıcaklık ve AgNO₃ miktarının etkisi incelendiğinde ise 17°C'nin ve 0,1 mM AgNO₃ miktarının üzerinde her koşulda AgNP üretimini göstermektedir (Şekil 4.4 c, d). AgNO₃ miktarının yaklaşık 0,3 mM ve 0,4 mM, pH'ın ise 7 ve 8 aralığında, ortalama çap boyutunun 100nm'nin üzerinde olduğu görülmektedir. Düşük AgNO₃ miktarı ve yüksek pH'da verimli boyutta üretim görülmektedir. En iyi pH'ın ise 9 olduğunu göstermektedir (Şekil 4.4 e, f)



Şekil 4. 3. *A. flavus* ile AgNP sentezine ait tepki yüzey grafiği (a, c, e) ve kontur grafiği (b, d, f), Sıcaklık (X1) ve pH (X2) (a, b) / Sıcaklık (X1) ve AgNO₃ miktarı (X3) (c, d) / pH (X2) ve AgNO₃ miktarının (X3) (e, f) AgNP'lerin ortalama çap boyutunun üzerindeki etkisi

BBD'ye göre 3 düzeyli 3 faktörün ortalama çap boyutu üzerine etkileri için regresyon denklemi; (X1; sıcaklık, X2; pH, X3; AgNO₃ miktarı) Ortalama çap boyutu = - 896 + 22,7 X1 + 154,4 X2 + 519 X3 - 0,403 X1*X1 - 8,31 X2*X2 - 1356 X3*X3 - 0,625 X1*X2 + 13,75 X1*X3 - 1,3 X2*X3

Bu denklem sonucunda negatif çarpanlı değişkenlerin ortalama çap boyutunu arttırdığını, pozitif çarpanlı değişkenlerin ise azalttığını göstermektedir.

Çizelge 4. 2. *A. flavus* ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin ortalama çap boyutu üzerine kodlanmış katsayılar

Koşul	Coef	SE Coef	T-Değeri	P-Değeri	VIF
Constant	122,0	18,5	6,58	0,001	
X1	7,5	11,4	0,66	0,538	1,00
X2	41,5	11,4	3,65	0,015	1,00
X3	13,5	11,4	1,19	0,288	1,00
X1*X1	-40,3	16,7	-2,41	0,061	1,01
X2*X2	-33,2	16,7	-1,99	0,103	1,01
X3*X3	-54,3	16,7	-3,24	0,023	1,01
X1*X2	-12,5	16,1	-0,78	0,472	1,00
X1*X3	27,5	16,1	1,71	0,148	1,00
X2*X3	-0,5	16,1	-0,03	0,976	1,00

Çizelge 4.2’de P değeri 0,05’ten küçük olan değişkenler istatistiksel olarak anlamlı değişkenlerdir aksi durum ise istatistiksel olarak etkisiz sayılır. P değeri, maksimum kabul edilebilir hata düzeyini göstermektedir. Ünlü bir istatistikçi olan Fisher tarafından bu hatanın maksimum kabul edilebilir düzeyi 0,05 olarak önerilmiş ve kabul görmüştür (Barabadi, 2019)

Çizelge 4. 3. *A. flavus* ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin ortalama çap boyutu üzerine R^2 ve düzeltilmiş R^2 değerleri

S	R-sq	R-sq (adj)
32,1248	87,95 %	66,26 %

A. flavus ile AgNP sentezinde 3 faktörün etkisi partikül boyutu analizi sonuçlarına göre regresyon denklemi deneyin %88’ini açıklamaktadır. R2 değeri ile Düzeltilmiş R^2 arasındaki uzaklığın fazla olması deneyin anlamlı olmadığına işaret etmektedir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4. 4. *A. flavus* ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin ortalama çap boyutu üzerine varyans analizi

Kaynak	DF	Adj SS	Adj MS	F-Değeri	P-Değeri
Model	9	37659,7	4184,4	4,05	0,069
Hata	5	5160,0	1032,0		
Toplam	14	42819,7			

Faktörlerin ortalama çap boyutu üzerine etkileri için deney tasarımının verdiği regresyon denklemi varyans analizine göre anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$) (Çizelge 4.4).

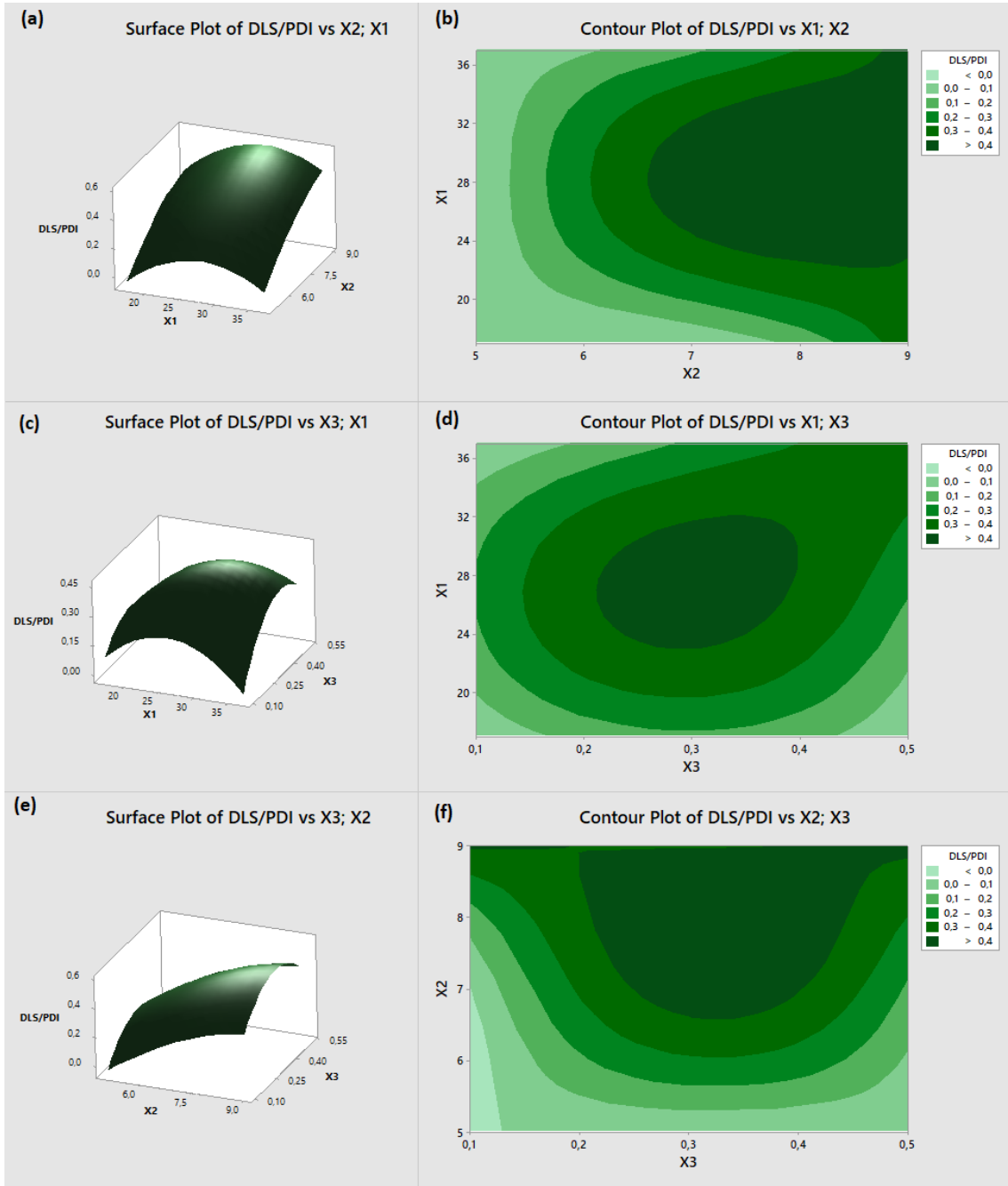
Şekil 4.5 a ve b'de sıcaklık ve pH, *A. flavus* ile üretilen AgNP'lerin PDI değeri üzerindeki etkisini tepki yüzey grafiği (a) ve kontur grafiği (b) ile gösterilmiştir. Deney tasarımının verdiği grafikler, pH'ın artması ve sıcaklığın düşmesi ya da düşük pH ve yüksek sıcaklık, monodispersiteyi olumlu yönde etkilemektedir. Sıcaklık ve AgNO₃ miktarının birbirini etkileyen faktörler olmadığı görülmekte ve düşük AgNO₃ miktarının PDI değeri üzerinde olumlu etkisi vardır dolayısıyla düşük AgNO₃ konsantrasyonlarında ve ortalama sıcaklıklarda iyi monodispersite görülmüştür (Şekil 4.5 c, d). AgNO₃ miktarı ve pH birbirini ters orantılı etkilemektedir. Yüksek AgNO₃ varlığında ve düşük pH'da ya da düşük AgNO₃ miktarı ve yüksek pH'da monodispersitesi daha iyi AgNP sentezi görülmüştür (Şekil 4.5 e, f).

BBD'ye göre 3 düzeyli 3 faktörün DLS sonuçları üzerine etkileri için regresyon denklemi; (X1; sıcaklık, X2; pH, X3; AgNO₃ miktarı) $DLS/PDI = -2,475 + 0,0844 X1 + 0,311 X2 + 1,52 X3 - 0,001835 X1*X1 - 0,01674 X2*X2 - 4,280 X3*X3 + 0,00089 X1*X2 + 0,0465 X1*X3 + 0,0037 X2*X3$

Bu denklem sonucunda negatif çarpanlı değişkenler, DLS sonucunu yükselttiğini, pozitif çarpanlı değişkenler ise düşürdüğünü göstermektedir.

Çizelge 4. 5. *A. flavus* ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin DLS analizi üzerine etkilerinin kodlanmış katsayılar

Koşul	Coef	SE Coef	T-Değeri	P-Değeri	VIF
Constant	0,4477	0,0435	10,29	0,000	
X1	0,0554	0,0266	2,08	0,092	1,00
X2	0,2034	0,0266	7,64	0,001	1,00
X3	0,0473	0,0266	1,77	0,136	1,00
X1*X1	-0,1835	0,0392	-4,68	0,005	1,01
X2*X2	-0,0670	0,0392	-1,71	0,148	1,01
X3*X3	-0,1712	0,0392	-4,37	0,007	1,01
X1*X2	0,0178	0,0377	0,47	0,657	1,00
X1*X3	0,0930	0,0377	2,47	0,057	1,00
X2*X3	0,0015	0,0377	0,04	0,970	1,00



Şekil 4.5. *A. flavus* ile AgNP sentezine ait tepki yüzey grafiği (a, c, e) ve kontur grafiği (b, d, f), Sıcaklık (X1) ve pH (X2) (a, b) / Sıcaklık (X1) ve AgNO₃ miktarı (X3) (c, d) / pH (X2) ve AgNO₃ miktarının (X3) (e, f) AgNP'lerin DLS sonuçları üzerindeki etkisi

Çizelge 4. 6. *A. flavus* ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin DLS analizi üzerine etkilerinin R² ve düzeltilmiş R² değerleri

S	R-sq	R-sq (adj)
0,0753398	95,70 %	87,96 %

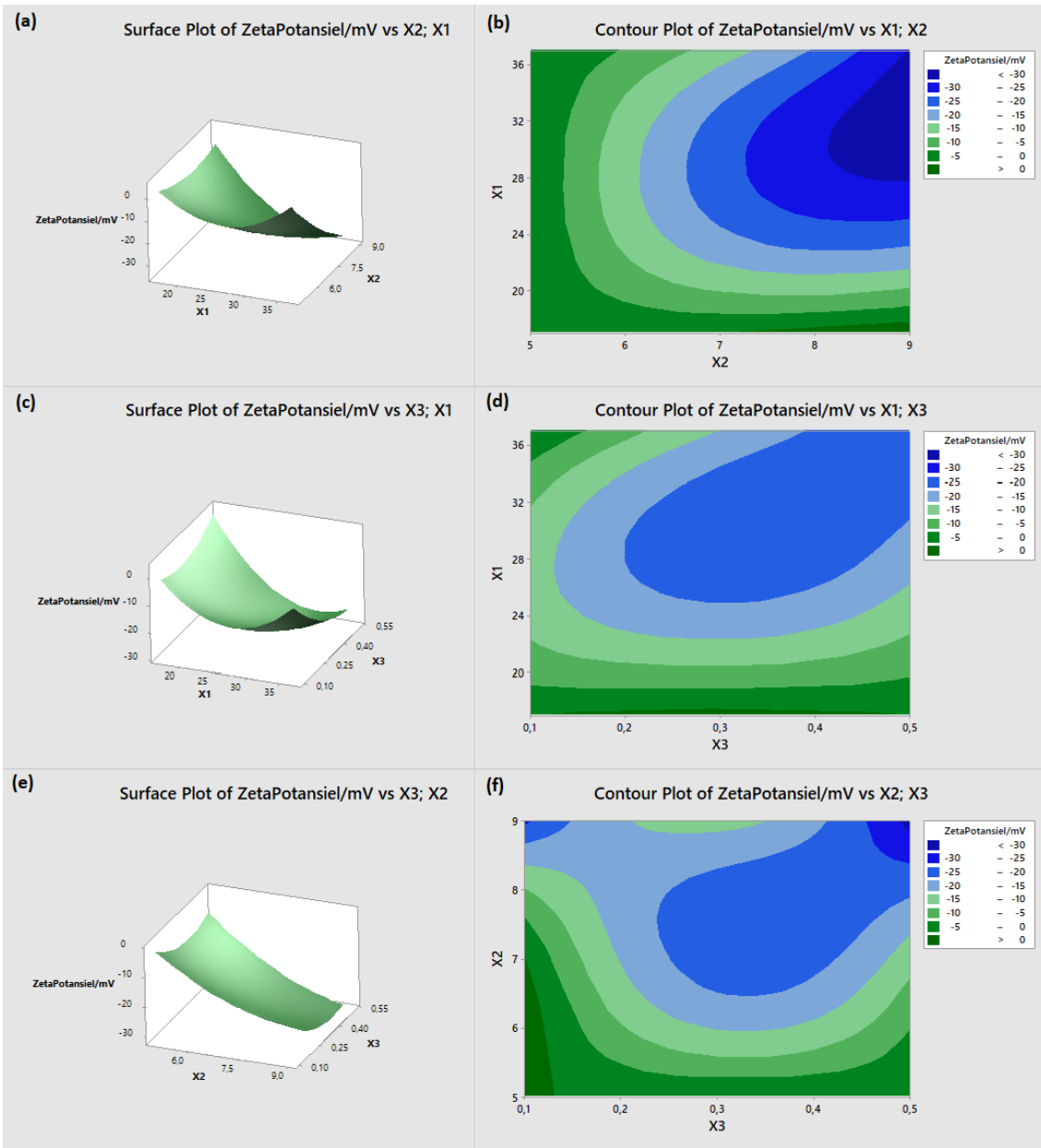
A. flavus ile AgNP sentezinde 3 faktörün etkisi DLS analizi sonuçlarına göre regresyon denklemi deneyin %95'ini açıklamaktadır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4. 7. *A. flavus* ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin DLS analizi üzerine etkilerinin Varyans analizi

Kaynak	DF	Adj SS	Adj MS	F-değeri	P-değeri
Model	9	0,631554	0,070173	12,36	0,006
Hata	5	0,028380	0,005676		
Toplam	14	0,659934			

Çizelge 4.7'de verilen varyans analizi P değeri 0,05'ten küçük olduğundan dolayı istatistiksel olarak anlamlı bir denklem elde edilmiştir. Ayrıca, büyük Fisher-istatistik değeri (12,36), elde edilen modelin istatistiksel önemini göstermiştir (Muralidhar, Chirumamila, Marchant ve Nigam, 2001).

Şekil 4.6 biyosentezlenen AgNP'lerin zeta potansiyeli üzerine değişkenlerin etkisini tepki yüzey ve kontur grafiği ile göstermektedir. pH 8'in üzerinde ve 28°C sıcaklığın üzerindeki değerlerde yüzey yükünün kararlı olduğunu göstermiştir (Şekil 4.6 a, b). Bu da bize pH'ın ve sıcaklığın doğru orantılı birbirini etkilediğini göstermiştir. Sıcaklık ve AgNO₃ miktarının birbirini ters orantılı olarak etkilediği görülmektedir. Yüksek sıcaklık ve düşük AgNO₃ varlığında AgNP'lerin yüzey yükü dağılımının kararlı olduğu görülmektedir (Şekil 4.6 c ve d). Yüksek pH konsantrasyonu ve ortalama AgNO₃ varlığı zeta potansiyelini olumlu yönde etkilemiş ve yüzey yükü dağılımının kararlı olduğu görülmektedir (Şekil 4.6 e, f).



Şekil 4. 6. *A. flavus* ile AgNP sentezine ait tepki yüzey grafiği (a, c, e) ve kontur grafiği (b, d, f), Sıcaklık (X1) ve pH (X2) (a, b) / Sıcaklık (X1) ve AgNO₃ miktarı (X3) (c, d) / pH (X2) ve AgNO₃ miktarının (X3) (e, f) AgNP'lerin zeta potansiyeli üzerindeki etkisi

BBD'ye göre 3 düzeyli 3 faktörün zeta potansiyeli üzerine etkileri için regresyon denklemi; (X1; sıcaklık, X2; pH konsantrasyonu, X3; AgNO₃ miktarı) ZetaPotansiel/mV = 71,2- 3,38 X1- 5,9 X2 + 25,0 X3 + 0,1212 X1*X1 + 0,949 X2*X2 + 107,0 X3*X3- 0,426 X1*X2- 3,05 X1*X3- 3,69 X2*X3

Bu denklem sonucunda negatif çarpanlı değişkenlerin, zeta potansiyelini arttırdığını, pozitif çarpanlı değişkenlerin ise azalttığını göstermektedir.

Çizelge 4. 8. *A. flavus* ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin zeta potansiyeli üzerine etkilerinin kodlanmış katsayılar

Koşul	Coef	SE Coef	T-Değeri	P-Değeri	VIF
Constant	-22,50	3,44	-6,54	0,001	
X1	-7,31	2,11	-3,47	0,018	1,00
X2	-10,50	2,11	-4,99	0,004	1,00
X3	-3,79	2,11	-1,80	0,132	1,00
X1*X1	12,12	3,10	3,91	0,011	1,01
X2*X2	3,79	3,10	1,22	0,275	1,01
X3*X3	4,28	3,10	1,38	0,226	1,01
X1*X2	-8,52	2,98	-2,86	0,035	1,00
X1*X3	-6,10	2,98	-2,05	0,096	1,00
X2*X3	-1,48	2,98	-0,50	0,641	1,00

Çizelge 4.8’de P değeri 0,05’ten küçük olan değişkenler istatistiksel olarak anlamlı değişkenlerdir diğerleri ise istatistiksel olarak etkisiz sayılır.

Çizelge 4. 9. *A. flavus* ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin zeta potansiyeli üzerine etkilerinin R² ve düzeltilmiş R² değerleri

S	R-sq	R-sq (adj)
5,95646	93,33 %	81,32 %

Regresyon denklemi deneyin %93’ünü açıklıyor. Düzeltilmiş R² değerimiz %81’dir ve R² değerine çokta uzak değildir bu da deneyin anlamlı olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4. 10. *A. flavus* ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin zeta potansiyeli üzerine etkilerinin varyans analizi

Kaynak	DF	Adj SS	Adj MS	F-Değeri	P-Değeri
Model	9	2482,06	275,785	7,77	0,018
Hata	5	177,40	35,479		
Toplam	14	2659,46			

Deney tasarımının verdiği varyans analizi deneyin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.10). Ayrıca, büyük Fisher-istatistik değeri (7,77), elde edilen modelin istatistiksel önemini göstermiştir (Muralidhar vd., 2001).

4.2.3. *Aspergillus clavatus* aracılığıyla AgNP sentezinin BBD ile optimizasyonu

A. clavatus ile AgNP sentezinde, DLS ve zeta potansiyel sonuçları oluşan NP'lerin uygun boyutlarda olmadığı ve yüzey yükü stabilitesinin dengesiz olduğu göstermiştir (Çizelge 4.11). Bu nedenle değerlendirmeye alınmamıştır.

Çizelge 4. 11. Box-Behnken tasarımına göre yapılan 15 deney ve sonuçları (X1, X2 ve X3 sırasıyla sıcaklık, pH ve AgNO₃ miktarı)

Deney	X1	X2	X3	ZetaPotansiyeli (mV)	DLS/PDI	Partikül boyutu (nm)
1	27	5	0,5	0	0	0
2	27	7	0,3	0	0	0
3	17	7	0,1	0	0	0
4	17	5	0,3	0	0	0
5	37	7	0,1	0	0	0
6	27	7	0,3	0	0	0
7	27	7	0,3	0	0	0
8	17	7	0,5	-28,6	0,472	370
9	27	5	0,1	0	0	0
10	27	9	0,1	-0,8	0,488	78
11	27	9	0,5	-0,7	0,391	298
12	37	9	0,3	-1,7	0,471	146
13	17	9	0,3	-0,19	0,405	138
14	37	5	0,3	0	0	0
15	37	7	0,5	-19,5	0,435	120

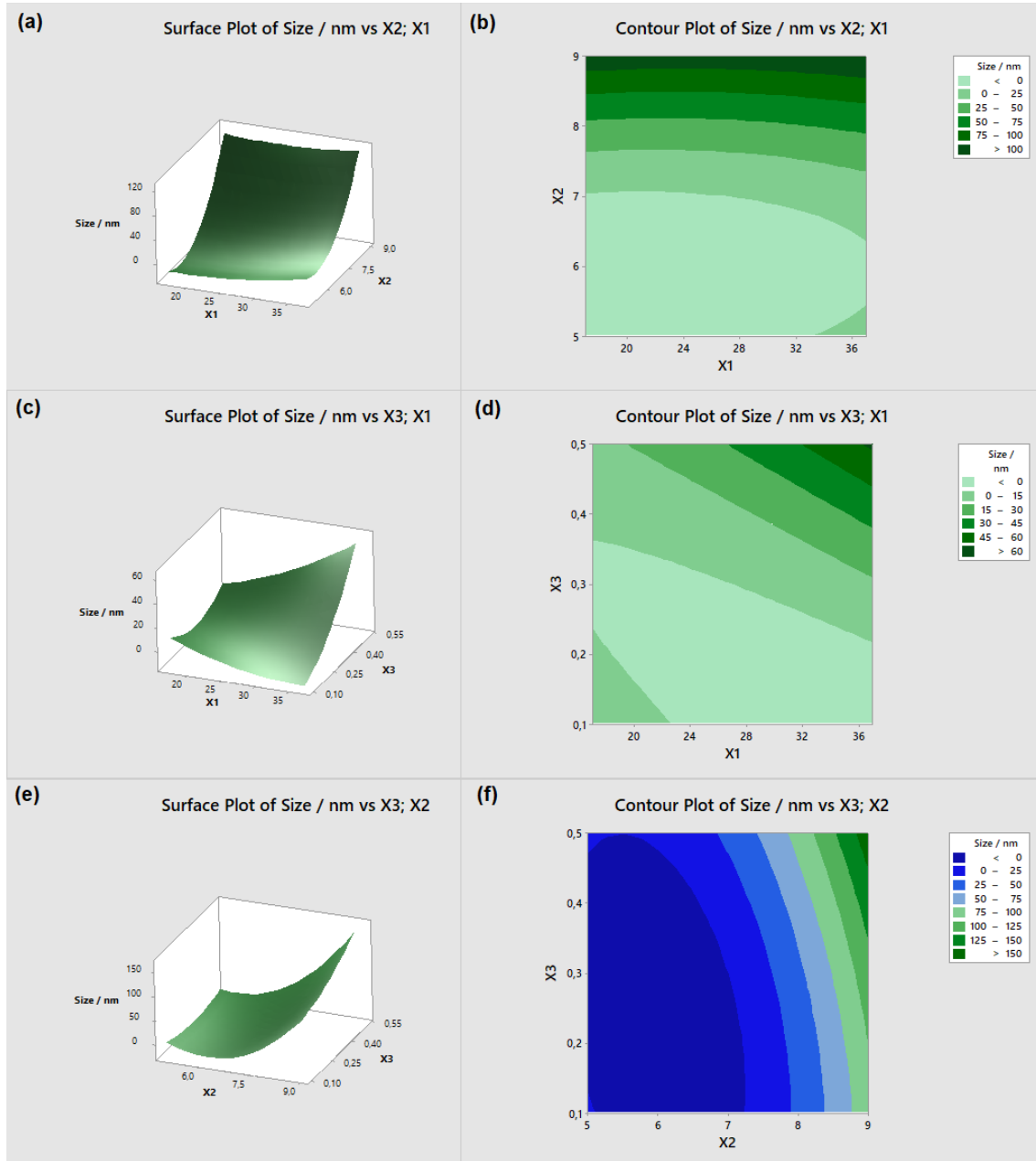
4.2.4. *A. fumigatus* aracılığıyla AgNP sentezinin BBD ile optimizasyonu

A. fumigatus ile AgNP'lerin sentezlenmesi aşamasında etkili olan sıcaklık, pH ve AgNO₃ konsantrasyonunun (3 faktör 3 düzey) optimizasyonu BBD'ye göre 15 deney yapılarak incelenmiştir. Bu 3 faktör sentezlenen AgNP'lerin morfolojisini ve partikül boyutunu etkilemektedir. BBD'de yanıt olarak, sentezlenen AgNP'lerin zeta potansiyeli, polidispersite indeksi ve partikül boyutu belirlenmiştir. Deney koşulları ve yanıtlara ilişkin değerler çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4. 12. Box-Behnken tasarımına göre yapılan 15 deney ve sonuçları (X1, X2 ve X3 sırasıyla sıcaklık, pH ve AgNO₃ miktarı).

Deney	X1	X2	X3	ZetaPotansiel (mV)	DLS/PDI	Partikül boyutu (nm)
1	27	5	0,5	0	0	0
2	27	7	0,3	0	0	0
3	17	7	0,1	0	0	0
4	17	5	0,3	0	0	0
5	37	7	0,1	0	0	0
6	27	7	0,3	0	0	0
7	27	7	0,3	0	0	0
8	17	7	0,5	0	0	0
9	27	5	0,1	0	0	0
10	27	9	0,1	-31,4	0,204	94
11	27	9	0,5	-30,4	0,494	168
12	37	9	0,3	-7,6	0,419	110
13	17	9	0,3	-25,6	0,35	126
14	37	5	0,3	0	0	0
15	37	7	0,5	-29,9	0,246	74

Şekil 4.12 biyosentezlenen AgNP'lerin ortalama çap boyutu üzerine değişkenlerin etkisini tepki yüzey ve kontur grafiği ile göstermektedir. Her bir tepki yüzeyi grafiğinin ve kontur grafiğinin köşelerindeki ve merkezindeki noktalar, deneysel tasarım noktalarını temsil etmektedir.



Şekil 4. 7. *A. fumigatus* ile AgNP sentezine ait tepki yüzey grafiği (a, c, e) ve kontur grafiği (b, d, f), Sıcaklık (X1) ve pH (X2) (a, b) / Sıcaklık (X1) ve AgNO₃ miktarı (X3) (c, d) / pH (X2) ve AgNO₃ miktarının (X3) (e, f) AgNP'lerin ortalama çap üzerindeki etkisi

A.fumigatus ile sentezlenen AgNP'lerin, sıcaklık ve pH'ın ortalama çap boyutunun etkisine bakıldığında birbirini doğru orantılı olarak etkilediğini göstermektedir (Şekil 4.7 a, b). Sıcaklık ve AgNO₃ miktarının ise birbirini etkileyecek bir etkisi olmadığı

görülmektedir (Şekil4.7 c, d). pH'ın yaklaşık 7,5 – 9 aralığında her AgNO₃ miktarında AgNP sentezini olumlu yönde etkilemektedir (Şekil 4.7 e, f).

BBD'ye göre 3 düzeyli 3 faktörün ortalama çap boyutu üzerine etkileri için regresyon denklemi; (X1; sıcaklık, X2; pH, X3; AgNO₃ miktarı) Ortalama çap boyutu = $590 - 3,89 X1 - 162,9 X2 - 669 X3 + 0,0600 X1*X1 + 13,25 X2*X2 + 312 X3*X3 - 0,200 X1*X2 + 9,25 X1*X3 + 46,3 X2*X3$

Bu denklem sonucunda negatif çarpanlı değişkenlerin ortalama çap boyutunu arttırdığını, pozitif çarpanlı değişkenlerin ise azalttığını göstermektedir.

Çizelge 4. 13. *A. fumigatus* ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin ortalama çap boyutu üzerine etkilerinin Kodlanmış katsayılar

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	-0,00	8,55	-0,00	1,000	
X1	7,25	5,24	1,38	0,225	1,00
X2	62,25	5,24	11,89	0,000	1,00
X3	18,50	5,24	3,53	0,017	1,00
X1*X1	6,00	7,71	0,78	0,472	1,01
X2*X2	53,00	7,71	6,88	0,001	1,01
X3*X3	12,50	7,71	1,62	0,166	1,01
X1*X2	-4,00	7,41	-0,54	0,612	1,00
X1*X3	18,50	7,41	2,50	0,055	1,00
X2*X3	18,50	7,41	2,50	0,055	1,00

Çizelge 4.13'de P değeri 0,05'ten küçük olan değişkenler istatistiksel olarak anlamlı değişkenlerdir aksi durum ise istatistiksel olarak etkisiz sayılır.

Çizelge 4. 14. *A. fumigatus* ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin ortalama çap boyutu üzerine etkilerinin R² ve düzeltilmiş R² değerleri

S	R-sq	R-sq (adj)
14,8122	97,75%	93,69 %

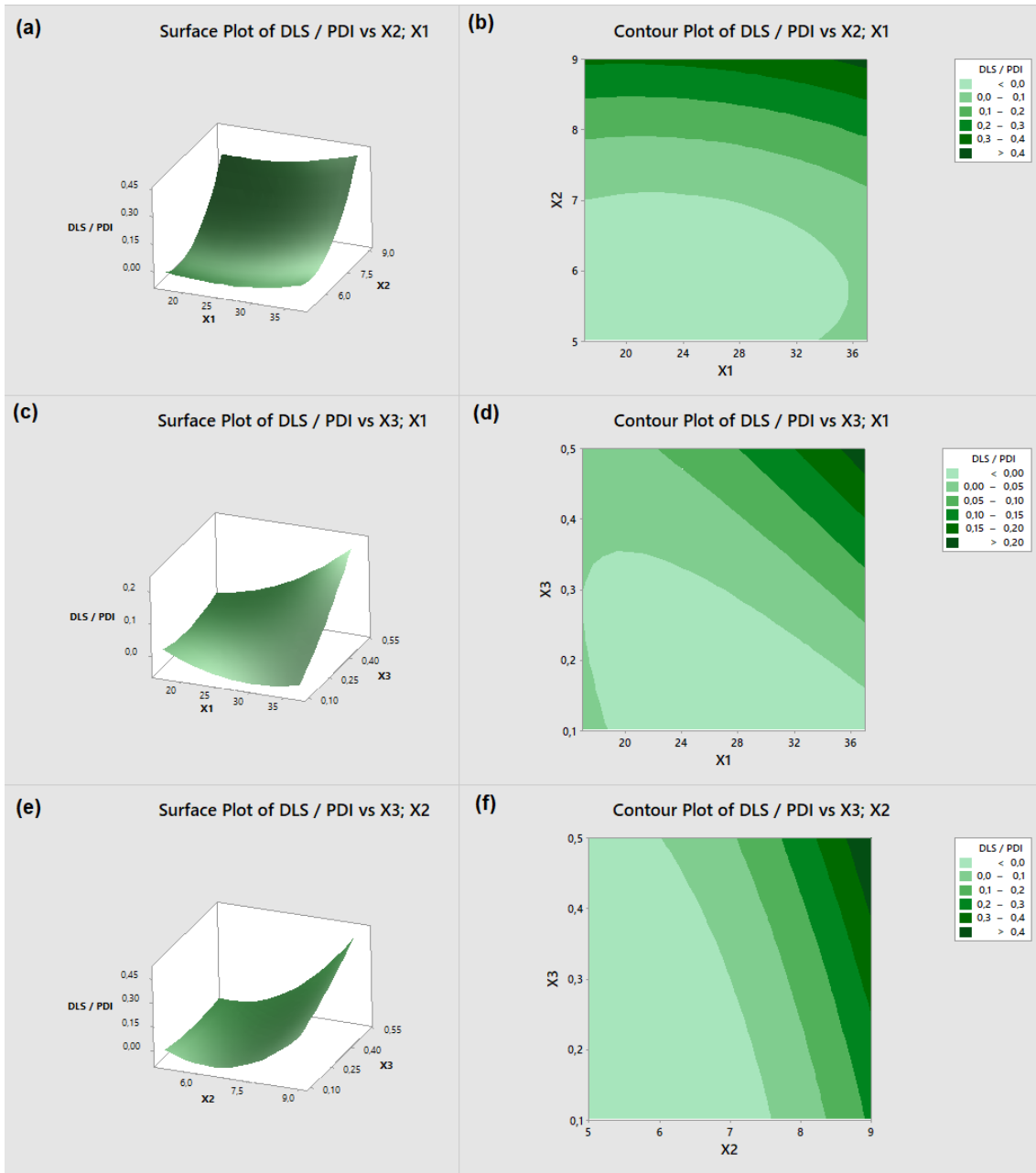
Regresyon denklemi deneyin %97'sini açıklıyor. Düzeltilmiş R^2 değeri %93'tür ve R^2 değerine yakın olmasından dolayı deneyin anlamlı olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.14).

Çizelge 4. 15. *A. fumigatus* ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin ortalama çap boyutu üzerine etkilerinin varyans analizi

Kaynak	DF	Adj SS	Adj MS	F-Değeri	P-Değeri
Model	9	47602,7	5289,2	24,11	0,001
Hata	5	1097,0	219,4		
Toplam	14	48699,7			

Çizelge 4.15'de verilen varyans analizi sonucunda P değeri 0,05'ten küçük olduğundan dolayı istatistiksel olarak anlamlı bir denklem elde edilmiştir.

Şekil 4.8 biyosentezlenen AgNP'lerin PDI değeri üzerine değişkenlerin etkisini tepki yüzey ve kontur grafiği ile göstermektedir. *A.fumigatus* ile sentezlenen AgNP'lerin monodispersitesi üzerinde sıcaklık ve pH birbirini etkilemeyen parametreler olduğunu görülmektedir (Şekil 4.8 a, b). AgNP'lerin 27°C'nin altındaki sıcaklıklarda iyi monodispersiteye sahip olmadığı görülmektedir (Şekil 4.8 c, d). pH ve AgNO₃ miktarının sentezlenen AgNP'lerin PDI değeri üzerindeki etkileri ters orantılıdır. Yüksek pH düşük AgNO₃ miktarı ya da tam tersi durumlarda iyi monodispersiteye sahip AgNP sentezlenebileceği görülmektedir (Şekil 4.8 e, f).



Şekil 4. 8. *A. fumigatus* ile AgNP sentezine ait tepki yüzey grafiği (a, c, e) ve kontur grafiği (b, d, f), Sıcaklık (X1) ve pH (X2) (a, b) / Sıcaklık (X1) ve AgNO₃ miktarı (X3) (c, d) / pH (X2) ve AgNO₃ miktarının (X3) (e, f) AgNP'lerin PDI değeri üzerindeki etkisi

BBD'ye göre 3 düzeyli 3 faktörün DLS sonuçları üzerine etkileri için regresyon denklemi; (X1; sıcaklık, X2; pH konsantrasyonu, X3; AgNO₃ miktarı) DLS/PDI = 2,152 -

$$0,0327 X_1 - 0,5202 X_2 - 2,092 X_3 + 0,000396 X_1 * X_1 + 0,03816 X_2 * X_2 + 0,547 X_3 * X_3 + 0,000863 X_1 * X_2 + 0,03075 X_1 * X_3 + 0,1813 X_2 * X_3$$

Bu denklem sonucunda negatif çarpanlı değişkenlerin ortalama çap boyutunu arttırdığını, pozitif çarpanlı değişkenlerin ise azalttığını göstermektedir.

Çizelge 4. 16. *A. fumigatus* ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin DLS analizi üzerine etkilerinin kodlanmış katsayılar

Koşul	Coef	SE Coef	T-Değeri	P-Değeri	VIF
Sabit	0,0000	0,0179	0,00	1,000	
X1	0,0394	0,0109	3,60	0,016	1,00
X2	0,1834	0,0109	16,76	0,000	1,00
X3	0,0670	0,0109	6,12	0,002	1,00
X1*X1	0,0396	0,0161	2,46	0,057	1,01
X2*X2	0,1526	0,0161	9,48	0,000	1,01
X3*X3	0,0219	0,0161	1,36	0,232	1,01
X1*X2	0,0173	0,0155	1,11	0,316	1,00
X1*X3	0,0615	0,0155	3,97	0,011	1,00
X2*X3	0,0725	0,0155	4,69	0,005	1,00

Çizelge 4.16'te P değeri 0,05'ten küçük olan değişkenler istatistiksel olarak anlamlı değişkenlerdir aksi durum ise istatistiksel olarak etkisiz sayılır.

Çizelge 4. 17. *A. fumigatus* ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin DLS analizi üzerine etkilerinin R² ve düzeltilmiş R² değerleri

S	R-sq	R-sq (adj)
0,0309459	98,93%	97,01 %

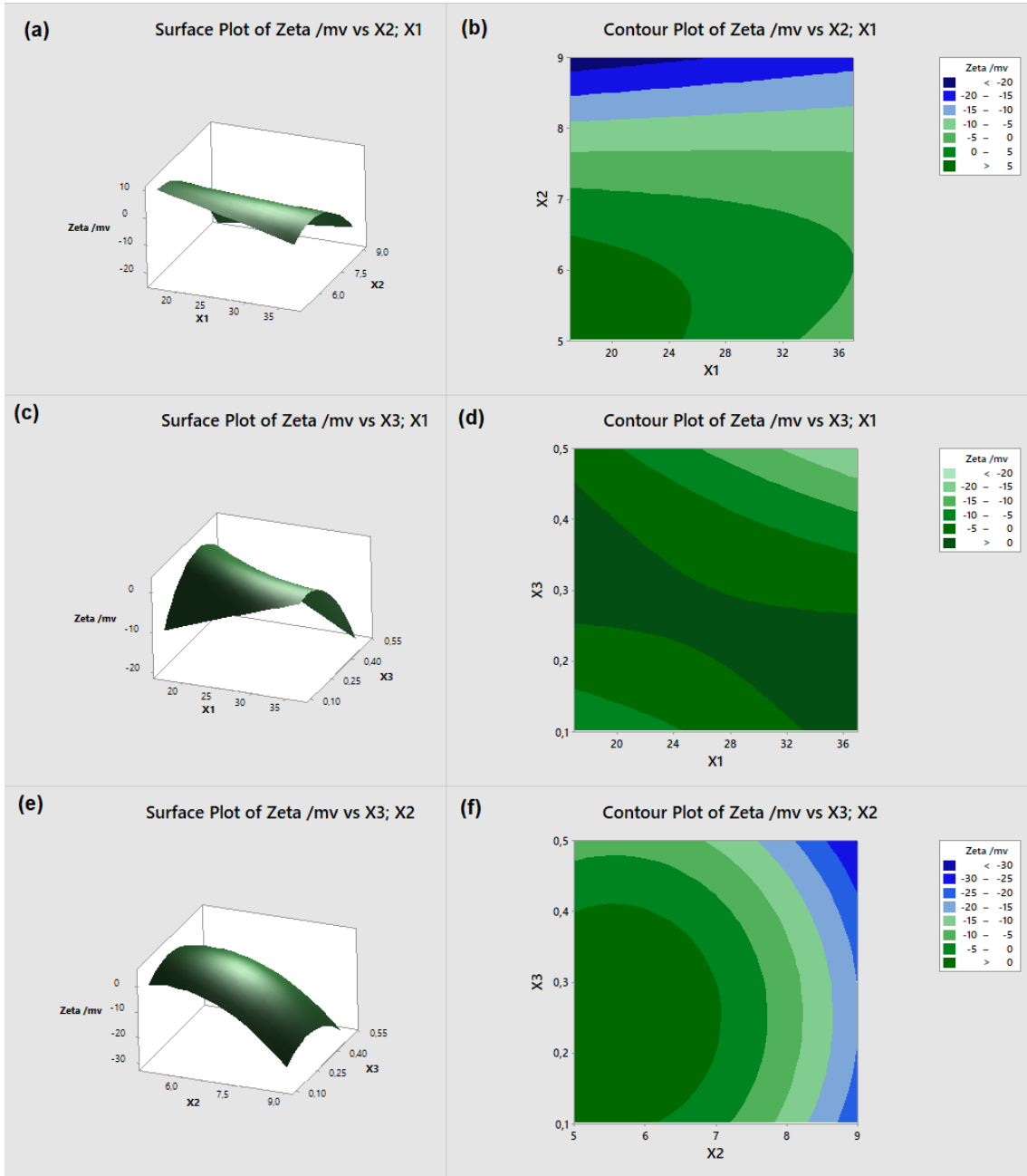
Regresyon denklemi deneyin %98'ini açıklıyor. Düzeltilmiş R² değeri %97'dir ve R² değerine çok yakındır. Bu nedenle denklemin sağlıklı olduğunu söylenebilir.

Çizelge 4. 18. *A. fumigatus* ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin DLS analizi üzerine etkilerinin varyans analizi

Kaynak	DF	Adj SS	Adj MS	F-Değeri	P-Değeri
Model	9	0,443816	0,049313	51,49	0,000
Hata	5	0,004788	0,000958		
Toplam	14	0,448604			

Çizelge 4.18’de verilen varyans analizi sonucunda P değeri 0,05’ten küçük olduğundan dolayı istatistiksel olarak anlamlı bir denklem elde edilmiştir.

Sıcılığın ve pH’ın, *A.fumigatus* ile sentezlenen AgNP’lerin zeta potansiyeli üzerindeki etkisine bakıldığında birbirini ters orantılı etkilediği, yüksek sıcaklık düşük pH’da ya da tam tersi durumlarda yüzey yükünün kararlı olduğu görülmüştür (Şekil 4.9 a, b). Sıcaklık ve AgNO₃ miktarının birbirini etkilemeyen parametreler olduğu görülmektedir (Şekil 4.9 c, d). Yüksek pH’da ve 0,1 mM’in üzerinde AgNO₃ miktarında yüzey yükünün kararlı olduğu görülmektedir (Şekil 4.9 e, f).



Şekil 4. 4. *A. fumigatus* ile AgNP sentezine ait tepki yüzey grafiği (a, c, e) ve kontur grafiği (b, d, f), Sıcaklık (X1) ve pH (X2) (a, b) / Sıcaklık (X1) ve AgNO₃ miktarı (X3) (c, d) / pH (X2) ve AgNO₃ miktarının (X3) (e, f) AgNP'lerin zeta potansiyeli üzerindeki etkisi

BBD'ye göre 3 düzeyli 3 faktörün zeta potansiyeli üzerine etkileri için regresyon denklemi; (X1; sıcaklık, X2; pH konsantrasyonu, X3; AgNO₃ miktarı) Zeta potansiyeli/

$$mV = -52,8 - 0,51 X1 + 16,3 X2 + 188 X3 - 0,0016 X1*X1 - 2,03 X2*X2 - 183 X3*X3 + 0,225 X1*X2 - 3,74 X1*X3 + 0,6 X2*X3$$

Bu denklem sonucunda negatif çarpanlı değişkenlerin ortalama çap boyutunu arttırdığını, pozitif çarpanlı değişkenlerin ise azalttığını göstermektedir.

Çizelge 4. 19. *A. fumigatus* ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin zeta potansiyeli üzerine etkilerinin kodlanmış katsayılar

Koşul	Coef	SE Coef	T-Değeri	P-Değeri	VIF
Constant	0,00	5,82	0,00	1,000	
X1	-1,49	3,57	-0,42	0,694	1,00
X2	-11,87	3,57	-3,33	0,021	1,00
X3	-3,61	3,57	-1,01	0,357	1,00
X1*X1	-0,16	5,25	-0,03	0,976	1,01
X2*X2	-8,14	5,25	-1,55	0,182	1,01
X3*X3	-7,31	5,25	-1,39	0,222	1,01
X1*X2	4,50	5,04	0,89	0,413	1,00
X1*X3	-7,47	5,04	-1,48	0,198	1,00
X2*X3	0,25	5,04	0,05	0,962	1,00

Çizelge 4.19'de P değeri 0,05'ten küçük olan değişkenler istatistiksel olarak anlamlı değişkenlerdir aksi durum ise istatistiksel olarak etkisiz sayılır.

Çizelge 4. 20. *A. fumigatus* ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin zeta potansiyeli üzerine etkilerinin R² ve düzeltilmiş R² değerleri

S	R-sq	R-sq (adj)
10,0839	79,48%	42,54 %

Regresyon denklemi deneyin %79'unu açıklıyor. Düzeltilmiş R² değeri %42'dir (Çizelge 4.20)

Çizelge 4. 21. *A. fumigatus* ile AgNP sentezini etkileyen faktörlerin zeta potansiyeli üzerine etkilerinin varyans analizi

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	1968,85	218,76	2,15	0,206
Error	5	508,40	169,47		
Total	14	2477,25			

Çizelge 4.21'de verilen varyans analizi sonucunda P değeri 0,05'ten büyük olduğundan dolayı istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir denklem elde edilmiştir.

Optimizasyon çalışması sonucunda AgNP sentezinde pH 7,0 ile 9,0 arası inkübasyon sıcaklığı 27°C-37°C arası ve AgNO₃ konsantrasyonunun ise 0,1 ile 0,5 mM aralığında başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Sıcaklık ile pH arasında ters orantılı bir etkileşim olduğu, AgNO₃ miktarının ise diğer faktörlerle etkileşmediği sonucuna varılmıştır.

Yapılan bir çalışmaya göre, istatistiksel optimizasyon ile, nitrat redüktaz aktivitesine sahip *Penicillium oxalicum* GRS-1'in ham hücresel içeriği kullanılarak 7,2 pH, 1,975 mM AgNO₃ konsantrasyonu ve 86 saatte 136 ppm ile maksimum AgNP üretimine ulaşıldığı bildirilmiştir (Rose, Soni, Rishi, ve Soni, 2019). Krupa ve ark. yaptığı çalışmada ise AgNP biyosentezi için 5 deniz bakterisi kullanılmış ve 7 pH, 45°C ve 72 saat inkübasyon süresi sonunda en verimli AgNP üretimi kaydedilmiştir (Krupa, 2016).

4.3. AgNP'lerin UV-Vis Spektrumu ile Karakterizasyonu

Her bir fungus ile yapılan çalışmada filtrata AgNO₃ ilavesi ve inkübasyon sonrasında filtratlarda AgNP varlığı Uv-Vis spektrometresiyle 200-800 nm aralığında tarama sonucu tespit edilmiştir. Özellikle optimizasyon çalışmaları gibi çok sayıda örnekte AgNP varlığının belirlenmesinde bu yöntem oldukça kullanışlı ve güvenilir bir yöntemdir. Her bir fungus için ayrı uygulanan BBD kapsamında 15 deneye ait filtratlarda AgNP varlığı Uv-Vis spektrumu ile elde edilen absorbansa göre belirlenmiş daha sonra diğer

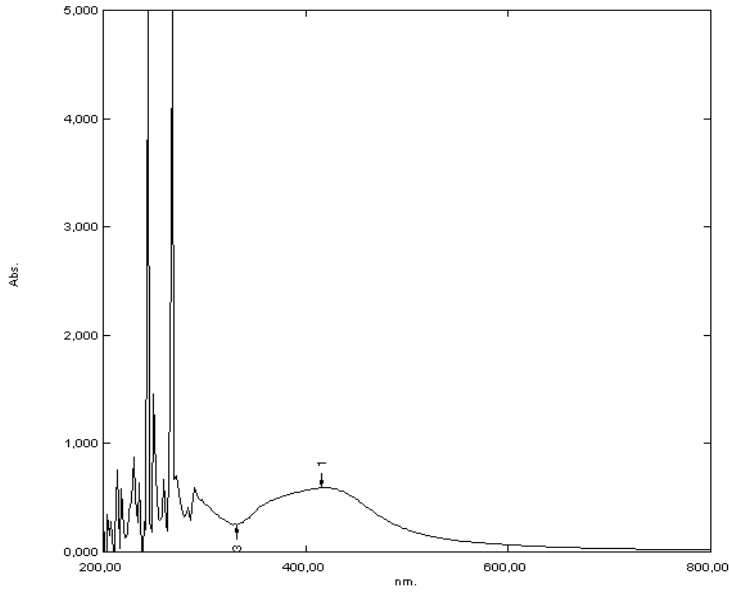
karakterizasyon yöntemleri uygulanmıştır. Bir başka deyişle, UV-Vis spektrumunda AgNP tespit edilmeyen örnekler elenerek çalışmaya devam edilmiştir.

AgNP'ler yüzey plazmon uyarılmalarından dolayı absorpsiyon pikinde değişim gösterirler ve bu nedenle UV-vis spektroskopisi AgNP'lerin yapısal karakterizasyonunda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. AgNP'lerin en önemli özelliği olan yüzey plazmon absorpsiyon bantları 350-450 nm bölgesinde özellikle 400 nm civarında görülmektedir. AgNP varlığı 200-800 nm bölgesinde tarama yapılarak belirlenmiştir. Yüzey plazmon zirveleri 420-430 nm bandında kaydedilen çözeltilerde AgNP varlığından söz edilmiştir (Saravanan ve Nanda, 2010).

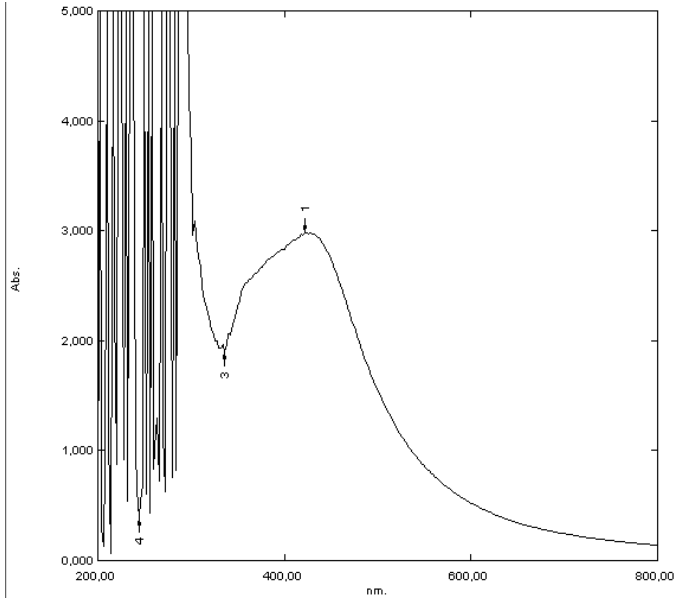
4.3.1. *A. flavus* ile sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrum karakterizasyonu

A. flavus ile yapılan çalışmada 15 deneyden 6 tanesinde çıplak göz ile renk değişimi görülmüştür (Şekil 4.1). Uv-vis spektrumlarına göre 3 çözeltinin yüzey plazmon rezonans zirveleri 416-430 nm bandında gözlemlenmiştir. Bu üç çözeltinin AgNP sentez koşulları 27°C/9pH/0,1mM AgNO₃, 27°C/9pH/0,5mM AgNO₃ ve 37°C/9pH/0,3mM AgNO₃'dir. Sırasıyla 416nm, 422nm, 430nm bandında spektrumlar kaydedilmiştir (Şekil 4.10-12). Bu spektrumlar AgNP'ler için karakteristik yüzey plazmon rezonans bandlarıdır ve AgNP varlığını göstermektedir (Honary vd., 2013).

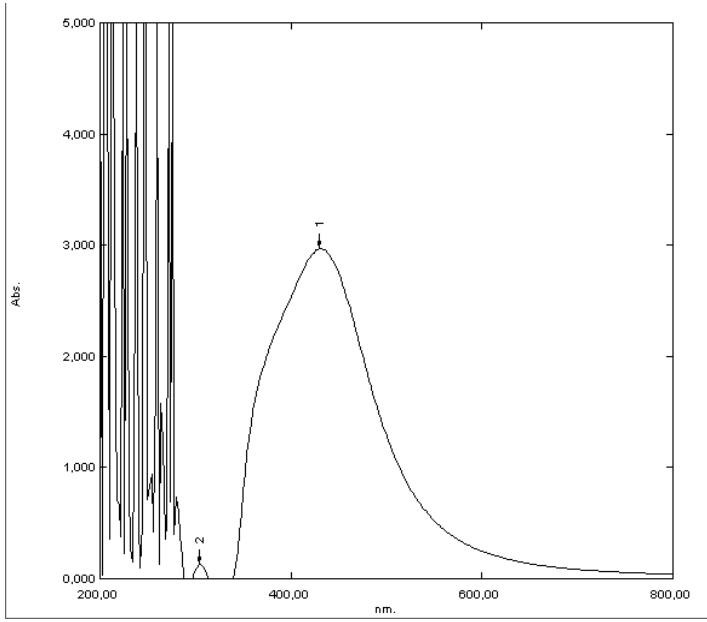
Vidya ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *A.flavus* ile biyosentezlenen AgNP'lerin maksimum yüzey plazmon zivresi 434 nm'de kaydedilmiştir (Vidya ve Subramani, 2017). Başka bir çalışmada ise yine *A. flavus* ile biyosentezlenen AgNP'ler 420 nm'de gümüş yüzey plazmon rezonans bandı gösterdi (Sulaiman, Hussien, ve Saleem, 2015).



Şekil 4.10. *A. flavus* ile 27°C / 9 pH / 0,1mM AgNO₃ koşullarında gerçekleşen AgNP sentezine ilişkin UV-Vis spektrumu.



Şekil 4.11. *A. flavus* ile 27°C / 9 pH / 0,5 mM AgNO₃ koşullarında gerçekleşen AgNP sentezine ilişkin UV-Vis spektrumu

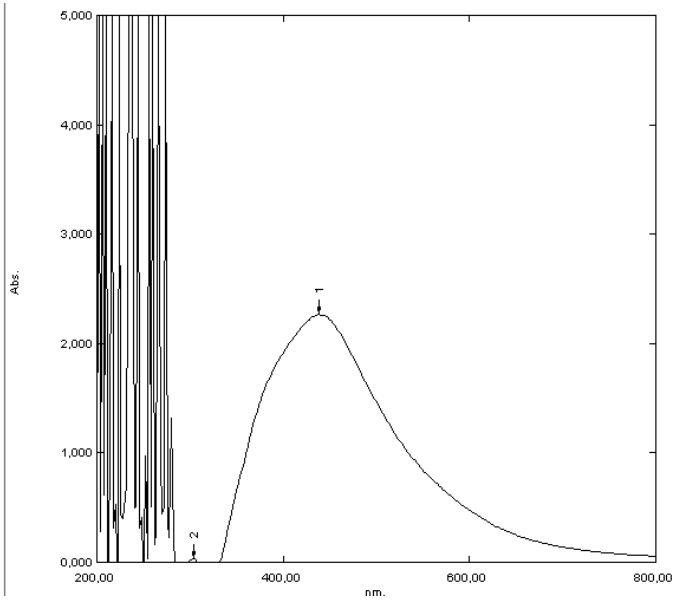


Şekil 4.12. *A.flavus* ile 37°C / 9 pH / 0,3 mM AgNO₃ koşullarında gerçekleşen AgNP sentezine ilişkin UV-Vis spektrumu

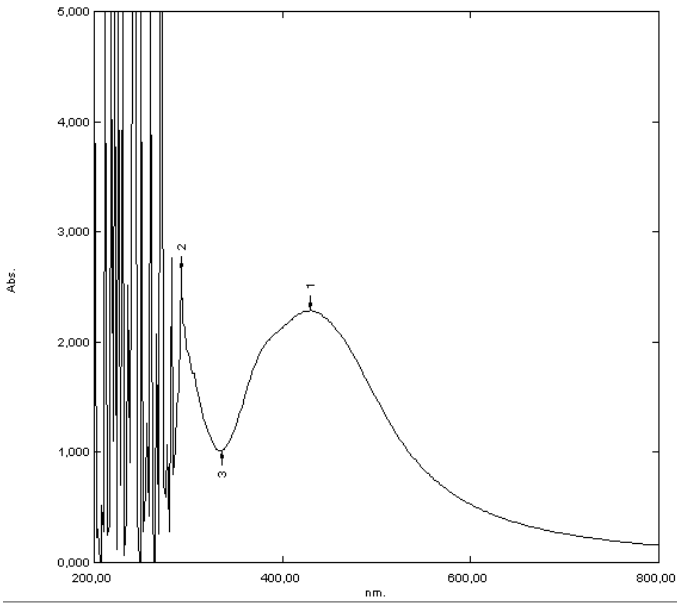
4.3. *A. fumigatus* ile sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis Karakterizasyonu

A. fumigatus ile yapılan AgNP sentezi deneylerinin beşinde (Şekil 4.2) renk değişimi görülmüştür. Bu 5 çözülden yalnızca 2 çözülide AgNP varlığını işaret eden spektrumlar gözlenmiştir. Uv-vis spektrumlarına göre bu çözeltilerde yüzey plazmon rezonans zirveleri 430-438 nm bandında gözlemlenmiştir. Sırasıyla 37°C/7pH/0,5mM ve 27°C/9pH/0,1mM koşullarının AgNP sentezini desteklediği anlaşılmaktadır (Şekil 4.13, 4.14).

Yapılan bir çalışmada *A.fumigatus* ile biyosentezlenen AgNP'lerin, maksimum absorbansın 420 nm'de meydana geldiği UV-Vis spektroskopisi ile doğrulandı (Alani, Moo-Young, ve Anderson, 2012).



Şekil 4.13. *A. fumigatus* ile 27°C / 9 pH / 0,1 mM AgNO₃ koşullarında gerçekleşen AgNP sentezine ilişkin UV-Vis spektrumu.



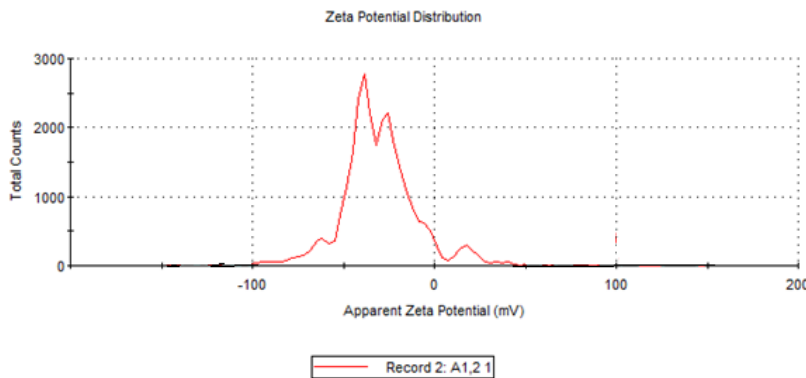
Şekil 4.14. *A. fumigatus* ile 37°C / 7 pH / 0,5 mM AgNO₃ koşullarında gerçekleşen AgNP sentezine ilişkin UV-Vis spektrumu.

4.4. AgNP'lerin Zeta Potansiyeli DLS Karakterizasyonu

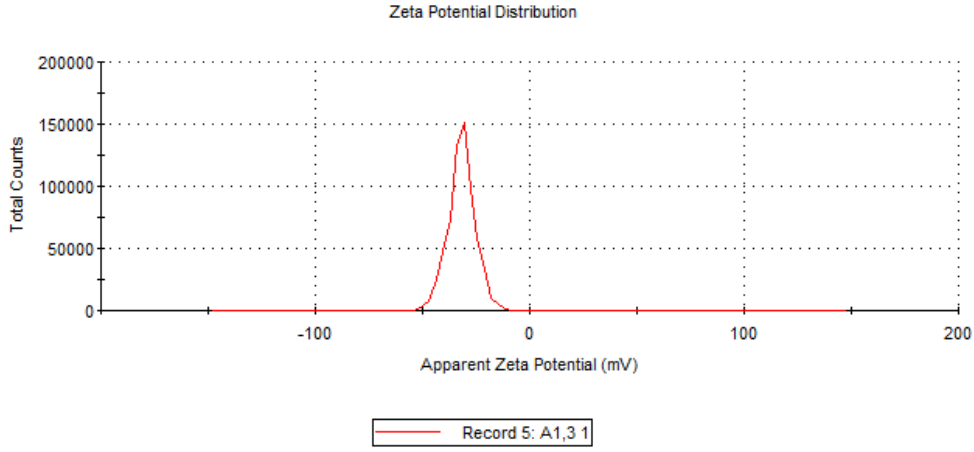
Her bir fungus için uygulanan BBD kapsamında 15 deneye ait Uv-Vis spektrumu ile AgNP varlığı saptanan 5 örneğin (Şekil 4.10-4.14) içerdiği AgNP'lerin karakterizasyonuna zeta potansiyeli ve DLS analizleriyle devam edilmiştir.

Zeta potansiyeli ile AgNP'lerin toplam elektrostatik yük değerleri ölçülmektedir. Zeta potansiyeli, +30mV'den yüksek veya -30mV'den düşük ise dağılımın elektrostatik olarak kararlı olduğu, sıfır ve sıfıra yakın zeta potansiyeli ise dağılımın kararsız olduğu anlamına gelmektedir (Barabadi vd., 2019). Bu çalışmada *A. flavus* ile sentezlenen AgNP'lerin zeta potansiyeli en iyi olan koşullar; 27°C/ 9 pH/ 0,5 mM, 37°C/ 9 pH/ 0,3 mM ve 27°C/ 9 pH/ 0,1 mM ve sırasıyla zeta potansiyelleri; -31,8 mV, -30,2 mV ve -25,9 mV olarak belirlenmiştir (Şekil 4.15-4.17).

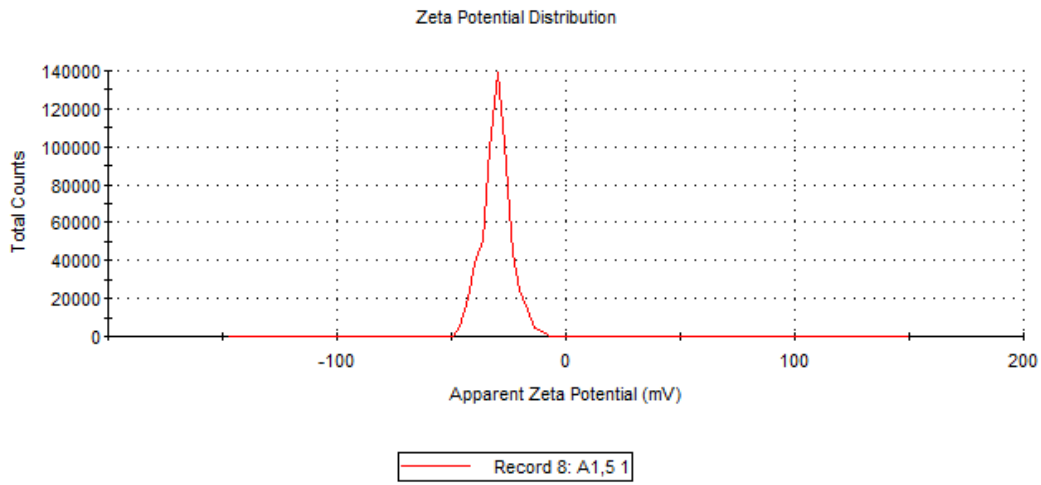
A. fumigatus ile sentezlenen AgNP'ler için ise zeta potansiyeli en iyi iki koşulda belirlenmiştir; 27°C/ 9 pH/ 0,1 mM ve 37°C/ 7 pH/ 0,5 mM, zeta potansiyelleri sırasıyla -31,4mV ve -29,9mV olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.18, 4.19). Her iki türde de zeta potansiyeli sonuçları -30mV'a yakın olması kararlı sistemler olduğunu göstermektedir (Barabadi vd., 2019). Barabadi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *Penicillium citrinum* aracılığıyla biyosentezlenen AgNP'lerin zeta potansiyeli -23mV bulunmuştur ve -30mV a yakın olduğu için kararlı kabul edilmiştir (Barabadi vd., 2019).



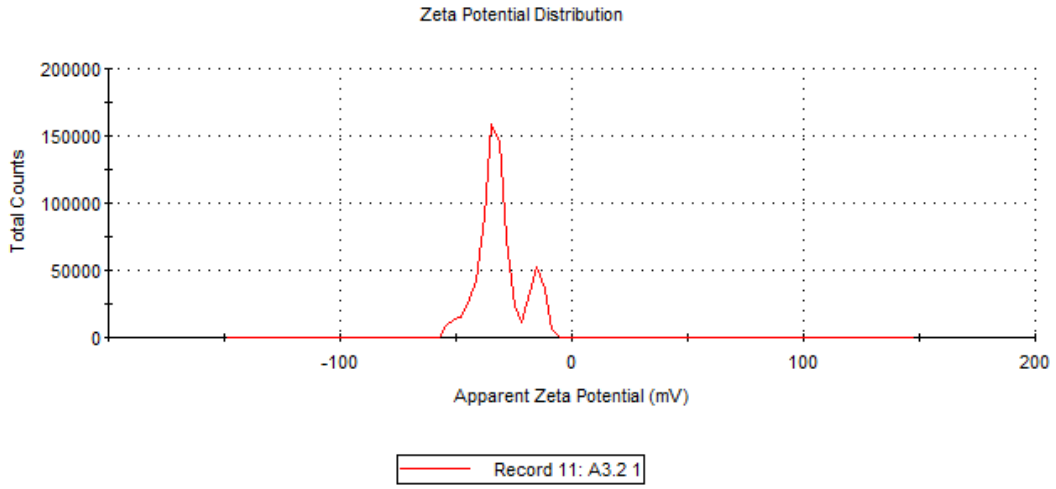
Şekil 4.15. *A. flavus* 27°C/9pH/0,1mM AgNO₃ koşullarında sentezlenen AgNP'lerin zeta potansiyel grafiği



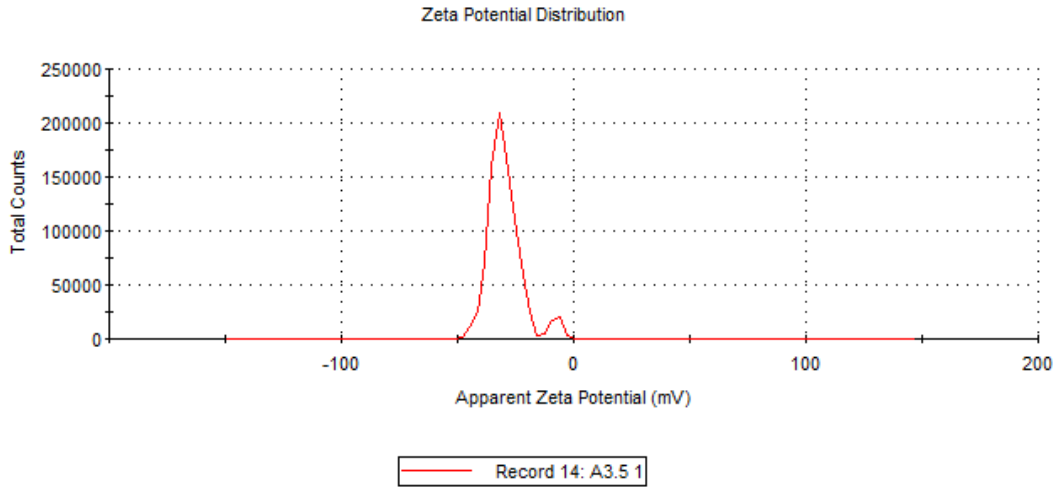
Şekil 4.16. *A. flavus* 27°C/ 9 pH/ 0,5 mM AgNO₃ koşullarında sentezlenen AgNP'lerin zeta potansiyel grafiği



Şekil 4.17. *A. flavus* 37°C/ 9 pH/0,3 mM AgNO₃ koşullarında sentezlenen AgNP'lerin zeta potansiyel grafiği



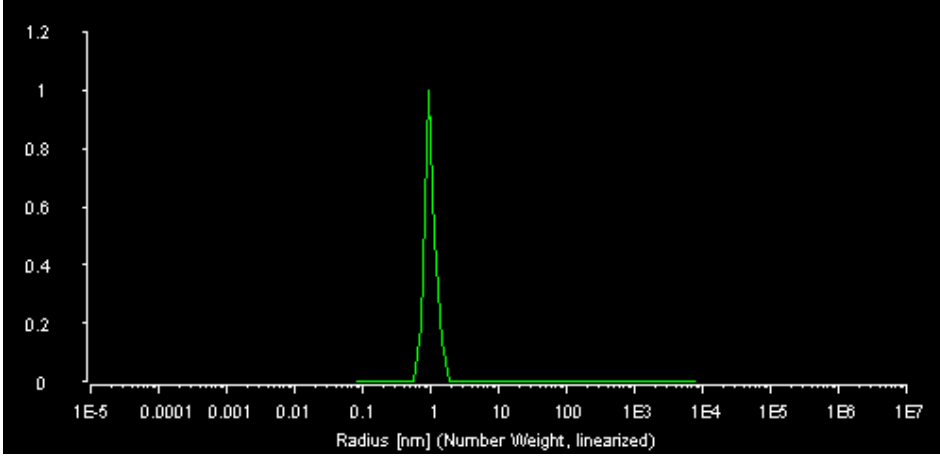
Şekil 4.18. *A. fumigatus* 27°C/9 pH /0,1 mM AgNO₃ koşullarında sentezlenen AgNP'lerin zeta potansiyel grafiği



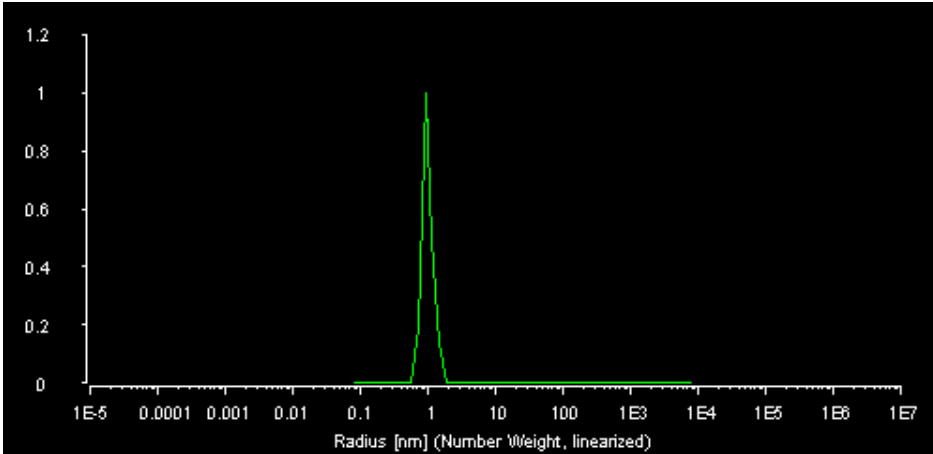
Şekil 4.19. *A. fumigatus* 37°C/ 7 pH /0,5 mM AgNO₃ koşullarda sentezlenen AgNP'lerin zeta potansiyel grafiği

DLS ölçümleri ile parçacık boyutu dağılımı ve polidispersite indeksi (PDI) değerleri belirlenmiştir. PDI, tek dispersiyonlu partiküller için 0,01 değerinden 0,5-0,7 değerlerine kadar değişen partikül boyutu dağılım genişliğini açıklar ve 0,7'nin üzerindeki değerler, önemli ölçüde geniş boyut dağılımına sahip çoklu dağılmış örneklerde görülür (Barabadi vd., 2019). Bu çalışmada *A. flavus* ile sentezlenen AgNP'lerin en iyi sonuç

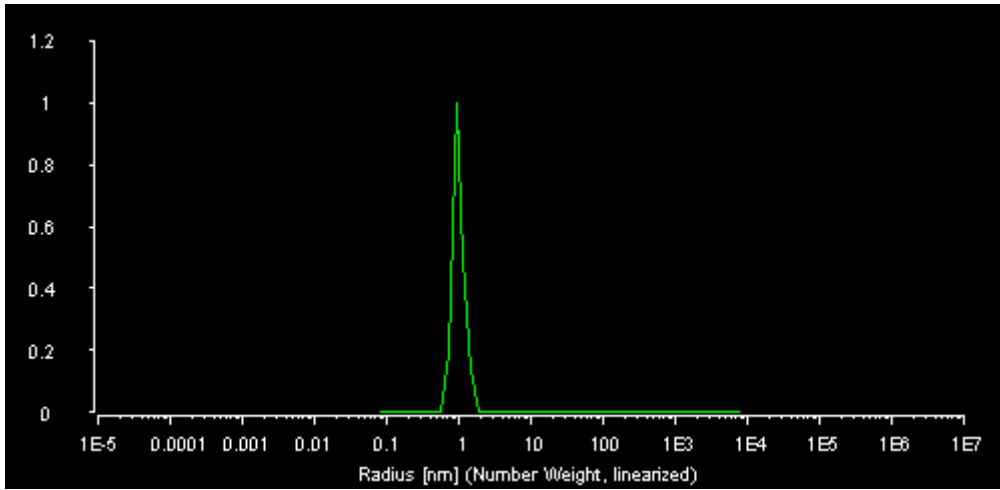
verdiği parametreler; 27°C/9pH/0,5mM, 37°C/9pH/0,3mM ve 27°C/9pH/0,1mM ve sırasıyla PDI değerleri, 0,464 / 0,420 / 0,426, parçacık boyutları; 68nm, 72nm, 70nm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.20 - 4. 22). Kaydedilen bu PDI değerleri iyi monodispersiteyi ve oldukça iyi tanımlanmış AgNP boyutlarını göstermektedir. Ölçüm koşullarının farklı olmasından dolayı boyut analizi açısından TEM ile DLS ölçümleri arasında farklılıklar görülebilmektedir. *A. fumigatus* ile sentezlenen AgNP'lerin DLS sonuçları ise; 27°C/9pH/0,1mM ve 37°C/7pH/0,5mM koşullarında sırasıyla PDI değerleri, 0,204 ve 0,246, parçacık boyutları ise, 94 nm ve 74 nm olarak kaydedilmiştir. Bu PDI sonuçları da bize AgNP'lerin iyi monodispersiteye sahip olduğunu ve partikül boyutu dağılımının iyi olduğunu göstermektedir (Şekil 4.23 ve 4. 24).



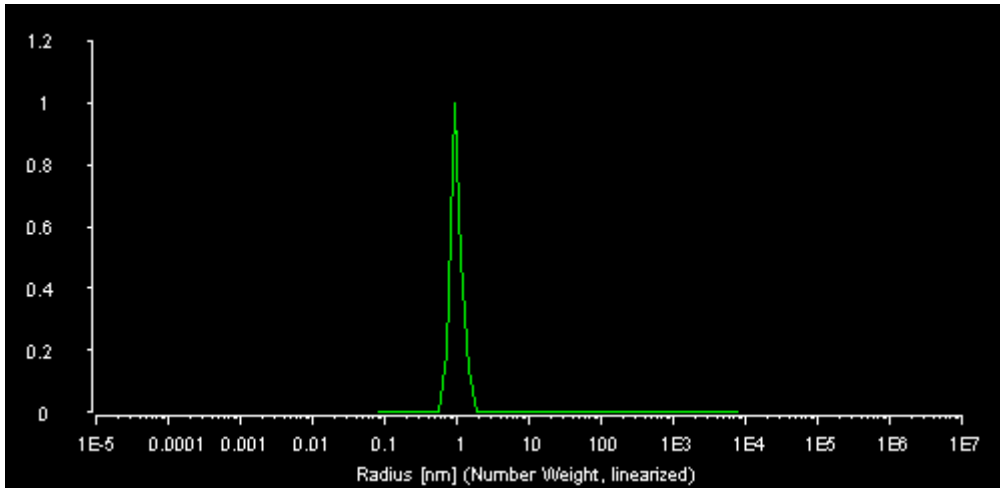
Şekil 4.20. *A.flavus*, 27°C / 9pH / 0,1mM için DLS analizi



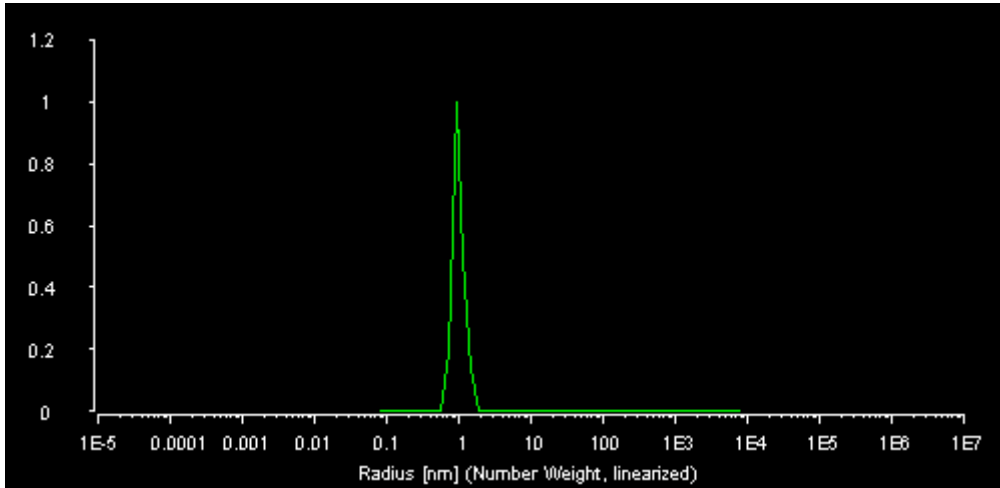
Şekil 4.21. *A.flavus*, 27°C / 9pH / 0,5mM AgNO₃ koşullarında partikül boyutu dağılımı



Şekil 4.22. *A.flavus*, 37°C / 9pH / 0,3mM için DLS analizi



Şekil 4.23. *A.fumigatus*, 27°C / 9pH / 0,1mM için DLS analizi

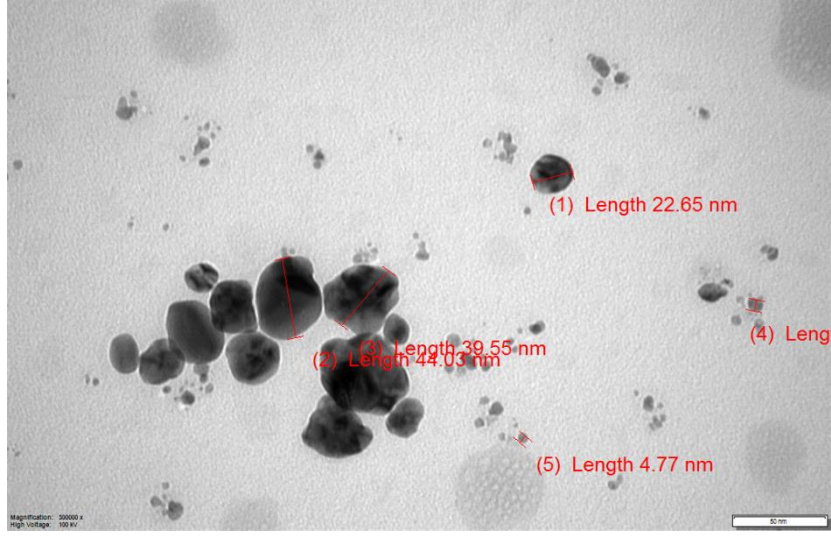


Şekil 4.24. *A.fumigatus*, 37°C / 7pH / 0,5mM için DLS analizi

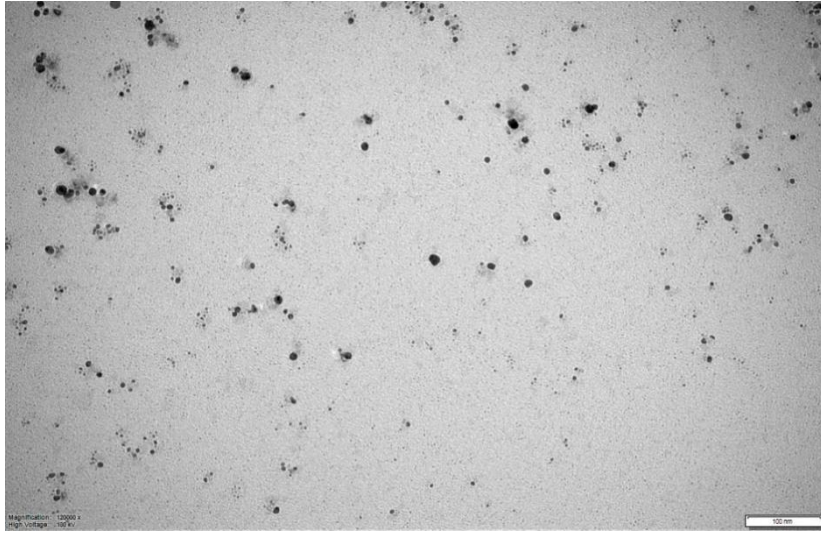
4.5. AgNP'lerin TEM ile Karakterizasyonu

TEM ile yapılan analiz sonucu AgNP'lerin boyut ve morfolojileri belirlenmiştir. *A. flavus* ve *A. fumigatus* ile üretilen AgNP'lerin boyutları sırasıyla, 20nm-45nm ve 10nm-30nm arasında olup her ikisinde de nanopartiküllerin küresel morfolojiye sahip olduğu görülmüştür.

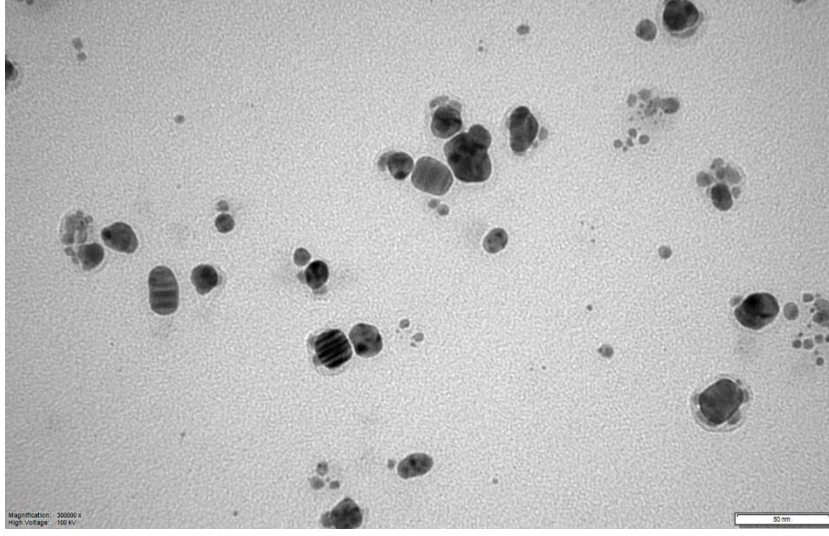
A. flavus ile yapılan bir çalışmada biyosentezlenen AgNP'lerin morfolojileri TEM'de incelenmiş ve sonuç olarak AgNP'lerin boyutunun 10-35 nm aralığında tek tip küresel şekilli oldukları kaydedilmiştir (Jain, Bhargava, Majumdar, Tarafdar, ve Panwar, 2011). Vidya ve Subramani'nin 2017'de *A. flavus* ile yaptığı bir çalışmada ise biyosentezlenen AgNP'lerin boyutları 10-40 nm arasında küresel şekilli olarak görülmüştür (Vidya ve Subramani, 2017). *A. fumigatus* ile yapılan bir çalışmada AgNP'lerin küresel boyutta ve 3-20 nm aralığında olduğu kaydedilmiştir (Sarsar, Selwal, ve Selwal, 2016). Alani ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise *A. fumigatus* ile biyosentezlenen AgNP'lerin yaklaşık %50'si 25 nm, %30'u 35 nm'de, %10'u 15 nm'de ve %10'u 45 nm olarak 4 farklı boyutta görüntülenmiştir (Alani, Moo-Young, ve Anderson, 2012).



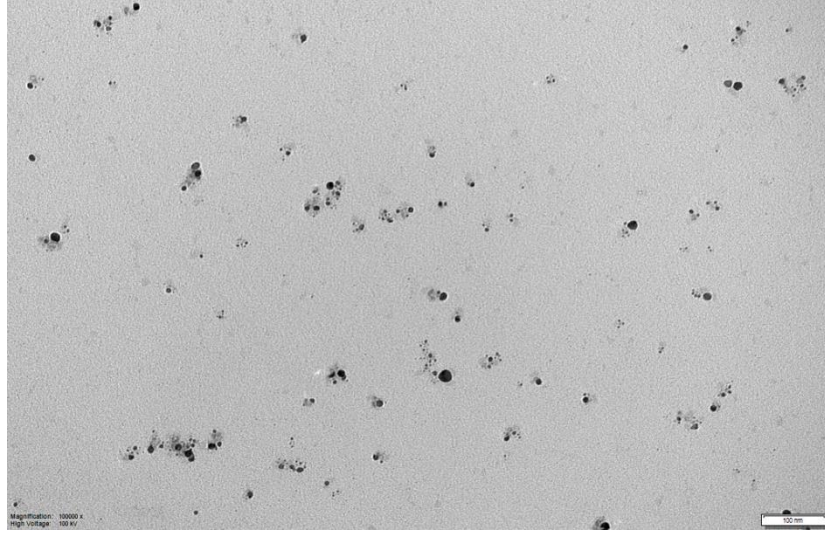
Şekil 4.25. *A.flavus* ile sentezlenen AgNP'lerin (27°C/9pH/0,1mM) TEM analizi



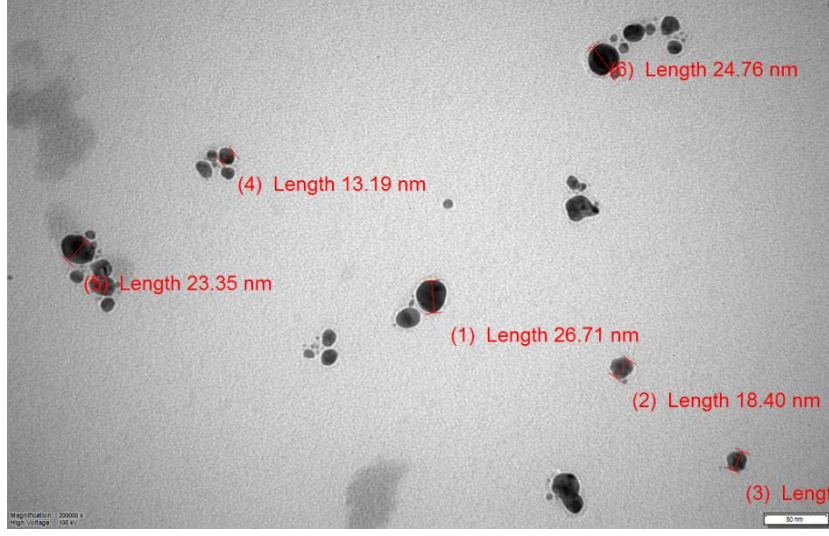
Şekil 4.26. *A.flavus* ile sentezlenen AgNP'lerin (27°C/9pH/0,5mM) TEM analizi



Şekil 4.27. *A.flavus* ile sentezlenen AgNP'lerin (37°C/9pH/0,3mM) TEM analizi



Şekil 4.28. *A.fumigatus* ile sentezlenen AgNP'lerin (27°C/9pH/0,1mM) TEM analizi

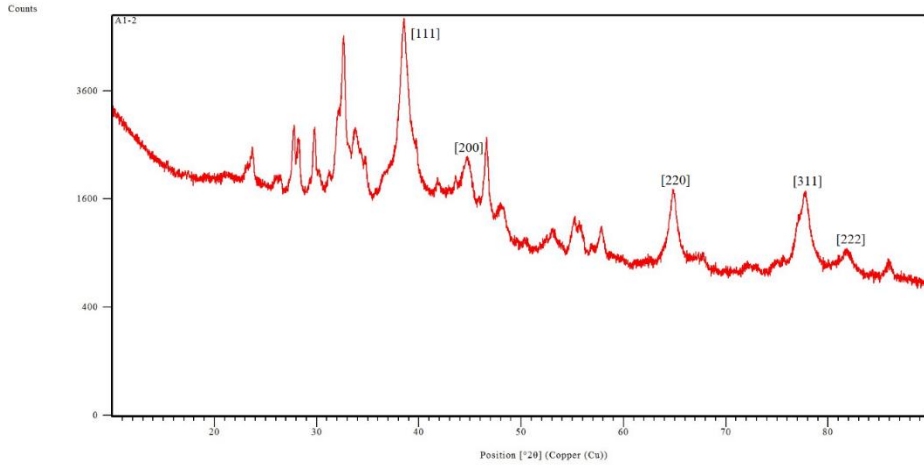


Şekil 4.29. *A.fumigatus* ile sentezlenen AgNP'lerin (37°C/7pH/0,5mM) TEM analizi

4.6. AgNP'lerin XRD ile Karakterizasyonu

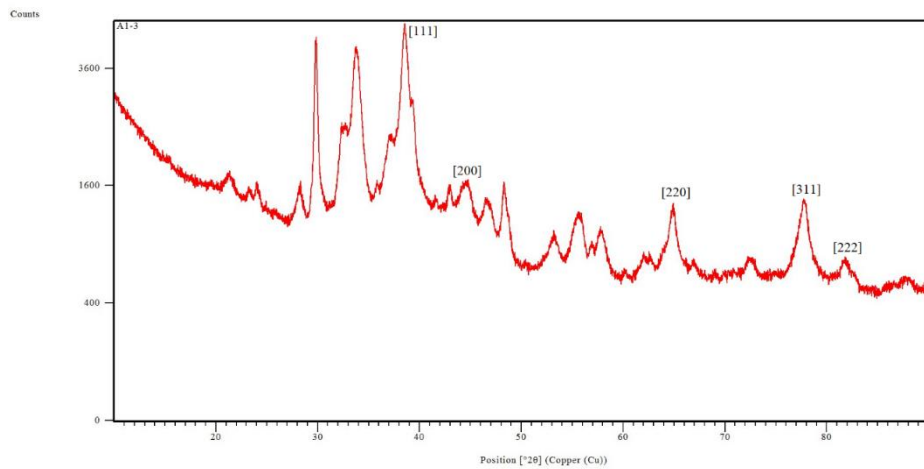
İncelenen 5 örnekteki NP'lerin X-ışını kırınım deseni Şekil 30-34'de verilmiştir. *A. flavus* 37°C/ 9pH/ 0,3mM AgNO₃ koşullarında sentezlenen AgNP'lerin XRD deseninde diğerlerinde farklı [hkl] değerleri dikkati çekmektedir (Şekil 4.32).

A. flavus ile 27°C/ 9pH/ 0,1mM AgNO₃ (A1-2) koşullarında sentezlenen AgNP'lerin XRD deseninde bazı karakteristik pikler 38,057 [111], 44,278 [200], 64,411 [220], 77,357 [311]ve 81,457 [222] gözlemlendi. Elde edilen piklerin literatürdeki önceki çalışmalarla uyumlu olduğu gözlemlendi. Ayrıca gözlenen gümüş pikleri Ag kristallerinin kübik yapıda olduğunu işaret etmektedir. Gümüşün [hkl] değerleri Şekil 4.30'da verilmektedir.



Şekil 4.30. *A. flavus* 27°C/ 9pH/ 0,1mM AgNO₃ koşullarında sentezlenen AgNP'lerin XRD deseni

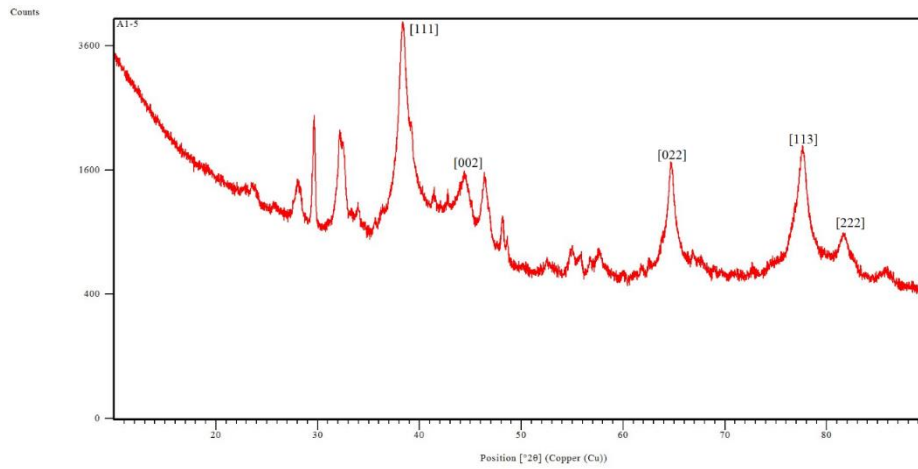
A. flavus ile 27°C/ 9pH/ 0,5mM AgNO₃ (A1-3) koşullarında sentezlenen AgNP'lerin XRD deseninde de görülen karakteristik pikler 37,981 [111], 44,142 [200], 64,200 [220], 77,088 [311]ve 81,208 [222] literatürdeki önceki çalışmalarla uyumlu olup gözlenen gümüş pikleri kübik yapıdaydı. Gümüşün [hkl] değerleri Şekil 4.31'de verilmektedir.



Şekil 4.31. *A. flavus* 27°C/ 9pH/ 0,5mM AgNO₃ koşullarında sentezlenen AgNP'lerin XRD deseni

A. flavus ile AgNP sentezinin başarılı olduğu üçüncü kombinasyonu 27°C/ 9pH/ 0,5mM AgNO₃ (A1-5) koşullarını kapsamaktadır. Bu koşullarda sentezlenen AgNP'lerin XRD deseninde de görülen karakteristik piklerin [hkl] değerlerinin farklı olduğu dikkati çekmektedir (sırasıyla 38,039 [111], 44,210 [002], 64,305 [022], 77,223 [113]ve 81,352 [222]). Gözlenen gümüş pikleri kristal yapının kübik olduğunu işaret etmektedir.

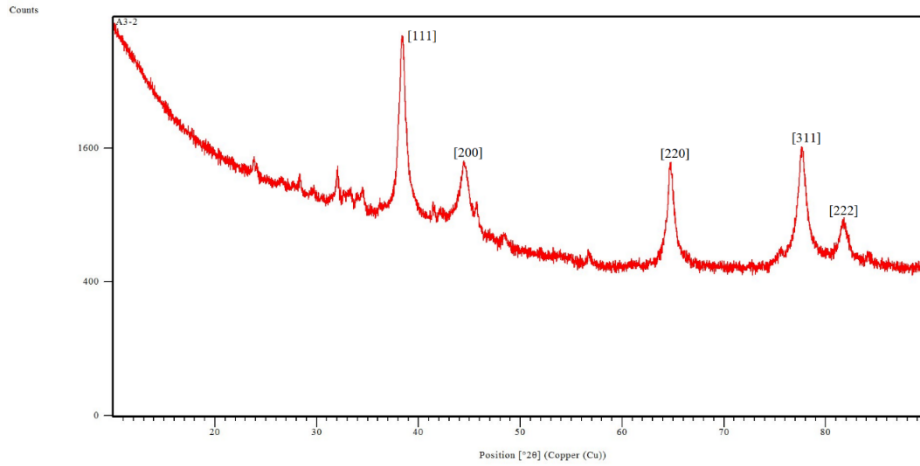
Yapılan bir çalışmada *A. flavus* tarafından sentezlenen biyosentezlenmiş gümüş nanoyapının XRD modeli AgNP'lerin yapısının yüz merkezli kübik olduğunu gösterdi ve spektrumların gümüş için [200], [220] ve [311] düzlemlerine karşılık geldiği kaydedildi (Sulaiman, 2015).



Şekil 4.32. *A. flavus* 37°C/ 9pH/ 0,3mM AgNO₃ koşullarında sentezlenen AgNP'lerin XRD deseni

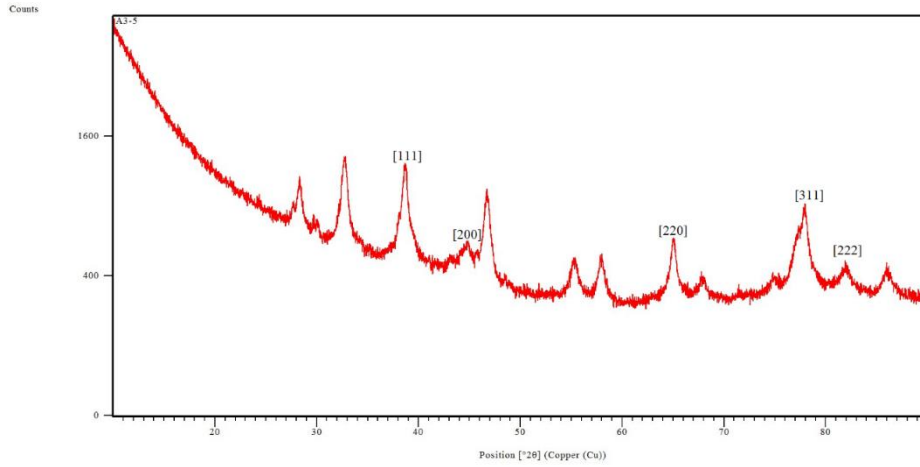
A. fumigatus ile 27°C/ 9pH/ 0,1mM AgNO₃ (A3-2) koşullarında sentezlenen AgNP'lerin XRD deseninde oluşan karakteristik pikler, *A. flavus* ile aynı koşullarda sentezlenen AgNP'lerin gösterdiği kırınım desenleri ile aynı olduğu görülmektedir (sırasıyla 38,101 [111], 44,600 [200], 64,678 [220], 77,549 [311]ve 81,505 [222]). Elde

edilen piklerin literatürdeki önceki çalışmalarla uyumlu olduğu gözlemlendi. Ayrıca gözlenen gümüş pikleri kübik yapıyı işaret etmektedir. Gümüşün [hkl] değerleri Şekil 4.33'de görülmektedir.



Şekil 4.33. *A. fumigatus* 27°C/ 9pH/ 0,1mM AgNO₃ koşullarında sentezlenen AgNP'lerin XRD deseni

A. fumigatus ile 37°C/ 7pH/ 0,5mM AgNO₃ (A3-5) koşullarında sentezlenen AgNP'lerin XRD deseninde oluşan karakteristik pikler, *A. fumigatus* ile 27°C/ 9pH/ 0,1mM AgNO₃ koşullarında sentezlenen AgNP'lerin gösterdiği kırınım desenleri ile aynı olduğu görülmektedir (sırasıyla 38,101 [111], 44,600 [200], 64,678 [220], 77,549 [311] ve 81,505 [222]). Elde edilen piklerin literatürdeki önceki çalışmalarla uyumlu olduğu gözlemlendi. Ayrıca gözlenen gümüş pikleri kristal yapısının kübik olduğuna işaret etmektedir.



Şekil 4.34. *A. fumigatus* 37°C/ 7pH/ 0,5mM AgNO₃ koşullarında sentezlenen AgNP'lerin XRD deseni

Çizelge 4. 22. Sentezlenen AgNP'lerin XRD toz kırınım desenine ilişkin veriler

	<i>A. flavus</i>			<i>A. fumigatus</i>	
Koşullar	A1-2	A1-3	A1-5	A3-2	A3-5
Pikler 2θ[°][hkl]	27°C/ 9pH/ 0,1mM AgNO ₃	(27°C/ 9pH/ 0,5mM AgNO ₃	(37°C/ 9pH/ 0,3mM AgNO ₃	(27°C/ 9pH/ 0,1mM AgNO ₃)	(37°C/ 7pH/ 0,5mM AgNO ₃)
1	38,057 [111]	37,981 [111]	38,039 [111]	38,101 [111]	38,101 [111]
2	44,278 [200]	44,142 [200]	44,210 [002]	44,600 [200]	44,600 [200]
3	64,411 [220]	64,200 [220]	64,305 [022]	64,678 [220]	64,678 [220]
4	77,357 [311]	77,088 [311]	77,223 [113]	77,549 [311]	77,549 [311]
5	81,457 [222]	81,208 [222]	81,352 [222]	81,505 [222]	81,505 [222]

Çizelge 4.22'de daha iyi fark edildiği gibi AgNO₃ konsantrasyonunun değişmesi kristal yapısında ve morfolojisinde önemli bir değişikliğe neden olmamaktadır. AgNP sentez sürecinde oluşan NP'lerin kristal yapılarını gösteren 2θ [°] piklerin pozisyonu aynı iken A1-5 koşullarında kristal yapısının yani [hkl] değerinin farklılık gösterdiği dikkati çekmektedir. Bu durum NP'lerin kristal yapısını etkileyen sıcaklık, pH ve substrat konsantrasyonunun birbiriyle etkileştiği bir düzeyde olduğunu düşündürmektedir.

İki farklı fungal türün kullanıldığı ve BBD ile belirlenen koşullarda sentezlenen AgNP'lerin XRD toz kırınım desenleri, Ag⁺ iyonlarının fungal kültürler aracılığıyla Ag⁰'a indirgenmesiyle AgNP'lerin sentezlendiğini göstermektedir.

Basaravaja vd., (2008), *Fusarium semitectum* fungal kültürünü kullanarak gümüş nitrat çözeltilisinden gümüş AgNP'lerin ekstrasellüler sentezi üzerine yaptıkları çalışmada, sentezlenen AgNP'leri XRD ile incelemişlerdir. AgNP'lerin kristal yapısına ilişkin 2θ [°] pozisyonuna karşılık gelen [hkl] değerlerini [111], [200], [220] ve [311] olarak bildirmişlerdir (Çizelge 4.22).

Rose vd., (2019), *Penicillium oxalicum* GRS-1'in hücresel içeriğini kullanılarak sentezlediği AgNP'leri X-ışını kırınımı ile karakterize etmiştir. XRD grafiği, yüzey merkezli kübik (FCC) şekilli kristallerin kırınımalarını 9, 11, 21, 22, 27, 32, 38 ve 46 pozisyonlarında keskin pikler olarak tanımlamışlardır. *A. flavus* ve *A. fumigatus* ile yapılan sentezde ise AgNP lere ait kristal yapıların pikleri sadece 38 pozisyonu ile benzerlik göstermektedir (Çizelge 4.22).

4.7. AgNP'lerin Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktiviteleri

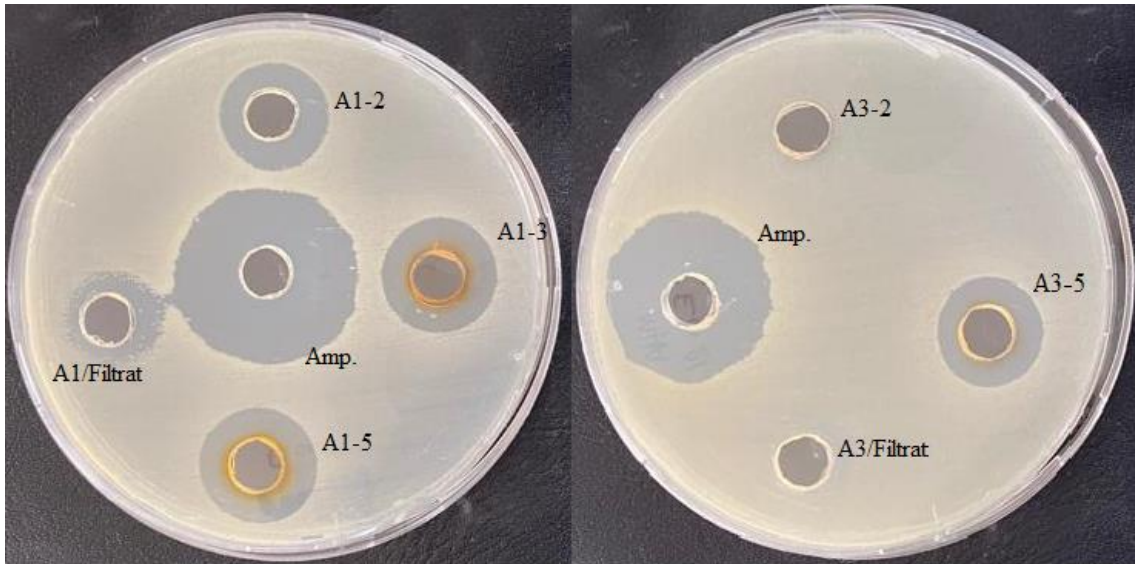
AgNP'lerin antimikrobiyal aktiviteleri, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans* test organizmaları kullanılarak, agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak *E. coli* ve *S. aureus* için ampisilin kullanılmıştır ve bu suşların ampisiline karşı oldukça duyarlı olduğu görülmüştür, *C. albicans* için ise flukonazol kullanılmıştır.

Karakterizasyon sonucunda iki türden seçilen koşullarda üretilen AgNP'lerin *E. coli*, *S. aureus* ve *C. albicans* organizmaları üzerine etkisi zon çapı (mm) cinsinden Çizelge 4.8.1'de verilmiştir. *E. coli*, *S. aureus* ve *C. albicans* organizmalarının *A. fumigatus* ile 27°C/9pH/0,1mM'da sentezlenen AgNP dışında diğer koşullarda sentezlenen AgNP'lere karşı oldukça duyarlı olduğu görülmüştür.

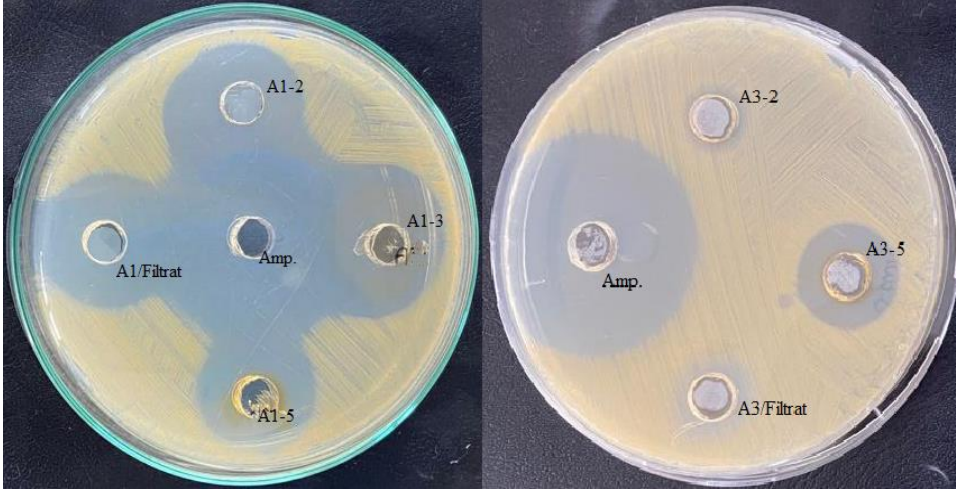
Çizelge 4. 23. Biyosentezlenen AgNP'lerin agar kuyucuk yöntemi ile belirlenen inhibisyon zon çapları (mm)

Test organizmaları	<i>A. flavus</i>			<i>A. fumigatus</i>		
	A1-2	A1-3	A1-5	A3-2	A3-5	Amp/Flu
<i>E. coli</i> ATCC 25922	17	18	17	-	18	30/-
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	27	30	25	-	21	28/-
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	16	18	17	-	13	-/-

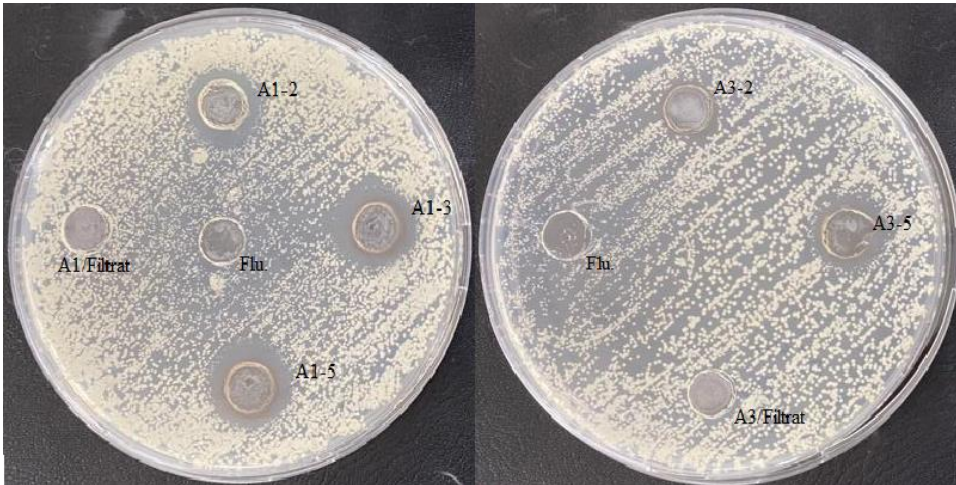
A1-2 (*A. flavus* 27°C/9pH/0,1mM); A1-3 (*A. flavus* 27°C/ 9 pH/ 0,5 mM); A1-5 (*A. flavus* 37°C/ 9 pH/ 0,3 mM); A3-2 (*A. fumigatus* 27°C/ 9 pH/ 0,1 mM); A3-5 (*A. fumigatus* 37°C/ 7 pH/ 0,5 mM); Amp: Ampisilin; Flu: Flukonazol



Şekil 4.35. Biyosentezlenen AgNP'lerin *E. coli* üzerindeki duyarlılığı (A1 (*A. flavus* filtrat), A1-2 (*A. flavus* 27°C/9pH/0,1mM), A1-3 (*A. flavus* 27°C/9pH/0,5mM), A1-5 (*A. flavus* 37°C/9pH/0,3mM), A3 (*A. fumigatus* filtrat), A3-2 (*A. fumigatus* 27°C/9pH/0,1mM), A3-5 (*A. fumigatus* 37°C/7pH/0,5mM), Amp (Ampisilin))



Şekil 4.36. Biyosentezlenen AgNP'lerin *S.aureus* üzerindeki duyarlılığı (A1 (*A.flavus* filtrat), A1-2 (*A.flavus* 27°C/9pH/0,1mM), A1-3 (*A.flavus* 27°C/9pH/0,5mM), A1-5 (*A.flavus* 37°C/9pH/0,3mM), A3 (*A.fumigatus* filtrat), A3-2 (*A.fumigatus* 27°C/9pH/0,1mM), A3-5 (*A.fumigatus* 37°C/7pH/0,5mM), Amp (Ampisilin))



Şekil 4.37. Biyosentezlenen AgNP'lerin *C.albicans* üzerindeki duyarlılığı (A1 (*A.flavus* filtrat), A1-2 (*A.flavus* 27°C/9pH/0,1mM), A1-3 (*A.flavus* 27°C/9pH/0,5mM), A1-5 (*A.flavus* 37°C/9pH/0,3mM), A3 (*A.fumigatus* filtrat), A3-2 (*A.fumigatus* 27°C/9pH/0,1mM), A3-5 (*A.fumigatus* 37°C/7pH/0,5mM), Flu. (Flukonazol))

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada daha önce AgNP taraması yapılan türlerden; *A. flavus*, *A. fumigatus* ve *A. clavatus* için optmizasyon ve karakterizasyon çalışması yapılmıştır. *A. clavatus*, zeta potansiyeli ve DLS analizleri sonucunda yüzey yükünün kararsız olması ve monodispersitesinin düşük olmasından dolayı çalışmanın ileriki safhalarında yer almamaktadır. *A. flavus* ve *A. fumigatus* ile biyosentezlenen AgNP'lerin sentez koşulları, pH, sıcaklık ve AgNO₃ miktarı açısından optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışması için ikiden fazla faktör ve düzeyde kullanılan BBD ile her bir tür için 15 kombinasyon tasarlanmıştır. BBD den elde edilen veriler doğrultusunda her bir faktörün tek başına etkisi ile faktörlerin birbiriyle etkileşimi incelenmiştir.

BBD uygulanarak sentezlenen AgNP içeren örneklerin yüzey plazmon rezonans bandları *A. flavus* ile sentezde 416 nm – 430 nm de, *A. fumigatus* ile sentezde 438 nm ve 430 nm de pikler tespit edilmiştir. Bu spektrumlar AgNP'ler için karakteristik yüzey plazmon rezonans pikleridir ve AgNP varlığını göstermektedir.

Sentezlenen AgNP'lerin zeta potansiyeli -31,8mV ile -25,9mV arasında değişmiştir. Her iki türde de zeta potansiyeli sonuçları -30mV'a yakın olması onların kararlı sistemler olduğunu göstermektedir.

TEM görüntülerine göre *A. flavus* ve *A. fumigatus* ile üretilen AgNP'lerin boyutları sırasıyla, 20nm-45nm ve 10nm-30nm arasında olup morfolojileri küresel olarak görülmüştür. Morfolojilerinin homojen olması katalitik aktivitelerini olumlu yönde etkilemektedir ve endüstride tercih edilen bir özelliktir.

İki farklı fungal türün kullanıldığı ve BBD ile belirlenen koşullarda sentezlenen AgNP'lerin XRD toz kırınım desenleri, metal iyonlarının fungal kültürler aracılığıyla indirgenerek AgNP'lerin sentezlendiğini göstermektedir.

AgNP'ler etkili antimikrobiyal ajanlar olarak bilinmektedir. Bu çalışmada en etkili antimikrobiyal aktivite *A. fumigatus* ile 37°C / 7pH / 0,5mM koşullarda sentezi yapılan AgNP'de gözlemlenmiştir.

Bu çalışmalar doğrultusunda biyosentezlenen AgNP'lerin sentez koşullarının optimize edilmesi sonucu endüstriyel boyuta taşınabileceği ve biyouyumlu NP'lerin üretilebileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda, üretimin yeşil sentez ile yapılması hem maliyeti düşürmesi hem de çevre dostu üretim olması açısından önem kazanmaktadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abbasi, E., Milani, M., Aval, S. F., Kouhi, M., Akbarzadeh, A., Nasrabadi, H. T., . . . Samiei, M. (2016). Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications and properties. *Critical Reviews in Microbiology*, 42(2), 173-180. doi:10.3109/1040841x.2014.912200
- Abbasi, E., Milani, M., Fekri Aval, S., Kouhi, M., Akbarzadeh, A., Tayefi Nasrabadi, H., . . . Nejati-Koshki, K. (2016). Silver nanoparticles: synthesis methods, bio-applications and properties. *Critical Reviews in Microbiology*, 42(2), 173-180.
- Adams, T. H. ve Timberlake, W. E. (1990). Developmental repression of growth and gene expression in *Aspergillus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(14), 5405-5409.
- Adrio, J. L. ve Demain, A. L. (2003). Fungal biotechnology. *International Microbiology*, 6(3), 191-199.
- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B. L. ve Ikram, S. (2016). A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise. *Journal of advanced research*, 7(1), 17-28. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4703479/pdf/main.pdf>
- Ahmet, A. (2004). *Aspergillus*, *Penicillium* and related species reported from Turkey. *Mycotaxon*, 89(1), 155-157.
- Alam, M. S., Garg, A., Pottoo, F. H., Saifullah, M. K., Tareq, A. I., Manzoor, O., Javed, M. N. (2017). Gum ghatti mediated, one pot green synthesis of optimized gold nanoparticles: Investigation of process-variables impact using Box-Behnken based statistical design. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 758-767. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.05.129
- Alani, F., Moo-Young, M., ve Anderson, W. (2012). Biosynthesis of silver nanoparticles by a new strain of *Streptomyces* sp compared with *Aspergillus fumigatus*. *World Journal of Microbiology ve Biotechnology*, 28(3), 1081-1086. doi:10.1007/s11274-011-0906-0
- Alghuthaymi, M. A., Almoammar, H., Rai, M., Said-Galiev, E. ve Abd-Elsalam, K. A. (2015). Myconanoparticles: synthesis and their role in phytopathogens management. *Biotechnology ve Biotechnological Equipment*, 29(2), 221-236.
- Almeida, K. B., Ramos, A. S., Nunes, J. B. B., Silva, B. O., Ferraz, E. R. A., Fernandes, A. S., . . . Falcao, D. Q. (2019). PLGA nanoparticles optimized by Box-Behnken for efficient encapsulation of therapeutic *Cymbopogon citratus* essential oil. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 181, 935-942. doi:10.1016/j.colsurfb.2019.06.010
- Ariduru, R. ve Arabacı, G. (2013). Çiğertaze otu (*Salvia officinalis*) bitkisinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi. *Sakarya University Journal of Science*, 17(2), 241-246.

- Azbukina, Z. M. (1985). Modern Taxonomy of Rust Fungi. *Mikologiya I Fitopatologiya*, 19(6), 457-462. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:A1985AXL6000001
- Barabadi, H. (2017). Nanobiotechnology: A promising scope of gold biotechnology. *Cell. Mol. Biol*, 63, 3-4.
- Barabadi, H., Honary, S., Ebrahimi, P., Alizadeh, A., Naghibi, F. ve Saravanan, M. (2019). Optimization of myco-synthesized silver nanoparticles by response surface methodology employing Box-Behnken design. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*, 49(2), 33-43.
- Barabadi, H., Honary, S., Ebrahimi, P., Mohammadi, M. A., Alizadeh, A. ve Naghibi, F. (2014). Microbial mediated preparation, characterization and optimization of gold nanoparticles. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(4), 1493-1501. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4323328/pdf/bjm-45-1493.pdf>
- Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M. ve Rizzolio, F. (2020). The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*, 25(1). doi:ARTN 112
10.3390/molecules25010112
- Bennett, J. (1998). Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *Journal of biotechnology*, 66(2-3), 101-107.
- Binnig, G., Quate, C. F. ve Gerber, C. (1986). Atomic force microscope. *Physical review letters*, 56(9), 930. Retrieved from <https://journals.aps.org/prl/pdf/10.1103/PhysRevLett.56.930>
- Camas, M., Celik, F., Camas, A. S. ve Ozalp, H. B. (2019). Biosynthesis of gold nanoparticles using marine bacteria and Box-Behnken design optimization. *Particulate Science and Technology*, 37(1), 31-38. doi:10.1080/02726351.2017.1287794
- Dağhoğlu, Y., ve Öztürk, B. Y. (2019). A novel intracellular synthesis of silver nanoparticles using *Desmodesmus* sp.(Scenedesmaceae): different methods of pigment change. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*, 30(3), 611-621.
- Değirmencioğlu, A. ve Yazgı, A. (2006). Tepki Yüzeyleri Metodolojisi" Optimizasyon Esaslı Çalışmalara İlişkin Teorik Esaslar ve Tarımsal Mekanizasyon Uygulamaları". *Tarım Makinaları Bilimi Dergisi*, 2(2), 111-115.
- Dorcheh, S. K. ve Vahabi, K. (2016). Biosynthesis of nanoparticles by fungi: large-scale production. *Fungal metabolites*, 395-414.
- Drexler, K. E., Peterson, C. ve Pergamit, G. (1991). Unbounding the Future: The Nanotechnology Revolution. New York, William Morrow. In *Quill Books* (pp. 225).

- Durán, N., Marcato, P. D., Alves, O. L., De Souza, G. I. ve Esposito, E. (2005). Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *Journal of nanobiotechnology*, 3(1), 1-7.
- Ersöz, M., Sulak, M., Bersani, M., Işıtan, A., Balaban, M., Yakar, Z., . . . Onar, V. (2018). Nanoteknoloji 2: karakterizasyon ve uygulamalar. In: Pamukkale Üniversitesi Yayınları.
- Gahlawat, G. ve Choudhury, A. R. (2019). A review on the biosynthesis of metal and metal salt nanoparticles by microbes. *Rsc Advances*, 9(23), 12944-12967. doi:10.1039/c8ra10483b
- Gürmen, S. ve Ebin, B. (2008). Nanopartiküller ve üretim yöntemleri-1. *Metaller Dergisi*, 150, 31-38.
- Hashmi, S. S., Abbasi, B. H., Rahman, L., Zaka, M. ve Zahir, A. (2019). Phytosynthesis of organo-metallic silver nanoparticles and their anti-phytopathogenic potency against soil borne *Fusarium* spp. *Materials Research Express*, 6(11). doi:ARTN 1150a9
10.1088/2053-1591/ab4d7c
- Hawksworth, D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, 105(12), 1422-1432.
- Honary, S., Barabadi, H., Gharaei-Fathabad, E. ve Naghibi, F. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles induced by the fungus *Penicillium citrinum*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(1), 7-11.
- Öztürk, B. Y., Gürsu, B. Y., ve Dağ, İ. (2020). Antibiofilm and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles using marine red algae *Gelidium corneum*. *Process Biochemistry*, 89, 208-219.
- Jain, N., Bhargava, A., Majumdar, S., Tarafdar, J. C., ve Panwar, J. (2011). Extracellular biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Aspergillus flavus* NJP08: A mechanism perspective. *Nanoscale*, 3(2), 635-641. doi:10.1039/c0nr00656d
- Jeevanandam, J., Chan, Y. S. ve Danquah, M. K. (2016). Biosynthesis of Metal and Metal Oxide Nanoparticles. *Chembioeng Reviews*, 3(2), 55-67. doi:10.1002/cben.201500018
- Joshi, M., Bhattacharyya, A. ve Ali, S. W. (2008). Characterization techniques for nanotechnology applications in textiles.
- Khabat, V. ve Sedigheh, K. (2014). Chapter 29–Biosynthesis of silver nano-particles by trichoderma and its medical applications. *Biotechnology and Biology of Trichoderma. Elsevier BV*, 1, 393-404.

- Khajeh, M. (2010). Application of Factorial Design and Box-Behnken Matrix in the Optimization of a Magnetic Nanoparticles Procedure for Copper Determination in Water and Biological Samples. *Biological trace element research*, 135(1-3), 355-363. doi:10.1007/s12011-009-8509-4
- Kinnear, C., Moore, T. L., Rodriguez-Lorenzo, L., Rothen-Rutishauser, B. ve Petri-Fink, A. (2017). Form follows function: nanoparticle shape and its implications for nanomedicine. *Chemical reviews*, 117(17), 11476-11521.
- Krupa, A. N. D., Abigail, M. E. A., Santhosh, C., Grace, A. N. ve Vimala, R. (2016). Optimization of process parameters for the microbial synthesis of silver nanoparticles using 3-level Box Behnken Design. *Ecological Engineering*, 87, 168-174. doi:10.1016/j.ecoleng.2015.11.030
- Kumar, S. A., Abyaneh, M. K., Gosavi, S., Kulkarni, S. K., Pasricha, R., Ahmad, A. ve Khan, M. (2007). Nitrate reductase-mediated synthesis of silver nanoparticles from AgNO₃. *Biotechnology letters*, 29(3), 439-445.
- Liu, J.-f., Yu, S.-j., Yin, Y.-g. ve Chao, J.-b. (2012). Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 33, 95-106.
- Lung, I., Stan, M., Opris, O., Soran, M. L., Senila, M. ve Stefan, M. (2018). Removal of Lead(II), Cadmium(II), and Arsenic(III) from Aqueous Solution Using Magnetite Nanoparticles Prepared by Green Synthesis with Box-Behnken Design. *Analytical Letters*, 51(16), 2517-2529. doi:10.1080/00032719.2018.1446974
- Matsumura, Y., Yoshikata, K., Kunisaki, S.-i. ve Tsuchido, T. (2003). Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Applied and environmental microbiology*, 69(7), 4278-4281.
- Mehmet, A. (2018). Nanoparçacıkların Ölçme ve İnceleme Teknikleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 11(1), 63-69.
- Muralidhar, R. V., Chirumamila, R., Marchant, R. ve Nigam, P. (2001). A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. *Biochemical Engineering Journal*, 9(1), 17-23.
- Poole Jr, C. P. ve Owens, F. J. (2003). *Introduction to nanotechnology*: John Wiley ve Sons.
- Priya, D. D., Nandhakumar, M., Shanavas, S., Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., ve Madhumitha, G. (2020). Aerva lanata-mediated bio-treated production of copper oxide nanoparticles, optimization by BBD-RSM method and its behaviour against water related mosquito. *Applied Nanoscience*. doi:10.1007/s13204-020-01573-x
- Prabhu, S. ve Poulouse, E. K. (2012a). Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International nano letters*, 2(1), 1-10.

- Prabhu, S. ve Poulouse, E. K. (2012b). Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International nano letters*, 2(1), 32.
- Pradell, T., Climent-Font, A., Molera, J., Zucchiatti, A., Ynsa, M., Roura, P. ve Crespo, D. (2007). Metallic and nonmetallic shine in luster: An elastic ion backscattering study. *Journal of Applied Physics*, 101(10), 103518.
- Pratt, I., Adley, C., Chambers, G. ve Anderson, W. (2008). Relevance for Food Safety of Applications of Nanotechnology in the Food and Feed Industry.
- Ramesh, T., Yamunadevi, R., Sundaramanickam, A., Thangaraj, M., Kumaran, R. ve Annadurai, D. (2021). Biodiversity of the fungi in extreme marine environments. In *Fungi Bio-Prospects in Sustainable Agriculture, Environment and Nanotechnology* (pp. 75-100): Elsevier.
- Rokem, J. (2010). Industrial mycology. *Biotechnology*, 6, 75-97.
- Saravanan, M. ve Nanda, A. (2010). Extracellular synthesis of silver bionanoparticles from *Aspergillus clavatus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 77(2), 214-218. Retrieved from
- Sigler, L. (1986). Taxonomy of Arthroconidial Fungi. *Zentralblatt Fur Bakteriologie Mikrobiologie Und Hygiene Series a-Medical Microbiology Infectious Diseases Virology Parasitology*, 262(1), 10-11. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:A1986E100800009
- Singh, P., Kim, Y.-J., Zhang, D. ve Yang, D.-C. (2016). Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 34(7), 588-599.
- Skiba, M. I., Vorobyova, V. I., Pivovarov, A. ve Makarshenko, N. P. (2020). Green Synthesis of Silver Nanoparticles in the Presence of Polysaccharide: Optimization and Characterization. *Journal of Nanomaterials*, 2020. doi:Artn 305130810.1155/2020/3051308
- Sulaiman, G. M., Hussien, H. T., ve Saleem, M. M. N. M. (2015). Biosynthesis of silver nanoparticles synthesized by *Aspergillus flavus* and their antioxidant, antimicrobial and cytotoxicity properties. *Bulletin of Materials Science*, 38(3), 639-644. doi:10.1007/s12034-015-0905-0
- Vidya, P., ve Subramani, G. (2017). Fungus Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Aspergillus Flavus* and Its Antibacterial Activity against Selective Food Borne Pathogens. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(12), 4627-4634. doi:10.5281/zenodo.1069710
- Warnock, D. W. (2007). Taxonomy and Classification of Fungi. *Manual of Clinical Microbiology*, 9th Ed, 1721-1727. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000278004500116

- Weissig, V., Pettinger, T. K. ve Murdock, N. (2014). Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 4357.
- Yazdi, M. E. T., Amiri, M. S., Akbari, S., Sharifalhosseini, M., Nourbakhsh, F., Mashreghi, M., . . . Es-haghi, A. (2020). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Helichrysum graveolens* for Biomedical Applications and Wastewater Treatment. *Bionanoscience*, 10(4), 1121-1127. doi:10.1007/s12668-020-00794-2
- Zia, M., Gul, S., Akhtar, J., Ul Haq, I., Abbasi, B. H., Hussain, A., . . . Chaudhary, M. F. (2017). Green synthesis of silver nanoparticles from grape and tomato juices and evaluation of biological activities. *IET nanobiotechnology*, 11(2), 193-199. doi:10.1049/iet-nbt.2015.0099