

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

TERMOFİLİK BASİLLERDE GÜMÜŞ NANOPARTİKÜL BİYOSENTEZİ,
KARAKTERİZASYONU VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ İLE *IN VITRO*
YARA İYİLEŞTİRİCİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Gaye Ekin GÜRSOY ÇALIŞ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2026

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

TERMOFİLİK BASİLLERDE GÜMÜŞ NANOPARTİKÜL BİYOSENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ İLE *IN VITRO* YARA İYİLEŞTİRİCİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Gaye Ekin GÜRSOY ÇALIŞ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN

Bu tez kapsamında, toksisite genlerine sahip olmayan termofilik *SGC-R* bakterisinin kültür koşulları (NaCl'siz NB, 55°C, pH 8.5, 48 saat) ve hücresiz kültür süpernatantından gümüş nanopartiküllerin (AgNP'lerin) üretimi koşulları (1 mM AgNO₃, 60°C, pH 7.5, 48 saat) optimize edilerek yüksek saflıkta, monodispers ve küresel morfolojide AgNP'ler biyolojik olarak sentezlenmiştir. Elde edilen nanopartiküller UV-Vis spektrofotometre, FT-IR ve TEM analizleri ile karakterize edilmiştir. AgNP'ler UV-Vis spektroskopisinde 401 nm'de belirgin bir yüzey plazmon rezonans piki göstermiştir. FT-IR analizleri AgNP'lerin stabilizasyonunu kolaylaştırmış olabilecek protein içerikli veya diğer organik kalıntıların varlığını göstermiştir. TEM analizi ile 27-67 nm aralığında boyutlara sahip, küresel AgNP'ler gözlenmiştir. Sentezlenen AgNP'ler, Gram-pozitif, Gram-negatif ve fungal patojenlere karşı güçlü antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivite sergilemiş; özellikle *Candida* türleri ve *Staphylococcus epidermidis*'e karşı en düşük minimum inhibitör konsantrasyonları (78.13 µg/mL) gözlenmiştir. Ticari kimyasal AgNP'lerle kıyaslandığında biyolojik AgNP'ler çok daha düşük konsantrasyonlarda etkili olmuş ve yüzey kaplayıcı özellikleri sayesinde etkinlikleri artmıştır. DPPH analizi, nanopartiküllerin konsantrasyona bağlı olarak antioksidan aktivite sergilediğini göstermiştir. Sağlıklı hücrelerde düşük toksisite, kanser hücre hatlarında ise seçici sitotoksik etki belirlenmiştir. *In vitro* yara modeli çalışmalarında, fibroblast ve keratinosit hücreleri canlılığını korurken, özellikle düşük dozlarda migrasyon üzerinde etki göstermiştir. Elde edilen bulgular, *SGC-R* aracılığıyla gerçekleştirilen biyolojik sentezin çevresel açıdan uyumlu, biyogüvenli ve verimli bir yöntem olduğunu ve biyomedikal uygulamalar, kanser tedavisi ve yara bakımında terapötik potansiyel sergileyebileceğini ortaya koymuştur.

Ocak 2026, 181 sayfa

Anahtar Kelimeler: Gümüş nanopartikül (AgNP), Yeşil sentez, Termofilik basil, Karakterizasyon, Biyolojik aktiviteler, Yara iyileşmesi

ABSTRACT

PhD Thesis

INVESTIGATION OF SILVER NANOPARTICLE BIOSYNTHESIS, CHARACTERIZATION, BIOLOGICAL ACTIVITIES AND *IN VITRO* WOUND HEALING EFFECTS IN THERMOPHILIC BACILLI

Gaye Ekin GÜRSOY ÇALIŞ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN

Within the scope of this thesis, the culture conditions of the thermophilic *SGC-R* bacterium lacking toxicity genes (NB without NaCl, 55 °C, pH 8.5, 48 h) and the conditions for the production of silver nanoparticles (AgNPs) from the cell-free culture supernatant (1 mM AgNO₃, 60°C, pH 7.5, 48 h) were optimized, enabling the biological synthesis of high-purity, monodisperse AgNPs with a spherical morphology. The synthesized nanoparticles were characterized using UV-Vis spectrophotometry, FT-IR, and TEM analyses. The AgNPs exhibited a distinct surface plasmon resonance peak at 401 nm in the UV-Vis spectrum. FT-IR analyses indicated the presence of proteinaceous or other organic residues that may have facilitated the stabilization of the AgNPs. TEM analysis revealed spherical AgNPs with sizes ranging from 27 to 67 nm. The synthesized AgNPs demonstrated strong antimicrobial and antibiofilm activities against Gram-positive, Gram-negative, and fungal pathogens; notably, the lowest minimum inhibitory concentrations (78.13 µg/mL) were observed against *Candida* species and *Staphylococcus epidermidis*. Compared with commercially available chemically synthesized AgNPs, the biologically synthesized AgNPs were effective at much lower concentrations, and their activity was enhanced due to their surface-coating properties. DPPH analysis demonstrated that the nanoparticles exhibited concentration-dependent antioxidant activity. Low toxicity was observed in healthy cells, while selective cytotoxic effects were detected in cancer cell lines. In *in vitro* wound model studies, fibroblast and keratinocyte cells maintained their viability, and the study showed an effect on migration, especially at low doses. Overall, these findings demonstrate that *SGC-R*-mediated biological synthesis is an environmentally compatible, biosafe, and efficient method, and that the resulting AgNPs exhibit therapeutic potential for biomedical applications, cancer therapy, and wound care.

January 2026, 181 pages

Key Words: Silver nanoparticle (AgNP), Green synthesis, Thermophilic bacilli, Characterization, Biological activities, Wound healing

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının her aşamasında değerli bilgi ve tecrübelerini benden hiçbir zaman esirgemeyen, akademik bakış açımı geliştirmemde büyük katkı sağlayan, sabrı ve yapıcı yaklaşımıyla bana her zaman yol gösteren, akademik disiplin ve etik değerlerin yanı sıra bana hayata dair pek çok şey katan, hayatımın önemli dönüm noktalarında her daim destekçim ve şansım olarak yer alan, benim için bir danışmanın çok ötesinde olan saygıdeğer ve kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Arzu ÇÖLERİ CİHAN'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı),

Çok değerli katkılarından dolayı Tez İzleme Komitesi üyeleri hocalarım Sayın Prof. Dr. Ayşe KARAKEÇİLİ'ye (Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı) ve Sayın Prof. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı), hem lisans hem de lisansüstü eğitim sürecim boyunca sabır ve güler yüzüyle en büyük destekçilerimden biri olan, akademik bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, kendisini tanımış olmayı daima şans saydığım Sayın Doç. Dr. Başar KARACA'ya, Doktora sürecini birlikte paylaştığımız, birbirimizden güç aldığımız Dr. Ayşe Büşra KARAKAYA'ya, Hatice DEMİR'e, ne zaman ihtiyaç duysam desteğime koşan İrem KAYABAŞI'na ve Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarındaki tüm çalışma arkadaşlarıma, laboratuvarlarında çalışma fırsatı bulduğum, Sayın Prof. Dr. Özlem YILDIRIM'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı) ve Dr. Öğr. Üyesi Okan ONAR'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı),

Her koşulda yanımda olan, ikinci ailem Özge KURU KAVAK ve Eyüp KAVAK'a

Doktora sürecim boyunca kendi bilgi, deneyim ve birikimiyle bana ilham olan, bilime ve akademik değerlere olan yaklaşımıyla beni her daim yönlendiren ve her zaman yanımda olduğunu hissettiren babam Halil GÜRSOY'a, Sevgisi, emeği ve fedakârlığıyla bugün burada olmamı mümkün kılan en temel değerlerin kaynağı olan; sevgi, saygı ve özlemle andığım anneme ve tez çalışması süresince sabrı, anlayışı ve desteğiyle her zaman yanımda olan, güç kaynağım, yol arkadaşım, sevgili eşim Mert ÇALIŞ'a

Bu Doktora tezini, 119C208 kodlu “Yenilikçi Teknolojiler Kullanılarak Katma Değeri Yüksek Biyoteknolojik Ürün Geliştirilmesi ve Bu Alanda Çalışacak Nitelikli Araştırmacıların Yetiştirilmesi” başlıklı, 2244 Bilim İnsanı Destekleme Programı ile destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK BİDEB), Sentebiolab Biyoteknoloji Şirketi'ne, şirketin yönetim kurulu başkanı Halit ERYİĞİT'e ve FDK-2024-3436 kodlu “Termofilik Basillerde Gümüş Nanopartikül Biyosentezi, Karakterizasyonu ve Biyolojik Aktiviteleri ile *In Vitro* Yara İyileştirici Etkilerinin Araştırılması” başlıklı Doktora Tez Projesi ile destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (BAP),

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Gaye Ekin GÜRSOY ÇALIŞ
Ankara, Ocak 2026

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	7
2.1 Nanoteknoloji ve Nanopartiküller	7
2.2 Gümüş Nanopartiküllerin Morfolojik Çeşitliliği	8
2.3 Gümüş Nanopartikül Sentezi.....	10
2.3.1 Gümüş nanopartiküllerin fiziksel sentezi.....	12
2.3.2 Gümüş nanoprtiküllerin kimyasal sentezi	13
2.3.3 Gümüş nanoprtiküllerin biyolojik (yeşil) sentezi	14
2.3.3.1 Bitki kaynaklı sentez (fitojenik sentez).....	15
2.3.3.2 Mantar kaynaklı sentez	17
2.3.3.3 Alg kaynaklı sentez.....	19
2.3.3.4 Polisakkarit ve protein kaynaklı sentez	20
2.3.3.5 Bakteri kaynaklı sentez.....	21
2.4 Bakteriyel AgNP'lerin Sentez Mekanizmaları ve Diğer Sentez Yöntemlerine Göre Avantajları.....	31
2.5 Gümüş Nanopartiküllerin Genel Uygulama Alanları ve Biyolojik Aktiviteleri	33
2.5.1 Gümüş nanopartiküllerin antibakteriyel özelliği	34
2.5.2 Gümüş nanopartiküllerin antifungal özelliği	38
2.5.3 Gümüş nanopartiküllerin antiviral özelliği.....	39
2.5.4 Gümüş nanopartiküllerin antikanser özelliği	40
2.5.5 Gümüş nanopartiküllerin antiprotozoal özelliği	42
2.5.6 Gümüş nanopartiküllerin antiinflamatuvar özelliği	43
2.6 Gümüş Nanopartiküllerin Medikal Kullanımları.....	44
2.6.1 Gümüş nanopartiküllerin kardiyovasküler malzemelerde kullanımı	45
2.6.2 Gümüş nanopartiküllerin cerrahi kateterlerde kullanımı.....	46
2.6.3 Gümüş nanopartiküllerin sert doku mühendisliğinde kullanımı.....	46
2.6.4 Gümüş nanopartiküllerin yumuşak doku mühendisliğinde kullanımı	48
3. MATERYAL VE YÖNTEM	51
3.1 Materyal.....	51
3.1.1 Bakteri kültürleri ve hücre hatları.....	51
3.1.2 Besiyerleri.....	51
3.1.3 Çözeltiler ve kitler.....	53
3.2 Yöntem	56
3.2.1 Bakteri kültürünün ön aktifleştirme işlemleri	56

3.2.2 SGC-R’de istenmeyen olası toksisite genlerinin varlığının veya noksanlığının PCR reaksiyonları ile tayini ve <i>in silico</i> analiz ile azot metabolizmasının anotasyonu	56
3.2.3 Termofilik basilin farklı koşullarda mikrobiyal gelişimi.....	58
3.2.4 Gümüş nitrat çözeltisinin hazırlanması ve süpernatant aracılığıyla hücre dışı AgNP’lerin eldesi	59
3.2.5 AgNP’lerin üretiminin ve etkinliğinin 4 adımlı verim tayini.....	59
3.2.6 AgNP’lerin üretiminin mikrobiyal gelişim düzeyinde optimizasyonu	60
3.2.6.1 Besiyerinin tuz ihtiva edip etmemesinin mikrobiyal gelişim ve AgNP’lerin üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi	61
3.2.6.2 Ön aktiveleştirme süresi ve inokülasyon miktarının belirlenmesi	61
3.2.6.3 Besiyeri pH’sının mikrobiyal gelişim ve AgNP’lerin üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi	62
3.2.6.4 Belirlenen pH’larda kültürsüz boş besiyerlerinin AgNP’leri üretme olasılığının belirlenmesi	62
3.2.6.5 İnkübasyon sıcaklığının mikrobiyal gelişim ve AgNP’lerin üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi.....	63
3.2.7 Termofilik basilin büyüme eğrisinin ve AgNP’lerin 48 saatlik zamana bağlı üretiminin ortaya çıkarılması	63
3.2.8 AgNP’lerin üretiminin süpernatant düzeyinde optimizasyonu.....	64
3.2.8.1 Süpernatant pH’sının AgNP’lerin üretimi üzerine etkisi.....	65
3.2.8.2 AgNO ₃ konsantrasyonunun AgNP’lerin üretimi üzerine etkisi.....	65
3.2.8.3 İnkübasyon sıcaklığının AgNP’lerin üretimi üzerine etkisi	65
3.2.8.4 İnkübasyon süresinin AgNP’lerin üretimi üzerine etkisi	66
3.2.9 Laboratuvar ölçeğinde (lab-scale) AgNP’lerin üretimi	66
3.2.10 Üretilen AgNP’lerin karakterizasyonu	67
3.2.10.1 UV-Vis spektroskopisi	67
3.2.10.2 FT-IR.....	67
3.2.10.3 TEM 68	
3.2.11 Üretilen AgNP’lerin biyolojik özelliklerinin incelenmesi	68
3.2.11.1 Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) yöntemiyle antimikrobiyal aktivite analizleri	69
3.2.11.2 Antibiyofilm aktivite analizleri.....	70
3.2.11.3 Antioksidan aktivite analizleri.....	71
3.2.11.4 Sağlıklı hücre hatlarına karşı sitotoksosite analizleri	72
3.2.11.5 Kanser hücre hatlarına karşı sitotoksosite analizleri.....	73
3.2.12 <i>In vitro</i> yara modeli ve yara kapanma analizi (scratch assay)	73
3.2.13 İstatistiksel analiz	74
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	75
4.1 SGC-R’de Olası Toksisite Genlerinin Varlığının veya Noksanlığının PCR Reaksiyonları Sonuçları ve <i>In Silico</i> Azot Metabolizması Tahmini.....	75
4.2 SGC-R’nin Farklı Koşullarda Mikrobiyal Gelişim Sonuçları	78
4.3 AgNP’lerin Üretiminin Mikrobiyal Gelişim Düzeyinde Optimizasyon Sonuçları	80
4.4 SGC-R’nin Büyüme Eğrisi ve AgNP’lerin 48 Saatlik Zamana Bağlı Üretimi	87
4.5 AgNP’lerin Üretiminin Süpernatant Düzeyinde Optimizasyon Sonuçları.....	90
4.6 Laboratuvar Ölçeğinde (Lab-Scale) AgNP’lerin Üretimi.....	93

4.7 Üretilen AgNP'lerin Karakterizasyonu	97
4.7.1 UV-Vis spektroskopisi	97
4.7.2 FT-IR	97
4.7.3 TEM	98
4.8 Üretilen SGC-R AgNP'lerinin Biyolojik Özellikleri	100
4.8.1 Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) yöntemiyle antimikrobiyal aktivite sonuçları.....	100
4.8.2 Antibiyofilm aktivitesi sonuçları	104
4.8.3 Antioksidan aktivite sonuçları.....	109
4.8.4 Sağlıklı hücre hatlarına karşı sitotoksite sonuçları	110
4.8.5 Kanser hücre hatlarına karşı sitotoksite sonuçları	113
4.9 <i>In Vitro</i> Yara Modeli ve Yara Kapanma Sonuçları (Scratch Assay)	117
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	121
KAYNAKLAR	141
ÖZGEÇMİŞ.....	180

SİMGELER DİZİNİ

°C	: Santigrad Derece
%	: Yüzde
<	: Küçüktür
>	: Büyüktür
µg	: Mikrogram
µM	: Mikromolar
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
Ag	: Gümüş
Ag ⁺	: Monovalent Gümüş İyonu
Ag ⁰	: Elemental Gümüş
AgCl	: Gümüş Klorür
AgNO ₃	: Gümüş Nitrat
Ag ₂ O	: Gümüş Oksit
Ag ₂ S	: Gümüş Sülfür
Au	: Altın
cm ²	: Santimetre kare
Cu	: Bakır
C ₁₀ H ₁₈ O	: Geraniol
dk	: Dakika
g	: Gram
HCl	: Hidroklorik Asit
K ₂ HPO ₄	: Potasyum Fosfat Dibazik
L	: Litre
log	: Logaritma
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
NO ₂ ⁻	: Nitrit
NaCl	: Sodyum Klorür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NaBH ₄	: Sodyum Borohidrit
nm	: Nanometre
v	: Hacim
w	: Ağırlık

Kısaltmalar

AgNP	: Gümüş Nanopartikül
AuNP	: Altın Nanopartikül
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
AFM	: Atomik Kuvvet Mikroskobu
BHI	: Brain Heart Infusion (Beyin Kalp İnfüzyon)
CDC	: Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi

CFE	: Hücre İçermeyen Bakteri Ekstraktı
DMEM-HG	: Dulbecco's Modified Eagle Medium-High Glucose
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DMSOR	: Dimetil Sülfoksit Redüktaz
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DLS	: Dinamik Işık Saçılımı
DSM	: Alman Kültür Koleksiyonu
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
FBS	: Fetal sıgır serumu
FT-IR	: Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi
LB	: Luria-Bertani
kob	: Koloni Oluşturan Birim
LSPR	: Lokalize Yüzey Plazmon Rezonansı
MHA	: Mueller-Hinton Agar
MHB	: Mueller-Hinton Broth
MIK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MTT	: 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür
MDR	: Çoklu İlaça Dirençli
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NAD(P)H	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
Nap	: Periplazmik Nitrat Redüktaz
Nar	: Solunum Zarına Bağlı Nitrat Redüktaz
Nas	: Asimilasyon Sitoplazmik Nitrat Redüktaz
NB	: Nutrient Broth
NP	: Nanopartikül
OD	: Optik Densite (Optik Yoğunluk)
PBS	: Fosfatlı Salin Solüsyonu
pH	: Hidrojen İyonu Konsantrasyonunun Negatif Logaritması
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
rpm	: Dakikadaki Dönüş Sayısı
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SF	: Species
SDB	: Sabouraud Dextrose Broth
SDB	: Sabouraud Dextrose Broth
sp.	: Sabouraud Dextrose Broth
STM	: Taramalı Tünelleme Mikroskobu
subsp.	: Subspecies
TSA	: Tryptic Soy Agar
TSB	: Tryptic Soy Broth
UV-Vis	: Ultraviyole- Görünür Bölge Spektroskopisi XRD X-Işını Difraksiyonu
XPS	: X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi
XRD	: X-Işını Difraktometrisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Çeşitli <i>Bacillus</i> türlerinin kültür süpernatantı kullanılarak çeşitli şekillerde AgNP'lerin biyolojik sentezi	9
Şekil 2.2 Mantar kaynaklı nanopartikül sentezinin hücre içi/hücre dışı şematik mekanizması	18
Şekil 2.3 Hücre içi ve hücre dışı nanopartikül sentezinin şematik gösterimi	23
Şekil 2.4 Bakteriler tarafından NADH bağımlı nitrat redüktaz enzimi aracılığıyla gümüş nanopartiküllerinin üretim mekanizması	32
Şekil 2.5 Gümüş nanopartiküllerin antimikrobiyal aktivite mekanizmasını gösteren diyagram	35
Şekil 2.6 AgNP'lerin rejeneratif tıp uygulamaların	45
Şekil 2.7 Hücrelerin işlevsel bir dokuya dönüşmesi için 3 boyutlu bir yapı sağlayan ideal bir iskelenin şematik gösterimi	47
Şekil 2.8 AgNP içeren ısıya duyarlı hidrojellerin yara iyileştirme uygulamaları için jelleştirilmesi ve yara kapanmasını göstermek için <i>in vitro</i> hücre göçü deneyi	49
Şekil 4.1 Toksin genlerine ait PCR çalışmasının agaroz jel elektroforez görüntüleri	76
Şekil 4.2 <i>SGC-R</i> 'ye ait azot metabolizması yolağı	77
Şekil 4.3 <i>SGC-R</i> 'nin farklı tuz oranı, pH, sıcaklık ve sürelerde OD ₆₆₀ ölçüm sonuçları	79
Şekil 4.4 Farklı kültür parametreleri neticesinde elde edilen AgNP'lerin OD ₃₄₀₋₅₀₀ ölçüm sonuçları ve kuru ağırlıkları.....	81
Şekil 4.5 Kültür içermeyen ve AgNO ₃ ile muamele edilen pH 8.5 değerine sahip TSB besiyerinin UV-Vis spektroskopisinde 350-500 nm arasında tarama sonucu	83
Şekil 4.6 Kültür içermeyen ve AgNO ₃ ile muamele edilen pH 8.5 değerine sahip NB besiyerinin UV-Vis spektroskopisinde 350-500 nm arasında tarama sonucu	84
Şekil 4.7 Farklı kültür parametreleri neticesinde elde edilen AgNP'lerin OD ₃₄₀₋₅₀₀ ölçüm sonuçları ve kuru ağırlıkları.	85
Şekil 4.8 (a) <i>SGC-R</i> 'nin 48 saat boyunca takip edilen mikrobiyal gelişimi ve (b) <i>SGC-R</i> 'nin AgNP'lerinin üretimi.....	89
Şekil 4.9 Denenen farklı süpernatant parametreleri neticesinde elde edilen AgNP'lerin OD ₃₄₀₋₅₀₀ ölçüm sonuçları ve kuru ağırlıkları	92
Şekil 4.10 (a) Sırasıyla 10, 50, 100 ve 500 mL olarak geliştirilen kültür ve (b) 48 saatlik kültürün hücresiz süpernatantından elde edilen <i>SGC-R</i> 'ye ait AgNP'ler	94

Şekil 4.11 (a) 10, 50, 100 ve 500 mL olarak ölçeklendirilmesi yapılan kültürlerin 0. ve 48. saatlerde 660 nm dalga boyunda elde edilen kültür yoğunlukları, (b) kültürlerin 0. ve 48. saatlerde elde edilen koloni sayımları ve (c) kültürlerin hücresiz süpernatantlarından elde edilen AgNP'lerin yaş ve kuru ağırlıkları.....	96
Şekil 4.12 SGC-R'nin AgNP'lerinin UV-Vis spektroskopisinde 340-500 nm arasında gerçekleştirilen tarama sonucu (401 nm'de ölçülen Yüzey Plazmon Rezonans Piki OD: 1.072 ve seyreltme faktörü: 4 (OD: 4.288))	97
Şekil 4.13 SGC-R AgNP'lerinin FT-IR spektrumları	98
Şekil 4.14 SGC-R AgNP'lerinin TEM mikrografı	99
Şekil 4.15 SGC-R AgNP'lerinin partikül boyutlarının histogramı	100
Şekil 4.16 SGC-R AgNP'lerinin (a) <i>C. parasilosis</i> ATCC 22019 ve (b) <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984'e karşı gerçekleştirilen MİK test sonucu.....	103
Şekil 4.17 Farklı koşullar altında (pH 7.5 ve pH 8.0) damla plaka testi ile elde edilen <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853'e karşı SGC-R AgNP'lerinin inhibisyon zonları	103
Şekil 4.18 SGC-R AgNP'lerinin Gram-negatif patojenlerin biyofilm üretimleri üzerine olan etkileri	105
Şekil 4.19 SGC-R AgNP'lerinin Gram-pozitif patojenlerin biyofilm üretimleri üzerine olan etkileri.	107
Şekil 4.20 SGC-R AgNP'lerinin ökaryotik patojenlerin biyofilm üretimleri üzerine olan etkileri	108
Şekil 4.21 SGC-R AgNP'lerinin ve standart gallik asit çözeltisinin antioksidan aktivitesi	109
Şekil 4.22 SGC-R AgNP'lerinin (a) L929, (b) HDF ve (c) HaCaT sağlıklı hücre hatlarına karşı hesaplanan IC ₅₀ (µg/mL) konsantrasyon değerleri.....	111
Şekil 4.23 HDF hücre hatlarına karşı (a) 28-48 nm, (b) 48-78 nm, (c) 100 nm boyutlarındaki ticari kimyasal nanopartiküllerin, (d) AgNO ₃ ve HaCaT hücre hatlarına karşı (e) 28-48 nm, (f) 48-78 nm, (g) 100 nm boyutlarındaki ticari kimyasal nanopartiküllerin, (h) AgNO ₃ uygulaması sonucu hesaplanan IC ₅₀ (µg/mL) konsantrasyon değerleri	112
Şekil 4.24 SGC-R AgNP'lerinin (a) MCF7, (b) HT-29 ve (c) A549 kanser hücre hatlarına karşı hesaplanan IC ₅₀ (µg/mL) konsantrasyon değerleri ve 5-FU kemoterapi ilacının (d) MCF7, (e) HT-29 ve (f) A549 kanser hücre hatlarına karşı hesaplanan IC ₅₀ (µg/mL) konsantrasyon değerleri	114
Şekil 4.25 SGC-R AgNP'lerinin 78,125 µg/mL konsantrasyonunun 48 saat boyunca MCF7 hücre hattı üzerindeki etkisi.....	115
Şekil 4.26 SGC-R AgNP'lerinin 78,125 µg/mL konsantrasyonunun 48 saat boyunca HT-29 hücre hattı üzerindeki etkisi	116

Şekil 4.27 SGC-R AgNP’lerinin uygulandığı <i>in vitro</i> yara modelindeki HDF hücrelerinin göçü	118
Şekil 4.28 SGC-R AgNP’lerinin uygulandığı <i>in vitro</i> yara modelindeki HaCaT hücrelerinin göçü	119
Şekil 4.29 HDF hücrelerinde oluşturulan yara bölgesinin test edilen grup ve saatlerdeki kapanma miktarları.....	120
Şekil 4.30 HaCaT hücrelerinde oluşturulan yara bölgesinin test edilen grup ve saatlerdeki kapanma miktarları.....	120



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 AgNP'lerin sentezini gerçekleştiren çeşitli bakteriler	26
Çizelge 3.1 Triptik Soy Agar besiyeri içeriği	52
Çizelge 3.2 Triptik Soy Broth besiyeri içeriği	52
Çizelge 3.3 Nutrient Broth besiyeri içeriği	52
Çizelge 3.4 Mueller-Hinton Agar besiyeri içeriği.....	52
Çizelge 3.5 Mueller-Hinton Broth besiyeri içeriği	53
Çizelge 3.6 Luria-Bertani Broth besiyeri içeriği.....	53
Çizelge 3.7 Brain Heart Infusion Broth besiyeri içeriği	53
Çizelge 3.8 Sabouraud Dextrose Broth besiyeri içeriği	53
Çizelge 3.9 DNA saflaştırma ve PCR bileşenleri	54
Çizelge 3.10 Agaroz jel içeriği	54
Çizelge 3.11 100 mM AgNO ₃ çözeltisi içeriği	54
Çizelge 3.12 Serum fizyolojik çözeltisi içeriği	54
Çizelge 3.13 1 N NaOH çözeltisi içeriği.....	54
Çizelge 3.14 1 N HCl çözeltisi içeriği	54
Çizelge 3.15 Kristal viyole çözeltisi içeriği	55
Çizelge 3.16 Metanol çözeltisi içeriği.....	55
Çizelge 3.17 Etanol:Aseton çözeltisi içeriği	55
Çizelge 3.18 %70'lik etanol çözeltisi içeriği	55
Çizelge 3.19 0.1 mM 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) çözeltisi içeriği	55
Çizelge 3.20 Hücre kültürü bileşenleri.....	55
Çizelge 3.21 Toksisite genlerine spesifik primerler.....	57
Çizelge 3.22 Patojenlerin biyofilm üretiminde kullanılan koşullar	71
Çizelge 4.1 SGC-R'nin besiyeri tuz miktarı, ön aktifleştirme süresi ve inokülasyon miktarı koşullarının optimizasyonu sonucu mikrobiyal gelişimi ve elde edilen AgNP'lerin bu patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite taraması .	82
Çizelge 4.2 SGC-R'nin besiyeri pH'sı, AgNP'lerin üretiminde kullanılacak besiyeri içeriği ve inkübasyon sıcaklığı koşullarının optimizasyonu sonucu mikrobiyal gelişimi ve elde edilen AgNP'lerin bu patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite taraması	86
Çizelge 4.3 SGC-R'den elde edilen süpernatant koşullarının optimizasyonu sonucu elde edilen AgNP'lerin belirlenen patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite taraması.....	93

Çizelge 4.4 Gram-negatif, Gram-pozitif ve ökaryotik mikroorganizmalardan oluşan 16 farklı patojene karşı gerçekleştirilen antimikrobiyal aktivite taraması sonucu elde edilen minimum inhibisyon konsantrasyonları 102

Çizelge 5.1 Gümüş nanopartikül sentezi gerçekleştiren termofilik bakteriler..... 130



1. GİRİŞ

“Nano” terimi, Yunanca “nanos” (cüce, küçük) sözcüğünden türemiş olup, metrenin milyarda birine (10^{-9} m) karşılık gelmektedir. Nanopartiküller genel olarak 1-100 nm aralığındaki boyutlarda tanımlanır, fakat bazı literatürlerde birkaç yüz nanometreye kadar uzanan sınırlar da kabul edilebilir (Gong vd. 2007, Makvandi vd. 2020). Nanopartiküller, sahip oldukları bu küçük boyutlar sayesinde makroskobik hallerine kıyasla farklı fizikokimyasal özellikler sergilerler; özellikle yüzey alanı/hacim oranının artması, optik, elektriksel, manyetik, katalitik ve biyolojik davranışlarında belirgin değişimlere yol açar. Nano boyutlu metalik parçacıklar, makroskobik örneklerden farklı davranabilir; çünkü yüzey alanı/hacim oranı çok yüksektir, bu da yüzey reaktivitesini artırır. Bu sayede, parçacık yüzeyine adsorbe olan kimyasal türler daha belirgin hale gelir, yüzey elektron yapısı ve termodinamik özellikler değişebilir. Bu avantaj, özellikle biyolojik sistemlerde etkinlik kazandırabilir (Nowack vd. 2011, Kumar vd. 2018).

Nanoteknoloji; malzeme bilimi, kimya, fizik, biyoloji ve mühendislik gibi pek çok disiplinin kesişim noktasında yer almakta ve özellikle tıp, biyoteknoloji, enerji, çevre, elektronik ve sensör uygulamalarında kritik rol oynamaktadır. Yenilikçi tıbbi teşhis sistemleri, yeni nesil ilaç dağıtım sistemleri, kaplamalar, yara iyileştirme materyalleri ve biyosensörler gibi birçok uygulamada kullanılabilen biyouyumlu nanomalzemelerin sentezi ve tasarımı nanoteknoloji uygulamaları arasında öne çıkmaktadır (Ghasemzadeh vd. 2014, Adeyemi ve Sulaiman 2015).

Gümüş, yüksek ısı ve elektrik iletkenliğine sahip, yumuşak ve parlak bir metaldir. Sahip olduğu özellikleri nedeniyle tarih boyunca tıbbi uygulamalarda kullanılmıştır (Firdhouse ve Lalitha 2015, Konop vd. 2016). Ancak makroskobik gümüş mikroorganizmalara karşı zaman zaman güçlü etki gösteremeyebilirken, nano boyutlu gümüşün benzersiz fiziksel ve kimyasal özellikler gösterdiği ve bu özelliklerin topikal klinik uygulamalarda makro ölçekli formundan çok daha etkili olduğu belirlenmiştir (Nowack vd. 2011). Bunun başlıca nedeni, gümüş nanopartiküllerin yüzey alanı/hacim oranları sayesinde hedef mikroorganizmaların daha geniş yüzey alanlarına maruz kalmasıdır (Kumar vd. 2018). Gümüş nanopartiküller (AgNP’ler) için literatürde kolloidal gümüş, nanogümüş, gümüş

nanoyapılar gibi çeşitli terminolojiler de kullanılmaktadır (Makvandi vd. 2020). Gümüş nanopartiküller, biyomedikal, sağlık, gıda, sensör, kaplama, tekstil, yara örtüsü, optik ve katalitik gibi birçok alanda kullanım potansiyeli taşımaktadırlar (Mukherjee vd. 2001, Li vd. 2010, Chernousova ve Epple 2013, Li vd. 2014). Örneğin, gümüş nanopartiküller tekstil ürünlerinin antibakteriyel kaplamalarında, tıbbi cihaz kaplamalarında, yara örtülerinde, ilaç salım taşıyıcılarında, sensör ve biyoalgılama platformlarında yaygın şekilde araştırılmaktadırlar (Sondi ve Salopek-Sondi 2004, Li vd. 2010, Chernousova ve Epple 2013). Bir başka örnek olarak da gümüş nanopartiküller membran kaplamaları ve su filtrelerinde olmak üzere su arıtımı, su dezenfeksiyonu ve çevresel uygulamalarda da kullanılmaktadırlar (Zhang vd. 2016).

Gümüş nanopartiküllerin en iyi bilinen biyolojik aktiviteleri, bakteriler üzerinde farklı etki mekanizmalarıyla gösterdikleri antimikrobiyal etkilerdir (Kumar vd. 2018). Literatürde öne çıkan başlıca etki mekanizmaları arasında; nanopartiküllerden kontrollü biçimde salgılanan monovalent gümüş iyonlarının (Ag^+) hücre içi protein, enzim ve DNA gibi yapılara bağlanıp fonksiyonlarını bozarak toksik etki göstermesi, AgNP'lerin reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini indüklemesi ve bunun da lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarı gibi hücre içi hasar yollarına yol açması, AgNP'lerin hücre duvarı ya da zar bileşenlerine bağlanarak yapısal bütünlüğü bozması ve/veya zar geçirgenliğini değiştirmesi ve bunun sonucunda hücre içeriğinin dışarı sızması bilinmektedir. Ayrıca AgNP'ler, bakterilerin yüzeye tutunmasını, koloni oluşturmalarını ve biyofilm geliştirmesini engelleyerek dirençli mikroorganizmalara karşı etkinlik sağlaması ve AgNP'ler veya Ag^+ iyonlarının DNA sarmalı ile etkileşerek replikasyon/transkripsiyon süreçlerini bozması ve aynı zamanda enzim aktivitelerini inhibe etmesi gibi mekanizmalar yer almaktadır (Siddiqi vd. 2018). Bu mekanizmalar birbirleriyle sinerjik etki gösterebilirler. Boyut, şekil, kaplama ajanı ve yüzey yükü gibi partikül özellikleri bu etki mekanizmalarının verimliliğini doğrudan etkilemektedir. Daha küçük boyutlu nanopartiküller daha yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahip olduğundan, genellikle daha güçlü biyolojik etki gösterirler (Khan vd. 2018, Siddiqi vd. 2018).

AgNP'lerin sentezi için farklı yöntemler mevcuttur. Bunlar; lazer ablasyonu, ultrasonik parçalama ve püskürtme gibi fiziksel sentez yöntemleri, sodyum borhidrür ($NaBH_4$) veya

sitrat benzeri indirgeme ajanlarının kullanıldığı kimyasal indirgeme ve fotokimyasal yöntemler gibi kimyasal sentez yöntemleri, mikroorganizmalar, bitki özütleri veya diğer biyomoleküller aracılığıyla biyolojik (yeşil) sentez yöntemleri olmak üzere üç ana yaklaşımda sınıflandırılmaktadırlar (Singh vd. 2018, Wang vd. 2020). Fiziksel ve kimyasal sentez yöntemleri kontrollü üretim sağlamakla beraber, genellikle yüksek enerji gereksinimi, pahalı ekipman ve toksik kimyasal ajanlara bağımlı olma gibi dezavantajları vardır. Bu dezavantajlar biyoyuumluluk, çevresel etki ve maliyet açılarından önemli sorunlar doğurabilmektedir. Bu nedenle, biyolojik sentez yöntemleri giderek daha fazla tercih edilir duruma gelmiştir. Bu yaklaşımlar çoğunlukla daha çevre dostu, daha düşük toksisite riski taşıyan ve daha düşük maliyetli seçenekler sunar. Biyolojik sentez yöntemlerinde kullanılan organizmalar ya da biyomoleküller, hem indirgeme (redüksiyon) hem de capping/stabilizasyon rolü üstlenebilirler ve agregasyonu önleyerek daha fazla stabilizasyon sağlarlar (Singh vd. 2018, Ramesh vd. 2015, Singh vd. 2015, Wang vd. 2020). Gümüş nanopartiküllerin biyosentezi, bitki, mantar ve bakteri gibi çeşitli biyolojik sistemlerde incelenmiş olup, genellikle Ag^+ iyonlarına karşı geliştirilen toksisiteye karşı direnç mekanizmalarıyla tanımlanmaktadır (Barros vd. 2018, Zhao vd. 2018). Ancak bitki ve mantar temelli yöntemler çoğunlukla *in vitro* uygulamalarda yaygınken, bakteriyel üretimin biyoteknolojik açıdan çeşitli avantajlar sağlar; bakteriler hızlı büyür, kontrollü kültür ortamlarında üretilebilir ve biyomoleküler yollarla nanopartikül kontrolü sağlama potansiyeli sunar (Pantidos 2014, Bao ve Lan 2019, Dhandapani vd. 2020). Bakteriler tarafından nanopartikül sentezi, gümüş iyonlarının indirgendiği yere bağlı olarak hücre içi (intraselüler) veya hücre dışı (ekstraselüler) gerçekleşmektedir (Javaid vd. 2018). Hücre içi gerçekleştirilen üretim, üretilen partiküllerin hücre dışı ortama salınması için ilave mekanik ve kimyasal işlemler gerektirmektedir. Bu da hücre içi üretimi, hücre dışı üretim sürecine göre daha çok aşamalı ve uzun süreli hale getirmektedir (Das vd. 2014).

Fazladan aşama gerektirmemesi sebebiyle kısa sürmesi ve daha ucuz olması bakımından avantajlı olan ekstraselüler AgNP'lerin sentezini gerçekleştirebilen türleri barındıran bir bakteri grubu da termofilik basillerdir. Olumsuz koşullarda spor oluşturabilen bu bakterilerin ideal gelişme sıcaklıkları 50 ila 65°C arasında değişmektedir. Yüksek sıcaklıklarda üreyebilme yetenekleri sahip oldukları termal olarak kararlı enzimler ve

çeşitli makromoleküller sayesinde. Termofilik süreçler kararlı, hızlı ve maliyeti düşük, reaktant aktivitesini ve ürün eldesini kolay kılan süreçlerdir. Bu mikroorganizmalar, temel hücre dışı polisakkaritler, amilaz, selüloz, ksilanaz ve proteaz gibi ekzoenzimler ve kanser araştırmalarında kullanılan proteinler içerir. Bu özelliklerine insan başta olmak üzere yüksek yapılı canlıların vücudunda yaşayamamaları ve patojen olmamaları da eklendiğinde, bu hususlar onları endüstriyel ve biyoteknolojik kullanım açısından avantajlı hale getirmektedir (Zeikus 1979, Mormile vd. 2003, Jahan vd. 2024).

Nanopartiküllerin sahip olduğu fizikokimyasal özellikler sergileyecekleri davranışları, biyodağılımlarını, güvenilirliklerini ve etkinliklerini belirlemektedir. Bu nedenle sentezi gerçekleştirilen AgNP'lerin karakterizasyonu, fonksiyonel yönlerini ve potansiyel kullanım alanlarını belirleyebilmek için oldukça elzemdir. Nanopartikül karakterizasyonu, UV-Vis spektroskopisi, X-ışını difraktometrisi (XRD), dinamik ışık saçılımı (DLS), Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR), X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS), geçirimli elektron mikroskobu (SEM), transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) gibi çok çeşitli analitik teknikler ile gerçekleştirilmektedir (Zhang vd. 2016).

Yara; fiziksel, kimyasal veya cerrahi nedenlere bağlı olarak doku devamlılığının bozulması, dokuların kesintiye uğraması veya tahrip olması olarak tanımlanmaktadır (Chaudhari vd. 2016, Gonzalez vd. 2016). Yara iyileşmesi deri ve deri altındaki dokularda meydana gelen, sırasıyla hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden yapılanma aşamalarından oluşan karmaşık ama iyi bir organizasyon gerektiren biyolojik bir süreçtir. Yaralar başlıca akut veya kronik olmak üzere iki kategoride sınıflandırılır. Akut yaralar, bahsi geçen bu yara iyileşme süreçlerini takip ederek 1-12 hafta içinde iyileşen yaralardır. Kronik yaralar ise yaşlılık, obezite, çeşitli damar hastalıkları ve immün yetmezlik gibi patolojik sebeplerden dolayı, yara iyileşme basamaklarının sekteye uğradığı ve iyileşmenin tam olarak gerçekleşmediği yaralardır. Kronik yaralar enfeksiyona karşı daha duyarlıdır, pıhtı oluşumu gözlenmezken, aşırı inflamasyon gelişir ve zamanla bakteriyel kaynaklı biyofilm oluşumu görülmektedir (van Neck 2012, Langer vd. 2015, Shah vd. 2019). Gümüş ve bileşikleri antik çağlardan beri antibakteriyel ve terapötik uygulamalar için yaygın olarak kullanılmıştır. Hipokrat, ülserleri tedavi etmek ve yara

iyileşmesini desteklemek amacıyla gümüş preparatlar kullanırken, gümüş nitrat (AgNO_3) yara bakımı ve alet dezenfeksiyonu için kullanılmıştır. Doğumdan kaynaklanan vezikovajinal fistüllerin ince gümüş tellerle dikilmesinin enfeksiyonu büyük ölçüde azalttığı görülmüştür. 19'uncu yüzyılın başlarında, yara enfeksiyonu ve yanık tedavisi için gümüş preparatlar geliştirilmiştir. Son yıllarda, antibiyotiklerin yanlış ve gereksiz kullanımına bağlı gelişen bakteriyel direnç, dünya çapında global bir sorun haline gelmiştir ve nanoteknolojinin gelişmesiyle birlikte gümüş ve nanogümüşe olan ilgi ve ihtiyaç giderek artmaktadır (Alexander 2009, Khan vd. 2018, Kumar vd. 2018).

Yukarıda özetlenen bilgilerin ışığında, tez çalışması dahilinde;

- AgNP'lerin üretim kabiliyeti bakımından taranmış yüksek sıcaklıklarda gelişebilen ve sporlu termofilik bir basilden doğal yollarla AgNP'lerin üretiminin gerçekleştirilmesi,
- Termofilik basilin mikrobiyal gelişiminin ve fonksiyonel AgNP'lerin üretiminin optimize edilmesi,
- Sentezlenen AgNP'lerin potansiyel kullanım alanlarını ve kullanım şeklini aydınlatabilmek adına karakterizasyonunun yapılması,
- Karakterize edilen AgNP'lerin antimikrobiyal, antibiyofilm, antioksidan ve sitotoksik etki gibi biyolojik aktivitelerinin aydınlatılması,
- Son olarak *in vitro* yara modeli oluşturularak elde edilen AgNP'lerin hücre göçü ve yara iyileşmesi üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Literatürde, özellikle termofilik *Anoxybacteroides* cinsinden biyolojik sentez yöntemiyle gümüş nanopartikül elde edilmesine yönelik oldukça kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Mevcut çalışmalar çoğunlukla *Geobacillus* cinsi üyelerine odaklanmıştır. Tez kapsamında çalışılan termofilik *SGC-R* ilk kez bu çalışma ile literatüre kazandırılacaktır. Ayrıca bu tez çalışmaları *SGC-R*'nin nanopartikül üretim potansiyelini doğrudan etkileyen faktörlerin detaylı bir optimizasyonunu ele almamaktadır. Ek olarak termofilik bakteriler aracılığıyla sentezlenen AgNP'lerin çoğunlukla antimikrobiyal aktiviteleri çalışılmış olmakla birlikte, antibiyofilm aktiviteleri, antioksidan aktiviteleri, sağlıklı ve kanser hücre hatlarına karşı sergiledikleri sitotoksik etkileri detaylı araştırılmamıştır. *In*

vitro yara modeli oluşturularak gümüş nanopartikül içeren proliferasyon ortamlarının, yara iyileşmesinde büyük önem arz eden hücre göçüne etkisinin incelenmesi ise termofilik bakteri kaynaklı sentezlenen gümüş nanopartiküller için ilk kez bu tez çalışması ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma bu açılarından bu konudaki literatür eksiğini kapatmasının yanı sıra beraberinde yeni ve özgün çalışma konularına da öncülük etme potansiyeli oluşturmaktadır.



2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Nanoteknoloji ve Nanopartiküller

Nanoteknoloji temel olarak nano boyutta materyallerin üretilmesi ve bu materyallerin yeni özellikler kazandırılmış malzeme, cihaz veya sistemlerin geliştirilmesi uygulamalarında kullanılmasını konu alan disiplinler arası bir bilim dalıdır. Nano ölçekte malzemelerin optik, mekanik, elektriksel ve kimyasal özelliklerinde gözle görülür farklılıklar ortaya çıkmaktadır (Sharma ve Kumar 2021, Joudeh ve Linke 2022). Nanoteknoloji kavramı ilk olarak 1974 yılında Profesör Norio Taniguchi tarafından oluşturulmuştur (Goutam vd. 2020). 1980'li yıllarda taramalı tünelleme mikroskobu (STM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) gibi gelişmiş görüntüleme tekniklerinin keşfiyle birlikte nano boyuttaki yapılar doğrudan gözlemlenebilmiş ve manipüle edilebilir hale gelmiştir. Günümüzde nanoteknoloji; fizik, kimya, biyoloji, tıp, mühendislik ve malzeme bilimi gibi farklı disiplinlerin kesişim noktasında yer alarak, hem temel araştırmalarda hem de uygulamalı alanlarda geniş bir kullanım alanına sahiptir (Altammar 2023). Nanoteknoloji tıp ve biyolojik bilimlerde çoğunlukla; tıbbi teşhis, biyoalgılama, sağlık bakımı, ilaç dağıtımı, çeşitli kaplamalar, tıbbi cihazlar, yara iyileşmesi dahil olmak üzere çok çeşitli potansiyel uygulamalara sahip, biyouyumlu nanomateryallerin sentezini içermektedir (Ghasemzadeh vd. 2014, Adeyemi ve Sulaiman 2015).

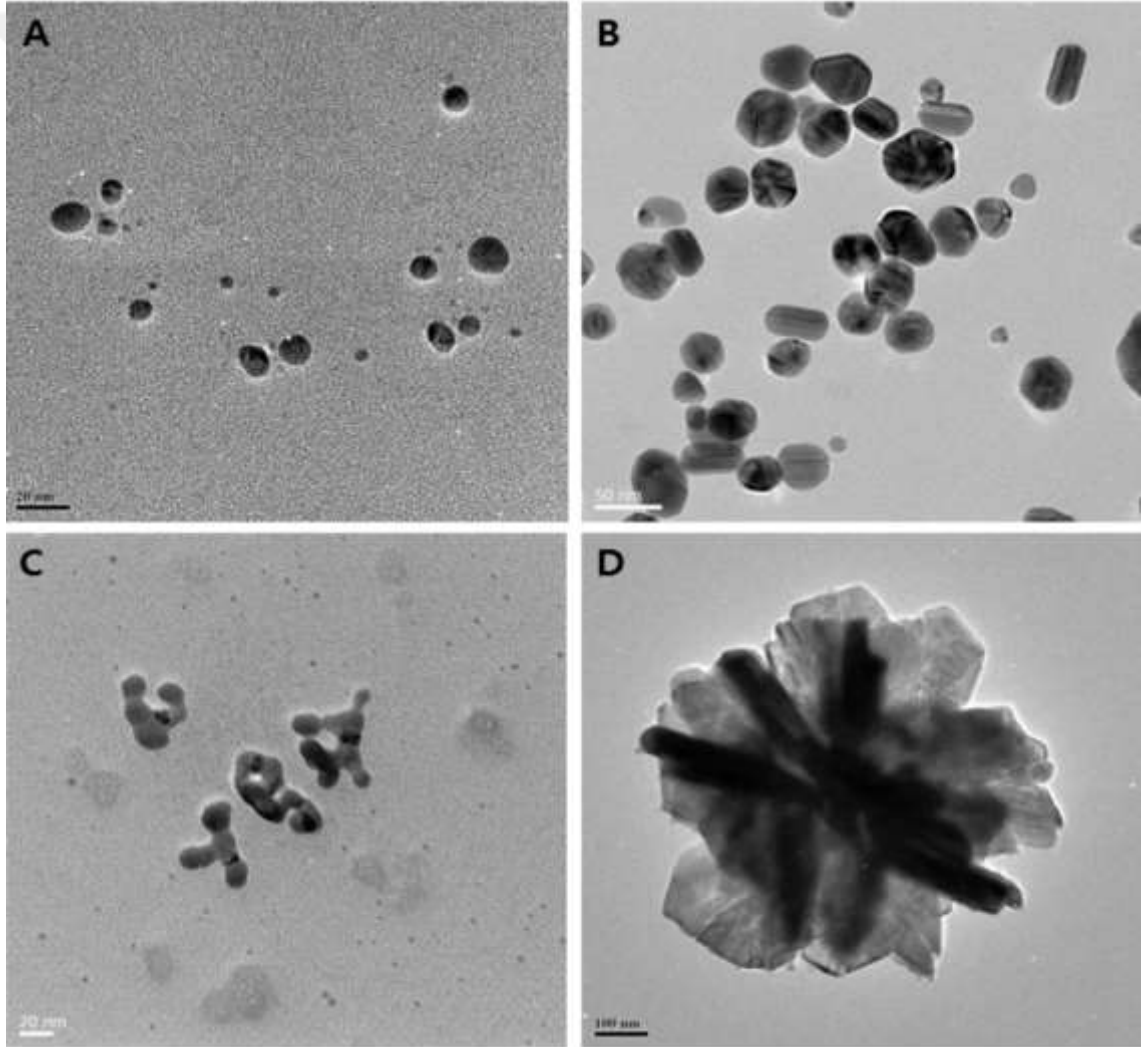
Nanoteknolojinin en temel unsurları nanopartiküllerdir. Nanopartiküller, genellikle 1-100 nm aralığında değişen boyutlardaki parçacıkları içeren malzemeler olarak tanımlanmaktadır (Khan vd. 2022). Nanopartiküller, küçük boyutları sayesinde yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahiptirler ve bu durum, reaktivite, çözünürlük, optik soğurma ve manyetik özellikler gibi birçok fizikokimyasal özelliğe sahip olmalarını sağlamaktadır (Sharma ve Kumar 2021, Yusuf vd. 2023). Nanopartiküllerin en temel özellikleri; nano ölçekte elektron hareketlerinin kısıtlanması sonucu ortaya çıkan kuantum boyut etkileri, artan yüzey alanı neticesinde partiküllerin yüzey enerjisinin yükselmesi sonucu artan kimyasal reaktivite, yüksek mekanik dayanım ve optik davranış olarak özgün renk/ışık saçılımı sergileme olarak özetlenebilmektedir. Bu özellikler sayesinde nanopartiküllerin

biyomedikal uygulamalardan enerji depolama sistemlerine kadar çok geniş bir yelpazede kullanım alanı bulunmaktadır (Sharma ve Kumar 2021, Joudeh ve Linke 2022). Nanopartiküller; karbon temelli nanopartiküller, metal nanopartiküller, polimerik nanopartiküller, yarı iletken nanopartiküller, lipit temelli nanopartiküller ve seramik nanopartiküller gibi farklı materyal yapılarında, küresel, spiral, üçgen ve silindirik gibi farklı şekillerde ve farklı büyüklüklerde olabilirler. Aynı zamanda dağınık veya aglomerat denilen yığınlar halinde bulunabilirler (Joudeh ve Linke 2022, Altammar 2023). Karbon temelli nanopartiküller; yalnızca karbon atomundan meydana gelmiş nanopartiküllerdir. En bilinen örnekleri fullerenerler, karbon siyahı nanopartiküller ve karbon kuantum noktalarıdır. Elektrik iletkenliği, elektron afinitesi yüksek absorpsiyon, optik ve termal özellikleri sayesinde ilaç taşınımı ve biyogörüntüleme gibi alanlarda uygulamaları vardır (Joudeh ve Linke 2022). Metal nanopartiküller; yalnızca metalden meydana gelen nanopartiküllerdir, sahip oldukları lokalize yüzey plazmon rezonansı (localized surface plasmon resonance, LSPR) sayesinde belirgin elektriksel özellikleri bulunmaktadır. Gümüş (Ag), altın (Au) ve bakır (Cu) nanopartiküller gibi en belirgin örnekleri, görünür ışık elektromanyetik spektrumunda geniş absorpsiyon bandı gösterirler (Khan vd. 2020, Altammar 2023). Polimerik nanopartiküller; genellikle organik yapıda olup, polimerik çekirdeğe adsorbe edilen veya polimerik gövdenin içine hapsedilen aktif maddelere de sahip olabilirler. Yarı iletken nanopartiküller; hem metal hem de metal olmayan nanopartiküllerle benzer özellikler taşır. Biyogörüntüleme ve kanser terapisinde kullanılabilirler (Altammar 2023). Lipit temelli nanopartiküller; katı lipit çekirdeği ve çözünebilir lipofilik moleküller içeren bir matrikse sahiptir. Lipit kısımlar içerirler ve bu yüzden biyolojik uygulamaları yaygındır (Khan vd. 2020, Altammar 2023). Son olarak seramik nanopartiküller; özel bir yolla ısı işlem görüp soğutulmuş inorganik ve metal olmayan küçük partiküllerdir. Polikristal, porlu, çukur gibi şekillerde olabilecekleri gibi şekilsiz de olabilirler. Çoğunlukla kaplama ve batarya yapımı gibi çeşitli uygulama alanları bulunur (Altammar 2023).

2.2 Gümüş Nanopartiküllerin Morfolojik Çeşitliliği

Nanopartiküllerin morfolojisi, sentez yöntemi ve reaksiyon koşullarına bağlı olarak önemli ölçüde değişebilmektedir. AgNP'lerin şekil ve boyut gibi morfolojik farklılıkları,

materyallerin optik özellikleri, antibakteriyel etkinlik ve katalitik performans gibi fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri üzerinde belirleyici rol oynaması nedeniyle nanoteknoloji alanında yoğun şekilde araştırılmaktadır (El-Seedi vd. 2019). Morfolojik çeşitlilik, AgNP'lerin kritik özelliklerini doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle, uygulamaya yönelik nanomalzeme tasarımında şekil ve yüzey özelliklerinin optimize edilmesi, verimliliği artırmak açısından büyük önem taşımaktadır. Farklı morfolojilere sahip AgNP'lerin fonksiyonel performansları literatürde karşılaştırılarak, belirli uygulamalar için ideal nanopartiküllerin seçimi yapılmaktadır (Zhang vd. 2016). AgNP'lerin sergilediği farklı morfolojiler Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1 Çeşitli *Bacillus* türlerinin kültür süpernatantı kullanılarak çeşitli şekillerde AgNP'lerin biyolojik sentezi. (A) Küresel, (B) karışık popülasyonlar (sekizgen, çubuk, altıgen ve ikosaedral), (C) yüksek oranda dallanmış ve (D) çiçek benzeri şekil (Zhang vd. 2016)

Küresel nanopartiküller, simetrik yapıları ve homojen yüzeyleri sayesinde en yaygın araştırılan formdur. Bu yapıların simetrik yüzey geometrisi, özellikle antibakteriyel uygulamalarda yüksek yüzey etkileşim alanı sağlamak ve reaktif türlerin hücre duvarıyla temasını artırmaktadır (Narayanan ve Sakthivel 2011). Öte yandan, kübik ve üçgen plaka gibi morfolojiler, yüzey köşe ve kenarlarının fazla olması nedeniyle elektron yoğunluğunun arttığı bölgelere sahiptir. Bu durum, bu nanopartiküllerin katalitik aktivitelerinde ve optik özelliklerinde önemli iyileşmeler sağlamaktadır. Köşe ve kenar bölgelerinin artmış elektron yoğunluğu, adsorpsiyon ve reaktiviteyi yükseltmekte, yüzey topografileri çok yönlü etkileşim yüzeyleri sunmaktadır. Özellikle üçgen plaka nanopartiküller, yüzey köşeleri ve düz yüzey alanları sayesinde belirgin bir yüzey enerjisi farklılığı taşımaktadır. Bu özellikler yüzey plazmon rezonanslarını (SPR) belirli dalga boylarına yoğunlaştırarak daha keskin ve ayarlanabilir sinyaller vermesini sağlamakta, bu da biyosensör uygulamalarında ve optoelektronik cihazlarda avantaj yaratmaktadır (Zhang vd. 2016). Nanowire (nanotel) ve çubuk biçimindeki AgNP'ler ise elektron iletimi ve geniş yüzey alanı özellikleri sayesinde fotonik ve elektronik uygulamalarda tercih avantajlıdır. Bu morfolojiler, çoklu plazmon rezonans modları sayesinde optik spektrumda geniş bir dalga boyu aralığında etkinlik gösterirler. Böylece özellikle sensör teknolojilerinde spektral uygulamalarda ayarlanabilirlik sağlarlar (El-Seedi vd. 2019). Hiyerarşik ve dendritik morfolojiler, daha büyük mimari düzenlemeler içinde alt birimlerin birleşmesiyle oluşmaktadır ve dallanmış yapıları sayesinde genellikle artan yüzey alanı ile karakterizedir. Bu da AgNP'lerin özellikle çevresel kataliz ve su arıtımı gibi alanlarda yüksek etkinlik göstermelerine olanak vermektedir. Bu morfolojiler, reaktif moleküllerin erişimini artırarak katalitik reaksiyon hızlarını optimize eder (Narayanan ve Sakthivel 2011).

2.3 Gümüş Nanopartikül Sentezi

Genel olarak nanopartiküllerin sentezinde kimyasal, fiziksel ve biyolojik (yeşil) yöntemler olarak üç ana yaklaşım kullanılmaktadır. Farklı sentez yöntemleri sonucunda farklı büyüklük ve şekillerde nanopartiküller elde edilebilmektedir. Fiziksel yöntemler çoğunlukla gümüş metalinin yığın (bulk) formunun özel metodolojiler ile nano ölçeğe indirilmesini ifade eden “top-down (tümünden gelim veya yukarıdan aşağıya)” yaklaşımını

(Uthaman vd. 2021), kimyasal ve biyolojik yöntemler ise atomdan başlanarak nano ölçek partiküle geçilen “bottom-up (tüme varım veya aşağıdan yukarıya)” yaklaşımını (Rani vd. 2024) temel almaktadır (Kaabipour ve Hemmati 2021, Tarannum vd. 2019, Jayaprakash vd. 2019). Tüme varım yaklaşımında çözücü madde, indirgeyici ajan ve ihtiyaç duyulursa aglomerasyonu önlemek amacıyla polimer veya protein esaslı stabilizasyon ajanları kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan kapsamlı çalışmalar çözücü tipi (iyon öncülü), indirgeme ajanı, stabilizasyon ajanı ve çeşitli sentez koşullarının nanopartikül özelliklerini belirleyen temel faktörler olduğunu vurgulamaktadır (Uthaman vd. 2021, Patel vd. 2023, Abdelmoneim vd. 2025). AgNO_3 gibi gümüş tuzları en yaygın kullanılan çözücü tipleridir. Çözücü ortamının dielektrik sabiti, iyon hareketliliğini ve dolayısıyla çekirdekleşme kinetiğini etkilemektedir (Abdelmoneim vd. 2025). Kimyasal yöntemlerde kullanılan NaBH_4 veya sitrat gibi güçlü indirgeme ajanları çekirdekleşme hızını artırarak daha küçük partiküller elde edilmesini sağlamaktadır (Tarannum vd. 2019). Yüksek pH ve sıcaklık, indirgeme kinetiğini hızlandırarak partikül büyümesini etkilemektedir. Sentezin düşük sıcaklıkta gerçekleşmesi genellikle daha küçük partiküller oluşmasını sağlamaktadır (Lithi vd. 2025).

AgNP’lerin fiziksel ve kimyasal yollarla sentezinin pekçok dezavantajı bulunmaktadır. Literatürlerde yer alan birçok rapor, nanopartiküllerin kimyasal ve fiziksel yaklaşımlarla sentezlenmesinin yüksek maliyetli olduğunu, enerji ve zaman kaybına yol açtığını, sıcaklık ve vakum gibi zorlu koşullar gerektirdiğini, sağlığa zararlı ve çevre için tehdit edici olduğunu yani çevre dostu olmadıklarını göstermektedir (Li vd. 2011, Borase vd. 2014, Iravani vd. 2014). Fiziksel sentezde büyük tüp fırının sıcaklığını ve basıncını yükseltmek aşırı enerji tüketimine yol açmaktadır. Sistemin, nanopartikül sentezi öncesi termal kararlılığa ulaşması ve bunu süreç boyunca koruması yüksek güç kaynağı gerektirmekte ve uzun zaman almaktadır. AgNP’lerin kimyasal sentezinde kimyasalların hem indirgeyici hem de kapatıcı ajanlar olarak yoğun kullanımı, sentezlenen AgNP’lerin kimyasal kontaminasyonu sonuçlanmaktadır (Ramanathan ve Gopinath 2017). Son yıllarda sürdürülebilirlik ve toksisite konularına verilen önemle birlikte toksik kimyasallar gerektirmeyen, ekonomik ve çevre dostu proseslerin geliştirilmesine yönelik ihtiyaç giderek artmaktadır (Iravani vd. 2014, Lithi vd. 2025, Rani vd. 2024). Kimyasal ve fiziksel yöntemlerin dezavantajlarının üstesinden gelmek için biyolojik sentez

yöntemleri geliştirilmiştir. Farklı türlerdeki nanopartiküllerin biyolojik sentezi, bitkiler, bakteriler, mantarlar, mayalar ve algler gibi biyolojik sistemlerde meydana gelen doğal süreçleri içermektedir (Zhang vd. 2016, Khan vd. 2018). AgNP'lerin biyosentezi, mikroorganizmalar, bitkiler ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerler gibi doğal indirgeyici maddeler kullanılarak gümüş iyonunun indirgenmesi olarak ifade edilmektedir. Biyosentezde, sentezlenen biyo bazlı indirgeme ve kapatma maddelerinin kullanımı, organik çözücülerin ve kimyasal reaktiflerin dahil edilmesini engeller (Ramanathan ve Gopinath 2017). Ayrıca birçok araştırma, yeşil sentezde kullanılan indirgeme ve kaplama ajanlarının türü, pH, sıcaklık gibi parametrelerin nanopartikül boyutu ve morfolojisi üzerinde önemli etkiler yarattığını göstermektedir. Bu nedenle parametre optimizasyonu, istenilen boyut ve morfolojinin elde edilmesinde temel bir gerekliliktir (Tarannum vd. 2019, Kaabipour ve Hemmati 2021).

2.3.1 Gümüş nanopartiküllerin fiziksel sentezi

Fiziksel sentez yöntemlerinin, tehlikeli ve toksik kimyasal çözücüler içermemeleri ve nanopartiküllerin dağılımının homojenliği gibi avantajları bulunmaktadır. Ancak fiziksel yöntemlerin çeşitli dezavantajları da vardır. Üretimin düşük verimli olması, termal kararlılık için uzun süre gerekliliği ve yüksek enerji tüketimi bu sentez yöntemlerinin en büyük engellerdir (Khan vd. 2018, Jayaprakash vd. 2019). AgNP'lerin buharlaşma ve yoğunlaşma yoluyla sentezi, atmosferik basınçla çalışan bir tüp fırın gerektirmektedir. Bu yöntemde kullanılan büyük tüp fırın, sıcaklığı uygun şekilde ayarlayarak hem buharlaşma hem de yoğunlaşma gerçekleştirmek üzere tasarlanmıştır. Ancak tüp fırın oldukça geniş bir yer kaplar, aynı zamanda kararlı bir çalışma sıcaklığına ulaşmak için fazla güç tüketimi ve bir ön ısıtma süresi gerektirmektedir. Bu yüzden bu yöntem ürün eldesi için uzun zaman ve termal kararlılık gereksinimi duyar (Iravani vd. 2014, Zhang vd. 2016). Bir diğer fiziksel sentez yöntemi olan lazer ablasyonu, yığın gümüş metali içeren bir solüsyona lazer ışını içeren bir işlemdir (Ramanathan ve Gopinath 2017). Ablasyon verimliliği ve üretilen AgNP'lerin özellikleri, metalik hedefe çarpan lazerin dalga boyu, lazer darbelerinin süresi (femto-, piko- ve nanosaniye düzeyinde), lazer akışı ve hızı, etkin sıvı ortam, ortamda sürfaktanların varlığı veya yokluğu gibi pek çok farklı parametreye bağlı olarak farklılık göstermektedir (Kim vd. 2005, Kawasaki ve Nishimura 2006).

Düşük lazer akışı, hedef metal parçacıkların kaynağından çıkarılmasını sağlarken, lazer akışındaki artış, oluşturulan parçacıkların boyutunun homojen olmasını sağlamaktadır. Lazer darbelerinin süresi, partiküllerin konsantrasyonunu ve morfolojisini etkilemektedir. Süre uzadıkça konsantrasyon artmaktadır (Iravani vd. 2014, Ramanathan ve Gopinath 2017). Ark deşarj yöntemi, yüzey aktif maddeler ve stabilizatörler olmadan suda AgNP'leri sentezleyen yeni bir fiziksel yöntemdir. Deiyonize su içine gümüş tel daldırılarak AgNP'ler toplanır ve kullanılan gümüş tel elektrot görevi görür. Eksiksiz bir ark deşarj sistemi; elektrot görevi gören bir gümüş tel, elektrotları yerinde tutmak için bir servo kontrol sistemi, sistemi çalıştırmak için gerekli bir güç kaynağı, deiyonize su içeren cam kap ve manyetik karıştırıcıdan oluşmaktadır. Güç devreden geçerken, gümüş tel tabakası buharlaşır ve deiyonize suda tekrar yoğunlaşır (Ramanathan ve Gopinath 2017).

2.3.2 Gümüş nanoprtiküllerin kimyasal sentezi

Kimyasal sentez yöntemlerinin, üretimin kolay olması ve ürün veriminin yüksek olması gibi avantajları bulunmaktadır. Ancak toksik indirgeme ajanlarının kullanımı canlılar için zararlıdır ve çevre dostu bir yöntem olmadığı da bilinmektedir (Zhang vd. 2016, Tarannum vd. 2019). Organik ve inorganik indirgeme ajanlarının kullanıldığı bir yöntem olan kimyasal indirgeme (redüksiyon), kimyasal yöntemlerle AgNP'leri sentezlemenin en yaygın yoludur. Bu yöntemde organik ve inorganik indirgeyici ajanlar, kapatma ajanları veya stabilizatörler ve metal öncüleri veya gümüş tuzları olmak üzere üç ana bileşen kullanılmaktadır (Iravani vd. 2014, Khan vd. 2018). Kimyasal indirgeme yöntemiyle, su ve organik çözücüler içinde kolloidal dağılım sonucu kararlı AgNP'ler üretilmektedir. Metal katyonunun indirgenmesi sayesinde metal nanopartiküllerlar doğrudan oluşturulur (Ramanathan ve Gopinath 2017). Çözeltilerdeki Ag^+ iyonlarının indirgenmesi için kullanılan en yaygın indirgeyici ajanlar, sodyum borohidrit ($NaBH_4$), elementel hidrojen, sitrat (Pyatenko vd. 2007), askorbik asit (Blanco-Andujar ve Thanh 2010), hidrazin bileşikleri, poliol prosesi, Tollens reaktifi, N,N dimetilformamid (DMF) ve polietilen glikol (PEG)-blok kopolimerleridir (Ramanathan ve Gopinath 2017, Khan vd. 2018). Bu indirgeyicilerin varlığı sayesinde, Ag^+ 'nın elemental (nano) formuna (Ag^0) indirgenmesi ve ardından sulu ve susuz çözeltilerde oligomerik kümeler halinde yığılması sağlanır. Son olarak, bu oligomerik kümelerden metalik kolloidal AgNP'ler oluşturulur

(Wiley vd. 2005, Merga vd. 2007). Nanopartikül büyümesini stabilize eden, parçacıkları sedimentasyondan, aglomerasyondan ve yüzey özelliklerini kaybetmekten korumak için kullanılan yaygın stabilizatörler arasında, alkoller, tiyoller, aminler, asidik fonksiyonel gruplar, polivinil pirolidon (PVP), polivinil alkol, polietilen glikol, poli N-izopropilakrilamid, poli metil metakrilat, poli metakrilik asit ve kolajen gibi polimerik bileşikler ve yüzey aktif maddeler bulunmaktadır (Chen vd. 2013, Iravani vd. 2014, Ramanathan ve Gopinath 2017, Khan vd. 2018). Bir diğer sentez yöntemi elektrokimyasal yöntemdir ve bir elektrokimyasal devreden elektron transferi ile metalik katyonun metallere dönüşümü olarak açıklanabilir. Daldırma, darbe potansiyel süreleri ve elektrolitik çözeltilerin bileşimi gibi elektroliz parametreleri manipüle edilerek partikül boyutu ve yoğunluğu ayarlanabilir (Iravani vd. 2014, Ramanathan ve Gopinath 2017). AgNP'ler üreten bir elektrokimyasal yöntemde katot olarak titanyum ve anot olarak platin kullanılırken, elektrolit çözeltisi olarak sıklıkla AgNO_3 kullanılmaktadır (Ramanathan ve Gopinath 2017). Boyut kontrollü ve monodispers AgNP'ler, mikroemülsiyon yöntemi kullanılarak sentezlenebilir (Iravani vd. 2014). Bu yöntem, reaktantların birinin gümüş metal öncülü ve diğerinin indirgeyici ajan olduğu iki karışmaz fazdan oluşan bir çözelti içermektedir. AgNP'lerin hazırlanması bu iki fazın başlangıçta uzamsal olarak ayrılmasına dayanmaktadır. İki faz arasındaki arayüz ve fazlar arası interfaz taşımanın gücü indirgeyici ajan ve gümüş öncülü arasındaki sinerjiyi etkilemektedir. Arayüz taşıma sistemine bir kuaterner alkil-amonyum tuzu çözücü olarak aracılık etmektedir. Ara yüzeyde oluşan gümüş metal kümeler, yüzeylerinin polar olmayan sulu çözeltide bulunan stabilizatörler ile kaplanması yoluyla stabilize edilir ve fazlar arası taşıyıcı arayüz tarafından organik çözeltiye aktarılır. Bu yöntemin en büyük dezavantajı, yüksek miktarda zararlı organik çözücü tüketimi gerektirmesidir. İşlem sonrası AgNP'leri elde edebilmek için büyük miktarlarda yüzey aktif madde ve organik çözücüler çözeltiden ayrılarak nihai üründen uzaklaştırılmalıdır (Iravani vd. 2014, Ramanathan ve Gopinath 2017).

2.3.3 Gümüş nanoprtiküllerin biyolojik (yeşil) sentezi

Gümüş nanopartiküllerin biyolojik sentezi nanoteknoloji alanında giderek ilgi çeken bir araştırma konusu haline gelmiştir. Toksik içeriklerin aksine, metal iyonlarının nano

boyutlu metallere indirgenmesi ve metal veya metal oksit nanopartiküllerin belirlenen boyut ve morfolojilerde stabilizasyonu için redoks reaktanları olarak çoğunlukla bitki ve mikroorganizmaların kullanıldığı, sentez sırasında hiçbir toksik indirgeyici veya stabilize edici madde gerektirmeyen doğal sentez yöntemleri, çevre dostudur (Tong vd. 2014, Khan vd. 2018, Gour ve Jain 2019, Sharma ve Kumar 2021). Bu indirgenme reaksiyonu gerçek koşullarda mikroorganizmaların yaşadıkları habitatlarda bulunabilecek metal iyonlarının toksik formlarından kendilerini korudukları bir yaşam stratejisi olarak görülebilir (Javaid vd. 2018). Çeşitli bitki, mantar ve bakteriler gibi biyolojik sistemler metalik nanopartikülleri sentezleme yeteneği göstermekte ve nanopartikül üretim kabiliyeti olduğu bilinen organizmaların skalası her geçen gün genişlemektedir (Iravani vd. 2014, Pantidos 2014). AgNP'lerin biyolojik sentezi söz konusu olduğunda yaygın olarak çeşitli mikroorganizmalar (Gaidhani vd. 2013, Singh vd. 2013) ve bitkiler (Chopade vd. 2012, Salunke vd. 2014) kullanılmaktadır. Bitki ve mikroorganizmaların yanı sıra fitokimyasallar, amino asitler, proteinler, polisakkaritler, vitaminler ve polifenoller gibi doğal bileşenler de nanopartikül sentezinde kullanılmaktadır (Makvandi vd. 2020). Biyolojik tabanlı protokoller ile üretilen nanopartiküllerin boyutları ve morfolojileri; organizma türleri, organizmaların kalıtsal ve genetik özellikleri, substrat konsantrasyonu, pH, ışık, sıcaklık, tampon çeşiti, karıştırma hızı ve süresi dahil olmak üzere birçok kontrol edilebilir kritik parametreye bağlı olarak değişmektedir (Iravani vd. 2014).

2.3.3.1 Bitki kaynaklı sentez (fitojenik sentez)

Son yıllarda, bitkiler veya çeşitli bitki özütleri kullanılarak metalik nanopartiküllerin sentezi üzerine yapılan araştırmalar artmaktadır. Biyolojik gümüş nanopartikül üretiminde en çok tercih edilen üretim türlerinden biri bitki kaynaklı biyosentezdir. Yapraklar, kök, gövde, tohum, meyve, kallus ve çiçek gibi çok çeşitli bitki kısımlarının, farklı morfolojik yapılarda metal nanopartikül sentezlediği keşfedilmiştir (Velusamy vd. 2016, Sharma ve Kumar 2021). Bitki özleri kullanılarak sentezlenen nanopartiküllerin şekilleri ve boyutları, pH, sıcaklık, reaksiyon süresi, kullanılan bitki türleri, bitki ekstraktında bulunan bileşenlere, bitki ekstraktlarının hazırlanma şekli, bitkinin ekstrakt elde edilen kısmı ve reaksiyon ortamındaki fitokimyasalların konsantrasyonuna bağlıdır

(Quester vd. 2013, El-Seedi vd. 2019, Makvandi vd. 2020). Bitki özleri çeşitli organik maddeler içermektedir. Bu organik maddeler alkaloidler, flavonoidler, tanenler, steroidler, glikozitler ve benzenoidler ile temsil edilmektedir. Bu maddeler metal veya metal oksit nanopartiküllerin üretimini kolaylaştırmakla birlikte özdeş olmayan ve çoklu dağılımlı (polidispers) partiküller üretilmesi sonucunu doğurmaktadır. Ayrıca bitkisel üretimin mevsimsel değişikliklerden etkilenmesi de bir diğer dezavantajdır (Singh vd. 2015, Khandel vd. 2018, Makvandi vd. 2020).

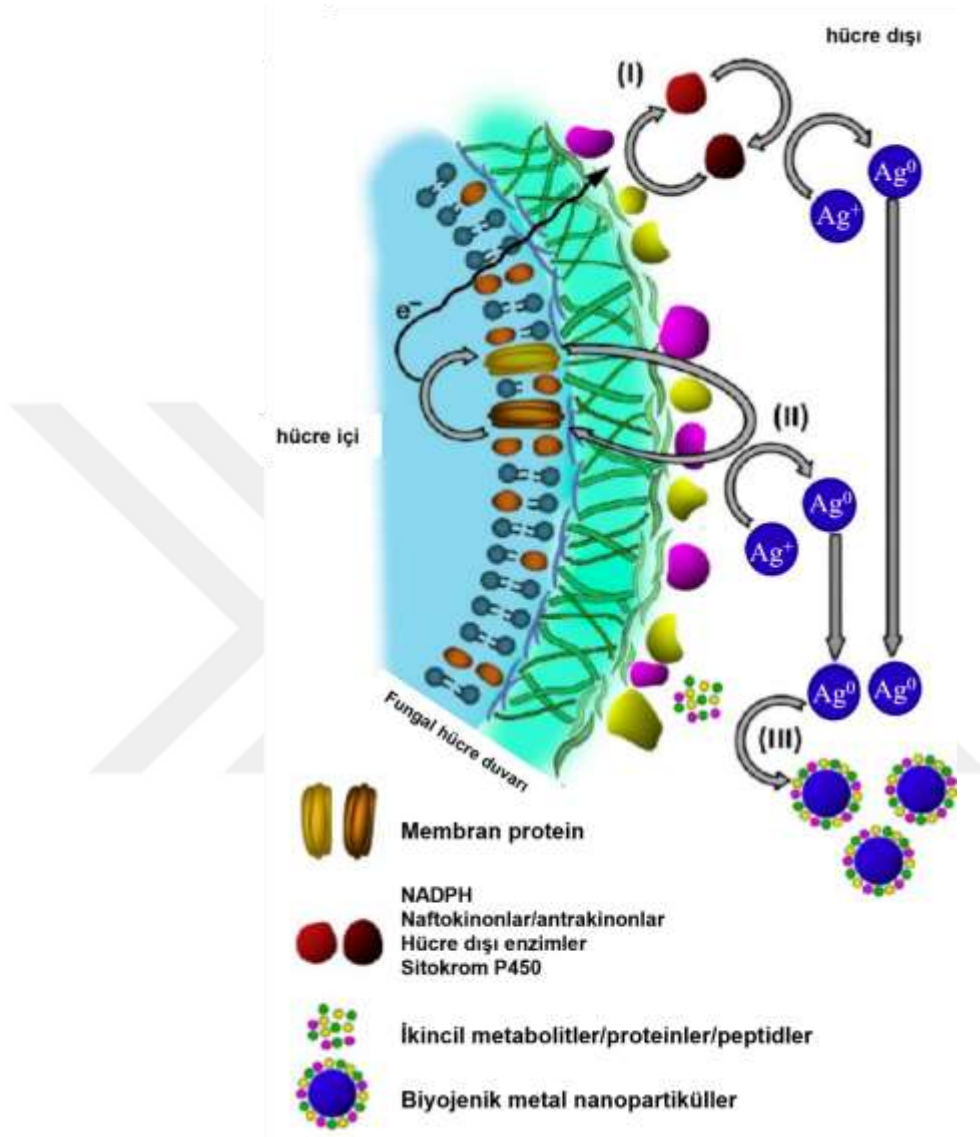
Araştırmacılar, farklı bitki özleri kullanarak antibakteriyel ve antikanser gibi çeşitli biyolojik aktiviteler gösteren, farklı boyut ve şekillere sahip AgNP'leri sentezlemeye odaklanmışlardır (Khan vd. 2018). AgNP'lerin bitkisel kaynaklı sentezi ilk olarak tıbbi bir bitki olan *Pelargonium endlicherianum* Fenzl.'de tanımlanmıştır ve bu AgNP'ler *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus* suşlarına karşı güçlü antibakteriyel aktivite göstermiştir (Elumalai vd. 2010, Şeker Karatoprak vd. 2017). Tıbbi bitkiler olan *Acalypha indica* ve *Garcinia mangostana*'nın yaprak özütlerini kullanarak AgNP'lerin sentezi gerçekleştirilen çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Krishnaraj vd. 2010, Veerasamy vd. 2011, Beyene vd. 2017). Başka bir çalışmada, *Ocimum sanctum*'un yaprak özütünde bulunan askorbik asit sayesinde, Ag⁺ iyonlarını AgNP'lere indirgediği bulunmuştur. Elde edilen AgNP'lerin *S. aureus* ve *Escherichia coli* suşlarına karşı etkili olduğu gösterilmiştir (Singhal vd. 2011, Mallikarjuna vd. 2011). *Cinnamomum zeylanicum*'un kabuk özütü kullanılarak AgNP'ler elde edilmiştir (Sathishkumar vd. 2009). *Cinnamomum tamala* yaprak ekstraktı ile AgNP'ler üretilmiştir (Yadav ve Khurana 2015). *Euphorbia hirta*'nın yaprak özütü kullanılarak AgNP'ler elde edilmiştir. Bu AgNP'ler, *B. cereus* ve *S. aureus*'a karşı etkili antibakteriyel özellik sergilemiştir (Elumalai vd. 2010). Tıbbi bitkiler olan *Azadirachta indica* ve *P. graveolens*'den izole edilen geraniol (C₁₀H₁₈O) bileşiğinden AgNP'ler sentezlenmiş ve bu AgNP'lerin, fibrosarkom Wehi 164 kanser hücrelerine karşı etkinliği tespit edilmiştir (Safaepour vd. 2009). *Aloe vera* ve *Capsicum annum* bitkilerinin yaprak ekstraktlarından AgNP'lerin sentezinin gerçekleştirildiği tespit edilmiştir (Chandran vd. 2006, Li vd. 2007). *Carica papaya* meyve özütünden partikül sentezi gerçekleştirilmiş ve sentezlenen nanopartiküllerin çoklu ilaca dirençli (MDR) insan patojenlerine karşı oldukça etkili olduğu saptanmıştır (Jain vd. 2009). *Pinus desiflora*, *Diospyros kaki*, *Ginkgo biloba*, *Magnolia kobus*, *Platanus*

orientalis bitkilerinin yaprak özütlerine ek olarak *Jatropha curcas*'ın tohum özütleri kullanılarak da AgNP'lerin sentezi yapılmıştır (Bar vd. 2009, Begum vd. 2009, Song ve Kim 2009, Iravani vd. 2014). Lukman ve arkadaşları *Medicago sativa* tohum özütlerini kullanarak AgNP'ler üretmiştir (Lukman vd., 2011). *Camellia sinensis* özütünde bulunan kafein ve teofilin gibi fenolik asit tipi biyomoleküller AgNP'lerin biyosentezi için indirgeyici ve stabilize edici bir ajanlar olarak kullanılmıştır (Vilchis-Nestor vd. 2008). *Medicago sativa*, *Cymbopogon flexuosus* ve *P. graveolens* bitki özleri, AgNP'lerin sentezinde yeşil reaktantlar olarak sunulmaktadır (Iravani vd. 2014). Ayrıca, *Datura metel* bitkisinin yaprak özütünde bulunan alkaloidler, proteinler/enzimler, amino asitler, alkollü bileşikler ve polisakkaritler indirgeyici olarak kullanılmış ve AgNP'ler sentezlenmiştir (Kesharwani vd. 2009). Suda yaşayan bir bitki olan *Nelumbo nucifera*'dan elde edilen yaprak ekstraktlarının gümüş iyonlarını indirgeyebildiği ve farklı şekil ve boyutlarda AgNP'ler ürettiği gösterilmiştir (Santhoshkumar vd. 2011). *Allophylus cobbe* (Gurunathan vd. 2014), *Artemisia princeps* (Gurunathan vd. 2015), *Typha angustifolia* (Gurunathan 2015), *Moringa oleifera* (Prasad ve Elumalai 2011), *Eucalyptus citriodora* ve *Ficus bengalensis* (Ravindra vd. 2010), *Cacumen platycladi* (Huang vd. 2011), *Murraya koenigii* (Christensen vd. 2011) ve *Pinus eldarica* (Iravani ve Zolfaghari 2013) gibi bitki özleri ve bitkiler de nanopartikül sentezinde kullanılmıştır (Zhang vd. 2016).

2.3.3.2 Mantar kaynaklı sentez

Mantarlar, çok çeşitli doğal habitatlarda yaşayabilen ökaryotik organizmalardır. Mantarlar, hızlı bir şekilde büyümeleri ve laboratuvarında kültüre alınmalarının kolay olması gibi avantajları sayesinde nanoteknolojide kullanım potansiyelleri yüksek adaylardır (Mukherjee vd. 2001, Castro-Longoria vd. 2011, 2012, Quester vd. 2013). Üretilen nanopartiküller, mantarların ürettiği biyomoleküllerin tipi, konsantrasyonu, inkübasyon koşulları, kullanılan çözeltiler ve reaksiyon süresi gibi çeşitli parametrelere göre çeşitlilik göstermektedir (Quester vd. 2013). Mantar kaynaklı nanopartikül sentezi hem hücre dışı hem de hücre içi mekanizmalara dayanmaktadır (Şekil 2.2). Hücre içi sentezde mantar hücre duvarı fonksiyonel gruplarının sahip olduğu negatif yük, pozitif metal iyonlarını çeker. Metal iyonları hücre duvarında bulunan enzimlere veya proteinlere bağlanır. Enzimler metal iyonlarının indirgenmesine vesile olur ve

nanopartiküller oluşur. Hücre dışı nanopartikül sentezinde ise mantarın salgıladığı redüktaz enzimi indirgeyici ajan olarak görev yapar (Rahman vd. 2019, Garg vd. 2020).



Şekil 2.2 Mantar kaynaklı nanopartikül sentezinin hücre içi/hücre dışı şematik mekanizması: (I) hücre dışı süreç, (II) yüzey süreci ve (III) stabilizasyon süreci (Makvandi vd. 2020)

Mantar kaynaklı gümüş nanopartiküllerin biyosenteziyle ilgili yapılan ilk çalışmalardan biri, filamentli bir mantar olan *Verticillium* sp. tarafından AgNP'lerin hücre dışı sentezidir (Mukherjee vd. 2001, Ghorbani vd. 2011). Farklı çalışmalar, *Aspergillus fumigatus* ve *Fusarium oxysporum* kullanılarak AgNP'lerin hücre dışı olarak sentezlendiğini göstermiştir (Ahmad vd. 2003, Bhainsa ve D'Souza 2006). Balaji ve arkadaşları,

Cladosporium cladosporioides türünden hücre dışı olarak AgNP'ler oluşturmak için AgNO₃ çözeltisi kullanmıştır (Balaji vd. 2009). *A. flavus*, sulu çözeltide AgNP'lerin üretimi için kullanılabilmektedir (Vigneshwaran vd. 2007). *Trichoderma asperellum* ve *Trichoderma reesei* türlerinin de hücre dışı olarak AgNP'ler ürettiği gösterilmiştir (Vahabi vd. 2011). *Phanerochaete chrysosporium* da gümüş iyonlarını indirgeyerek AgNP'ler oluşturmuştur (Vigneshwaran vd. 2006). Kathiresan ve çalışma arkadaşları *Penicillium fallutanum* kültürünün gümüş iyonları ile karanlık koşullarda inkübe edilmesi sonucunda küresel AgNP'lerin üretilebileceğini göstermiştir (Kathiresan vd. 2009). *Penicillium oxalicum* GRS-I hücresel ekstraktı kullanılarak gümüş nanopartikül sentezi sağlanmış ve antibakteriyel aktivitesi incelenmiştir. Üretilen gümüş nanopartiküller *S. aureus*, *E. coli* ve *Salmonella typhimurium* patojenlerine karşı yapılan antibakteriyel aktivite testlerinde etkili bulunmuştur (Rose vd. 2019). AgNP'lerin mantar kaynaklı sentezi söz konusu olduğunda *Penicillium expansum* HA2N ve *A. terreus* HA1N isimli iki mantar türü de kullanılmıştır (Ammar ve El-Desouky 2016). Bir çalışmada *Piriformospora indica* mantarından elde edilen gümüş nanopartiküller, insan meme karsinomu (MCF-7), insan servikal karsinomu (HeLa) ve insan karaciğer hepatoselüler karsinomu (HepG2) olmak üzere 3 farklı kanser hücre hattı üzerinde denenmiş ve gümüş nanopartiküllerin tümör aktivitesini baskıladığı tespit edilmiştir (Aziz vd. 2019, Garg vd. 2020).

2.3.3.3 Alg kaynaklı sentez

Algler de AgNP'lerin sentezi için çalışılan mikroorganizmalar arasındadır. Metal nanopartikülleri üretmek için birkaç alg türü araştırılmıştır (Quester vd. 2013, Khan vd. 2018). Alglerin hem hücre içi hem hücre dışı üretim yöntemleriyle gümüş nanopartikül üretebildiğine dair çalışmalar mevcuttur (Garg vd. 2020). Venkatpurwar ve Pokharkar, suda yaşayan kırmızı alglerden AgNP'lerin sentezini bildirmiştir. Bu AgNP'ler özellikle çeşitli Gram-negatif bakterilere karşı etkili anti-bakteriyel aktivite göstermiştir (Venkatpurwar ve Pokharkar 2011). Bazı alg türleri, *Tetraselmis gracilis*, *Chaetoceros calcitrans*, *Isochrysis galbana* ve *Chlorella salina* gümüş iyonlarının indirgenmesi sonucu AgNP'lerin biyosentezini başarıyla gerçekleştirebilir (Shahverdi vd. 2007). *Spirulina platensis* biyokütlesi AgNO₃ varlığında hücre dışı küresel AgNP'ler

oluşturmuşlardır (Govindaraju vd. 2008). *Sargassum wightii* Greville biyokütlesinin AgNP'leri sentezleyebildiği gösterilmiştir (Govindaraju vd. 2009). *Spirulina platensis* ile yapılan bir çalışmada hücre dışı sentez yöntemiyle gümüş nanopartiküller üretilmiştir (Sharma vd. 2015).

2.3.3.4 Polisakkarit ve protein kaynaklı sentez

Polisakaritler, AgNP'lerin sentezinde indirgeyici ajanlar ve/veya kapaklama ajanları olarak görev almaktadırlar ve bu şekilde de çevre dostu AgNP'ler sentezlenebilmektedir (Iravani vd. 2014, Khan vd. 2018). Bir çalışmada kapama maddesi olarak nişasta ve indirgeyici madde olarak β -D-glukoz kullanılması ile AgNP'ler elde edilmiştir (Raveendran ve Wallen 2003). Yine başka bir çalışmada nişasta çözeltisi ve AgNO_3 kullanılarak AgNP'ler sentezlenmiştir (Vigneshwaran vd. 2006). AgNP'ler, nişasta ve glikoz içeren NaOH solüsyonu kullanılarak hazırlanabilmektedir (Tai vd. 2008, Gao vd. 2011). Benzer şekilde, nişasta kullanılarak AgNP'ler hazırlanırken, nişastayı bozunmadan çözdüğü ve yüksek moleküler ağırlığa sahip modifiye edilmemiş nişasta partiküllerinin topaklanmasını daha uzun süre önlediği için NaOH kullanılmaktadır (Fouda vd. 2020, Dawadi vd. 2021). AgNP'lerin sentezi için sodyum ve kalsiyum aljinatlarının kullanılabileceğini ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır (Liu vd. 2009, Saha vd. 2010). AgNP'lerin sentezi hyaluronik asit kullanılarak da gerçekleştirilmiştir (Kemp vd. 2009). AgNP'lerin hazırlanmasında karboksimetil kitosan ve N-ftaloil kitosan (Laudenslager vd. 2008, Kibeche vd. 2015, Biao vd. 2017, Dawadi vd. 2021), selüloz, alkol ve aldehit grupları (Tummalapalli vd. 2015), hidroksil propil selüloz (Abdel-Halim ve Al-Deyab 2011, Hussain vd. 2015), polietilen glikol (Bo vd. 2009) ve trisodyum sitrat (Rehan vd. 2015) indirgeyici ajanlar olarak kullanılmaktadır (Khan vd. 2018).

Proteinler, nanopartikül sentezinde inorganik kimyasalların kullanımını en aza indirmek amacıyla biyolojik indirgeyici ajanlar veya nanopartiküllerin boyut ve stabilitesini kontrol eden kapaklama ajanları olarak yer alabilmektedirler (Garcia-Hernandez vd. 2019). Bu kullanım potansiyeli, hidroksil fonksiyonel grubuna sahip tirozin, serin ve treonin, karboksil fonksiyonel grubuna sahip asparagin ve glutamin, tiyol fonksiyonel grubuna sahip sistein ve tioeter fonksiyonel grubuna sahip metionin gibi spesifik

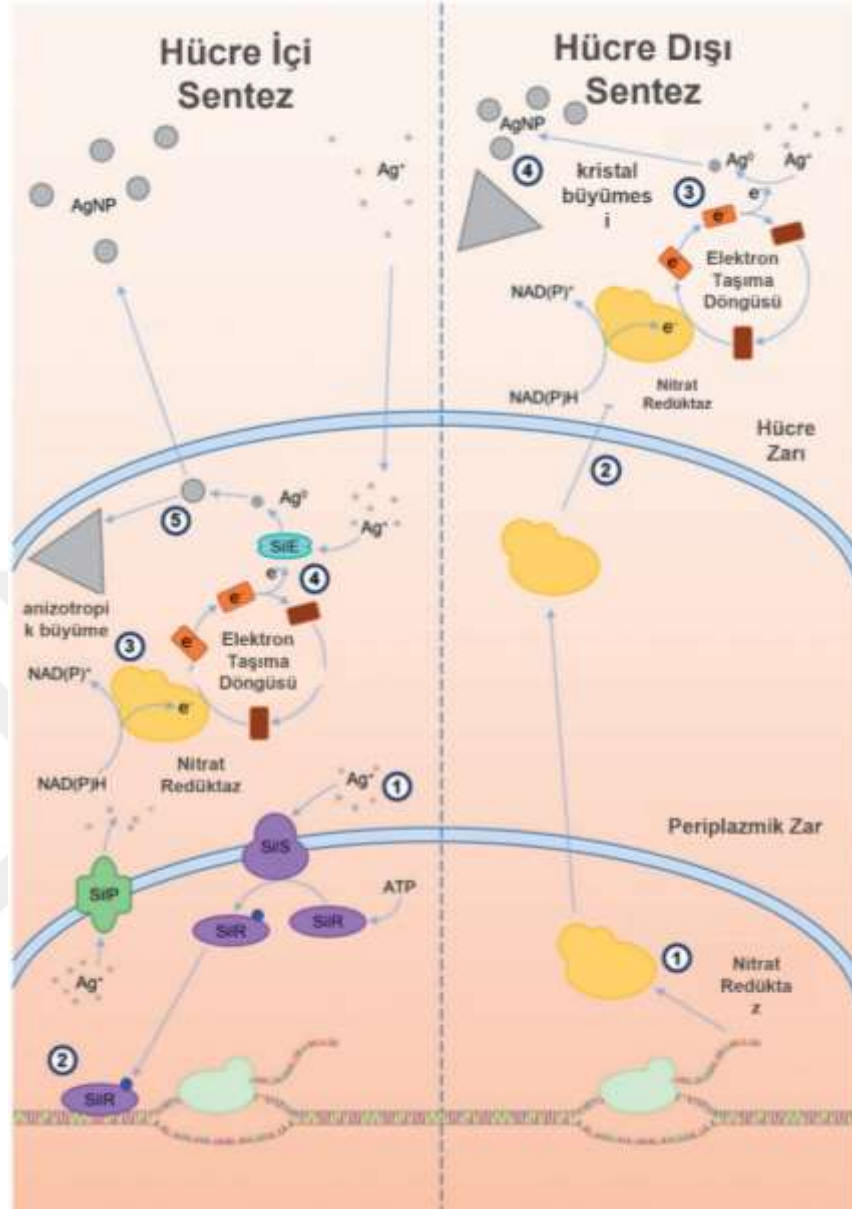
fonksiyonel gruplar barındıran amino asitlerin varlığına bağlanmaktadır. Bu fonksiyonel gruplar, metal iyonlarıyla reaksiyona girebilmektedir (Dwivedy vd. 2019, El-Seedi vd. 2019). Biyolojik indirgeyici ajanlar olarak proteinlerin kullanılmasının nanopartiküllerin boyutunun ve şeklinin kontrol edilebilmesi ve çözücü olarak toksik kimyasallar yerine suyun kullanılması gibi önemli avantajları bulunurken (Nasrollahzadeh vd. 2019), sentez esnasında yüksek sıcaklık kullanımının kısıtlanması ve proteinlerin 3 boyutlu konfigürasyonlarını olumsuz etkileyen ve performanslarını düşüren çevresel değişikliklere karşı oldukça duyarlı olmaları gibi dezavantajları bulunmaktadır (Liu vd. 2020). Nanopartiküllerin hazırlanması için çeşitli böcek proteinleri de kullanılmıştır (Makvandi vd. 2020). Bunlardan biri ipek böceği *Bombyx mori*'den ekstrakte edilen ipek fibroinidir. Çözünmeyen ve biyoyumlu bir protein olan ipek fibroini, yapısındaki tirozin gibi bazı polar amino asitler dahil olmak üzere 18 tip amino asit sayesinde biyolojik indirgeyici bir madde olarak kullanılma potansiyeli kazanmaktadır (Selvakannan vd. 2004, Fei vd. 2013, Harisha vd. 2019). İpek böceği kozasından elde edilen ve pıhtılaşmayı önleme, antioksidan, antibakteriyel, antiapoptozis ve sitoprotektif özelliklere sahip, biyoyumlu bir protein olan serisin, AgNP'lerin hazırlanması için kullanılmıştır (Khan vd. 2018, Boonpavanitchakul vd. 2020, Makvandi vd. 2020, Muhammad Tahir vd. 2020). Ayrıca, bitki tohumlarında bol miktarda bulunan bir protein türü olan zein, ilaç dağıtımında kullanılabilen, kendi kendine bir araya gelme davranışına sahip kolloidal partiküller üretme kabiliyetine sahip, biyoyumlu bir proteindir (Madani ve Tarakanova 2020).

2.3.3.5 Bakteri kaynaklı sentez

Dünya'da en bol bulunan mikroorganizmalar bakterilerdir ve AgNP'lerin üretiminde bakterilerin kullanımı oldukça dikkat çekici bir yöntem haline gelmiştir. Diğer yöntemlere benzer şekilde, bakteri kültürlerinden AgNP'lerin hazırlanmasında metal öncülleri veya gümüş tuzları kullanılmaktadır (Khan vd. 2018, Makvandi vd. 2020). Bakterilerde AgNP'lerin üretimi için çoğunlukla AgNO₃ tuzu kullanılmaktadır. Buna ek olarak, gümüş sülfür (Ag₂S) ve gümüş oksit (Ag₂O) gibi diğer gümüş tuzlarını içeren nanopartiküller de rapor edilmiştir (Dhoondia ve Chakraborty 2012, Debabov vd. 2013, Singh vd. 2015). Üretilen nanopartiküllerin boyut ve şekli, değişen sıcaklık, pH,

inkübasyon süresi ve/veya metal öncülerinin konsantrasyonu gibi parametrelerden etkilenmektedir (Quester vd. 2013). Ekstremofiller olarak adlandırılan ve aşırı yüksek veya düşük sıcaklıklar, asidite, alkali koşullar, tuz veya kükürt konsantrasyonları gibi her türlü ekstrem habitatta yaşayan bakteriler bu ortamlara oldukça iyi adapte olurlar ve kolayca gelişip çoğalırlar. Bazı bakteri türleri, metallerin toksisitesi gibi stresleri bastırmak için çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmiştir. Bu bakterilerin, AgNP'leri biriktirebilmesi yoğun gümüş içeren bir ortamda toksik etkiden korunmaları ve hayatta kalabilmeleri ile bağlantılıdır (Quester vd. 2013). Bakteri aracılı sentez, metal nanopartiküllerin sentezi için zahmetsiz ve basit bir yaklaşımdır.

Bakteriler tarafından nanopartikül sentezinin, gümüş iyonlarının indirgenme ortamına bağlı olarak ya hücre içi (intraselüler) ya da hücre dışı (ekstraselüler) (Şekil 2.3) ve/veya her ikisinde birden gerçekleştiği bulunmuştur. Hücre içi AgNP'lerin sentezinde, pozitif yüklü metal iyonları, elektrostatik etkileşimler yoluyla negatif yüklü hücre duvarında biriktirilmektedir. Zar proteinleri aracılığıyla taşındıktan sonra nitrat redüktaz gibi enzimler indirgeyici ajan rolü üstlenmekte ve elektron kaynağı oluşturmaktadır. Böylelikle iyonlar indirgenmekte ve metal nanopartikülleri oluşturulmaktadır. Metal nanopartiküller hücre içinde sentezlendiğinde peptitler ve proteinler dağıtıcı ajan olarak görev görmektedir. Nanopartiküllerin hücre dışı sentezinde hücre duvarından bulunan proteinler ve enzimler indirgeyici ajan rolü üstlenmektedir. İndirgeyici ajanların yardımı ile iyonlar hücre dışında sıfır değerlikli elemental forma indirgenerek nanopartikül üretimi sağlanmaktadır. Metal nanopartiküller hücre dışındayken, hücreye ait ekstraselüler komponentler dağıtıcı ajanlar olarak işlev görmektedir (Kato ve Suzuki 2019, Bahrulolum vd. 2021, Jadoun vd. 2022).



Şekil 2.3 Hücre içi ve hücre dışı nanopartikül sentezinin şematik gösterimi (Mabey vd. 2019)

Bakteriler hücre dışı sentez yönteminde, Ag^+ iyonlarını Ag^0 hücre dışında indirger ve AgNP'lerin oluşmasını sağlar. Bu indirgenme işleminde bakteri hücre duvarında bulunan proteinler veya enzimler, indirgeyici ajan olarak görev yapmaktadır (Javaid vd. 2018). Hücre dışı olarak üretilen AgNP'ler, bakteri büyümesi için kullanılan kültür ortamı ve çeşitli parametrelere bağlı olarak farklı boyutlara ve altıgen, küresel, üçgen, dairesel, disk veya kübik gibi çeşitli şekillere sahip olabilmektedir (Nanda ve Saravanan 2009, Oves vd. 2013, Elbeshehy vd. 2015, Otari vd. 2015). AgNP'ler, kültür süpernatantı veya sulu

hücre içermeyen ekstraktlar kullanılarak sentezlenmektedir. Bu AgNP'ler, tercih edilen çözücü içinde yeniden çözülebilen bir pelet olarak toplanır. Hücre dışı sentez yöntemleri, çözeltiden AgNP'lerin geri kazanılmasının kolay olması nedeniyle hücre içi senteze göre daha avantajlıdır (Oves vd. 2013, Singh vd. 2013, Singh vd. 2015, Javaid vd. 2018). Hücre dışı sentezin biyokütle kullanarak gerçekleştirilmesinde, bakteriler tarafından dış ortama salınan biyomoleküller, Ag iyonlarının AgNP'lere indirgenmesine yardımcı olmaktadır. Bu tür sentez, hem canlı (Mahdieh vd. 2012) hem de kurutulmuş bakteri biyokütlesi (Zhang vd. 2005) kullanılarak yapılabilmektedir (Singh vd. 2015). Hücre dışı sentezin bir diğer şekli kültür süpernatantı kullanılarak sentezdir. Bu sentez yönteminde, bakteriler tarafından büyüme sırasında salgılanan besleyici ortam bileşenleri ve organik molekülleri içeren süpernatant, gümüş iyonlarının AgNP'lere indirgenmesi için ideal bir kaynaktır. Hücre dışı sentez son olarak hücre içermeyen bakteri ekstraktının (cell free extract, CFE) kullanılmasıyla gerçekleştirilebilir. Bu yöntem bakteri biyokütlesinin, 1-3 gün arasında değişen belirli bir süre boyunca steril distile suda yeniden süspanse edilmesi, sonrası santrifüj işlemi ile toplanan CFE'ye gümüş tuzu eklenmesiyle gerçekleştirilmektedir. Tekrarlanan yıkamalar yoluyla bakteriyel biyokütle ve ortam bileşenlerinin uzaklaştırılmasını sağlar ve nanopartiküllerin sentezi hücreler tarafından açlık veya otoliz nedeniyle sulu çözeltiliye salınan organik biyomoleküller aracılığıyla gerçekleşir (Singh vd. 2013, Singh vd. 2015).

AgNP'lerin hücre içi sentezi, zar proteinlerinin aracılık ettiği ve bakteri hücresi içinde gümüş iyonlarının taşınmasını kapsayan bir yöntemdir (Javaid vd. 2018). Canlı bakterilerin hücre duvarında bulunan karboksil grupları gibi fonksiyonel gruplar elektrostatik etkileşimler yoluyla metalik iyonları yakalar (Makvandi vd. 2020). Bazı gümüşe dirençli bakteri hücreleri hayatta kalma stratejisi olarak bu toksik metal iyonlarını toksik olmayan hale getirmek için hücre duvarında veya periplazmik boşlukta biriken Ag^+ iyonlarını Ag^0 formuna indirgenmektedir (Singh vd. 2015, Javaid vd. 2018). Hücre içi sentez için, gümüş tuzu içeren kültür ortamına üretici bakteri eklenir ve uygun koşullarda inkübe edilir. Hücre içi olarak üretilen AgNP'lerin boyutu ve şekli yine kullanılan kültür ortamına ve farklı parametrelere bağlı olarak değişmektedir (Srivastava vd. 2013). Hücre içi sentez yöntemi, biriken nanopartiküllerin hücrelerden geri kazanılması için ek adımlar gerektirmektedir. Bu geri kazanım; ultrasonikasyon gibi fiziksel yöntemlerle

(Kalishwaralal vd. 2010), otoklavlama gibi ısı işlem uygulanmasıyla veya tuz ve deterjan kullanımı gibi kimyasal yöntemlerle (Fesharaki vd. 2010) gerçekleştirilen hücre lizisi sonrası yapılmaktadır (Singh vd. 2015, Javaid vd. 2018).

Çeşitli bakteri kaynaklı bileşenler kullanılarak da AgNP'lerin sentezi yapılmaktadır (Singh vd. 2015). Çeşitli bakteriler, biyolojik olarak parçalanma, düşük toksisite ve kimyasal muadillerine göre yüksek biyolojik uyumluluk avantajlarına sahip iyi birer biyosüpfaktan kaynağı olabilmektedir (Satpute vd. 2010). AgNP'lerin sentezi için bakterilerden elde edilen biyosüpfaktanların kullanımı sentez hızını artırmakta ve aynı zamanda stabilize edici bir ajan olarak görev yapmaktadır (Kiran vd. 2010, Kumar vd. 2010). Bakteriyel enzimler (Deepak vd. 2011), ekzopolisakkaritler (Kanmani ve Lim 2013, Morsy vd. 2014), doğal ve repolimerize flagellalar (Gopinathan vd. 2013) ve sporlar da (Hosseini-Abari vd. 2013) AgNP'lerin sentezinde kullanılmaktadır (Singh vd. 2015). Metal iyonlarının indirgenmesinin ve AgNP'lerin stabilizasyonunun enzimatik bir işlem sonucu gerçekleştiği bilinmektedir. Elektron mikroskobu analizleri, AgNP'lerin sitoplazmik hücre zarının yüzeyinde, sitoplazmanın içinde ve hücre dışında bulunabilen metal iyonlarının sitoplazmik zar üzerinde ve sitoplazma içinde bulunan enzimler tarafından biyolojik olarak indirgenmesiyle oluştuğunu göstermektedir (Korbekandi vd. 2012, Iravani vd. 2014). Bakteriyel kaynaklı AgNP'lerin sentezinin keşfi Klaus ve arkadaşlarının, gümüş madeninden izole edilen bir bakteri olan *P. stutzeri* AG259 bakterisinin hücre içi olarak AgNP'leri sentezleme yeteneğini bulmasıyla gerçekleşmiştir (Klaus vd. 1999). Bu keşif sonrası çok çeşitli Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerin AgNP'lerin sentezini gerçekleştirebildiği belirlenmeye başlanmıştır. Bakteriyel AgNP'lerin sentezinin gerçekleştirildiği çeşitli çalışmalar Çizelge 2.1'de sunulmuştur.

Çizelge 2.1 AgNP'lerin sentezini gerçekleştiren çeşitli bakteriler [M: mezofil, T: termofil, I: intraselüler, E: ekstraselüler]

Bakteri İsmi	Gram Boyama	Gelişme Sıcaklığı	Gerçekleştiği Yer	Şekil	Boyut (nm)	Kaynak
<i>Acetobacter xylinum</i> NCIM2526	Gram (-)	M	I	Lif	-	Ahmed vd. 2014
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Gram (-)	M	E	Küresel	4-40	Gaidhani vd. 2013, Singh vd. 2013
<i>Acinetobacter</i> sp. S7	Gram (-)	M	E	Altıgen ve Kübik	15-50	Zaki vd. 2011
<i>Aeromonas</i> sp.	Gram (-)	M	E ve I	-	6.4	Mouxing vd. 2006, Wang vd. 2012
<i>Anoxybacillus</i> sp. ST7	Gram (+)	T	I	Küresel	20	Gonca 2021
<i>Arthrobacter</i> sp. B4	Gram (+)	M	E	Kübik	9-72	Yumei vd. 2017
<i>B. amyloliquefaciens</i> Ts-1	Gram (+)	M	E	-	10-50	Chandra ve Sreelatha 2020
<i>Bacillus</i> sp.	Gram (+)	M	E	-	5-15	Pugazhenthiran vd. 2009
<i>Bacillus</i> sp. AZ1	Gram (+)	M	E	-	7-31	Deljou ve Goudarzi 2016
<i>Bacillus</i> sp. HAI4	Gram (+)	M	E	Küresel	33-264	Taran vd. 2016
<i>Bacillus</i> sp. SBT8	Gram (+)	M	E	Küresel	<60	Yurtluk vd. 2018
<i>Bacillus</i> sp. B1	Gram (+)	M	E	-	22.9-75.7	Gunashova vd. 2021
<i>B. brevis</i> NCIM 2533	Gram (+)	M	E	Küresel	41-68	Saravanan vd. 2017
<i>B. cereus</i>	Gram (+)	M	E ve I	Küresel, Altıgen	10-20	Babu vd. 2009, Prakash vd. 2011, Pourali ve Yahyaei 2016
<i>B. cereus</i> A30	Gram (+)	M	E	Küresel	24-46	Arul vd. 2017
<i>B. endophyticus</i> SCU-L	Gram (+)	M	E	Küresel	5.1	Gan vd. 2018
<i>B. flexus</i>	Gram (+)	M	E	Küresel, Üçgen	12-65	Priyadarshini vd. 2013
<i>B. funiculus</i>	Gram (+)	M	E	Küresel	20	Gurunathan vd. 2013
<i>B. licheniformis</i>	Gram (+)	M ve T	E	Küresel	18.69-63.42	Kalimuthu vd. 2008, Sriram vd. 2012, Shanthi vd. 2016

Çizelge 2.1 AgNP'lerin sentezini gerçekleştiren çeşitli bakteriler [M: mezofil, T: termofil, I: intraselüler, E: ekstraselüler] (devam)

Bakteri İsmi	Gram Boyama	Gelişme Sıcaklığı	Gerçekleştiği Yer	Şekil	Boyut (nm)	Kaynak
<i>B. magaterium</i>	Gram (+)	M	E ve I	Altıgen, Kübik	15-50	Zaki vd. 2011, Najitha Banu vd. 2014
<i>B. methylotrophicus</i> DC3	Gram (+)	M	E	Küresel	10-30	Wang vd. 2016
<i>B. pseudomycooides</i> MT32	Gram (+)	M	E	Küresel	32-86	El-Saadony vd. 2019
<i>B. pumilus</i>	Gram (+)	M	E	Küresel	77-92	Elbeshehy vd. 2015, Mahmoud vd. 2016
<i>B. stearothermophilus</i>	Gram (+)	T	E	Küresel	14 ± 4	El-Batal vd. 2013
<i>B. subtilis</i>	Gram (+)	M	E	Küresel, Altıgen, Üçgen, Polidispers	60	Saifuddin vd. 2009, Kannan vd. 2011, Paulkumar vd. 2013, Sathiyarayanan vd. 2013
<i>B. subtilis</i> ANR 88	Gram (+)	M	E	Küresel	4-18	Rane vd. 2017
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	Gram (+)	M	E	Küresel	10-20	Muthulakshmi ve Uma 2019
<i>B. subtilis</i> ssp <i>spizizenii</i> MT5	Gram (+)	M	E	Küresel	38-49	El-Saadony vd. 2018
<i>B. safensis</i> TEN12	Gram (+)	M	I	Küresel	22.77-45.98	Ahmed vd. 2020
<i>B. thuringiensis</i>	Gram (+)	M	E	-	43.52-142.97	Najitha Banu vd. 2014, Verma vd. 2018, Khaleghi vd. 2019
<i>Bhargavaea indica</i> DC1	Gram (+)	M	E	Küresel, Altıgen, Üçgen, Beşgen, İkosahedral	30-100	Singh vd. 2015
<i>Bordetella</i> sp.	Gram (-)	M	E	-	63-90	Thomas vd. 2012
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> 36	Gram (-)	M	-	Çubuk, Oval	5-50	Rasulov vd. 2016
<i>Brevibacterium casei</i>	Gram (+)	M	I	Küresel	10-50	Kalishwaralal vd. 2010
<i>B. frigoritolerans</i> DC2	Gram (+)	M	E	Küresel	97	Singh vd. 2015
<i>Caldibacillus thermoamylovorans</i> SA1	Gram (+)	T	E	Küresel	<100	Akkaya vd. 2024

Çizelge 2.1 AgNP'lerin sentezini gerçekleştiren çeşitli bakteriler [M: mezofil, T: termofil, I: intraselüler, E: ekstraselüler] (devam)

Bakteri İsmi	Gram Boyama	Gelişme Sıcaklığı	Gerçekleştiği Yer	Şekil	Boyut (nm)	Kaynak
<i>Chryseobacterium artocarp</i>	Gram (-)	M	-	Küresel	49	Venil vd. 2016
<i>Corynebacterium</i> sp. SH09	Gram (+)	M	E	-	10-15	Zhang vd. 2005
<i>Deinococcus radiodurans</i>	Gram (+)	M	E	Küresel	4-50	Kulkarni vd. 2015
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Gram (-)	M	E	Küresel	25-35	Karthik ve Radha 2012
<i>E. cloacae</i>	Gram (-)	M	E	Küresel	28.5-122	Shahverdi vd. 2007
<i>Enterococcus faecalis</i>	Gram (+)	M	E	-	10-80	Pourali vd. 2012
<i>E. coli</i>	Gram (-)	M	E	Küresel	15-89.6	Gurunathan vd. 2009, Kushwaha vd. 2015, Mathur vd. 2018, Verma vd. 2018
<i>E. fergusonii</i>	Gram (-)	M	E	Küresel, Altıgen	10-20	Pourali ve Yahyaei 2016
<i>Exiguobacterium</i> sp. KNU1	Gram (+)	M	E	Küresel	10-50	Tamboli ve Lee 2013
<i>E. aurantiacum</i>	Gram (+)	M	E	Küresel	5-50	Saeed vd. 2020
<i>Geobacillus</i> spp.	Gram (+)	T	E	E	<100	Cekuolyte vd. 2023
<i>G. stearothermophilus</i>	Gram (+)	T	E	Küresel	5-50	Mohammed Fayaz vd. 2011, Ghasemi et al. 2018
<i>G. thermodenitrificans</i> AZ1	Gram (+)	T	E	Küresel	1.44-16.3	Youssif vd. 2020
<i>Geobacter sulfurreducens</i>	Gram (-)	M	E	-	-	Law vd. 2008
<i>Gluconobacter roseus</i>	Gram (-)	M	E	-	10	Krishnaraj ve Berchmans 2013
<i>Idiomarina</i> sp.	Gram (-)	M	I	-	25	Seshadri vd. 2012
<i>Klebsiella oxytoca</i> DSM 29614	Gram (-)	M	E	Küresel	-	Baldi vd. 2016
<i>K. pneumoniae</i>	Gram (-)	M	E	Küresel	5-37	Shahverdi vd. 2007, Kalpana ve Lee 2013
<i>Lactobacillus</i> sp.	Gram (+)	M	E ve I	-	50	Brayner vd. 2007
<i>L. mindensis</i>	Gram (+)	M	E	Küresel	2-20	Dhoondia ve Chakraborty 2012
<i>L. lactis</i>	Gram (+)	M	E	Küresel	5-50	Saravanan vd. 2017, Viorica vd. 2017

Çizelge 2.1 AgNP'lerin sentezini gerçekleştiren çeşitli bakteriler [M: mezofil, T: termofil, I: intraselüler, E: ekstraselüler] (devam)

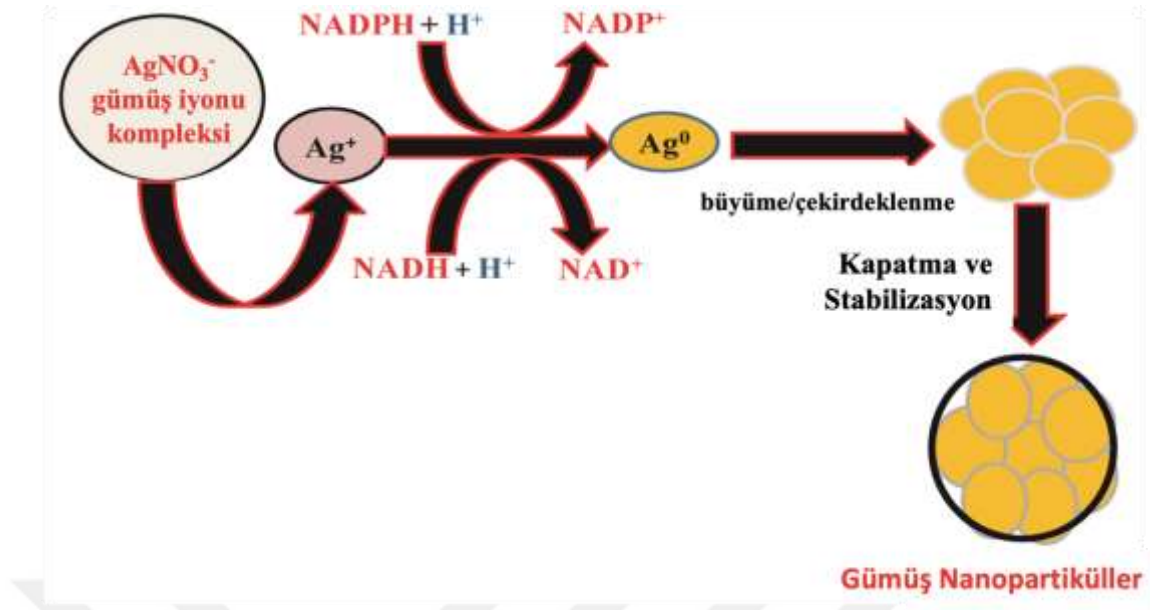
Bakteri İsmi	Gram Boyama	Gelişme Sıcaklığı	Gerçekleştiği Yer	Şekil	Boyut (nm)	Kaynak
<i>Microbacterium resistens</i>	Gram (+)	M	E	Küresel	10-20	Wang vd. 2016
<i>Morganella</i> sp.	Gram (-)	M	E	Yarı Küresel	10-40	Parikh vd. 2011, Ramanathan vd. 2011
<i>Nocardiosis</i> sp. MBRC-1	Gram (+)	M	E	Küresel	45 ± 0.15	Manivasagan vd. 2013
<i>Nocardiosis valliformis</i> OT1	Gram (+)	M	-	Küresel	5-50	Rathod vd. 2016
<i>Novosphingobium</i> sp. THG-C3	Gram (-)	M	-	Küresel	8-25	Yazdani-Arazi vd. 2017
<i>Ochrobactrum anthropi</i> PH5	Gram (-)	M	I	Küresel	35-85	Thomas vd. 2014, Gahlawat vd. 2016
<i>Pedicoccus pentosaceus</i>	Gram (+)	M	I	-	-	Sintubin vd. 2009
<i>Pilimelia columellifera</i> subsp. <i>pallida</i>	Gram (+)	M	E	Küresel	12.7-15.9	Golińska vd. 2016
<i>Proteus mirabilis</i>	Gram (-)	M	E ve I	Küresel	10-20	Samadi vd. 2009
<i>P. aeruginosa</i>	Gram (-)	M	E	Küresel, Disk	5-25	Kumar ve Mamidyala 2011, Otaqsara 2011, Srivastava ve Constanti 2012
<i>P. aeruginosa</i> BS-161R	Gram (-)	M	E	Küresel	13	Kumar ve Mamidyala 2010
<i>P. aeruginosa</i> DM1	Gram (-)	M	E	Küresel	45-100	Kumari vd. 2017
<i>P. aeruginosa</i> SN5	Gram (-)	M	E	-	35-60	Naik vd. 2017
<i>Rhodococcus</i> sp.	Gram (+)	M	I	Küresel	10-15	Otari vd. 2015
<i>Sinomonas mesophila</i> MPKL 26	Gram (+)	M	E	Küresel	4-50	Manikprabhu vd. 2016
<i>Sporosarcina koreensis</i> DC4	Gram (+)	M	E	Küresel		Singh vd. 2016
<i>S. aureus</i>	Gram (+)	M	E	Küresel	160-180	Nanda ve Saravanan 2009
<i>S. epidermidis</i>	Gram (+)	M	I	Küresel, Oval, Çubuk, Üçgen	10-80	Pourali vd. 2012, Rezvani Amin vd. 2016

Çizelge 2.1 AgNP’lerin sentezini gerçekleştiren çeşitli bakteriler [M: mezofil, T: termofil, I: intraselüler, E: ekstraselüler] (devam)

Bakteri İsmi	Gram Boyama	Gelişme Sıcaklığı	Gerçekleştiği Yer	Şekil	Boyut (nm)	Kaynak
<i>Streptacidiphilus</i> sp. CGG11n	Gram (+)	M	E	Küresel	4-45	Railean-Plugaru vd. 2016
<i>Streptacidiphilus durhamensis</i> HGG16n	Gram (+)	M	E	Küresel	8-48	Buszewski vd. 2018
<i>Streptococcus thermophiles</i>	Gram (+)	T	E	Küresel	28-122	El-Shanshoury vd. 2011
<i>Streptomyces</i> sp. 09 PBT 005	Gram (+)	M	E	Küresel	198-595	Saravana Kumar vd. 2015
<i>Streptomyces</i> sp. SS2	Gram (+)	M	E	Küresel	67.95 ± 18.52	Mohanta ve Behera 2014
<i>Streptomyces kasugaensis</i> M338-M1 ^T	Gram (+)	M	E	Küresel	13.2	Wypij vd. 2017
<i>Streptomyces glaucus</i>	Gram (+)	M	E	Küresel	4-25	Tsibakhashvili vd. 2011
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	Gram (+)	M	I	-	10-14	Priyadarshini vd. 2013
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Gram (+)	M	E	Küresel	20-30	Sadhasivam vd. 2010
<i>Thermoactinomyces</i> sp.	Gram (+)	T	E	Küresel	20-40	Deepa vd. 2013
<i>Ureibacillus thermosphaericus</i>	Gram (+)	T	E	Küresel	10-100	Juibari vd. 2011
<i>Weissella oryzae</i> DC6	Gram (+)	M	E ve I	Küresel	10-30	Singh vd. 2016

2.4 Bakteriyel AgNP'lerin Sentez Mekanizmaları ve Diğer Sentez Yöntemlerine Göre Avantajları

Bakterilerin nanopartikülleri nasıl ürettiğini anlamak için, öncelikle bakterilerin nanopartikülleri neden ürettiğini kavramak gerekir. Bakterilerin farklı çevresel stres koşullarında hayatta kalabilmek için geliştirdikleri bazı genetik ve biyokimyasal mekanizmalar bulunmaktadır. Gümüşün bakteriler için toksik olduğu bilinmektedir ve Ag^+ iyonlarının bakteriler üzerindeki toksisitesi bu stres koşullarından biridir (Alexander 2009, Javaid vd. 2018). Ag^+ elektron açısından zengin kükürt hidril (tiyol dahil) ve amin grupları içeren bir dizi biyolojik makromoleküle bağlanmakta ve bu proteinlerdeki sistein kalıntılarının yan zincirlerini hedef alarak disülfid bağlarına etki ederek proteinlerin üçüncül yapısının ve dolayısıyla işlevlerinin denatürasyonuna yol açmaktadır (Mijnendonckx vd. 2013). Bunun yanı sıra, Ag^+ iyonları DNA bazlarındaki heterosiklik aminlerle kompleks oluşturarak genetik materyallerin replikasyonunun ve transkripsiyonun bozulmasına neden olmaktadır (Prabhu ve Poulose 2012). Ag^+ toksisitesi, bakterilerde çeşitli direnç mekanizmalarının gelişmesine yol açmıştır. Strese maruz kalan bakterinin bu iyonu detoksifiye etmesi veya gidermesi bakterinin hayatta kalması için bir gerekliliktir. Bu süreçlerin AgNP'lerin biyoüretimi için önemli olduğu düşünülmektedir (Mabey vd. 2019). Bakterilerin AgNP'lerin sentez mekanizmaları hakkında yapılan çalışmalar Ag^+ iyonunun indirgenmesi ve detoksifikasyonunda NADH ve NAD(P)H'ye bağlı nitrat redüktaz ve nitroredüktaz A gibi nitratı nitrite indirgeyen çeşitli enzimlerin önemli role sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 2.4) (Anil Kumar vd. 2007, Shahverdi vd. 2007, Javaid vd. 2018). Nitrat redüktaz enzimleri dimetilsülfoksit redüktaz (DMSOR) enzim ailesinin bir parçasıdır ve hücrel konumlarına göre isimlendirilirler: disimilasyon periplazmik nitrat redüktazlar (Nap), solunum zarına bağlı nitrat redüktazlar (Nar) ve asimilasyon sitoplazmik nitrat redüktazlar (Nas) (Coelho vd. 2015). Enzimler nitratı nitrite indirmek için NAD(P)H'den yararlanmaktadır. Bunun için NAD(P)H bir hidrit iyonu (H^-) aracılığı ile redüktazın NAD(P)H bağlanma bölgesine iki elektron vermektedir. Elektronlar nitratın bulunduğu molibden aktif bölgesine (Mo aktif bölgesi) demir-sülfür kümesi aracılığıyla iletilmekte ve kovalent bağlanma gerçekleşmektedir. Bundan sonra nitrat, H^+ varlığında nitrit (NO_2^-) ve H_2O oluşturmak için redüksiyona uğramaktadır (Coelho vd. 2015, Mabey vd. 2019).



Şekil 2.4 Bakteriler tarafından NADH bağımlı nitrat redüktaz enzimi aracılığıyla gümüş nanopartiküllerinin üretim mekanizması (Javaid vd. 2018)

AgNP'lerin sentezinde kullanılan her yöntemin avantaj ve dezavantajları vardır. AgNP'lerin sentezinde en yaygın yöntemlerden biri olan kimyasal yöntemin en büyük dezavantajı, oldukça zararlı organik çözücülerini gerektirmesidir. Bu çözücülerin varlığı, sentezlenen nanopartiküllerin daha düşük biyoyumluluğa sahip olmasına neden olmakta ve bu da doğal uygulamalarını sınırlamaktadır (Park 2014, Khan vd. 2018). Fiziksel yöntemlerle sentez zararlı madde gerektirmez ve bu nedenle kimyasal olarak kirlenmemiş ve saf AgNP'ler elde edilebilmektedir (Tsuji vd. 2002). Ancak fiziksel yöntemde fırın tüplerinin kullanılmasının yüksek enerji tüketimi (Ge vd. 2014, Iravani vd. 2014, Wei vd. 2015), termal kararlılık için daha fazla zaman ve alan (Magnusson vd. 1999, Kruis vd. 2000, Ge vd. 2014) gerektirmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır. Biyolojik sentez yöntemleri, fiziksel ve kimyasal sentez yöntemlerine nazaran oldukça avantajlıdır (Javaid vd. 2018). AgNP'lerin biyolojik sentez kaynakları arasında bakteriler, sürdürülebilirliği, biyoyumluluğu, düşük maliyetli olması, stabilize edici ve indirgeyici ajanlar olarak biyopolimerlerin kullanılması sayesinde toksik olmaması, daha uzun süre daha yüksek stabilite göstermeleri ve endüstriye yönelik seri üretim için kolaylıkla kullanılabilmesi gibi benzersiz özellikleri sayesinde öne çıkmaktadır (Law vd. 2008, Manti vd. 2008, Saifuddin vd. 2009, Wei vd. 2015). Biyolojik sentez yöntemleri kendi içerisinde incelendiğinde, bitkisel kaynaklar kullanılarak gerçekleştirilen sentez çoğunlukla kısa

sürede tamamlanır fakat, gümüş iyonlarının indirgenmesinde flavonoidler, terpenoidler ve polifenoller gibi çoklu bileşenlerin kullanılması sonucu çoğunlukla biyolojik aktiviteyi olumsuz etkileyen polidispers AgNP'ler üretilebilmektedir (Chopade vd. 2012, Salunke vd. 2014). Biyolojik sentez yöntemleri arasında yaygın olarak kullanılan bitkisel kaynaklı sentezin diğer büyük dezavantajları ise, sentezin coğrafi ve mevsimsel farklılıklardan etkilenmesi, büyük çapta üretim söz konusu olduğunda geniş tarım alanlarına ihtiyaç duyulması ve çoklu ekstraksiyon adımları gerektirmesidir (Singh vd. 2013) Nanopartiküllerin mikrobiyal sentezi bu tür varyasyonlardan etkilenmemektedir (Salunke vd. 2014). Çeşitli araştırmalar, metalik nanopartiküllerin biyolojik üretiminde ağırlıklı olarak prokaryotlara odaklanmaktadır. Bakterilerin ekosistemdeki bollukları ve ekstrem koşullarda bile gelişebilmeleri öne çıkmalarını sağlayan önemli sebepler arasındadır. Bakterilerin üretiminde sıcaklık, pH, kültür ortamı, inkübasyon süresi ve oksijen koşulları gibi AgNP'lerin üretim miktarını ve üretilen AgNP'lerin boyutunu/şeklini etkileyen parametreler kolaylıkla optimize ve kontrol edilebilmektedir (Pantidos 2014). Bakterilerin son derece hızlı büyümeleri, kolay manipüle edilebilmeleri ve kullanım kolaylıkları, kontrollü nanopartikül büyümesi ve metal iyonlarının biyomineralizasyonuna olanak tanımaktadır (Pantidos 2014, Bao ve Lan 2019, Dhandapani vd. 2020).

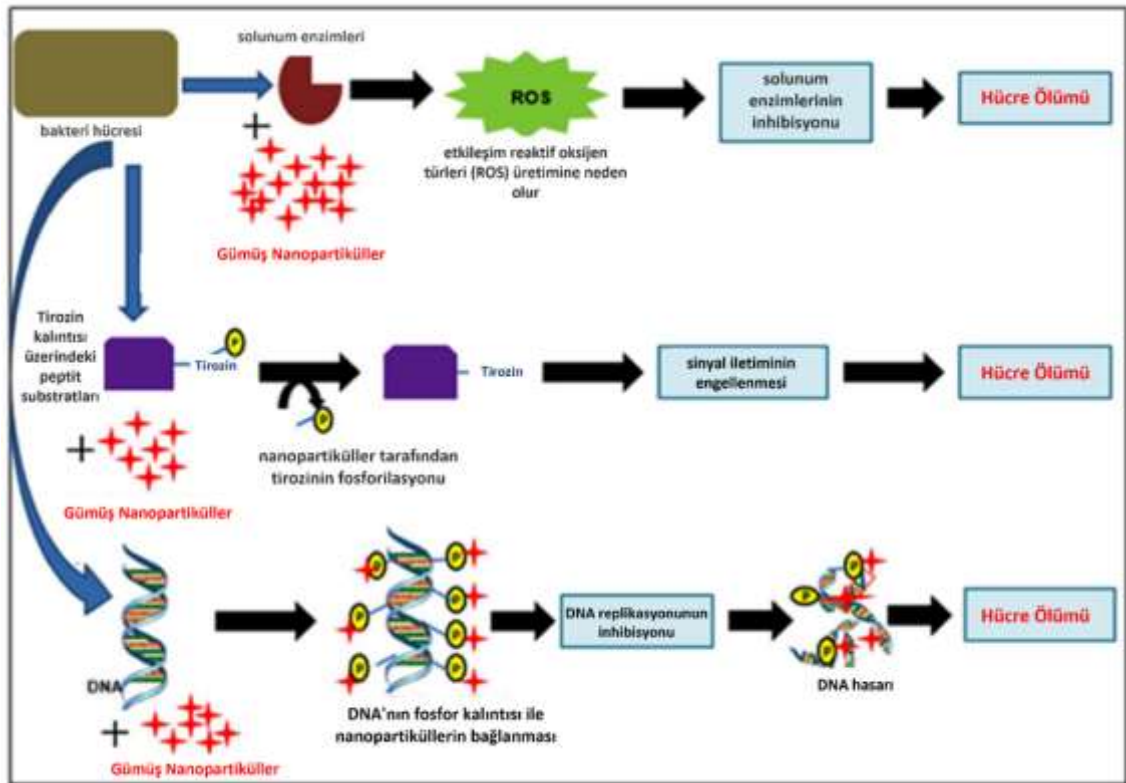
2.5 Gümüş Nanopartiküllerin Genel Uygulama Alanları ve Biyolojik Aktiviteleri

Gümüş nanopartiküller, antibakteriyel ve terapötik kullanım potansiyelleri sayesinde sıklıkla araştırılmaktadır. Bakterilerde geri dönüşü olmayan hasarlara neden olan reaktif oksijen türleri oluşturma yeteneğine sahip olan bu nanopartiküller ayrıca DNA veya RNA'ya bağlanmada güçlü bir afinite göstermektedir ve böylece mikrobiyal replikasyon sürecine müdahale etmektedir (dos Santos vd. 2014). Sergiledikleri güçlü antibakteriyel etkileri nedeniyle gümüş nanopartiküller, gelecekteki antimikrobiyal ajanlar için umut verici sonuçlar sunmaktadır (Zain vd. 2014). Antibakteriyel özelliklerinin yanı sıra yüksek çok yönlülükleri nedeniyle antiviral, antikanser ve antifungal gibi farklı özellikler sergileyerek, çeşitli canlı sistemlere karşı kullanılabilmektedirler (Pantidos 2014). Gümüş nanopartiküller, bu güçlü biyolojik etki özellikleri sayesinde en yaygın olarak kullanılan antienfeksiyon nanomalzemeler olarak bilinirler (Makvandi et al. 2020).

2.5.1 Gümüş nanopartiküllerin antibakteriyel özelliği

AgNP'ler sergiledikleri değerli fizikokimyasal ve antibakteriyel özellikleri sayesinde tıbbi ve farmasötik alanlardaki çalışmalar başta olmak üzere büyük ilgi görmektedir (Kumar vd. 2018). Gümüş ve gümüş nanopartiküllere ilgi, çoklu antibiyotiğe dirençli bakterilerin ortaya çıkması ve hastane kaynaklı bakteriyel enfeksiyonların artan prevalansı nedeniyle yükselmektedir (Khan vd. 2018). Mikrobiyal enfeksiyon, doku yenilenmesini bozmakta ve iyileşme için gereken süreyi uzatmaktadır (Jamaledin vd. 2020, Zare ve Makvandi 2020), bu durum, hastalarda yoğun ıstırap ve sıkıntıya neden olmakta ve sosyal sağlık sistemlerinden büyük miktarda kaynak tüketmektedir (Makvandi vd. 2019, Moeini vd. 2020, Wang vd. 2020). Bu nedenle, yeni antimikrobiyal özelliklere sahip bileşenlerin kullanılması oldukça önem arz etmektedir (Makvandi vd. 2020). Gümüş, antibakteriyel özelliklerinden dolayı özellikle antik çağlarda enfeksiyonları kontrol etmek için yaygın olarak kullanılmıştır. Fakat gümüş iyonlarının insanlar üzerindeki toksisitesi nedeniyle gümüşün kullanımı ciddi şekilde sınırlandırılmaktadır. Bu yüzden nanoteknoloji, giderek daha geniş yüzey alanı/hacim oranlarına, bakterilere karşı daha fazla etkinliğe ve en önemlisi insanlar için daha düşük toksisiteye sahip daha küçük gümüş nanopartiküllerin üretimine odaklanmaktadır. AgNP'ler bu geniş yüzeyalanı/hacim oranları ve kristalografik yüzey yapıları nedeniyle antibiyotiklere alternatif, potansiyel antibakteriyel ajanlar olarak değerlendirilmektedir (Zhang vd. 2016). AgNP'lerin sergiledikleri antibakteriyel aktiviteler sentez süreçleri, şekli, konsantrasyonu ve boyutlarına bağlıdır. Daha büyük yüzey alanı/hacim oranına sahip daha küçük boyutlu AgNP'ler, büyük partiküllerden daha etkili bir antibakteriyel aktivite göstermektedir (Khan vd. 2018). AgNP'lerin antibakteriyel ajanlar olarak kullanımıyla ilgili çeşitli mekanizmaların şematik gösterimi Şekil 2.5'te sunulmuştur. Gümüş nanopartiküller tipik olarak membran boyunca elektrostatik akışı engellemekte ve bu da bakterilerin membranının bozulmasına neden olmaktadır (Makvandi vd. 2020). Gümüş nanopartiküller bir bakteri hücresinden yaklaşık 250 kat daha küçük olduğu için, nanopartiküller bakteri hücre duvarına yapışmakta ve bu da hücre membran potansiyelinin kararsızlaşmasına, hücrede ATP seviyelerinin düşmesine ve hücresel sürecin engellenmesi sonucu hücre ölümünün gerçekleşmesine yol açmaktadır (Shrivastava vd. 2007, Li vd. 2010, Makvandi vd. 2020). Çeşitli araştırmalar, AgNP'lerin

bakteri hücre duvarında “çukur” veya “boşluk” oluşturarak buralarda biriktiğini, bu birikimin bakteri hücre zarının ve hücre duvarının geçirgenliğini bozduğunu ve sonunda bakterisidal aktiviteyi indüklediğini göstermektedir (Sondi ve Salopek-Sondi 2004, Li vd. 2010). AgNP’lerin bakteri hücrelerinde sitotoksisiteyi tetikleyen serbest radikallerin (ROS ve reaktif nitrojen türleri) oluşumuna yol açan redoks reaksiyonlarına katılarak bu sürece yardımcı olan genlerin ekspresyonunu artırdığı ve böylece mantar ve bakteri ölümüne yol açtığı bilinmektedir (Geethalakshmi ve Sarada 2013, Khan vd. 2018). Ayrıca, oksitlenmiş glutatyon, membran bozulmasına yol açarak lipid peroksidasyonunun artmasına ve böylece hücresel bileşenlerin sızmasına neden olabilmektedir (Piao vd. 2011). Son olarak, AgNP’ler DNA’da bulunan kükürt ve fosfor gruplarına bağlanarak DNA’nın çözülmesine neden olabilmekte ve bu da transkripsiyonel ve translasyonel bozulmaya yol açarak hücre ölümüne sebep olmaktadır (Khan vd. 2018).



Şekil 2.5 Gümüş nanopartiküllerin antimikrobiyal aktivite mekanizmasını gösteren diyagram (Khandel vd. 2018)

Yapılan bir çalışmada, deneysel kemik dokusu mühendisliği için geliştirilen enjekte edilebilir bir antienfeksiyon iskelesine antibakteriyel aktivite kazandırmak amacıyla mısır püskülü özü aracılığıyla AgNP'lerin sentezi gerçekleştirilmiştir (Makvandi vd. 2020). Bir çalışmada, AgNP'lerin *S. pyogenes*, *S. enterica*, *S. aureus* ve *E. faecalis*'e karşı önemli ölçüde etkili olduğu gösterilmiştir (Devi ve Joshi 2012). Shameli ve arkadaşları, disk difüzyon yöntemini kullanarak *S. aureus* ve *S. typhimurium* bakterilerine karşı AgNP'lerin boyuta dayalı antibakteriyel potansiyelini bildirmiştir. AgNP'lerin oldukça etkili olduğu ve her iki suşun da önemli ölçüde inhibisyonuna neden olduğu bulunmuştur. AgNP'lerin antibakteriyel potansiyelinin, nanopartiküllerin boyutuna bağlı olduğu, küçük partiküllerin büyük partiküllere kıyasla daha fazla bir temas yüzey alanına sahip olduğu için daha yüksek aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Shameli vd. 2012). Benzer şekilde, 20 nm'den küçük bir boyuta sahip AgNP'ler *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *Micrococcus luteus*'a karşı antibakteriyel özellikler sergilemiştir (Gade vd. 2010, Raheman vd. 2011). Başka bir çalışmada, küresel şekle sahip ve boyutları 5 ila 30 nm arasında değişen AgNP'lerin *B.cereus*, *Shigella* spp., *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* ve *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal aktivitesi gösterilmiştir (Rajkuberan vd. 2015). *K. pneumoniae*'nin kültür süpernatantlarından biyolojik olarak sentezlenen AgNP'lerle yapılan bir çalışmada, penisilin G, amoksisilin, eritromisin, klindamisin ve vankomisin gibi çeşitli antibiyotiklerin *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı etkinliklerinin AgNP'lerin varlığında arttığı rapor edilmiştir (Shahverdi vd. 2007). *S. aureus*'un kültür süpernatantları kullanılarak biyolojik olarak üretilen AgNP'ler, metisiline dirençli *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *S. typhi* ve *K. pneumoniae*'ye karşı önemli antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Nanda ve Saravanan 2009). Biyolojik sentez yöntemiyle elde edilen AgNP'lerin *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhi*, *M. luteus* ve *P. aeruginosa*'ya karşı inhibisyon zonları oluşturduğu rapor edilmiştir (Elangovan vd. 2015). Gurunathan ve arkadaşları AgNP'lerin önemli patojenik bakteriler olan *P. aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *S. aureus* ve *S. pneumoniae*'ye karşı antibakteriyel ve antibiyofilm aktivitesinin olduğunu bildirmiştir (Gurunathan vd. 2014).

AgNP'ler antimikrobiyal özellikleri sebebiyle özellikle tıp alanında, özellikle antibiyotik tedavisine yanıt vermeyen çoklu ilaca dirençli mikroorganizmalara karşı, sert ve yumuşak doku enfeksiyonlarının tedavilerinde kullanılmaktadır (Makvandi vd. 2020). Buna ek

olarak antiinflamatuvar yapılarının da son derece faydalı olabileceği bilinmektedir (Khan vd. 2018). Çeşitli çalışmalar, gümüş nanopartiküllerin güçlü bir antiinflamatuvar etki sergilediğini (Tian vd. 2007, Nadworny vd. 2008) ve yara iyileşmesini hızlandırdığını göstermektedir (Wright vd. 2002, Huang vd. 2007). Gerçekleştirilen çalışmalar, gümüş nanopartiküllerin varlığında yara iyileşmesinin hızlanmasının, lokal matriks metalloproteinaz aktivitesinin azalması ve yara içindeki nötrofil apoptozunun artması sonucu oluştuğunu göstermektedir (Khan vd. 2018). Çoğu yara, farklı patojenik mikroorganizmaların büyümesiyle enfekte olmaktadır. *S. aureus* ve *P. aeruginosa* fakültatif aerobikler grubuna giren ve gecikmiş yara iyileşmesinin başlıca nedenleri olarak kabul edilen patojenlerdir (Bowler vd. 2001). Bakteriyel AgNP'lerin benzersiz fizikokimyasal özellikleri, gümüşün etkinlik oranını artırmaya yardımcı olur ve AgNP'ler emdirilmiş yara örtü malzemeleri hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif patojenik mikroorganizmaların büyümesini engellemektedir (Madhumathi vd. 2010, Prabhu ve Poulouse 2012). Kremler ve merhemler gibi gümüş bazlı yara pansuman malzemeleri ve biyomedikal ürünler, farklı mikroorganizmalara karşı etkili antibakteriyel aktiviteleri nedeniyle halihazırda ticari olarak ilgi görmektedir (Kumar vd. 2018). Nanokristal gümüş yara örtüleri bir süredir ticari olarak mevcuttur ve yanıklar dahil olmak üzere toksik epidermal nekroliz (Asz vd. 2006), Stevens-Johnson sendromu (Yang vd. 2007), kronik ülser (Sibbald vd. 2007) ve pemfigus (Yang vd. 2007) gibi çeşitli yaraların tedavisi için klinik olarak kullanılmaktadır (Chen vd. 2006, Huang vd. 2007, Vlachou vd. 2007). Bir çalışmada, yara iyileştirme uygulamaları için antienfeksiyon kompozitleri olarak gümüş nanopartiküllerin gömüldüğü termosensitif hidrojel kullanılmıştır. Kontrol grubuna kıyasla biyokompozitin yara kapanmasını hızlandırdığı bildirilmiştir (Makvandi vd. 2019). Kurkumin gibi diğer doğal bileşikler de altın ve gümüş nanopartiküllerin biyosentezi için kullanılmıştır (Nambiar vd. 2018, Lyu vd. 2020). Gümüş nanopartiküller kaynayan sulu kurkumin çözeltisinde sentezlenmiş ve yara iyileştirme uygulamalarında kullanılmak üzere bakteriyel selüloza gömülmüştür. Kurkumin hidrofobik bir madde olduğundan ve suda iyi çözülmediğinden, siklodekstrinlerde mikrokapsüllenmiştir (Gupta vd. 2020). Bakteriyel selüloz, bakteriler tarafından sentezlenen ve biyolojik olarak parçalanabilen doğal bir selülozdur. Yüksek saflığı, toksik olmaması ve üstün fiziksel-mekanik özellikleri nedeniyle antibakteriyel tedavide ilgi çekmektedir. Bakteriyel selüloz/polianilin aerojelleri, polianilinin yerinde polimerizasyonu yoluyla farklı

miktarlarda gümüş nanoparçacıklar ile yüklenmiştir. Oluşturulan aerojel, *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı önemli antibakteriyel aktivite sergilemiştir. Polianilin ve bakteriyel selülozun AgNP'ler ile entegrasyonu, üçlü nanokompozitin hidrofilikliğini azaltmakta, bu da bakteriyel selülozun yüzeyinde hücre tutunmasının azalmasıyla sonuçlanmaktadır (Hosseini vd. 2020, Makvandi vd. 2020).

2.5.2 Gümüş nanopartiküllerin antifungal özelliği

Özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda, mantar enfeksiyonlarına sıklıkla rastlanmaktadır. Mantar kaynaklı enfeksiyonların üstesinden gelmek zor bir süreçtir, çünkü sınırlı sayıda antifungal ilaç mevcuttur (Kim vd. 2008). Bu yüzden, biyouyumlu, toksik olmayan ve çevre dostu içeriklerin geliştirilmesine karşı büyük bir ihtiyaç vardır. Bu noktada AgNP'lerin mantarların neden olduğu çeşitli hastalıklara karşı antifungal ajanlar olarak önemli bir rol oynamaktadır (Zhang vd. 2016). AgNP'ler mantarların membran bütünlüğünü bozarak veya normal tomurcuklanma sürecini engelleyerek hücre ölümünü gerçekleştirmektedir (Khan vd. 2018).

AgNP'lerin *Candida tropicalis*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* ve *Trichophyton mentagrophytes* gibi türlere karşı potansiyel aktiviteleri gösterilmiştir (Kim vd. 2008). Benzer şekilde, Velluti ve arkadaşları, AgNP'lerin *C. tropicalis*, *C. albicans* ATCC 10231, *Cryptococcus neoformans* ATCC 32264, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *A. fumigatus* ATCC 26934, *A. flavus* ATCC 9170, *A. niger* ATCC 9029, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* ATCC 997 ve *Microsporum gypseum* türlerine karşı etkili olduğunu bulmuştur (Velluti vd. 2014). Bir başka çalışmada, biyolojik olarak sentezlenen AgNP'lerin *Pleospora herbarum*, *Phoma glomerata*, *Fusarium semitectum*, *Trichoderma* spp. ve *C. albicans*'a karşı etkilerine ek olarak AgNP'lerin flukonazol ile bağlantılı olarak sinerjistik etkileri bildirilmiştir (Gajbhiye vd. 2009). Jo ve arkadaşları, iki bitki patojeni mantarı olan *Magnaporthe grisea* ve *Bipolaris sorokiniana*'ya karşı gümüş nanopartiküllerin antifungal potansiyelini göstermiştir. AgNP'lerin ftalazin, tiazolidin, hidrazid, pirazolo, tetrazolo ve piridazin türevleri gibi çeşitli heterosiklik bileşiklerle kombinasyonları sonucunda *C. albicans* ve *A. flavus*'a karşı fungisidal potansiyele sahip olduğu bulunmuştur (Jo vd. 2009). Biyolojik yöntemlerle sentezlenen AgNP'ler,

Alternaria alternata, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* ve *Curvularia lunata* dahil olmak üzere çeşitli fitopatogenik mantarlara karşı antifungal aktivite sergilemiştir (Krishnaraj vd. 2012, Monteiro vd. 2012). Benzer şekilde, *Bacillus* türleri tarafından sentezlenen AgNP'ler, bitkiler için patojenik bir mantar olan *Fusarium oxysporum*'a karşı güçlü antifungal aktivite sergilemiştir (Gopinath ve Velusamy 2013). AgNP'ler sadece insan ve bitki patojenik mantarlarına karşı değil, aynı zamanda agar ortamında kültürü yapılan *Penicillium brevicompactum*, *A. fumigatus*, *Cladosporium cladosporoides*, *Chaetomium globosum*, *Stachybotrys chartarum* ve *Mortierella alpin* gibi mantar türlerine karşı da inhibe edici etkiler göstermiştir (Ogar vd. 2015).

2.5.3 Gümüş nanopartiküllerin antiviral özelliği

Viral hastalıkların dünya çapında oldukça yaygın olmasından kaynaklı olarak doğal antiviral ajanların geliştirilmesi önem ve ihtiyaç arz etmektedir (Zhang vd. 2016). AgNP'ler bakterisidal potansiyelleri nedeniyle halihazırda antimikrobiyal ajanlar olarak büyük ilgi görürken, AgNP'ler dahil çeşitli metal nanopartiküllerin yeni antiviral ajanlar olarak kullanılabilimleri araştırılmaktadır (Khan vd. 2018). Biyolojik olarak sentezlenen AgNP'lerin boyutuna ve zeta potansiyeline bağlı olarak, herpes simpleks virüsü (HSV) tip 1 ve 2 ve insan parainfluenza virüsü tip 3'te canlılığı inhibe ederek enfeksiyonu azaltma potansiyeli sergilediği gösterilmiştir (Gaikwad vd. 2013). Bir başka çalışmada, AgNP'lerin, insan immün yetmezlik virüsüne (HIV) ve hepatit B virüsüne (HBV) karşı etkili inhibitör aktiviteleri çalışılmıştır (Xiang vd. 2011). Bu bağlamda AgNP'lerin viral replikasyonun erken bir aşamasında anti-HIV aktivitesini gösteren bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Polivinil pirolidon (PVP) kaplı AgNP'lerin, hücre bağlantılı HIV-1 ve hücre dışı HIV-1 izolatlarının bulaşını engellediği bulunmuştur (Lara vd. 2010). AgNP'lerin antiviral etkisini araştıran bir çalışmadan elde edilen veriler HIV-1'in hem makrofaj (M)-tropik hem de T-lenfosit (T)-tropik suşlarının AgNP'lerle kaplı poliüretan prezervatife (PUC) karşı oldukça duyarlı olduğunu göstermiştir (Mohammed Fayaz vd. 2012). Tannik asitin aracılık ettiği AgNP'lerin sentezi sonucu, çeşitli boyutlarda sentezlenen AgNP'lerin HSV-2 enfektivitesini azalttığı, virüs bağlanmasını, penetrasyonunu ve yayılmasını engellediği gösterilmiştir (Orlowski vd. 2014). Vero

hücrelerinin AgNP'lerin sitotoksik olmayan konsantrasyonları ile gerçekleştirilen tedavisinin, Peste des petits ruminant virüsünün (PPRV) replikasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği bulunmuştur. Bahsi geçen viral replikasyonu önlenme mekanizmaları, AgNP'lerin sitotoksik olmayan virion yüzeyi ve virion çekirdeği ile etkileşiminden kaynaklanmaktadır (Khandelwal vd. 2014). Fasulye Sarısı Mozaik Virüsünde (BYMV) 24 saat süren AgNP'lerin tedavisinin, virüs konsantrasyonunu, enfeksiyon yüzdesini ve hastalık şiddetini azalttığı rapor edilmiştir (Elbeshehy vd. 2015). Viral enfeksiyon esnasında, virüs önce konakçı hücre ile temas eder ve ardından yaşamsal materyalini bağlanma ve füzyon yoluyla hücrelere aktarır. Mekanizma tam olarak anlaşılmamasına rağmen, AgNP'lerin hücrelerde viral yüzey glikoproteinleri ile etkileşime girerek müdahale ettiği düşünülmektedir. Ayrıca, AgNP'lerin HIV-1'in yaşam döngüsü aşamalarını da engellediği rapor edilmiştir. Bu olayın arkasındaki mekanizma, AgNP'lerin fonksiyonel HIV-1 proteinlerini bloke etmesine, kükürt ve fosforlu genetik materyal gruplarına doğrudan bağlanarak ters transkripsiyon oranlarını azaltmasına dayanmaktadır (Khan vd. 2018).

2.5.4 Gümüş nanopartiküllerin antikanser özelliği

Farklı şekil ve boyutlardaki AgNP'lerin, farklı dozlarda ve farklı hücrelere uygulandığında elde edilen sonuçların oldukça değişken olduğunu kanıtlayan pek çok çalışma mevcuttur (Khan vd. 2018). AgNP'lerin yüzey kimyası, boyut, boyut dağılımı, şekil, partikül morfolojisi, partikül bileşimi, kaplama/kapaklama ajanları, aglomerasyon, çözünme hızı, çözeltideki partikül reaktivitesi, iyon salınımının etkinliği, hücre tipi ve sentez için kullanılan indirgeyici ajanlar gibi fiziksel ve kimyasal özellikleri sergileyecekleri sitotoksitenin belirlenmesi için çok önemli faktörlerdir (Carlson vd. 2008, Zhang vd. 2011, Sriram vd. 2012, Gliga vd. 2014). AgNP'lerin yüzey yükleri hücrelerdeki toksisite etkisini belirleyebilmektedir. AgNP'lerin çoklu dokulardaki dağılımı göz önüne alındığında, çalışmalar hücre tiplerinin AgNP'lere verilen yanıtları etkileyebileceğini ortaya koymaktadır (Zhang vd. 2016). Günümüzde farklı kanser türleri üzerinde birçok kemoterapötik ajanın kullanılıyor olmasına rağmen, kemoterapötik ajanların yan etkileri oldukça fazladır (Thorley ve Tetley 2013). Bu nedenle sistemik yan etkilerden kaçınmak için farklı teknolojilerin geliştirilmesi önem kazanmaktadır. Birçok

araştırmacı, tümör hücrelerini hedefleyebilecek formülasyonlar oluşturmak için alternatif bir araç olarak nanomalzemelerin geliştirmesi ve kullanılmasıyla ilgilenmektedir (Zhang vd. 2016). AgNP'ler antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri nedeniyle sıklıkla çalışılmakla birlikte, doğal sentez yöntemleriyle sentezlenen AgNP'lerin genotoksitesini ve sitotoksitesini değerlendiren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Khan vd. 2018, Husain vd. 2023). AgNP'lerin antikanser potansiyeli hakkında mevcut literatür, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunun AgNP'lerin kanser hücreleri ile etkileşiminin bir sonucu olduğunu göstermektedir. Çok sayıda çalışma, hücrelerin içinde ROS oluşumuna bağlı olarak AgNP'lerin ve AuNP'lerin kanser hücreleri üzerindeki antitümör aktivitesini öne sürmektedir (Franco-Molina vd. 2010, Zhang vd. 2013). Doğal sentez yöntemi olan biyosentez ile sentezlenen AgNP'lerin ROS oluşumu yoluyla DNA, proteinler ve çeşitli hücresel organellerle etkileşime girdiğini ve tümör hücrelerinde nekroz ve apoptozu indüklediğini rapor etmiştir (Durán vd. 2010). Çalışmaların tümü, AgNP'lerin ROS üretimi, laktat dehidrojenaz sızıntısının artması, apoptoz ve otofaji genlerinin düzenlenmesi, endoplazmik retikulum stresi, mitokondriyal işlev bozukluğu, kaspazların aktivasyonu ve DNA hasarı gibi çeşitli işlemlere katılarak hücre ölümünü indükleyebileceğini göstermektedir (Zhang vd. 2016). AgNP'lerin sitotoksite ve genotoksitesinin AgNP'lerin sentezlenme aşamasındaki parametrelere bağlı olduğu düşünülmektedir. Yüzey kimyası, AgNP'lerin hedef tümör hücreleriyle olan etkileşimini etkileyen parametrelerden biridir. AgNP'lerin tümör bölgesini spesifik olarak hedefleyebilmeleri için yüzey yüklerinin negatif veya nötr olması gerekmektedir. Ek olarak, parçacık boyutları da spesifik tümör bölgesini hedeflemede çok önemli bir faktördür (Zhang vd. 2016, Gurunathan vd. 2019).

Bu kapsamda AshaRani ve arkadaşları insan akciğer fibroblast hücresi olan IMR-90 ve insan beyin kanseri hücreleri U251 kullanarak nanoparçacık kaynaklı etkilerin hücresel ve moleküler mekanizmalarını araştırmıştır. AgNP'lerin yüzeylerinde hücre içi faktörlerin işlevini etkileyebilecek sitozolik proteinleri adsorbe edebildiklerini ve böylece gen ekspresyonunu ve proinflamatuvar sitokinleri düzenleyebildiklerini bulmuşlardır (AshaRani vd. 2012). *Vitex negundo* ve *Sesbania grandiflora*'nın yaprak ekstraktlarından sentezlenen AgNP'lerin, insan kolon kanseri hücre hattı olan HCT-15 ve insan meme kanseri hücre hattı olan MCF-7'ye karşı antiproliferatif etkiler gösterdiği, DNA sentezini

azalttığı ve apoptozu indüklediği bulunmuştur. Benzer şekilde, *S. grandiflora*'dan elde edilen AgNP'lerin de tümör hücrelerinde sitotoksikite, oksidatif stres ve apoptozu neden olduğu rapor edilmiştir (Jeyaraj vd. 2013, Prabhu vd. 2013). Bir başka çalışmada, AgNP'lerin ROS oluşumu yoluyla insan epidermoid larenks Hep-2 hücre hattında hücre hasara neden olduğu gösterilmiştir (Jacob vd. 2012). Doğal sentez yöntemleri kullanılarak bakteriyel ve mantar ekstraktlarından biyolojik olarak üretilen AgNP'lerin, insan meme kanseri MDA-MB-231 hücreleri üzerinde antikanser özellik sergiledikleri gösterilmiştir (Gurunathan vd. 2013). Benzer şekilde, *E. fergusonii*'den sentezlenen AgNP'ler, insan meme kanseri hücresi olan MCF-7 hücrelerine karşı doza bağlı sitotoksikite sergilemiştir (Gurunathan vd. 2013). Yine bir çalışmada, *Moringa olifera*'nın kök kabuğu ekstresinden elde edilen AgNP'lerin HeLa hücrelerinde ROS üretimi yoluyla apoptozu indüklediği raporlanmıştır (Vasanth vd. 2014). Bunların yanı sıra, AgNO₃ ve AgNP'lerin sırasıyla H-ras 5RP7 hücrelerinde ve rahim ağzı kanserinde sitotoksik, antiproliferatif ve apoptotik özellik için güçlü potansiyellere sahip olduğu gösterilmiştir (Kaplan vd. 2016, Pandurangan vd. 2016). Kanser hücrelerine karşı AgNP'lerin denendiği bir çalışma, AgNP'lerin apoptoz indüksiyonu yoluyla HepG2 hücrelerinin büyümesini etkili bir şekilde inhibe ettiğini göstermiştir (Guo vd. 2015).

2.5.5 Gümüş nanopartiküllerin antiprotozoal özelliği

Protozoal vektör kaynaklı hastalıklar, gelişmiş ülkelerdeki en yaygın ve önemli enfeksiyonlardır (Kamareddine 2012). WHO'ya göre, Leishmaniasis en bulaşıcı altıncı hastalıktır. Leishmaniasis, 1.5 milyon kutanöz leishmaniasis vakası ile dünya genelinde en yaygın tropikal enfeksiyonlardan biridir (Marr vd. 2012, Nadhman vd. 2014). Dünya çapında yıllık bir milyondan fazla sıtma kaynaklı ölüm yaşanmaktadır (Kamareddine 2012). Araştırmacılar, bu tip protozoal hastalıkları kontrol edebilmek için yenilikçi yaklaşımlar keşfetmeye çalışmaktadır. Bu hususta AgNP'ler de değerlendirilmiş ve umut verici potansiyellere sahip oldukları bildirilmiştir (Khan vd. 2018).

Fusarium oxysporum kullanılarak AgNP'ler sentezlenen bir çalışmada AgNP'lerin *Leishmania amazonensis* promastigotlarına karşı hem *in vitro* hem de *in vivo* potansiyelleri gösterilmiştir. Ayrıca çalışmada biyolojik ve kimyasal olarak sentezlenen

AgNP'ler karşılaştırılmış ve elde edilen sonuçlar, biyosentezlenmiş AgNP'lerin daha aktif olduğunu göstermiştir (Rossi-Bergmann vd. 2012). Başka bir çalışmada, *Cassia occidentalis* tarafından biyolojik olarak sentezlenen AgNP'lerin yüksek antimalaryal potansiyeli rapor edilmiştir. AgNP'ler, klorokine duyarlı ve dirençli *Plasmodium falciparum* ve sıtma vektörü *Anopheles stephensi*'ye karşı antiprotozoal etkiler sergilemiştir (Ajitha vd. 2015).

2.5.6 Gümüş nanopartiküllerin antiinflamatuvar özelliği

Enflamasyon, proinflamatuvar sitokinlerin artan üretimi, bağışıklık sisteminin aktivasyonu, prostaglandinlerin ve tamamlayıcı faktörler, interlekin-1 (IL-1), TNF- α ve TGF- β gibi kemotaktik maddelerin salınması ile desteklenen, doku tarafından yabancı maddelere karşı erken bir immünolojik yanıttır (Witte vd. 1997, Eming vd. 2007). İnflamatuvar etkinin üstesinden gelmek için etkili antiinflamatuvar ajanlar bulunması gerekmektedir. AgNP'ler son zamanlarda antiinflamatuvar ajanlar olarak önemli bir rol oynamaktadır (Zhang vd. 2016).

Bhol ve Schechter sıçandaki antiinflamatuvar aktiviteyi bildirmiştir. AgNP'lerle tedavi edilen fareler, doza bağlı olarak meydana gelen hızlı iyileşme sergilemiştir. Ek olarak, AgNP'ler önemli antimikrobiyal özellikler, yara iltihabında azalma ve fibrojenik sitokinlerin modülasyonunu göstermiştir (Bhol ve Schechter 2007, Tian vd 2007). Wong ve arkadaşları, hem *in vitro* hem de *in vivo* modellerde kullandıkları AgNP'lerin antiinflamatuvar özelliklerini araştırmış ve AgNP'lerin inflamatuvar belirteçlerin miktarını azalttığını bulmuşlardır. Bu da AgNP'lerin yara iyileşmesinin erken evrelerindeki inflamatuvarı baskılayabileceğini düşündürmüştür (Wong vd. 2007). Bir başka çalışmada, AgNP'ler ile tedavinin inflamatuvar hücrelerde apoptozu önemli ölçüde artırdığı ve proinflamatuvar sitokinlerin seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (Nadworny vd. 2010).

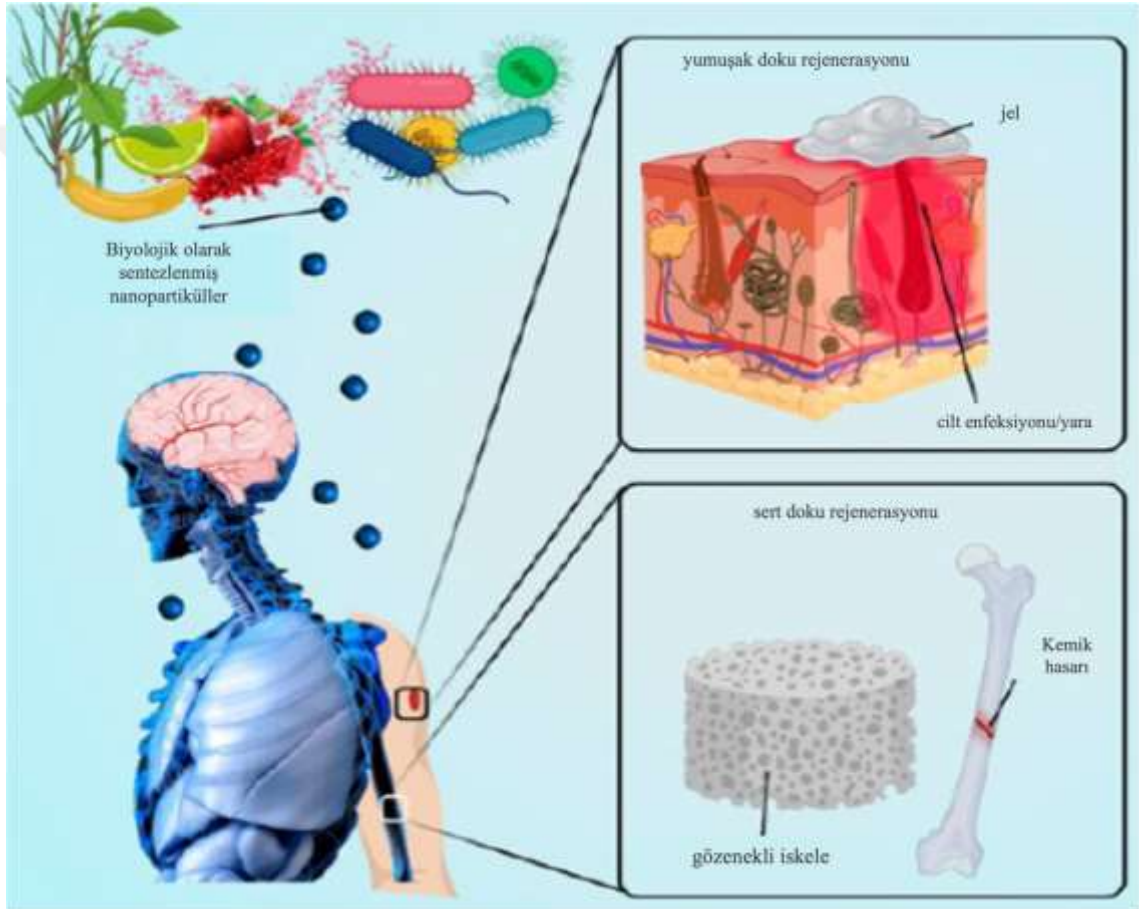
2.6 Gümüş Nanopartiküllerin Medikal Kullanımları

Farklı patojenik bakterilerin neden olduğu çeşitli bulaşıcı hastalıklar ve artan antibiyotik direnci sebebiyle, birçok ilaç şirketi ve araştırmacı, gelişmiş antibakteriyel aktiviteye ve azaltılmış yan etkilere sahip yeni malzemeler bulmak için çalışmaktadır. Antibiyotikler, dirençli mikroorganizma türlerinin gelişmesi nedeniyle etkinliklerini kaybetmektedir (Gong vd. 2007, Khan vd. 2018). Nano ölçekli malzemeler özellikle AgNP'ler, yüksek yüzey alanı/hacim oranı, farklı fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle yeni antimikrobiyal ajanlar olarak büyük ilgi görmektedir (Butler vd. 2015, Zhang vd. 2016).

Nanopartiküllerin sentezlenme şekli ile potansiyel kullanımları birbiriyle bağlantılıdır (Pantidos 2014). Nanopartikül sentezinde kimyasal teknikler, düşük maliyetli ve yüksek hacimli olarak kabul edilmeleri sebebiyle en yaygın kullanılan tekniktir. Fakat toksik çözücülerin kullanıldığı bir yöntem olan kimyasal sentez ile üretilen nanopartiküllerin, bu çözücülerden ve kimyasallardan kaynaklanan kontaminasyon sebebiyle biyomedikal uygulamalarda kullanım potansiyelleri oldukça sınırlıdır (Li vd. 2011). Doğal ortamlarda gelişen organizmalar, mükemmel terapötik potansiyele sahip biyouyumlu nanopartiküller üretmektedirler (Mohanpuria vd. 2008). Bitki özleri veya mikroorganizmalarla sentezlenen nanopartiküller, sentez sırasında ikincil metabolitlerin dahil edilmesi nedeniyle terapötik ajanlar olarak oldukça değerlidir. Biyosentezlenmiş AgNP'ler, biyouyumlulukları, yenilenebilirlikleri ve organik solvent içermeyen içeriklere sahip olmaları nedeniyle biyomedikal uygulamalar için ideal bir seçenek oluşturmaktadırlar. Bu nanopartiküllerin antimikrobiyal terapi, yumuşak ve sert doku mühendisliği dahil rejeneratif tıp uygulamaları vurgulanmaktadır (Şekil 2.6) (Giri vd. 2019, Makvandi vd. 2019, Zheng vd. 2019, Makvandi vd. 2020).

AgNP'lerin son derece güçlü geniş spektrumlu antibakteriyel (Manikandan vd. 2015, Sre vd. 2015), antifungal (Malachová vd. 2011), antiviral (Mohammed Fayaz vd. 2012), antiprotozoal (Adhikari vd. 2013) ve antikatalitik (Bindhu ve Umadevi 2015) özellikleri, bandajlar, kateterler, kanla temas eden implantlar, kardiyovasküler implantlar, antiseptik püskürtücüler, endodontik dolgu malzemeleri, çeşitli dişçilik aletleri, kontakt lenslere ek olarak kanser tedavisinde ve tıbbi görüntülemede dahil pek çok biyomedikal ürünün

geliştirilmesinde değerlendirilmektedirler (Kumar vd. 2018, León vd. 2019, Makvandi vd. 2020). Kanser; kemoterapi, hormon tedavisi, cerrahi operasyonlar, radyasyon, bağışıklık tedavisi ve hedefe yönelik tedavi dahil çeşitli yöntemlerle tedavi edilmektedir (Zhang vd. 2016). Kanserde metastaz ve antikanser ajanlara karşı direncin gelişmesi onkologlar ve klinisyenler için büyük zorluklar doğurmakta, ancak bu problem günümüzde nano ölçekli materyaller, özellikle AgNP'ler ile aşılabilmektedir (Elangovan vd. 2015).



Şekil 2.6 AgNP'lerin rejeneratif tıp uygulamaları (Makvandi vd. 2020)

2.6.1 Gümüş nanopartiküllerin kardiyovasküler malzemelerde kullanımı

Kalpdeki antitrombojenik ve antibakteriyel aktiviteleri artırmak amacıyla AgNP'ler ve elmas benzeri karbon yüzey kaplamalı kalp kapakçıkları tasarlanmaktadır (Deb vd. 2015). Partikül içerikli, çok katmanlı filmler oluşturulmakta ve bunların antibakteriyel, mekanik

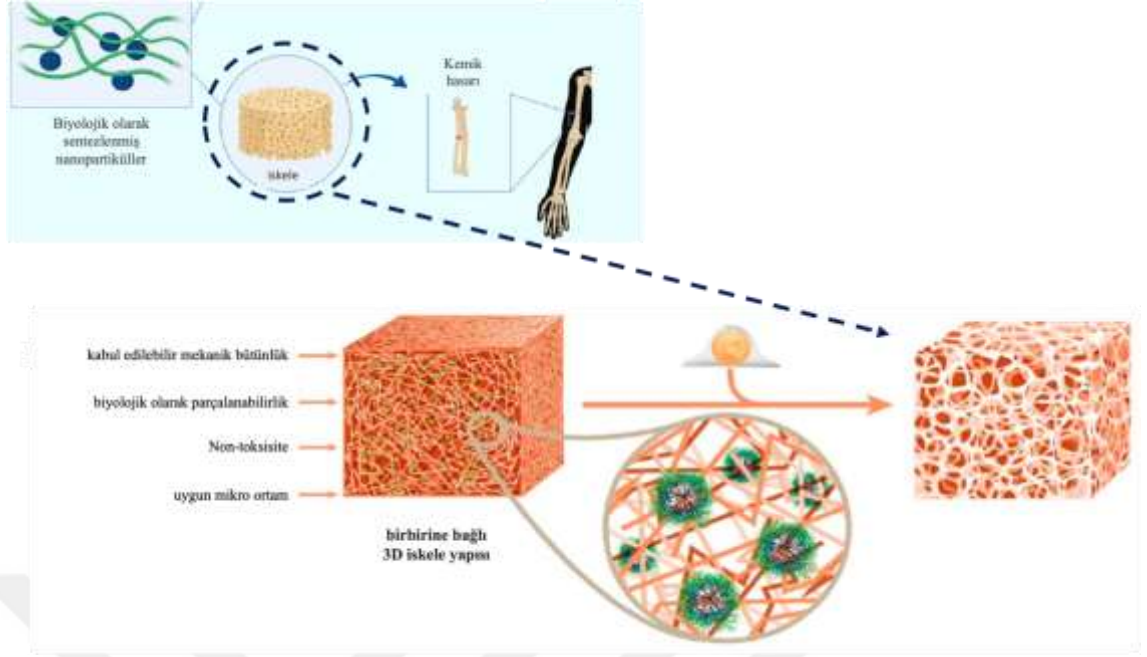
ve hemodinamik özellikleri *in vitro* olarak kardiyovasküler implantlarda kullanılmak üzere araştırılmaktadır (Ge vd. 2014).

2.6.2 Gümüş nanopartiküllerin cerrahi kateterlerde kullanımı

Kateterler, idrar veya diğer atık ürünlerin vücuttan atılması için insan vücuduna yerleştirilen esnek uzun tüplerdir. Tıp alanında kullanılan en yaygın kateter türleri santral venöz kateterler ve beyin cerrahisi kateterleridir. AgNP'ler, yarayı çevreleyen bakteriyel aktivitenin önlenmesi ve ameliyattan kaynaklanan enfeksiyonun önlenmesi amacıyla yara yüzeyiyle direkt temasta olan kateterlerde kullanılmaktadır (Namasivayam vd. 2013).

2.6.3 Gümüş nanopartiküllerin sert doku mühendisliğinde kullanımı

Kemik dokusu mühendisliğinde hücrelerin işlevsel bir dokuya dönüşmesi için 3 boyutlu, birbirine bağlı bir yapı sağlayan iskeleler kullanılmaktadır. 3 boyutlu iskeleler, kabul edilebilir mekanik bütünlüğe sahip ve biyolojik olarak parçalanabilir olmakla birlikte, toksik olmamalı ve doku rejenerasyonu için optimal bir mikro çevre sağlamalıdır (Makvandi vd. 2020, Zhou vd. 2020). Hücre büyümesini yönlendirmek için 3 boyutlu bir mimariye sahip olmalı ve bu mimari besinlerin ve oksijenin birbirine bağlı gözenekli yapıya nüfuz etmesine izin vermelidir. Bu gözenekli yapı hücrelerin bağlanmasını, göç etmesini, çoğalmasını ve farklılaşmasını da sağlamaktadır (Lim vd. 2017). Kemik dokusu mühendisliği iskeleleri, kemik greftleri ve kemik implantları yapımında metal nanopartiküllerin antibakteriyel ve antioksidan özelliklerinden yararlanılmaktadır (Şekil 2.7) (Makvandi vd. 2020).



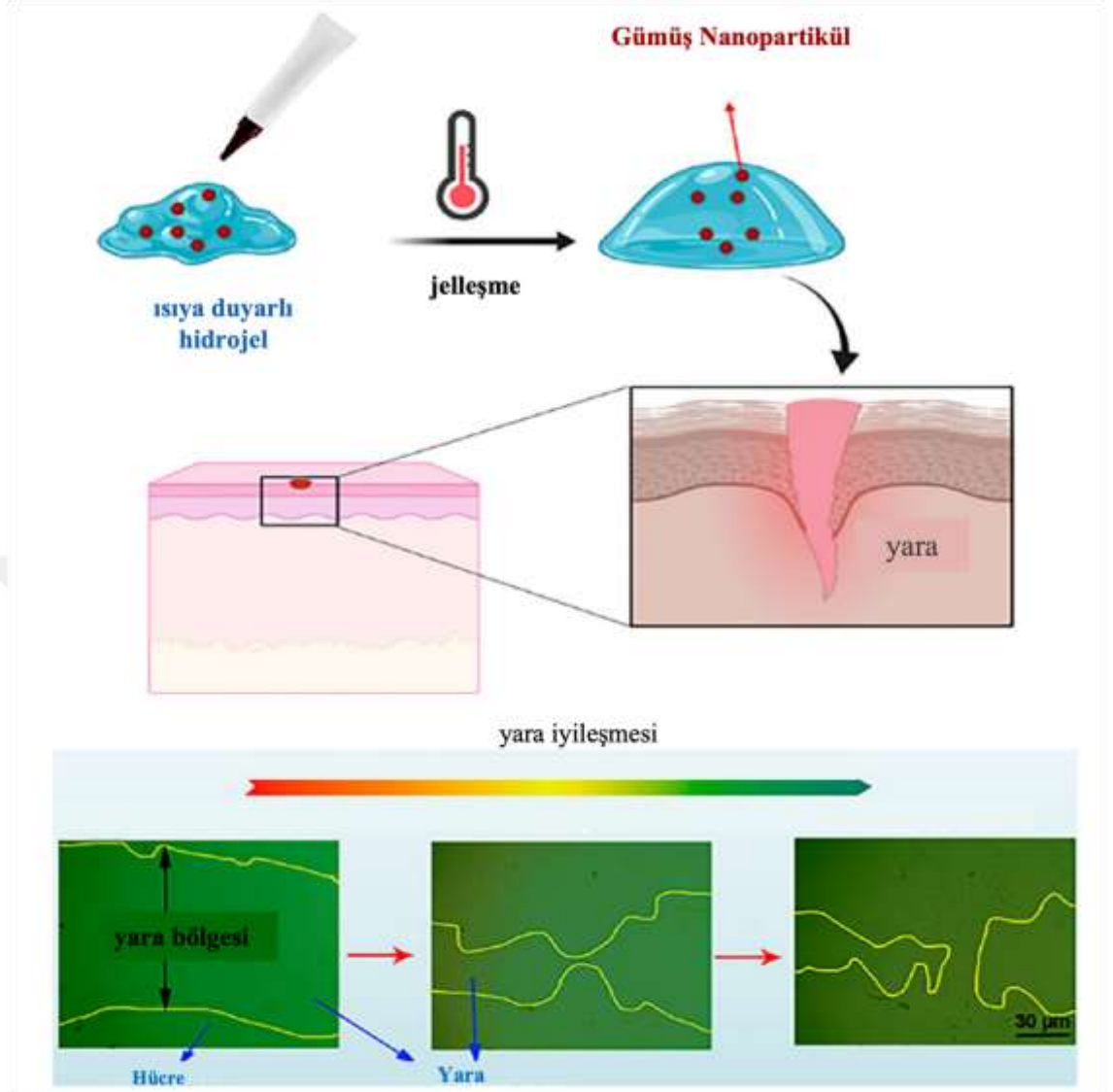
Şekil 2.7 Hücrelerin işlevsel bir dokuya dönüşmesi için 3 boyutlu bir yapı sağlayan ideal bir iskelenin şematik gösterimi (Makvandi vd. 2020)

Kemik dokusu mühendisliği için geliştirilen enjekte edilebilir bir antienfeksiyon iskelesine antibakteriyel aktivite kazandırmak amacıyla, mısır püskülü özü kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin uygulandığı bir çalışma bulunmaktadır. Biyolojik olarak sentezlenen AgNP'ler antibakteriyel aktivite ve düşük sitotoksisite sergilemiştir (Makvandi vd. 2020). Hidroksiapatit (HAP), doğal kemiğin ana mineral bileşeni olan karbonatlı apatitin bir analogudur. Hidroksiapatit doku mühendisliği uygulamalarında yapı iskelelerine sıklıkla dahil edilmektedir (Yao vd. 2017, Hidouri vd. 2019). Kontrol edilebilir boyut ve şekilde farklı hidroksiapatit nanoyapıları üretilmiştir (Mohandes ve Salavati-Niasari 2014). Üretilen farklı hidroksiapatitler, yapılarına antibakteriyel ve antifungal aktivite gibi ek özellikleri dahil etmek ve performanslarını artırmak için metal nanopartiküllerle modifiye edilmiştir (Mohandes ve Salavati-Niasari 2014, Makvandi vd. 2018). Örneğin, nanopartikül katkılı hidroksiapatit, kemik doku mühendisliği için deneysel yapı iskeleleri olarak geliştirilmiştir (Das vd. 2018, Makvandi vd. 2020). Başka bir çalışmada, yüzey modifikasyonu yoluyla hidroksiapatitin yapışmasını iyileştirmek için hidroksiapatit yüzeyine AgNP'ler eklenmiştir. Nanopartiküller için indirgeyici ve stabilizatör olarak polidopamin kullanılmıştır (Das vd. 2018). AgNP'ler, osteojenik farklılaşmayı ve mezenkimal kök hücrelerin çoğalmasını iyileştirmiştir ve böylece kemik

kırığı iyileşmesini desteklemiştir (Hu vd. 2019). *Opuntia* kaktüsü kaynak olarak kullanılarak sentezlenen AgNP'lerle kemik dokusu mühendisliği için HAP/AgNP kompozitleri üretilmiştir (Lozoya-Rodriguez vd. 2017).

2.6.4 Gümüş nanopartiküllerin yumuşak doku mühendisliğinde kullanımı

Enfeksiyon, doku mühendisliğinde karşılaşılan çözülmemiş bir problemdir. Mikrobiyal enfeksiyon, doku yenilenmesini bozarak iyileşme için gereken süreyi uzatmaktadır (Jamaledin vd. 2020, Zare ve Makvandi 2020). Bu sorun, hastalarda yoğun ıstırap ve sıkıntıya neden olurken, sosyal sağlık sisteminden de büyük miktarda kaynak tüketmeye neden olmaktadır (Makvandi vd. 2019, Moeini vd. 2020, Wang vd. 2020). Biyolojik olarak sentezlenen AgNP'ler, güçlü antibakteriyel, antifungal ve antiviral özelliklerine ek olarak biyouyumlu olmaları ve gelişmiş doku rejenerasyonu yeteneklerinden dolayı yumuşak doku mühendisliğinde açık ara en yaygın olarak kullanılan antienfeksiyon nanopartiküllerdir (León vd. 2019, Makvandi vd. 2020). Mikrobiyal patojenlerle, özellikle antibiyotik tedavisine yanıt vermeyen çoklu ilaç dirençli mikroorganizmalarla mücadele eden bu yapılar oldukça dikkat çekmektedir. Nanopartikül bazlı tedavilerin yara iyileşmesinde geniş bir uygulama alanı vardır ve nanopartiküllerin yara iyileşmesinde uygulanması iki farklı tedavi stratejisinden biriyle gerçekleştirilmektedir; bunlardan ilkinde AgNP'lerin sahip olduğu özellikler kremler, merhemler ve yara pansuman malzemeleri gibi nanopartikül bazlı biyomedikal yara ürünleri içeriklerine katılarak yarayı iyileştirmek için kullanılırken, ikinci stratejide ise nanopartikül, farmasötik olarak aktif bileşikleri yara bölgesine iletmek için bir taşıyıcı molekül olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.8) (Kalashnikova vd. 2015, Kumar vd. 2018).



Şekil 2.8 AgNP içeren ısıya duyarlı hidrojel­lerin yara iyileştirme uygulamaları için jelleştirilmesi ve yara kapanmasını göstermek için *in vitro* hücre göçü deneyi (Makvandi vd.2020)

Birçok dejeneratif hastalık, serbest radikallerin zararlı etkileriyle ilişkilidir. Bu hastalıklar arasında inflamatuvar eklem hastalığı, senil demans, göz bozukluğu, kardiyovasküler hastalıklar, Alzheimer ve Parkinson en yaygın görülenlerdir. Ayrıca oksidatif stres yanıklar, toksik epidermal nekroliz ve pemfigus gibi klinik cilt yaralarındaki iyileşme hızını azaltmaktadır (Ramanathan ve Gopinath 2017, Makvandi vd. 2020). Oksidatif stresi etkisiz hale getirmek için insan vücudu, hücreleri reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerine karşı koruyan antioksidanlara gereksinim duyar. Antioksidanlar, iyileşme sürecini hızlandırmak ve söz konusu hastalıklar çok fazla ilerlemeden önce serbest

radikalleri etkisiz hale getirmek için oldukça önemlidir. Biyolojik yöntemler ile doğal olarak üretilen AgNP'ler yüksek antioksidan özellikler sergileyebilmektedir (Dhandapani vd. 2020, Shah vd. 2020). Yara iyileşmesi, doku bütünlüğünün geri kazanılmasında vasküler ve immün hücreler arasındaki koordinasyonu içeren inflamatuvar sürecin önemli bir yönüdür (Manikandan vd. 2019, Tahvilian vd. 2019). Makrofajlar, nekrotik dokuları ve enfeksiyona sebep olan bakterileri ortadan kaldıran en önemli inflamatuvar hücrelerdir. Bu hücreler, fibroblastların yara bölgesine göçünü uyarmak için sitokinler ve kemotaktik faktörler salarak onarım sürecine katkıda bulunmaktadır (Zangeneh vd. 2019). Genel olarak, bitki özleri veya mikroorganizmalar kullanılarak doğal yollarla hazırlanan AgNP'ler, serbest radikalleri etkili bir şekilde yok eder ve yumuşak dokular için kimyasal ve sentetik içeriklere kıyasla çok daha az toksiktir. Bu rekabet avantajı, yara iyileşmesini önemli ölçüde iyileştiren ve enfeksiyon bölgesindeki iltihabı azaltan antibakteriyel, antiinflamatuvar ve/veya antioksidan materyallerin varlığına bağlanmaktadır (Koh ve DiPietro 2011, Zhaleh vd. 2019, Das ve Thatoi 2020).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteri kültürleri ve hücre hatları

Tez sürecinde yürütülen çalışmalarda kullanılan tüm bakteriler Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir. Tez dahilinde gümüş nanopartikül üreticisi olarak kullanılan *SGC-R* suşuna ait cins ve tür adlandırması dahil tam tür tanımı, 16S rRNA ve genom dizilemesi, karakterizasyon için gerekli bütün biyokimyasal ve kemotaksonomik analizler mevcut literatürde bulunmasına karşılık, doktora tez çalışmasının ileride detaylandırılarak patent başvurusu yapılması planlandığından tezde kullanılan bu termofilik bakterinin türü ve referans kodu paylaşılmamıştır. Ayrıca *SGC-R*'nin AgNP'leri iyi şekilde ürettikleri ise daha önceki araştırmalarımız neticesinde ortaya çıkarılmış ve bu sebeple doktora tezi çalışmasına dahil edilmiştir (Yalcinoz vd. 2025).

Hücre kültürü çalışmalarında sağlıklı hücre hatları kapsamında HDF (insan dermal fibroblastı, PCS-201-012), HaCaT (ölümsüzleştirilmiş insan keratinositi, Cytion 300493) ve L929 (fare fibroblastı, CCL-1) kullanılmıştır. Sağlıklı hücre hatlarının kullanıldığı tüm çalışmalar pasaj 3-6 arasında gerçekleştirilmiştir. Kanser hücre hatları kapsamında ise MCF7 (insan meme bezi karsinomu hücre hattı, HTB-22), HT-29 (Kolonorektal adenokarsinom hücre hattı, HTB-38) ve A549 (adenokarsinom insan alveolar bazal epitel hücre hattı, CCL-185) kullanılmıştır. Kanser hücre hatlarının kullanıldığı tüm çalışmalar ise pasaj 7-9 arasında gerçekleştirilmiştir. Tüm hücre hatlarının mikoplazma testleri gerçekleştirilmiş ve negatif çıkmıştır.

3.1.2 Besiyerleri

Tez kapsamında kullanılan besiyeri içerikleri ve hazırlanma bilgileri Çizelge 3.1-3.8 arasında sunulmuştur.

Çizelge 3.1 Triptik Soy Agar besiyeri içeriği

Triptik Soy Agar	g/L	Kimyasal Marka ve Kodları
Kazein pepton	17 g	Merck 105458
Soya pepton	3 g	
(D+) Glukoz monohidrat	2.5 g	
Potasyum fosfat dibazik (K ₂ HPO ₄)	2.5 g	
Sodyum klorür (NaCl)	5 g	
Agar	30 g	
Distile su	1000 mL	
pH = 7.3 ± 0.2		
İçerik 121°C'de 15 dakika süresince otoklavlanarak steril edilmiştir.		

Çizelge 3.2 Triptik Soy Broth besiyeri içeriği

Triptik Soy Broth	g/L	Kimyasal Marka ve Kodları
Kazein pepton	17 g	Merck 105459
Soya pepton	3 g	
(D+) Glukoz monohidrat	2.5 g	
K ₂ HPO ₄	2.5 g	
NaCl	5 g	
Distile su	1000 mL	
pH = 7.3 ± 0.2		
İçerik 121°C’de 15 dakika süresince otoklavlanarak steril edilmiştir.		

Çizelge 3.3 Nutrient Broth besiyeri içeriği

Nutrient Broth	g/L	Kimyasal Marka ve Kodları
Meat pepton	5 g	Merck 03856
Meat extract	3 g	
Distile su	1000 mL	
pH = 7.0 ± 0.2		
İçerik 121°C’de 15 dakika süresince otoklavlanarak steril edilmiştir.		

Çizelge 3.4 Mueller-Hinton Agar besiyeri içeriği

Mueller-Hinton Agar	g/L	Kimyasal Marka ve Kodları
Beef extract	2 g	Merck 103872
Kazein hidrolizat	17.5 g	
Nişasta	1.5 g	
Agar	17 g	
Distile su	1000 mL	
pH = 7.4 ± 0.2		
İçerik 121°C’de 15 dakika süresince otoklavlanarak steril edilmiştir.		

Çizelge 3.5 Mueller-Hinton Broth besiyeri içeriği

Mueller-Hinton Broth	g/L	Kimyasal Marka ve Kodları
Beef extract Kazein hidrolizat Nişasta Distile su pH = 7.4 ± 0.2	2 g 17.5 g 1.5 g 1000 mL	Merck 110293
İçerik 121°C’de 15 dakika süresince otoklavlanarak steril edilmiştir.		

Çizelge 3.6 Luria-Bertani Broth besiyeri içeriği

Luria-Bertani Broth	g/L	Kimyasal Marka ve Kodları
Kazein pepton Kazein hidrolizat Nişasta Distile su pH = 7.0 ± 0.2	2 g 17.5 g 1.5 g 1000 mL	Merck 110285
İçerik 121°C’de 15 dakika süresince otoklavlanarak steril edilmiştir.		

Çizelge 3.7 Brain Heart Infusion Broth besiyeri içeriği

Brain Heart Infusion Broth	g/L	Kimyasal Marka ve Kodları
Beef extract Kazein hidrolizat Nişasta Distile su pH = 7.4 ± 0.2	2 g 17.5 g 1.5 g 1000 mL	Merck 110493
İçerik 121°C’de 15 dakika süresince otoklavlanarak steril edilmiştir.		

Çizelge 3.8 Sabouraud Dextrose Broth besiyeri içeriği

Sabouraud Dextrose Broth	g/L	Kimyasal Marka ve Kodları
Kazein pepton Meat pepton Dextrose Distile su pH = 5.6 ± 0.2	5 g 5 g 20 g 1000 mL	Merck 146366
İçerik 121°C’de 15 dakika süresince otoklavlanarak steril edilmiştir.		

3.1.3 Çözeltiler ve kitler

Tez kapsamında kullanılan kimyasal çözeltiler ve kitlerin bilgileri Çizelge 3.9-3.20 arasında sunulmuştur.

Çizelge 3.9 DNA saflaştırma ve PCR bileşenleri

DNA Saflaştırma ve PCR Bileşenleri	Kimyasal Marka ve Kodları
Genomic DNA Purification Kit	Thermo Scientific K0512
Taq DNA Polimeraz	Thermo Scientific EP0402
100 bp DNA Ladder	NEB N3231L

Çizelge 3.10 Agaroz jel içeriği

Agaroz Jel	%1.5 (w/v)	Kimyasal Marka ve Kodları
Agaroz	1.5 g	Sigma A9539
1X TAE	100 mL	Thermo Scientific B49

Çizelge 3.11 100 mM AgNO₃ çözeltisi içeriği

100 mM AgNO ₃	20 mL (w/v)	Kimyasal Marka ve Kodları
AgNO ₃	0.34 g	Merck 101512
Distile su	20 mL	
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir.		

Çizelge 3.12 Serum fizyolojik çözeltisi içeriği

Serum Fizyolojik	g/L	Kimyasal Marka ve Kodları
NaCl	8.5 g	Merck 1.06404
Distile su	1000 mL	
İçerik 121°C’de 15 dakika süresince otoklavlanarak steril edilmiştir.		

Çizelge 3.13 1 N NaOH çözeltisi içeriği

1 N NaOH Çözeltisi	g/L	Kimyasal Marka ve Kodları
NaOH	40 g	Merck 106469
Distile su	1000 mL	
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir. pH ayarlarını yapmak için kullanılmıştır.		

Çizelge 3.14 1 N HCl çözeltisi içeriği

1 N HCl Çözeltisi	mL (v/v)	Kimyasal Marka ve Kodları
HCl (%37’lik)	82.6 mL	Merck 1003172500
Distile su	917.4 mL	
İçerik hazırlandıktan sonra 0,22 µm por çaplı membran filtreden (Sartorius, Fransa) geçirilerek steril edilmiştir. pH ayarlarını yapmak için kullanılmıştır.		

Çizelge 3.15 Kristal viyole çözeltisi içeriği

Kristal Viyole Çözeltisi	%0.1 (w/v)	Kimyasal Marka ve Kodları
Kristal viyole	0.1 g	Merck C0775
Distile su	100 mL	

Çizelge 3.16 Metanol çözeltisi içeriği

Metanol Çözeltisi	%95 (v/v)	Kimyasal Marka ve Kodları
Metanol	95 mL	Merck 1.01408
Distile su	5 mL	

Çizelge 3.17 Etanol:Aseton çözeltisi içeriği

Etanol:Aseton Çözeltisi	70:30 (v/v)	Kimyasal Marka ve Kodları
Saf etanol	70 mL	Merck 100983
Aseton	30 mL	Merck 1.00013

Çizelge 3.18 %70'lik etanol çözeltisi içeriği

%70'lik Etanol Çözeltisi	100 mL (v/v)	Kimyasal Marka ve Kodları
Saf etanol	70 mL	Merck 100983
Distile su	30 mL	

Çizelge 3.19 0.1 mM 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) çözeltisi içeriği

0.1 mM DPPH Çözeltisi	100 mL (w/v)	Kimyasal Marka ve Kodları
DPPH	0.004 g	Sigma D9132
Metanol	100 mL	Merck 1.01408

Çizelge 3.20 Hücre kültürü bileşenleri

Hücre Kültürü Bileşenleri	Kimyasal Marka ve Kodları
Dulbecco's Modified Eagle Medium-High Glucose (DMEM-HG)	Capricorn DMEM-HA CP 40-1309
Fetal sığır serumu (FBS)	Biological Industries 04-001-1A
Penisilin/Streptomisin	Capricorn PS-B
L-glutamin	Capricorn GLN-B
Trypsin/EDTA	Gibco 25200056
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	PanReac Applichem A3672
3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür (MTT)	Thermo Scientific M6494
İzopropanol	Merck 109634

3.2 Yöntem

3.2.1 Bakteri kültürünün ön aktifleştirme işlemleri

AgNP'lerin üreticisi olan *SGC-R*'nin tüm tür tanımları ve gelişim koşulları belirlenmiş olup, ön aktifleştirilmesi için, -80°C'de gliserol stoklarında bulunan suş öncelikle Tryptic Soy Agar (TSA) besiyerinde 55°C'de 18-24 saat süresince geliştirilmiştir (Karaca 2018). Bu aşamada, katı kültürde bakterinin saflığı kontrol edilmiştir. Bu kültürden 5 mL'lik standart Tryptic Soy Broth (TSB) besiyerine 2 McFarland standartına uygun olacak şekilde yoğun bir bulanıklıkta inoküle edildikten sonra suş, 55°C'de 15 saat çalkalamalı koşullarda (170 rpm/dk) geliştirilmiştir (Coleri 2007). Bu ön aktifleştirme işleminin sonunda hazır olan kültür, AgNP'lerin üretimi için hazırlanacak besiyerlerine inoküle edilmiştir. Bu iki adımlı inokülasyon işlemlerinin, kültür koleksiyonumuzdaki termofilik basil kültürlerinin “logaritmik fazda” maksimum hücre yoğunluğuna ulaşabilmeleri için etkili olduğu daha önceki çalışmalarımızla saptanmıştır (Kılıc vd. 2017).

3.2.2 *SGC-R*'de istenmeyen olası toksisite genlerinin varlığının veya noksanlığının PCR reaksiyonları ile tayini ve *in silico* analiz ile azot metabolizmasının anotasyonu

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda AgNP'lerin üreticisi olarak kullanılan termofilik basilin, yara iyileşmesi başta olmak üzere özellikle çeşitli medikal alanlarda kullanım potansiyeli açısından oldukça önemli olan, istenmeyen toksin genlerini içerip içermediğini belirlemek adına PCR çalışmaları yürütülmüştür. Gerçekleştirilen PCR çalışmaları neticesinde *SGC-R*, Hemolizin BL A-B-C-D (hbl A-B-C-D) (Guinebretie`re vd. 2002, Ouoba vd. 2008), Sitotoksin K (CK) (Ouoba vd. 2008), Hemolitik olmayan enterotoksin A-B-C (Nhe A-B-C) (Ouoba vd. 2008), Diyare enterotoksin (bceT) (Guinebretie`re vd. 2002), Emetik toksin (EM1) (Ouoba vd. 2008) ve Cereulide emetik toksin sentetaz (Ces1) (Ehling-Schulz vd. 2005) toksisite genlerinin varlığı veya noksanlığı yönünden taranmıştır. Bu 11 farklı toksin genlerine spesifik olarak kullanılan primerler Çizelge 3.21'de sunulmuştur. PCR çalışmalarında kalıp DNA olarak termofilik basilin genomik DNA'sı kullanılmıştır. İlgili genleri içerdiği bilinen bakterilerin

DNA'ları pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. PCR reaksiyonu için Thermo Scientific Taq polimeraz seti kullanılmış, reaksiyon koşulları için üreticinin tavsiye ettiği koşullar uygulanmıştır. Elde edilen PCR ürünleri % 1.5 oranında agaroz içeren jellerde, 100 voltta 50 dk süresince yürütülmüştür.

Çizelge 3.21 Toksisite genlerine spesifik primerler

Primer Adı	Dizi	Kaynak
hblA /F	GTGCAGATGTTGATGCCGAT	Ouoba vd. 2008
hblA /R	ATGCCACTGCGTGGACATAT	
hblB /F	AAGCAATGGAATACAATGGG	Guinebretie`re vd. 2002
hblB /R	AATATGTCCCAGTACACCCG	
hblC /F	AATGGTCATCGGAACCTCTAT	Ouoba vd. 2008
hblC /R	CTCGCTGTTCTGCTGTTAAT	
hblD /F	AATCAAGAGCTGTCACGAAT	Ouoba vd. 2008
hblD /R	CACCAATTGACCATGCTAAT	
NheA/F	TACGCTAAGGAGGGGCA	Ouoba vd. 2008
NheA/R	GTTTTTATTGCTTCATCGGCT	
NheB/F	CTATCAGCACTTATGGCAG	Ouoba vd. 2008
NheB/R	ACTCCTAGCGGTGTTCC	
NheC/F	CGGTAGTGATTGCTGGG	Ouoba vd. 2008
NheC/R	CAGCATTCGTAACCTGCCAA	
bceT1 F	CGTATCGGTCGTTCACTCGG	Guinebretie`re vd. 2002
bceT3 R	GTTGATTTTCCGTAGCCTGGG	
CK-F	ACAGATATCGGKCAAAATGC	Ouoba vd. 2008
CK-R	TCCAACCCAGTTWSCAGTTCD	
EM1F	GACAAGAGAAATTTCTACGAGCAAGTACAAT	Ouoba vd. 2008
EM1R	GCAGCCTTCCAATTACTCCTTCTGCCACAGT	
Ces1F	GGTGACACATTATCATATAAGGTG	Ehling-Schulz vd. 2005
Ces1R	GTAAGCGAACCTGTCTGTAACAACA	

AgNP'lerin sentezi, nitratı nitrite indirgeyen NADH bağımlı redüktaz, nitrat redüktaz ve nitroredüktaz A gibi çeşitli enzimlerle ilişkilendirilmektedir. Elektron transfer bileşenlerinin ve redüktaza sahip diğer peptit/proteinlerin Ag⁺ indirgeme ve AgNP'lerin üretiminde rol oynayabileceği öne sürülmektedir (Anil Kumar vd. 2007, Shahverdi vd. 2007, Saifuddin vd. 2009).

Bahsi geçen bu enzimler, nitratı nitrite indirgemek için NADPH kullanmaktadır. NADPH, redüktazın NADPH bağlanma bölgesine bir hidrit iyonuyla iki elektron verir. Elektronlar, demir-kükürt kümesi aracılığıyla nitratın bulunduğu aktif molibden bölgesine aktarılır. Nitrat daha sonra H^+ varlığında nitrit ve H_2O 'ya indirgenir (Coelho ve Romao 2015, Mabey vd. 2019). Bu süreçlerde rol alan nitrat redüktaz enzimleri, hücresel konumlarına göre isimlendirilmiştir: disimilasyon periplazmik nitrat redüktazları (Nap), solunum membran ilişkili nitrat redüktazları (Nar) ve asimilasyon sitoplazmik nitrat redüktazları (Nas) (Coelho ve Romao 2015). Tez kapsamında AgNP'lerin üreticisi olarak kullanılan *SGC-R* bakterisine ait tüm genom dizi bilgisi halihazırda NCBI veri tabanında bulunmaktadır. İlgili GenBank aksesyon numarası kullanılarak *SGC-R*'nin azot metabolik yolları Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi'nden (KEGG) çıkarılmıştır. Bu şekilde, nitrat redüktaz enzim yollarının varlığı kanıtlanabilmiştir. KEGG yolları BlastKOALA kullanılarak belirlenmiştir (Anonymous 2025).

3.2.3 Termofilik basilin farklı koşullarda mikrobiyal gelişimi

Termofilik *SGC-R*'nin mikrobiyal gelişimi için gerekli optimal besiyeri içeriğinin, pH'sının, inkübasyon sıcaklığının ve inkübasyon süresinin tespit edilebilmesi hedeflenmiştir. Bu bağlamda, besiyerinin tuz ihtiva edip etmemesinin mikrobiyal üreme üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla sodyum klorür ($NaCl$) içeren (%0.5) ve içermeyen 2 farklı TSB besiyeri, pH etkisinin belirlenmesi için 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 ve 9.5 olmak üzere 10 farklı pH, inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi için $50^{\circ}C$, $55^{\circ}C$, $60^{\circ}C$ ve $65^{\circ}C$ olarak 4 farklı sıcaklık ve inkübasyon süresinin belirlenmesi adına 18, 24 ve 48 saat olarak 3 farklı inkübasyon süresi sınanmıştır. Bahsi geçen parametrelerin denenmesi sonucunda kültür ortamları Ultraviyole-görünür bölge spektroskopisinde (UV-Vis) 660 nm dalga boyunda okutularak mikrobiyal üreme yoğunlukları belirlenmiştir.

3.2.4 Gümüş nitrat çözeltisinin hazırlanması ve süpernatant aracılığıyla hücre dışı AgNP'lerin eldesi

Biyolojik AgNP'lerin eldesi amacıyla kullanılan AgNO₃ çözeltisinin bakteri kültüründen elde edilen süpernatanta eklenecek olan son konsantrasyonu öncelikle literatür verileri ışığında 1 mM olarak belirlenmiştir (Juibari vd. 2011). AgNO₃ çözeltisi 100 mM ana stok olarak, her kullanımdan önce taze hazırlanmış ve 0.2 µm por çaplı membran filtre ile steril edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. 100 mM ana stok, 20 mL distile su içerisine 0.34 g AgNO₃ eklenerek ve oda sıcaklığında karıştırılarak hazırlanmıştır. AgNO₃ hazırlık işlemleri karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.

AgNP'lerin hazırlanması amacıyla, 5 mL TSB içerisinde 48 saat geliştirilen aktif termofilik bakteri kültürü, 15.000 rpm'de, 4°C'de 15 dakika santrifüj edilerek üst faz alınmıştır. Alınan süpernatant 0.45 µm por çaplı filtreden geçirilerek AgNP'lerin üretimine hazırlanmıştır. AgNP'lerin eldesi için, taze olarak hazırlanan 100 mM AgNO₃ ana stok çözeltisinden son konsantrasyon 1 mM olacak şekilde elde edilen bu hücresiz süpernatanta ilave edilmiştir. AgNO₃ çözeltisi eklenen süpernatant, 55°C'de 48 saat çalkalamalı koşullarda (120 rpm/dk) inkübe edilmiştir (Juibari vd. 2011, Cekuolyte vd. 2024). İnkübasyon sonunda 16.000 rpm'de, 4°C'de 15 dakika santrifüj gerçekleştirilerek oluşan AgNP'ler çöktürülmüştür. Santrifüj sonunda üst faz ayrılarak distile su ile yıkama sonrası çöken AgNP'ler oda koşullarında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan AgNP'lerin peletleri 250 µL distile su eklenerek çözülmüştür. AgNP'leri içeren koloidal solüsyonlar, UV-Vis spektroskopisinde 400 ila 450 nm arasında absorpsiyon piki göstermektedir (Yang 2021). Bu nedenle, nihai solüsyon, UV-Vis spektroskopisinde 350-500 nm'de taranmış, oluşacak absorpsiyon piklerine göre gümüş nanopartikül varlığı tespit edilmiştir.

3.2.5 AgNP'lerin üretiminin ve etkinliğinin 4 adımlı verim tayini

AgNP'lerin üretimini içeren optimizasyon çalışmaları esnasında, denenen her parametreden sonra elde edilen AgNP'ler 4 adımlı bir teyit yöntemine tabi tutulmuştur. Bu adımlar; **(1)** AgNO₃ çözeltisi eklenen süpernatantın inkübasyonu sonucu sarıdan

kahverengiye dönen renk değişimi tespit edilmiştir. Daha sonra (2) santrifüj ile çöktürülen AgNP'lerin peletleri tartılarak kültürün mL'si başına düşen AgNP'lerin peletlerinin miktarı belirlenmiştir. Bunu takiben, distile su ile çözülen AgNP'ler, (3) UV-Vis spektroskopisinde 350-500 nm arasında taranmış ve bu tarama sonucunda 400 ila 450 nm arasında absorpsiyon piki verip vermedikleri belirlenmiştir. Son adımda ise, (4) Gram-negatif *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve Gram-pozitif *S. aureus* ATCC 29213 seçilerek, farklı parametreler kullanılarak elde edilen AgNP'lerin bu patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite taraması gerçekleştirilmiştir. Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi için aktif patojen kültürleriyle 5 mL serum fizyolojik (SF) içerisinde 0.5 McFarland standardına uygun süspansiyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan patojen süspansiyonları TSA içeren petrilere yayılarak petrilere kurutulmuştur. Distile su ile çözülen AgNP'lerden 10 µL alınarak petrilere yayılmış olan patojenlerin üzerine damla ekim yapılmıştır. Petrilere 37°C'de 24 saat inkübe edilerek süre sonunda zon çapları "mm" cinsinden ölçülmüştür (CLSI 2016, Venegas vd. 2018, Garibo vd. 2020). Böylelikle biyolojik olarak en etkili AgNP'lerin hangi parametre sonucu elde edildiği belirlenebilmiştir.

3.2.6 AgNP'lerin üretiminin mikrobiyal gelişim düzeyinde optimizasyonu

AgNP'lerin üretiminin verimini artırmak amacıyla öncelikle AgNP'lerin üreticisi olarak kullanılan *SGC-R*'nin mikrobiyal üreme koşulları optimize edilmiştir. Bu kapsamda ilk olarak besiyerinin tuz ihtiva edip etmemesi ve ardından Bölüm 3.2.1'de anlatılan ve termofilik basil kültürlerinin maksimum hücre yoğunluğuna ulaşabilmeleri için etkili olduğu bilinen ön aktifleştirme işleminin süresi ve ön aktifleştirme sonrası gerçekleşecek inokülasyon miktarı belirlenmiştir. Ek olarak besiyeri pH'sı ve inkübasyon sıcaklığı gibi parametreler sınanmıştır. 5 mL hacimlerde geliştirilen kültürlerden Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı şekilde hücresiz süpernatant kullanılarak AgNP'ler elde edilmiştir. Denenen her farklı parametre neticesinde kültürlerin 660 nanometrede optik yoğunlukları ölçülerek bakterinin mikrobiyal gelişimi değerlendirilmiştir. Ayrıca farklı koşullardan elde edilen AgNP'ler Bölüm 3.2.5'te anlatılan adımlara tabi tutulmuştur ve böylece AgNP'lerin verimi ve biyolojik etkinlik açısından en iyi gelişim koşullarının belirlenmesi hedeflenmiştir. AgNP'lerin verimi hesaplanırken; farklı parametreler denenmeden önce

elde edilen yani ilk AgNP'lerin ağırlığı (mg), denenen farklı parametreler neticesinde elde edilen yani son AgNP'lerin ağırlığı (mg)'na bölünür. Bu şekilde bir verim katsayısı elde edilmektedir.

3.2.6.1 Besiyerinin tuz ihtiva edip etmemesinin mikrobiyal gelişim ve AgNP'lerin üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi

AgNP'lerin üretiminin mikrobiyal üreme düzeyinde optimizasyonu kapsamında ilk olarak besiyerinin tuz ihtiva edip etmemesinin etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bunun için TSA besiyerinde 55°C'de 18-24 saat süresince geliştirilen kültürden 5 mL'lik TSB besiyerine absorbansı 0.4-0.6 olacak bulanıklıkta inoküle edildikten 55°C'de 15 saat süreyle çalkalamalı koşullarda (170 rpm/dk) geliştirilmiştir. Besiyeri tuz içeriğinin belirlenebilmesi için ön aktifleştirmesi gerçekleştirilen örnekten 5 mL'lik Tuzlu TSB (%0.5 NaCl) ve 5 mL'lik Tuzsuz TSB (%0 NaCl) besiyerlerine %4 oranında inokülasyon gerçekleştirilmiştir. Kültür ortamları 55°C'de 48 saat süreyle çalkalamalı koşullarda (120 rpm/dk) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürelerinin sonunda hücresiz süpernatant ve bu süpernatantlar aracılığıyla AgNP'lerin eldesi Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Hücresiz süpernatantlara son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde gerçekleştirilen AgNO₃ ilavesi sonrası 55°C'de 48 saat çalkalamalı koşullarda (120 rpm/dk) inkübasyon gerçekleştirilmiştir. 16.000 rpm'de 15 dakika santrifüj ile oluşan AgNP'ler çöktürülmüştür. Santrifüj sonunda oda sıcaklığında kurutulan AgNP'ler 250 µL distile su eklenerek çözülmüş ve UV-Vis spektroskopisinde 350-500 nm arasında gerçekleştirilen taramalar sonucu bir kıyaslama yapılmıştır.

3.2.6.2 Ön aktifleştirme süresi ve inokülasyon miktarının belirlenmesi

Termofilik basilin kültüre alınmadan önce tabi tutulacağı ön aktifleştirme süresi, bu ön aktivasyon sonrası gerçekleştirilecek inokülasyon miktarı ve inkübasyon süresi belirlenmiştir. Ön aktifleştirme süresinin belirlenebilmesi adına TSA besiyerinde 55°C'de 18-24 saat süresince geliştirilen kültürden 5 mL'lik TSB besiyerine absorbansı 0.4-0.6 olacak bulanıklıkta inoküle edildikten sonra 55°C'de 6 ve 15 saat olmak üzere iki farklı süreyle çalkalamalı koşullarda (170 rpm/dk) geliştirilmiştir. İnokülasyon miktarının

belirlenebilmesi adına hem 6 saat hem de 15 saat olarak ön aktifleştirmesi gerçekleştirilen örneklerden önceki aşamada belirlenmiş olan 5 mL'lik besiyerlerine %1, %2, %3 ve %4 oranlarda inokülasyonlar gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan örnekler 55°C'de 24 saat ve 48 saat süreyle yine çalkalamalı koşullarda (120 rpm/dk) inkübe edilmiştir. Böylelikle ön aktifleştirme süresi ve inokülasyon miktarının yanı sıra inkübasyon süresinin de sınanması hedeflenmiştir. İnkübasyon sürelerinin sonunda kültürlerin UV-Vis spektroskopisinde 660 nm'de optik yoğunlukları ölçülmüştür. Ardından hücresiz süpernatant ve bu süpernatantlar aracılığıyla AgNP'lerin eldesi Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Farklı parametreler sonucu elde edilen AgNP'ler oda sıcaklığında kurutulduktan sonra ağırlıkları belirlenmiş 250 µL distile su eklenerek çözülmüş ve Bölüm 3.2.5'te anlatılan adımlara tabi tutulmuştur.

3.2.6.3 Besiyeri pH'sının mikrobiyal gelişim ve AgNP'lerin üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi

Bir önceki aşamada belirlenen ön aktifleştirme süresi ve inokülasyon miktarı kullanılarak deney kurulmuştur. Bölüm 3.2.3'te anlatılan çalışma neticesinde pH aralığı daraltılarak, SGC-R'nin geliştirileceği 5 mL'lik TSB besiyerinin pH'sı 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5 ve 10.0 olmak üzere yedi farklı pH değerine ayarlanmıştır. Farklı pH değerlerine ayarlanmış besiyerlerindeki kültürler 55°C'de çalkalamalı koşullarda (120 rpm/dk) 48 saat inkübe edilmiştir. UV-Vis spektroskopisinde 660 nm'de kültürlerin optik yoğunlukları ölçülerek bakterinin mikrobiyal gelişimi belirlenmiştir. Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı şekilde AgNP'lerin eldesi gerçekleştirilmiş ve AgNP'ler Bölüm 3.2.5'te anlatılan adımlara tabi tutulduktan sonra ideal besiyeri pH'sı seçilmiştir.

3.2.6.4 Belirlenen pH'larda kültürsüz boş besiyerlerinin AgNP'leri üretme olasılığının belirlenmesi

Gerçekleştirilen çalışmalarda kültür içermeyen boş besiyerlerine de AgNO₃ eklenerek kontrol ölçümleri yapılmıştır. Bu ölçümler esnasında TSB besiyerinde pH:8.0 ve sonrasında yer alan daha yüksek pH değerlerinde kontrol örneklerinin UV-Vis spektroskopisinde 400 ila 450 nm arasında absorpsiyon piki verdiği gözlenmiştir.

AgNP'lerin üretimini doğrulayan bu dalga boylarında boş besiyerinin de absorpsiyon piki vermesi istenen bir durum değildir. TSB besiyerinin içeriği (Kazein pepton, 17 g/L; Soya pepton, 3 g/L; K₂HPO₄, 2.5 g/L; Glukoz, 2.5 g/L; NaCl, 5 g/L) incelendiğinde, bu durumun TSB içeriğinde yer alan bitkisel soya peptondan kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu sebeple alternatif besiyeri olarak bitkisel içerik bulundurmeyen Nutrient Broth (NB) (Et pepton, 5 g/L; Et özütü, 3 g/L) besiyeri seçilerek denenmiştir. İki farklı içeriği karşılaştırmak amacıyla daha önceki adımlarda anlatıldığı şekilde mikrobiyal üreme takibi ve AgNP'lerin üretimi de gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.5 İnkübasyon sıcaklığının mikrobiyal gelişim ve AgNP'lerin üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi

Son parametre olarak inkübasyon sıcaklığının mikrobiyal gelişim ve AgNP'lerin üretimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Daha önceki aşamalarda belirlenen besiyeri, ön aktifleştirme ve pH koşulları kullanılarak kurulan kültür 50°C, 55°C, 60°C ve 65°C olarak dört farklı sıcaklıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası UV-Vis spektroskopisinde 660 nm'de kültürlerin optik yoğunlukları ölçülerek bakterinin mikrobiyal gelişimi belirlenmiştir. Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı şekilde AgNP'lerin eldesi gerçekleştirilmiştir ve AgNP'ler Bölüm 3.2.5'te anlatılan adımlara tabi tutularak ideal besiyeri pH'sı seçilmiştir.

3.2.7 Termofilik basilin büyüme eğrisinin ve AgNP'lerin 48 saatlik zamana bağlı üretiminin ortaya çıkarılması

Daha önceki aşamalarda gerçekleştirilen tüm optimizasyon çalışmaları neticesinde belirlenen nihai koşullar ile kurulan kültür koşullarında 48 saat süresince 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 15, 18, 24 ve 48. saatlerde alınan numuneler çalışılmıştır. AgNP'lerin üreticisi olan SGC-R öncelikle TSA besiyerinde 55°C'de 18-24 saat süresince geliştirilmiştir. Bu kültürden 5 mL NB besiyerine absorbansı 0.4-0.6 olacak bulanıklıkta inoküle edildikten sonra ideal ön aktifleştirme koşullarında geliştirilmiştir. Ön aktifleştirmenin tamamlanmasının ardından yine önceki çalışmalar kapsamında belirlenen ideal pH değerine ayarlanan 550 mL'lik NB besiyerine inoküle edilmiştir. Kültür optimizasyon çalışmaları sonucu seçilen inkübasyon sıcaklığında ve sürede çalkalamalı koşullarda (120

rpm/dk) inkübasyona bırakılmıştır. Kültürden yukarıda açıklanan 13 farklı zaman aralığında 3 adet 5'er ml'lik numuneler alınmıştır. Bu numuneler ile hem 660 nm'deki bakteri absorbanı ölçümü hem de seri dilüsyonlar yapılarak koloni sayımı gerçekleştirilmiştir. İlgili saatlerde alınan numunelerin UV-Vis spektroskopisinde 660 nm dalga boyunda okutulmasıyla elde edilen optik yoğunluklar ve gerçekleştirilen sayımların sonuçları ile *SGC-R* için bir büyüme eğrisi oluşturulmuştur. 13 farklı zaman aralığında alınan bakteri kültürü, 15.000 rpm'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edilerek üst faz alınmış ve 500 mL hacimli, 0.45 µm por çaplı vakumlu filtrasyon sistemlerinden (Nest, 343103) geçirilmiştir. Bu elde edilen hücresiz süpernatant AgNP'lerin eldesinde kullanılmıştır. Bu kapsamda elde edilen hücresiz süpernatanta son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde AgNO₃ çözeltisi eklenmiştir. AgNO₃ çözeltisi eklenen süpernatant, AgNP'lerin eldesi için 55°C'de 48 saat çalkalamalı koşullarda (120 rpm/dk) inkübe edilmiştir. 48 saat sonunda 16.000 rpm'de 15 dakika 4°C'de santrifüj edilerek oluşan AgNP'ler çöktürülmüştür. Elde edilen AgNP'lerin pelet miktarı belirlenmiş ve AgNP'lerin peletleri 1 mL distile su eklenerek çözülmüştür. AgNP'leri içeren koloidal solüsyonlar, UV-Vis spektroskopisinde 350 ila 500 nm arasında taranarak absorpsiyon pikleri tespit edilmiştir.

3.2.8 AgNP'lerin üretiminin süpernatant düzeyinde optimizasyonu

“Termofilik basilin büyüme eğrisinin ve AgNP'lerin 48 saatlik zamana bağlı üretiminin ortaya çıkarılması” tamamlandıktan sonra 48. saat sonucu kalan 300 mL'lik tüm kültür 15.000 rpm'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edilerek üst faz alınmış ve böylelikle AgNP'lerin eldesinde kullanılacak olan hücresiz süpernatant elde edilmiştir. Elde edilen süpernatant 0.45 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril tüplere eşit hacimlerde bölünmüş ve süpernatant optimizasyonu kapsamındaki tüm çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır. Böylelikle optimizasyon çalışmalarının aynı deney düzeneğinden elde edilen hücresiz süpernatantlar kullanılarak gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir.

3.2.8.1 Süpernatant pH'sının AgNP'lerin üretimi üzerine etkisi

Enzimatik olarak işleyen reaksiyonlar, pH koşullarındaki değişikliklere karşı oldukça hassastır (Mabey vd. 2019). Tez çalışması kapsamında hücresiz kültür süpernatantından AgNP'lerin eldesi aşamasında ilk olarak farklı süpernatant pH'larının etkisi incelenmiştir. 5 mL hücresiz kültür süpernatantlarının pH'ları 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, ve 9.0 olacak şekilde ayarlandıktan sonra 0.45 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Bu aşamadan sonra süpernatantlara son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde AgNO₃ çözeltisi eklenmiştir. AgNP'lerin eldesi için 55°C'de 48 saat çalkalamalı koşullarda (120 rpm/dk) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda süpernatantlardan Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı şekilde AgNP'lerin eldesi gerçekleştirilmiş ve elde edilen AgNP'ler Bölüm 3.2.5'te anlatılan adımlara tabi tutularak AgNP'lerin verimi biyolojik etkinliği bakımından en ideal süpernatant pH'sı belirlenmiştir.

3.2.8.2 AgNO₃ konsantrasyonunun AgNP'lerin üretimi üzerine etkisi

AgNO₃, bakteriyel AgNP'lerin üretimi için yaygın olarak kullanılan bir gümüş tuzu kaynağıdır. Bunun başlıca nedeni, diğer gümüş tuzlarına kıyasla sudaki çözünürlüğünün daha yüksek olmasıdır (Mabey vd. 2019). AgNO₃ konsantrasyonunun değişmesinin AgNP'lerin üretimi üzerine etkilerinin araştırıldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur (Juibari vd. 2011, Rajora vd. 2016, Chandra ve Sreelatha 2020). pH'sı belirlenen ideal değerde ayarlanan hücresiz kültür süpernatantlarına son konsantrasyonları 1 mM (0.001 M), 1.5 mM (0.0015 M), 1.75 (0.00175 M) ve 2 mM (0.002 M) olarak ayarlanan 4 farklı AgNO₃ çözeltisi eklenerek 55°C'de 48 saat çalkalamalı koşullarda (120 rpm/dk) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda süpernatantlardan Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı şekilde AgNP'lerin eldesi gerçekleştirilmiş ve Bölüm 3.2.5'te açıklanan adımlarla AgNP'lerin verimi ve biyolojik etkinliği bakımından en ideal AgNO₃ konsantrasyonu saptanmıştır.

3.2.8.3 İnkübasyon sıcaklığının AgNP'lerin üretimi üzerine etkisi

Sıcaklık, biyokimyasal reaksiyonları, enzim aktivitesini, gen ve protein ekspresyonundaki fizyolojik değişiklikleri etkileyen kritik bir parametredir. Çoğu

biyokimyasal reaksiyonda olduğu gibi, hücresiz kültür süpernatantından AgNP'lerin eldesi söz konusu olduğunda da sıcaklığın önemli bir etkisi vardır (Mabey vd. 2019). Bu bağlamda ideal pH'daki hücresiz süpernatantlara ideal konsantrasyonda AgNO₃ çözeltisi eklendikten sonra test tüpleri 50°C, 55°C, 60°C ve 65°C olmak üzere 4 farklı sıcaklıkta 48 saat boyunca çalkalamalı koşullarda (120 rpm/dk) inkübe edilmiştir. Daha sonra Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı şekilde AgNP'lerin eldesi gerçekleştirilmiş ve Bölüm 3.2.5'te anlatılan adımlar uygulanarak en ideal inkübasyon sıcaklığı belirlenmiştir.

3.2.8.4 İnkübasyon süresinin AgNP'lerin üretimi üzerine etkisi

İnkübasyon süresinin AgNP'lerin üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla, ideal pH'da ayarlanan hücresiz süpernatanta belirlenen ideal konsantrasyonda AgNO₃ çözeltisi eklenerek saptanmış optimal sıcaklıkta 24, 48 ve 72 saat boyunca çalkalamalı koşullarda (120 rpm/dk) inkübe edilmiştir. Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı şekilde AgNP'lerin eldesi gerçekleştirilmiş ve Bölüm 3.2.5'teki adımlarla en ideal inkübasyon süresi tespit edilmiştir.

3.2.9 Laboratuvar ölçeğinde (lab-scale) AgNP'lerin üretimi

Bu aşamada SGC-R'nin lab-scale üretimi için, belirlenmiş optimal gelişim koşullarında hazırlanan kültürün 10 mL'den 500 mL'ye kadar ölçeklendirilmesi yapılmıştır. Kültür gelişimi 10, 50 ve 100 mL olarak laboratuvar tüpü ve erlenlerinde nihai olarak da 500 mL olarak laboratuvar reaktöründe gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan reaktör, modifiye edilmiş Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) reaktörüdür. 500 mL besiyeri içeren reaktör otoklavlandıktan sonra içerisine daha önceki adımlar sonucu belirlenen koşullarda inokülasyon gerçekleştirilmiştir. 10, 50 ve 100 mL hacimlerde besiyeri içeren reaktör inkübatörde kaymaz zemin üzerine sabitlenerek dinamik koşullarda inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

Farklı hacimlerdeki kültürlerden elde edilen hücresiz süpernatantlar ile yine daha önce gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları neticesinde karar verilen koşullarda AgNP'ler sentezlenmiştir. Artan üretim hacimlerindeki AgNP'lerin üretim kapasitesini

gözlemlemek amacıyla, scale-up yapılan her koşuldan elde edilen AgNP'ler UV-Vis spektroskopisinde 350 ila 500 nm arasında taranmış ve AgNP'lerin peletlerinin ölçümleri yapılmıştır. Ek olarak büyük hacimde üretim sonucu daha önce anlatıldığı şekilde elde edilen AgNP'ler Bölüm 3.2.10'da yer alan "Üretilen AgNP'lerin karakterizasyonu" ve Bölüm 3.2.11'de yer alan "Üretilen AgNP'lerin biyolojik özelliklerinin incelenmesi" başlıklarındaki çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

3.2.10 Üretilen AgNP'lerin karakterizasyonu

Nanopartiküllerin sahip olduğu fizikokimyasal özellikler, onların davranışları, biyodağılımı, güvenilirliği ve etkinliği için oldukça önemlidir. Bu nedenle sentezi gerçekleştirilen AgNP'lerin karakterizasyonu, fonksiyonel yönlerini belirleyebilmek için elzemdir (Zhang vd. 2016). Tez kapsamında, ideal koşullarda sentezi gerçekleştirilip, Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı şekilde üretilen AgNP'lerin yapısal karakterizasyonları uygun spektral analizler olan UV-Vis spektroskopisi, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) ve Transmission Elektron Mikroskobu (TEM) yöntemleriyle ortaya çıkarılmıştır (Yang 2021, Vijayakumar vd. 2023).

3.2.10.1 UV-Vis spektroskopisi

AgNP'leri içeren koloidal solüsyonlar, UV-Vis spektroskopisi sonucunda 400 ila 450 nm arasında absorpsiyon piki göstermektedir (Yang 2021, Cekuolyte vd. 2023). Hazırlanan ve distile su ile süspanse edilen AgNP'ler UV-Vis spektroskopisinde (µQuant, BioTek Inc., Winooski, VT, ABD) 350-500 nm dalga boyu aralığında ve 1 nm çözünürlükte analiz edilerek absorpsiyon pikleri tespit edilmiştir. Analiz esnasında blank (kör tüp) olarak distile su kullanılmıştır.

3.2.10.2 FT-IR

FT-IR yöntemi ile nanopartikül yüzeyinde yer alan organik ve inorganik bileşiklerin kimyasal bileşenleri tespit edilebilmektedir. AgNP'ler gibi yapıların üzerine kovalent

olarak bağlanmış fonksiyonel moleküllerin veya katalitik işlem sırasında enzim ve substrat arasında meydana gelen etkileşimlerin doğrulanması gibi çalışmalar için de yaygın olarak kullanılmaktadır (Baudot vd. 2010, Vijayakumar vd. 2023). Hücresiz kültür süpernatantından sentezlenen AgNP'lerin 600-4000 cm^{-1} spektral aralığındaki transmisyon spektrumlarını (%) kaydetmek için bir FT-IR spektrofotometresi (IRAffinity 1; Shimadzu IRTracer 100, Kyoto, Japonya) kullanılmıştır. Birinci türev spektrumları, bağıl emilim yoğunluğunu incelemek için, ikinci türev spektrumları emilim maksimumlarını belirlemek için kullanılmıştır. Kurutulmuş AgNP'lerin toz örnekleri, 4 cm^{-1} çözünürlükte ortam koşullarında 100 kez taranmış ve ardından ortalama sonuçlar işlenmiştir. Spektrumlar 2 cm^{-1} 'lik adımlarla ayrıştırılmış ve 1868 ayrı veri noktası elde edilmiştir. Pik tanımlama ve rafine etme, üretici tarafından sağlanan IR Solutions Control yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.10.3 TEM

TEM analizi, 80 kV'da çalışan ve bir Emsis Veleta kamera ile donatılmış JEOL 100 CXII mikroskopu ile gerçekleştirilmiştir (Lin vd. 2014). TEM ölçümleri için, toz AgNP'ler Formvar film (EMS FCF300-Cu) ile kaplanmış bir bakır ızgaraya biriktirilmiştir. Biriktirme, yeterli dağılımı sağlamak için 5 μL nanopartikül süspansiyonunun karıştırıldığı ve sonikasyona tabi tutulduğu çözücü yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kolloid daha sonra oda sıcaklığında kurutulan bir ızgaraya yerleştirilmiştir (Sayah vd. 2011). AgNP'lerin ortalama gözenek boyutları Image J (NIH, ABD) programı kullanılarak TEM görüntülerinden belirlenmiştir.

3.2.11 Üretilen AgNP'lerin biyolojik özelliklerinin incelenmesi

AgNP'ler çok çeşitli biyolojik özellikler sergileyebilmektedir. Tez çalışması kapsamında hücre göçü ve yara kapanması üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanan AgNP'lerin özellikle medikal kullanımı için oldukça önemli olan biyolojik etkileri incelenmiştir. Bu kapsamda AgNP'lerin minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) yöntemiyle antimikrobiyal aktivitesi, antibiyofilm, antioksidan aktivitelerine ek olarak çeşitli sağlıklı ve kanser hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisine bakılmıştır.

3.2.11.1 Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) yöntemiyle antimikrobiyal aktivite analizleri

MİK, denenen materyalin görünür mikrobiyal üremeyi tamamen engelleyen en düşük konsantrasyonunu ifade etmektedir. Elde edilen AgNP'lerin MİK değerleri, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) 2016 kılavuzlarına göre belirlenmiştir (CLSI 2016). AgNP'lerin antimikrobiyal etkinliğinde, çok çeşitli Gram-negatif ve Gram-pozitif mikroorganizmanın yanı sıra ökaryotik iki mikroorganizma da taranmıştır. Tez çalışması kapsamında AgNP'lerin *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O157:H7 ATCC 35150, *S. enterica* subsp. *enterica* ATCC 13311, *A. baumannii* ATCC 19606, *K. pneumoniae* ATCC 13883, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, Metisilin-dirençli *S. aureus* ATCC 43300, *S. epidermidis* ATCC 35984, *E. faecium* NJ-1 (WHO-3), *E. faecalis* ATCC 29212, *S. mutans* ATCC 25175, *Listeria monocytogenes* NCTC 5348, *C. albicans* ATCC 10231 ve *C. parasilosis* ATCC 22019 patojenleri üzerine antimikrobiyal etkinliği belirlenmiştir.

AgNP'lerin minimum inhibe edici konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla mikrodilüsyon tekniği gerçekleştirilmiştir. Distile su kullanılarak steril koşullar altında AgNP'lerin seri dilüsyonları hazırlanmıştır. AgNP'lerin 2500-9.77 µg/mL aralığında yarı yarıya seyrelterek hazırlanan farklı konsantrasyonları 96 kuyulu mikrotitre plakalarda denenmiştir. Taranması kararlaştırılan 16 patojen Mueller Hinton Agar (MHA) besiyerinde 37°C'de 18-24 saat geliştirildikten sonra steril SF kullanılarak yoğunluk ayarlamaları yapılmıştır. 96 kuyulu mikrotitre plakalardaki kuyulara ilgili konsantrasyonlardaki AgNP'ler, Mueller Hinton Broth (MHB) besiyeri ve 0.5 McFarland standardı esas alınarak hazırlandıktan sonra 1/10 oranında seyreltilen patojen kültürü ilave edilmiştir. Patojenlerin deney esnasında ürediğini göstermek amacıyla MHB besiyeri ve patojen eklenen pozitif kontrol ve deney esnasında kontaminasyon olmadığını göstermek amacıyla yalnızca MHB besiyeri eklenen negatif kontrol kuyuları oluşturulmuştur (CLSI 2016, Garibo vd. 2020, Wasilewska vd. 2023). Bunun yanı sıra ticari olarak satın alınmış olan, kimyasal sentez ile üretilmiş 28-48 nm (Nanografi, SKU: NG04EO0105), 48-78 nm (SKU: NG04EO0103) ve 100 nm (SKU: NG04EO0112) olmak üzere 3 farklı boyuttaki AgNP'ler de deneye kontrol grubu olarak dahil edilmiştir.

Burada tez kapsamında üretilen biyolojik AgNP'ler ile ticari olarak satılan kimyasal AgNP'lerin antimikrobiyal aktivitesinin karşılaştırılması hedeflenmiştir. Deney 3 paralel olarak kurulmuştur. Mikrotitre plakalar 37°C'de 15 saat süresince inkübe edildikten sonra her bir patojen için üremenin gerçekleşmediği en düşük partikül konsantrasyonları MİK değeri olarak belirlenmiştir. Patojen üremesinin olmadığı belirlenen kuyulardan MHA besiyeri içeren petrilere damlatma yapılarak üremenin olmadığı ikinci bir adımla da teyit edilmiştir.

3.2.11.2 Antibiyofilm aktivite analizleri

AgNP'lerin antibiyofilm etkinliği, yine çeşitli Gram-negatif, Gram-pozitif ve ökaryotik mikroorganizmaya karşı taranmıştır. Tez çalışması kapsamında AgNP'lerin *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, *A. baumannii* ATCC 19606, *S. aureus* ATCC 25923, Metisilin-dirençli *S. aureus* ATCC 43300, *S. epidermidis* ATCC 35984, *E. faecium* 26 NJ-1 (WHO-3), *E. faecalis* ATCC 29212, *S. mutans* ATCC 25175, *C. albicans* ATCC 10231 ve *C. parasilosis* ATCC 22019 patojenleri üzerine antibiyofilm etkinliği belirlenmiştir.

AgNP'lerin antibiyofilm aktivitesini belirlemek için kristal viyole boyama tekniği kullanılmıştır. AgNP'lerin konsantrasyonları 2500-2.44 µg/mL arasına ayarlanmıştır ve 96 kuyulu mikrotitre plakalarında gerçekleştirilen deneyde kuyulara toplam 135 µL nanopartikül ve besiyeri eklenmiştir. Bahsi geçen biyofilm üreticisi patojenlerin her biri için biyofilm üretimi gerçekleştirdikleri bilinen farklı besiyerleri kullanılmıştır (Çizelge 3.22). Son olarak kuyulara 0.5 McFarland standardına göre ayarlandıktan sonra 1/10 oranında seyreltilen patojen kültürleri 15 µL olarak eklenmiştir. Deney kuyularına ek olarak, patojenlerin deney esnasında biyofilm ürettiğini göstermek amacıyla besiyeri ve patojen eklenen pozitif kontrol ve deney esnasında kontaminasyon olmadığını göstermek amacıyla yalnızca besiyeri eklenen negatif kontrol kuyuları oluşturulmuştur. Çizelge 3.20'de sunulan ilgili sıcaklık ve sürelerde inkübasyondan sonra, yapışmayan hücreleri uzaklaştırmak için plakalar steril SF ile yıkanmıştır. Kuyulara 200 µL %95 metanol eklenerek fiksasyon için oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra kuyulara %0.1 oranında hazırlanmış olan kristal viyole solüsyonu eklenmiş ve yine oda

sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Bekleme süresinden sonra, tutunmayan boyayı uzaklaştırmak için plakalar distile su ile yıkanmıştır. Oluşan biyofilm yapılarına tutunan boyayı çözmek için 200 µL etanol:aseton (70:30) uygulanarak plakalar UV-Vis spektroskopisinde 595 nm dalga boyunda okutulmuştur (Karaca 2018, Singh vd. 2021). Biyofilm miktarındaki azalma aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (3.1). [B: Boş (biyofilm yok, AgNP’ler yok, sadece ortam), C: Kontrol (biyofilm mevcut, AgNP’ler yok) ve T: Numune (biyofilm mevcut, AgNP’ler mevcut) için ölçülen optik yoğunluk değeri].

$$\text{“Azalma (\%)} = [(C - B) - (T - B)] / (C - B) \times 100\text{”} \quad (3.1)$$

Çizelge 3.22 Patojenlerin biyofilm üretiminde kullanılan koşullar

Patojen	Besiyeri	İnkübasyon Sıcaklığı
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	standart TSB + %2.5 NaCl + %0.5 glukoz	37°C
Metisilin-dirençli <i>S. aureus</i> ATCC 43300		
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	1/10 dilüe standart TSB	37°C
<i>E. faecium</i> [(NJ-1) (WHO-3)]	standart Brain Heart Infusion Broth (BHI)	37°C
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	standart BHI	37°C
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	standart TSB + %1 sükroz	37°C
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	standart TSB + %0.5 glukoz	37°C
<i>E. coli</i> ATCC 25922	tuzsuz Luria-Bertani Broth (LB) + %0.5 maya özütü + %1 tripton	28°C
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	1/10 dilüe standart LB	37°C
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	Sabouraud Dextrose Broth (SDB) + %1 glukoz	37°C
<i>C. parasilosis</i> ATCC 22019		

3.2.11.3 Antioksidan aktivite analizleri

AgNP’lerin antioksidan aktivitesi DPPH yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Blois 1958). Bu yöntem, kararlı serbest radikal DPPH’in elektron veya hidrojen atomları veren antioksidan kimyasalların varlığında, bu kimyasallar tarafından giderilmesi ile karakteristik mor rengin şiddetine bağlı olarak spektrofotometrik olarak belirlenmesi esasına dayanmaktadır.

AgNP'lerin konsantrasyonları 2500-4.88 µg/mL arasına ayarlanmış ve 96 kuyulu mikrotitre plakalarında gerçekleştirilen deneyde kuyulara metanol ile 0.1 mM konsantrasyonda hazırlanan DPPH çözeltisinden 150 µL ve etanol ile bahsi geçen konsantrasyonlardaki AgNP'lerin çözeltilerinden 50 µL eklenmiştir. Deney kuyularına ek olarak antioksidan aktivite gösterdiği bilinen gallik asit içeren kuyular pozitif kontrol ve AgNP'leri içermeyen, yalnızca DPPH çözeltisi içeren kuyular negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Kuyulara içerikler dağıtıldıktan sonra plakalar oda sıcaklığında ve karanlık koşullarda 30 dakika bekletilmiştir. Sürenin bitiminde plakalar UV-Vis spektroskopisinde 517 nm dalga boyunda okutulmuştur. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan AgNP'lerin antioksidan aktivitesi (RTA (radikal toplama aktivitesi)) aşağıda verilen formülden yararlanarak belirlenmiştir (3.2). [A_{kontrol} : negatif kontrol grubunun optik yoğunluğu, $A_{\text{örnek}}$: numunenin optik yoğunluk değeri].

$$\text{“RTA (\%)} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100\text{”} \quad (3.2)$$

3.2.11.4 Sağlıklı hücre hatlarına karşı sitotoksosite analizleri

Sentezlenen AgNP'lerin hücre canlılığı üzerindeki etkisi MTT testi (Mosmann 1983, Wallin ve Arscott 1998) ile araştırılmıştır. Sitotoksosite çalışmasında HDF, HaCaT ve L929 sağlıklı hücre hatları kullanılmıştır.

Hücreler uygun koşullar altında (%5 CO₂, 37°C > %90 nem) geliştirildikten sonra, enzimatik olarak tripsin-EDTA ile kaldırılmış ve hücre süspansiyonu santrifüj edilmiştir (1000 rpm, 5 dk). Daha sonra kuyulara, 3x10⁴ hücre/cm² olacak şekilde hücreler ekilmiş ve %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-glutamin içeren DMEM-HG besiyerinde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda hücrelerin üzerine 1500-1.95 µg/mL arasında farklı konsantrasyonlara ayarlanan AgNP'ler eklenmiştir. Ek olarak tez kapsamında biyolojik olarak üretilen AgNP'leri, kimyasal yöntemlerle üretilen AgNP'lerle karşılaştırmak amacıyla 28-48 nm, 48-78 nm ve 100 nm boyutlarında üç farklı ticari kimyasal nanopartikül çalışmaya eklenmiştir. Ayrıca, sadece hücre ve DMEM-HG içeren kuyular negatif kontrol, %5 DMSO içeren kuyular pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Daha sonra 96 kuyulu plakalar 48 saat inkübe edilmiştir. Süre

sonunda, kuyulardaki kültür ortamı çekilerek MTT solüsyonu (5 mg/mL, PBS’de, pH: 7.4) eklenmiştir ve 3 saat boyunca 37°C’de inkübe edilmiştir. 3 saatin sonunda, MTT solüsyonu çekilmiş ve 0.04 M HCl içeren izopropanol eklenmiştir. Plakalar, UV-Vis spektroskopisinde referans olarak 690 nm kullanılarak 570 nm dalga boyunda okutulmuştur (Devanesan ve AlSalhi 2021, Karakeçili vd. 2022). Hücre canlılığı, negatif kontrol değerine kıyasla aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır (3.3). [OD_{570e}: numunenin optik yoğunluk değeri, OD_{570b}: negatif kontrol grubunun optik yoğunluğu].

$$\text{“Canlılık (\%)} = (\text{OD}_{570e} / \text{OD}_{570b}) \times 100\text{”} \quad (3.3)$$

Elde edilen % canlılık değerlerine göre, yarı-maksimum inhibitör konsantrasyonu (IC₅₀) değerleri GraphPad Prism 9.2.0 yazılımı ile hesaplanmıştır.

3.2.11.5 Kanser hücre hatlarına karşı sitotoksiste analizleri

AgNP’lerin kanser hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi yine MTT testi ile Bölüm 3.2.11.4’te anlatıldığı şekilde araştırılmıştır. Kanser hücre hatları olarak MCF-7, HT-29 ve A549 kullanılmıştır. Ek olarak özellikle solid tümörlerin tedavisinde kullanılan, yaygın ve etkili bir kemoterapi ilacı olan 5-Fluorourasil (5-FU) deneylere dahil edilerek, AgNP’lerin etkilerinin bu kemoterapi ilacının etkileriyle karşılaştırılması hedeflenmiştir.

3.2.12 *In vitro* yara modeli ve yara kapanma analizi (scratch assay)

Farklı dozlarda AgNP’leri içeren proliferasyon ortamlarının, yara iyileşmesinde büyük önem arz eden hücre göçüne (migrasyonu) etkisinin belirlenebilmesi için çalışmalar yürütülmüştür. AgNP’lerin HDF ve HaCaT hücre göçü üzerine olan etkileri yara iyileşme deneyi yapılarak belirlenmiştir (Liang vd. 2007, Fronza vd. 2009, Gan vd. 2019). AgNP’lerin hücre göçü ile hücreler üzerindeki yarayı kapatma etkisine bakmak amacıyla hücreler, 48 kuyulu hücre kültür plakalarına Bölüm 3.2.11.4’te gerçekleştirilen sitotoksiste çalışmalarıyla aynı oranda (3x10⁴ hücre/cm²) ekilerek 37°C’de %5 CO₂ ile 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler istenilen yoğunluğa ulaştığında steril pipet

ucu kullanılarak kuyucuklara doğrusal bir çizik atılmış ve yapay bir yara bölgesi oluşturulmuştur. Daha sonra bütün kuyucuklar, mekanik etki ile kaldırılan hücrelerin ve hücre kalıntılarının uzaklaştırılması amacıyla PBS ile 2 kez yıkanmıştır. Ardından çizik oluşturulmuş kuyulara Bölüm 3.2.11.4’te gerçekleştirilen sitotoksisite çalışmaları neticesinde ilgili hücre hattı için belirlenen IC₅₀, IC_{50/2} ve IC_{50/4} konsantrasyonlarında AgNP’ler içeren besiyeri eklenmiştir. Negatif kontrol grubu olarak yine çizik oluşturulmuş kuyulardaki hücrelerin üzerine yalnızca besiyeri eklenmiştir. HDF ve HaCaT hücrelerinin boşluğa doğru hareketi 24 ve 48. saatlerde inverted mikroskop kullanılarak incelenmiştir. Yara alanının iki kenarı arasında kalan mesafe ImageJ yazılımı kullanılarak analiz edilmiş ve yara kapanma yüzdeleri aşağıda verilen formüle (3.4) göre hesaplanmıştır (Buachan vd. 2014). [A: Yaranın 0. saatteki genişliği, B: Yaranın belirli saatteki genişliği]

$$\text{“Yara Kapanması (\%)} = [(A - B) \times 100] / A” \quad (3.4)$$

3.2.13 İstatistiksel analiz

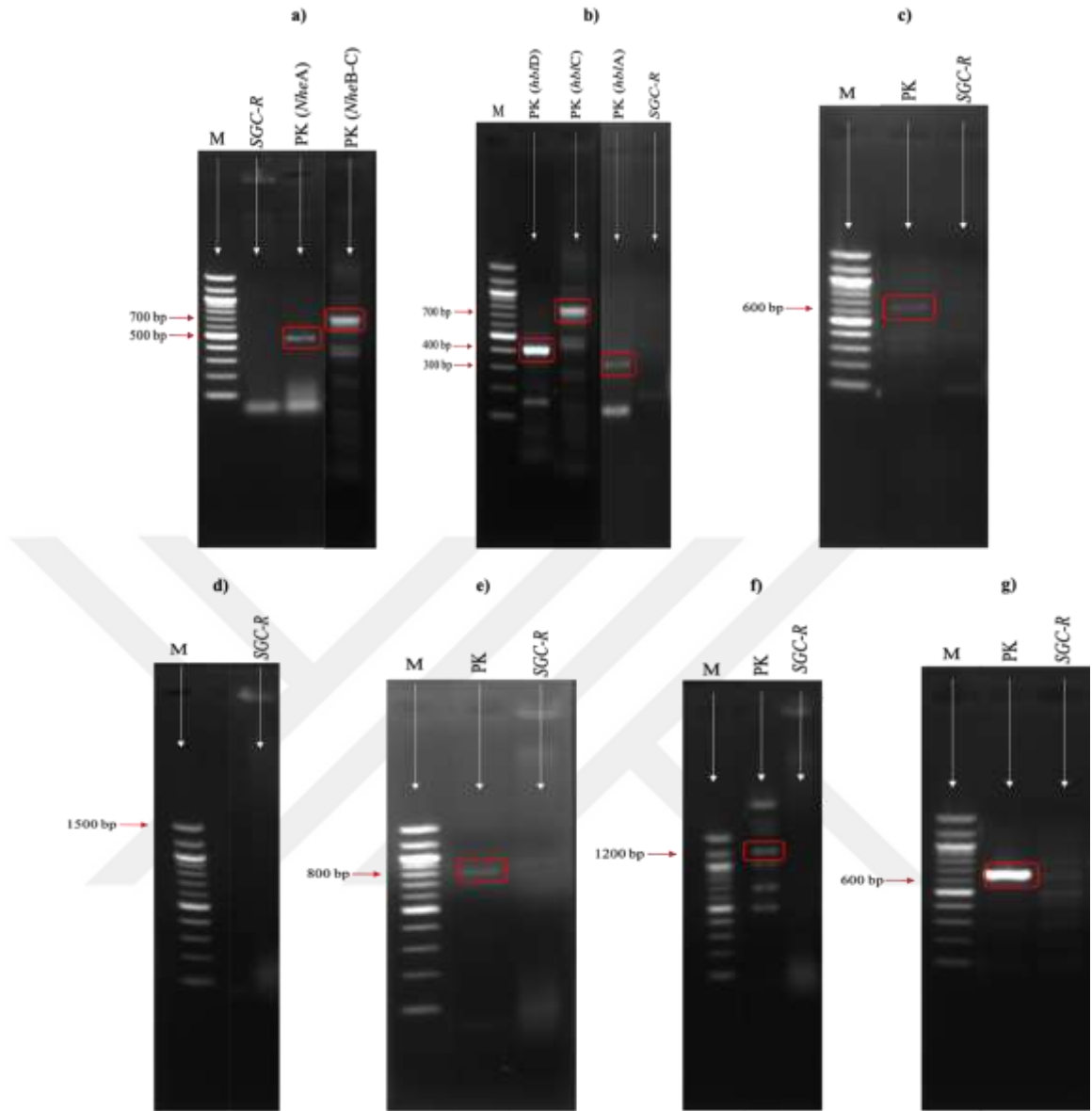
Tez çalışmasından elde edilen tüm veriler, ilişkili standart sapmalarla birlikte ortalama değerler olarak sunulmuştur. Çoklu karşılaştırmalar, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey post-hoc testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm istatistiksel analizler GraphPad yazılımı (sürüm 9.2.0, Boston, MA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 *SGC-R*'de Olası Toksisite Genlerinin Varlığının veya Noksanlığının PCR Reaksiyonları Sonuçları ve *In Silico* Azot Metabolizması Tahmini

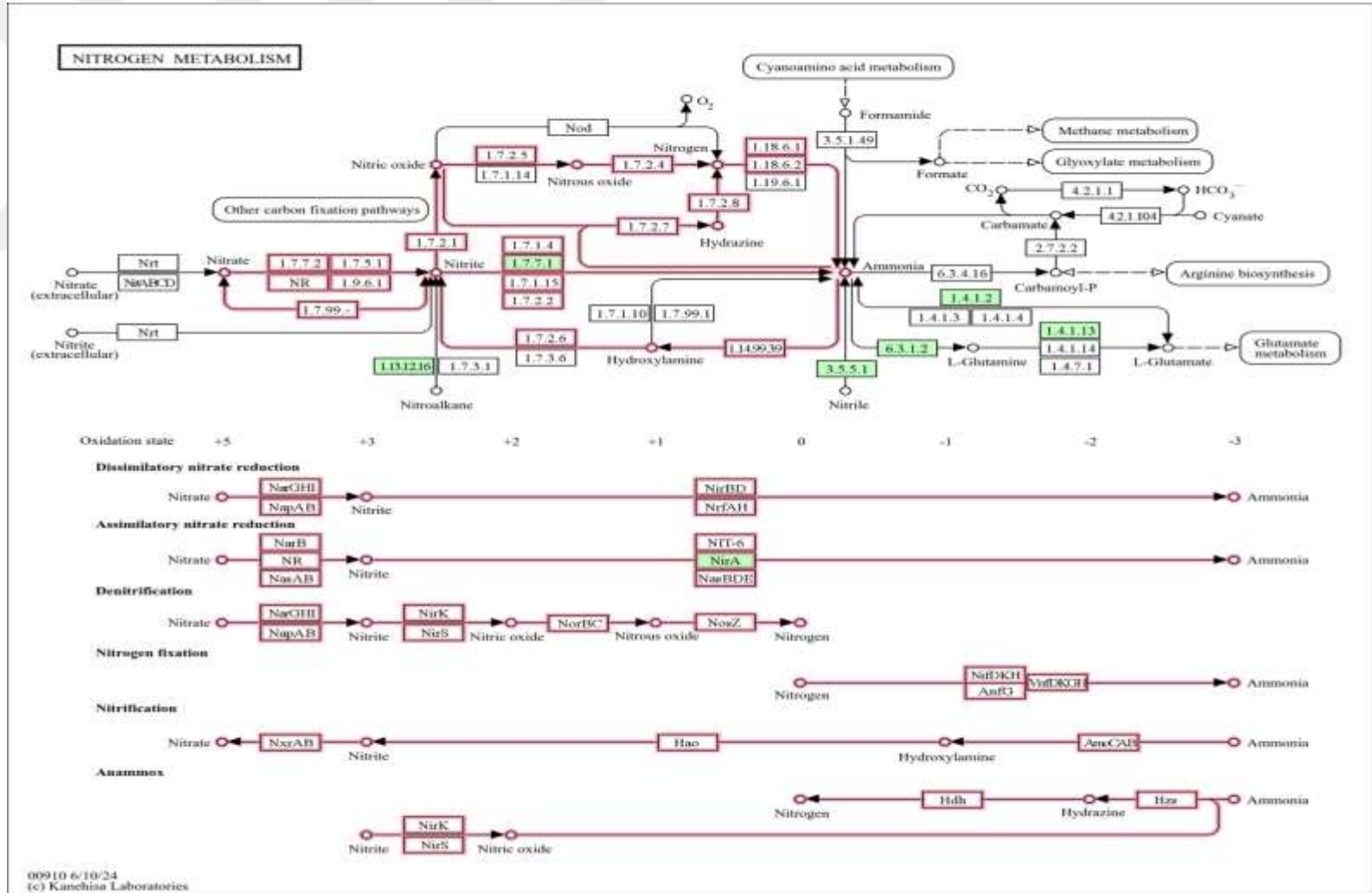
Termofilik *SGC-R*'nin genomik DNA'sı kullanılarak hbl A-B-C-D, CK, Nhe A-B-C, bceT, EM1 ve Ces1 toksisite genlerinin varlığı veya noksanlığı taranmıştır. Bahsi geçen 11 gen için spesifik olan primerlerle gerçekleştirilen PCR çalışmalarına ait sonuçlar Şekil 4.1'de sunulmuştur. Elde edilen PCR sonuçlarına göre *SGC-R*'nin test edilen 11 toksisite geni açısından da noksan olduğu bulunmuştur.

SGC-R'de *in silico* azot metabolizmasının varlığını belirlemek için yürütülen çalışmanın sonuçları Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Bakterinin ilgili metabolik yolda sahip olduğu proteinler/genler kırmızı ile gösterilmiştir. KEGG analizi, *SGC-R*'nin azot metabolizmasında tam disimilasyon ve asimilasyon nitrat indirgeme, denitrifikasyon, azot fiksasyonu, nitrifikasyon ve anammoks yollarını ortaya koymuştur. Elde edilen sonuçlara göre *SGC-R*; disimilasyon periplazmik nitrat redüktaz olan NapAB, solunum zarıyla ilişkili nitrat redüktazları olan NarGHI ve NarB ve asimilasyon için sitoplazmik nitrat redüktaz olan NasAB enzimlerine sahiptir. AgNO₃ substratından önemli miktarda biyolojik gümüş nanopartikül üretme kabiliyeti, bu azot metabolizması ile ilgili gen setlerinin varlığı ile açıklanabilmektedir.



Şekil 4.1 Toksin genlerine ait PCR çalışmasının agaroz jel elektroforez görüntüleri

(a) NheA (565 bp), NheB (755 bp) ve NheD (769 bp) toksin genlerini (PK NheA: *E. coli* O157:H7, PK NheB-C: *B. cereus*), (b) hblA (319 bp), hblD (429 bp) ve hblC (749 bp) toksin genlerini (PK: *B. subtilis* subsp. *subtilis*), (c) EM1 (635 bp) toksin genini (PK: *B. subtilis* subsp. *subtilis*), (d) hblB (2684 bp) toksin genini (PK: *E. coli* O157:H7), (e) CK (809 bp) toksin genini (PK: *E. coli* O157:H7), (f) Ces1 (1271 bp) toksin genini (PK: *B. subtilis* subsp. *subtilis*) ve (g) bceT (661 bp) toksin genini (PK: *E. arabatum*) içermediğini ispatlayan PCR çalışmasının agaroz jel elektroforez görüntüleri

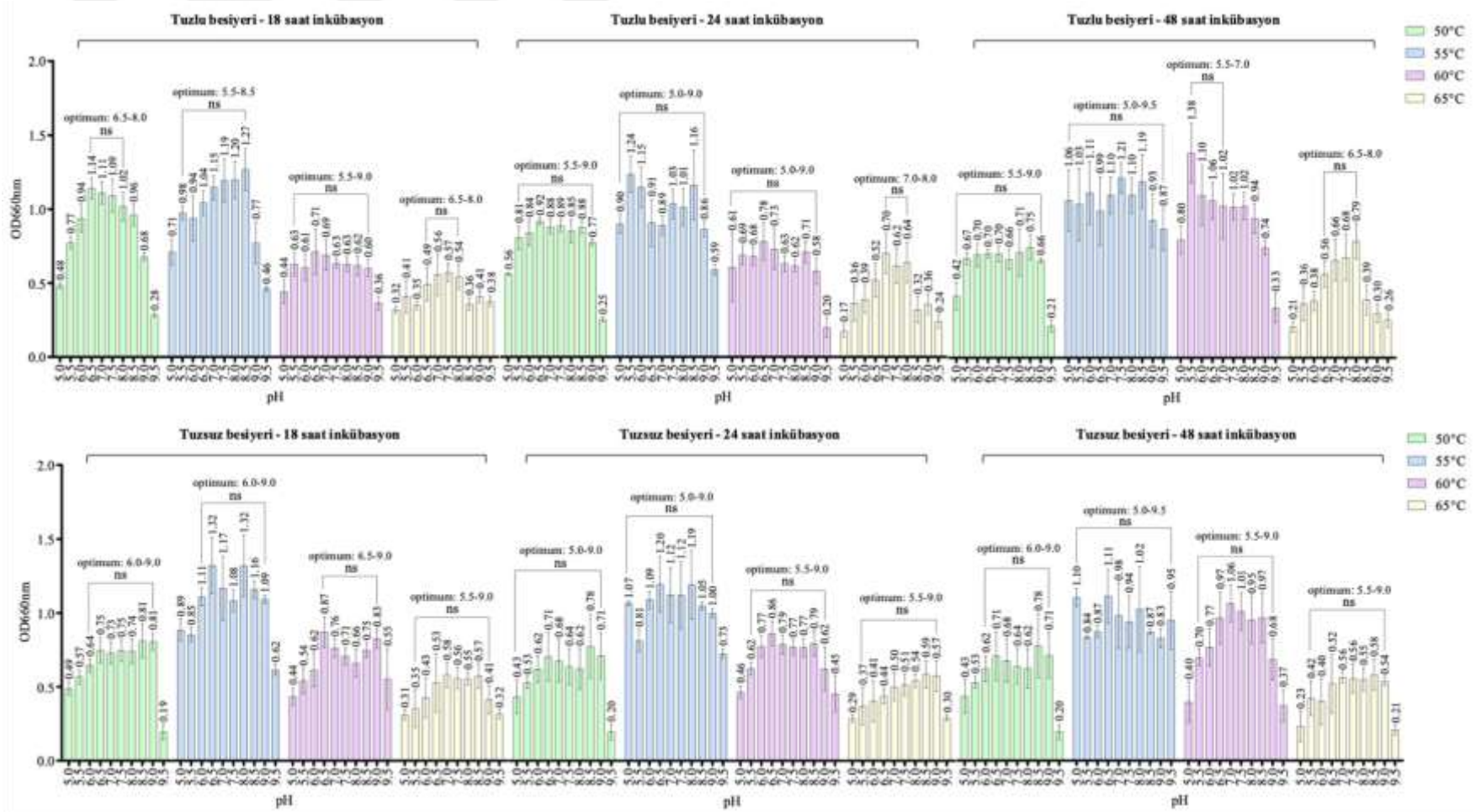


Şekil 4.2 SGC-R'ye ait azot metabolizması yolağı [1.13.12.16: nitrat monooksijenaz, 1.7.7.1: ferredoksin-nitrit redüktaz, 3.5.5.1: nitrilaz, 6.3.1.2: glutamin sentaz, 1.4.1.2: glutamat dehidrogenaz, 1.4.1.13: glutamat sentaz]

4.2 SGC-R'nin Farklı Koşullarda Mikrobiyal Gelişim Sonuçları

Tez kapsamında, mikrotitrasyon plaka kuyularında 3'er paralel olarak gerçekleştirilen çalışmalar neticesinde AgNP'lerin üreticisi olan SGC-R'nin mikrobiyal gelişim koşulları belirlenmiştir. Denenen farklı gelişim parametreleri neticesinde kültür ortamlarının UV-Vis spektroskopisinde 660 nm dalga boyunda okutulan mikrobiyal üreme yoğunluklarının karşılaştırılması sonucu ideal parametreler belirlenmiştir.

İlk olarak SGC-R'nin mikrobiyal gelişimi, TSB besiyerinin standart içeriğine (%0.5 NaCl katkılı) ve NaCl katkısız içeriğine göre belirlenmiştir. Besiyeri tuz içeriğinin yanı sıra, besiyeri pH'sı (5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 ve 9.5), sıcaklık (50°C, 55°C, 60°C ve 65°C) ve inkübasyon süresi (18 saat, 24 saat ve 48 saat) gibi temel çevresel faktörlerin de SGC-R'nin mikrobiyal gelişimi üzerine olan etkileri araştırılmıştır. SGC-R'nin NaCl içeren ve içermeyen TSB besiyelerindeki, farklı pH'lardaki, farklı inkübasyon sıcaklıklarındaki ve farklı inkübasyon süreleri sonunda 660 nm dalga boyundaki yoğunlukları Şekil 4.3'te verilmiştir. SGC-R'nin hem tuzlu TSB hem de tuzsuz TSB besiyelerinde en iyi gelişim gösterdiği sıcaklıklar 55°C olarak belirlenmiştir. 24 ve 48 saat aralıklarında inkübasyon sürelerinin mikrobiyal gelişim için çok daha etkili olduğu görülmüştür. Denenen farklı pH değerleri incelendiğinde çoğunlukla dikkate değer farklılıklar olmadığı saptanmış ve bir sonraki adım olan AgNP'lerin üretiminin mikrobiyal üreme düzeyinde optimizasyonunda, AgNP'lerin üretimi için oldukça kritik bir parametre olan pH'nın bu geniş aralıkta denenmesine karar verilmiştir. Yine besiyerinin tuz ihtiva edip etmemesinin de AgNP'lerin üretiminde etkili olabileceği düşünüldüğünden bir sonraki adımda iki koşulun da denenmesi uygun bulunmuştur.



Şekil 4.3 SGC-R'nin farklı tuz oranı, pH, sıcaklık ve sürelerde OD₆₆₀ ölçüm sonuçları (One-Way ANOVA, Tukey Testi, $p < 0.05$)

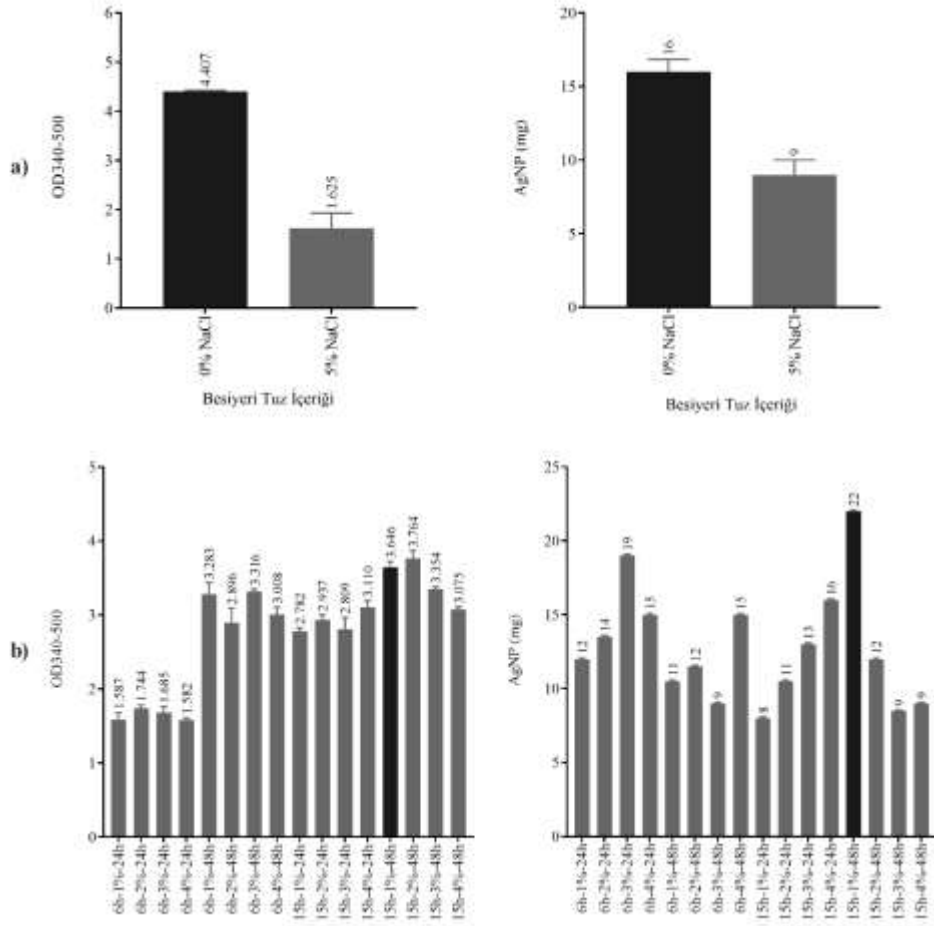
4.3 AgNP'lerin Üretiminin Mikrobiyal Gelişim Düzeyinde Optimizasyon Sonuçları

Bu aşamada *SGC-R*'nin mikrobiyal gelişim koşullarının optimizasyon çalışmaları AgNP'lerin üretim kapasitesi bakımından değerlendirilmiştir. Çalışmaların tamamı 3'er paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Bu bölümde denenen tüm farklı parametreler neticesinde elde edilen AgNP'ler Bölüm 3.2.5'te anlatılan 4 adımlı tayine tabi tutularak en ideal kültür koşulları seçilmiştir.

İlk olarak bakterinin geliştirileceği besiyerinin tuz ihtiva edip etmemesinin ve ön aktifleştirme süresi, inokülasyon miktarı ve inkübasyon süresinin AgNP'lerin üretim kapasitesi üzerine etkileri sınanmıştır. Tuzlu TSB ve tuzsuz TSB'de geliştirilen kültürlerden elde edilen süpernatantlara son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde AgNO_3 eklenerek 55°C'de 48 saat süresince inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda tayin adımlarından olan UV-Vis spektroskopisinde 400-450 nm arasında elde edilen piklere ait OD değerleri ve AgNP'lerin pelet ağırlıklarına ait sonuçlar Şekil 4.4a'da verilmiştir. Yine tayin adımlarından olan sarıdan kahverengiye renk değişimi ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 ile *S. aureus* ATCC 29213 patojenlerine karşı gerçekleştirilen antimikrobiyal aktivite taraması sonuçlarına ek olarak 660 nm'de ölçülen kültür yoğunluğu ve AgNP'lerin pelet miktarları kullanılarak hesaplanan AgNP'lerin verim katsayısı sonuçları Çizelge 4.1'de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde kültür yoğunluğunda kayda değer bir fark olmamakla birlikte, tuz ihtiva eden besiyerinde geliştirilen kültürden elde edilen nanopartiküllerin 400 ila 450 nm arasında daha düşük absorpsiyon piki vermesi ve elde edile AgNP'lerin pelet miktarlarının (mg) oldukça düşük olması bu koşulda AgNP'lerin üretiminin başarılı olmadığını göstermiştir. Paralel olarak sarıdan kahverengiye renk değişiminin de yine Tuzlu TSB besiyerinde çok düşük olduğu gözlenmiştir. Bu sebeple, AgNP'lerin üretim çalışmalarına tuzsuz besiyeri ile devam edilmesine karar verilmiştir.

Besiyeri tuz oranına karar verilmesini takiben gerçekleştirilen 6 saat-15 saat olmak üzere iki farklı ön aktifleştirme süresi, AgNP'lerin üretiminin gerçekleştirileceği besiyerine uygulanacak olan %1, %2, %3, %4 oranlarında dört farklı inokülasyon miktarı ve son olarak 24 saat, 48 saat olmak üzere iki farklı inkübasyon süresinin sınıandığı bir

optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.4b’de ve Çizelge 4.1’de paylaşılmıştır. AgNP’lerin 400 ila 450 nm arasında ölçülen absorpsiyon pikleri ve pelet miktarları değerlendirildiğinde 15 saat ön aktifleştirme, %1 inokülasyon miktarı ve 48 saat inkübasyon koşullarından en yüksek sonuçların elde edildiği görülmektedir. AgNP’ler için karakteristik olan 400-450 nm arasında pike sahip olan ve sarıdan kahverengiye renk değişiminin en iyi gözlemlendiği koşullarla antimikrobiyal aktivite tayini yapılmış ve elde edilen zon çapları incelendiğinde de yine en iyi zonları 15 saat ön aktifleştirme, %1 inokülasyon miktarı ve 48 saat inkübasyon koşullarında üretilen AgNP’lerde saptandığından, bundan sonraki çalışmalarda bu parametrelerin uygulanmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.4 Farklı kültür parametreleri neticesinde elde edilen AgNP’lerin OD₃₄₀₋₅₀₀ ölçüm sonuçları ve kuru ağırlıkları. (a) besiyerinin tuz içeriği ve (b) ön aktifleştirme süresi ve inokülasyon miktarı

Çizelge 4.1 SGC-R'nin besiyeri tuz miktarı, ön aktifleştirme süresi ve inokülasyon miktarı koşullarının optimizasyonu sonucu mikrobiyal gelişimi ve elde edilen AgNP'lerin bu patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite taraması

Optimizasyon parametreleri	OD ₆₆₀	Renk değişimi	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 (mm)	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 (mm)	AgNP'lerin ortalama peletleri (mg)	AgNP'lerin verim katsayısı**
NaCl konsantrasyonu (55°C, pH 7.3, 48 saat, 120 rpm)						
%0.5 NaCl	0.249	+	10 mm	10 mm	9	1.0
%0 NaCl	0.231	+++	9 mm	10 mm	16	1.8
Ön Aktifleştirme Süresi ve İnokülasyon Miktarı (Tuzsuz TSB, pH 7.3, 55°C, 170 rpm)						
15 saat ön aktifleştirme, %3 inokülasyon, 24 saat inkübasyon	0.231	+++	10 mm	10 mm	13	1.4
15 saat ön aktifleştirme, %4 inokülasyon, 24 saat inkübasyon	0.249	++	9 mm	10 mm	16	1.8
15 saat ön aktifleştirme, %1 inokülasyon, 48 saat inkübasyon	0.345	+++	11 mm	11 mm	22	2.4
15 saat ön aktifleştirme, %2 inokülasyon, 48 saat inkübasyon	0.303	++	-	-	12	1.3

*: şeffaf zon,

** : Verim katsayısı = İlk AgNP'lerin ağırlığı (mg)/Son AgNP'lerin ağırlığı (mg)

+: renk değişimi zayıf

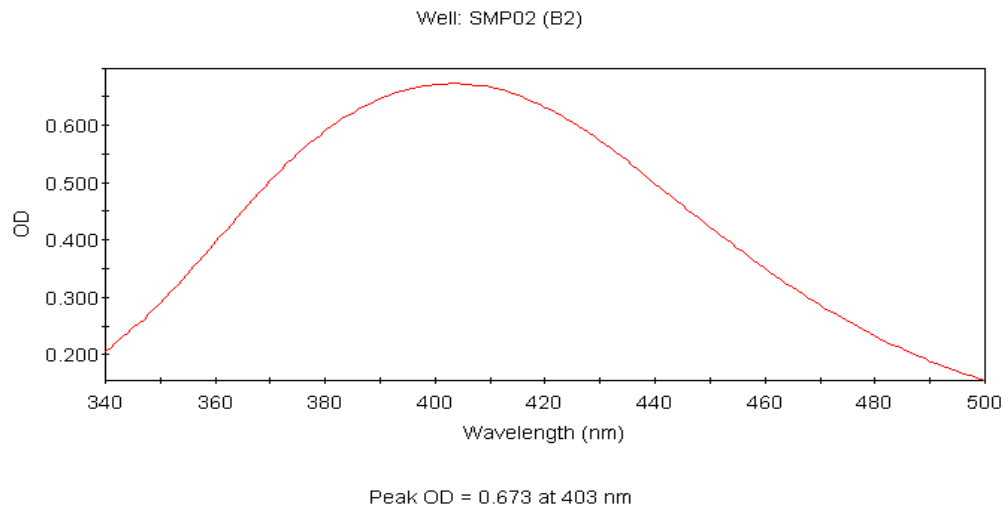
++: renk değişimi orta düzey

+++ : renk değişimi güçlü

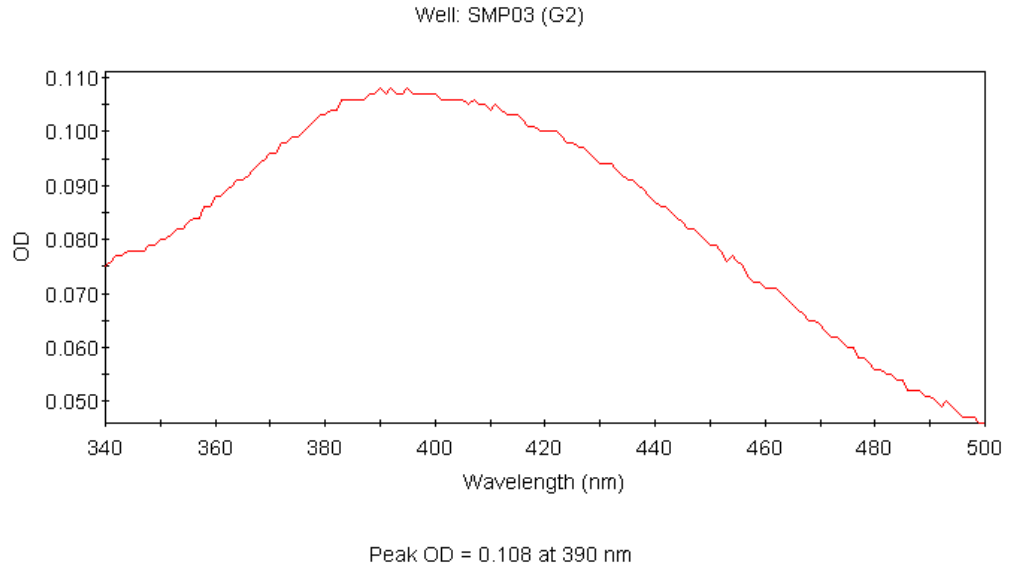
AgNP'lerin üretimi için bakterinin geliştirileceği besiyerinin tuz içeriği ve deney kurulum koşullarına karar verilmesini takiben, optimizasyon çalışmaları kapsamında besiyeri pH'sının, doğrudan blank olarak kullanılan besiyerinin ve inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi amaçlanmıştır. 15 saat ön aktifleştirme ve %1 oranında inokülasyonları gerçekleştirilen örnekler 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5 ve 10.0 olmak üzere on farklı pH değerine sahip tuzsuz besiyerlerinde 48 saat süreyle geliştirildikten sonra daha önce anlatıldığı şekilde AgNP'ler elde edilmiştir (Şekil 4.7a). Elde edilen yapılardan 400-450 nm arasında pike sahip olmayanlar elendikten sonra antimikrobiyal aktivite

taramaları gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.2). AgNP'lerin üretim sonuçlarına bakıldığında; pH'sı 5.0, 5.5, 6.0 ve 6.5 olan besiyerlerinde geliştirilen kültürlerin hücresiz süpernatantları ile AgNP'ler üretilenmemiştir. AgNP'lerin üretimi pH 7.0 ve daha yüksek pH değerlerinde gerçekleşmektedir. AgNP'lerin pelet miktarları, AgNP'lerin OD değerleri ve patojenlere karşı sergiledikleri antimikrobiyal etkinlikler göz önünde bulundurulduğunda pH 8.5 koşullarının en iyi sonuçlara sahip olduğu görülmekle birlikte, pH 7.5 ve 8.0 koşullarının da yine bir sonraki aşama olan besiyeri seçiminde değerlendirilmesine karar verilmiştir.

Bu deneyde pH değerleri 7.5, 8.0 ve 8.5 olarak ayarlanmış tuzsuz TSB ve tuzsuz NB besiyerleri analiz edilmiştir. Bu besiyerleri, önceki aşamalarda belirlenen koşullarda bakteri inokülasyonu yapılmış ve bakteri inokülasyonu yapılmamış boş besiyerleri olarak iki gruba ayrılmıştır. Bakteri inokülasyonu içeren ve içermeyen her iki gruba da son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde AgNO₃ eklenerek 55°C sıcaklıkta çalkalamalı koşullarda (120 rpm/dk) 48 saat süresince inkübe edilmiştir. 48 saat sonunda inokülasyon yapılmamış TSB besiyerinde sarıdan kahverengi rengine dönüşün yüksek olduğu ve UV-Vis spektroskopisinde AgNP'ler için karakteristik aralık olan 400-450 nm arasında pozitif pik verdiği görülmüştür (Şekil 4.5). NB besiyerinde renk değişimi gözlenmemiş ve UV-Vis spektroskopisinde AgNP'lerin aralığının dışında kalan 390 nm'de farklı bir pik verdiği görülmüştür (Şekil 4.6).



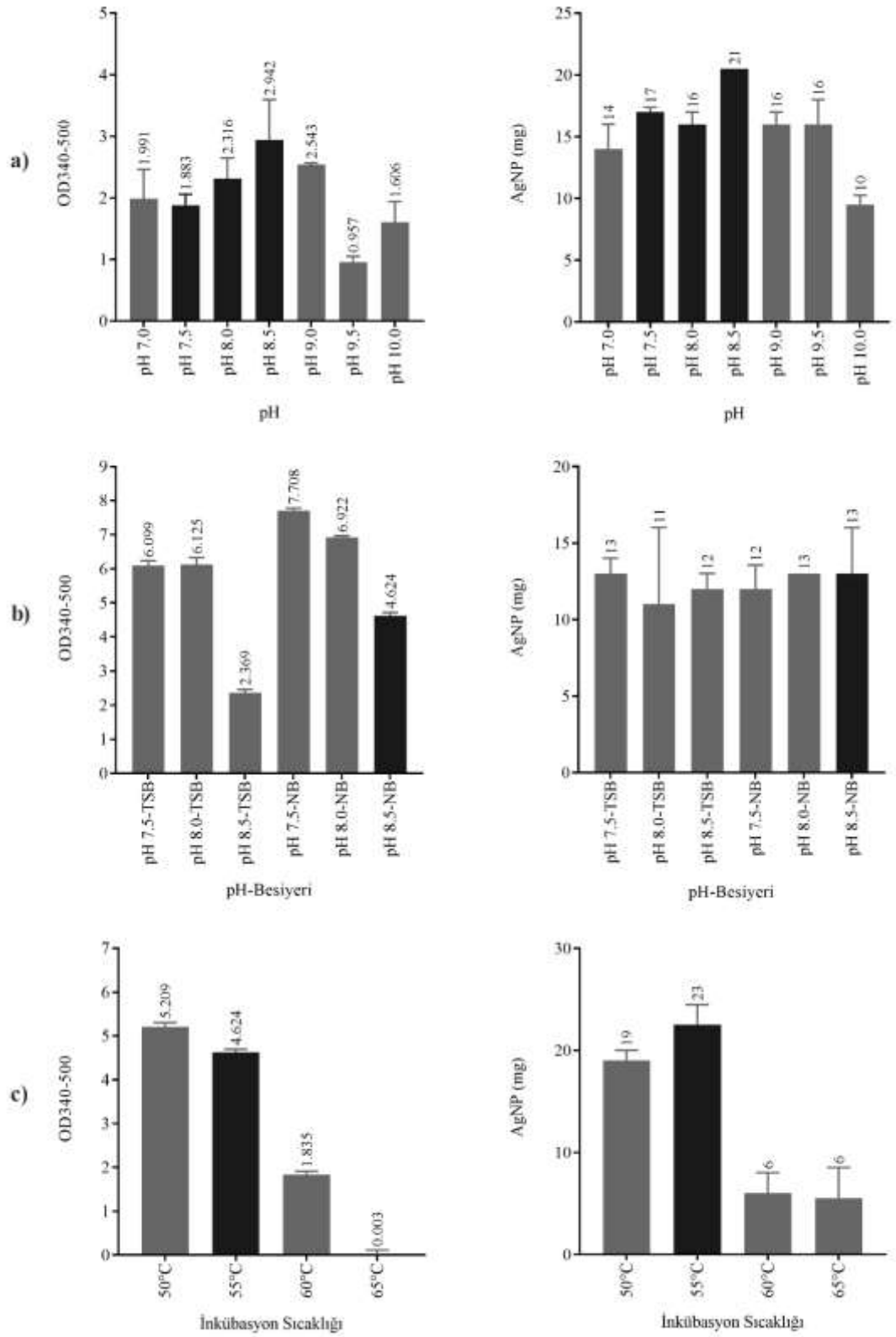
Şekil 4.5 Kültür içermeyen ve AgNO₃ ile muamele edilen pH 8.5 değerine sahip TSB besiyerinin UV-Vis spektroskopisinde 350-500 nm arasında tarama sonucu (Yüzey Plazmon Rezonans Piki OD: 0.673)



Şekil 4.6 Kültür içermeyen ve AgNO_3 ile muamele edilen pH 8.5 değerine sahip NB besiyerinin UV-Vis spektroskopisinde 350-500 nm arasında tarama sonucu (Yüzey Plazmon Rezonans Piki OD: 0.108)

TSB ve NB besiyerlerinde geliştirilen kültür süpernatantlarından elde edilen AgNP'lere ait sonuçlar Şekil 4.7b ve Çizelge 4.2'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, AgNP'lerin pelet miktarlarının ve özellikle patojenlere karşı antimikrobiyal aktivitenin en yüksek olduğu koşulun NB besiyeri ve pH 8.5 olduğu saptanmıştır. AgNP'lerin OD değerleri bazı koşullardan düşük olmasına rağmen tezin nihai amacı biyolojik olarak etkin AgNP'ler üretmek olduğu için bu koşul seçilmiştir.

Son olarak 50°C, 55°C, 60°C ve 65°C olmak üzere dört farklı inkübasyon sıcaklığı sınanarak, mikrobiyal gelişim koşullarının AgNP'lerin üretim kapasitesi bakımından optimizasyonu tamamlanmıştır. 15 saat ön aktifleştirmeleri ve %1 oranında inokülasyonları gerçekleştirilen örnekler pH 8.5 değerine sahip tuzsuz NB besiyerinde, 50°C, 55°C, 60°C ve 65°C sıcaklıklarda 48 saat süreyle geliştirildikten sonra kültürlerin hücresiz süpernatantlarından elde edilen AgNP'lere ait sonuçlar Şekil 4.7c'de ve Çizelge 4.2'de sunulmuştur. AgNP'lerin OD ölçümleri, pelet miktarları ve özellikle sergilediği antimikrobiyal aktivite bakımından en ideal koşul 55°C olarak seçilmiştir.



Şekil 4.7 Farklı kültür parametreleri neticesinde elde edilen AgNP'lerin OD₃₄₀₋₅₀₀ ölçüm sonuçları ve kuru ağırlıkları. (a) besiyeri pH'sı, (b) besiyeri ve (c) inkübasyon sıcaklığı

Çizelge 4.2 SGC-R'nin besiyeri pH'sı, AgNP'lerin üretiminde kullanılacak besiyeri içeriği ve inkübasyon sıcaklığı koşullarının optimizasyonu sonucu mikrobiyal gelişimi ve elde edilen AgNP'lerin bu patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite taraması

Optimizasyon parametreleri	OD ₆₆₀	Renk değişimi	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 (mm)	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 (mm)	AgNP'lerin ortalama peletleri (mg)	AgNP'lerin verim katsayısı**
pH (Tuzsuz TSB, 15 saat ön aktifleştirme, %1 inokülasyon, 55°C, 120 rpm, 48 saat)						
pH 7.0	0.257	++	13 mm*	11 mm	14	1.6
pH 7.5	0.282	+++	11 mm*	11 mm	17	1.9
pH 8.0	0.268	+++	11 mm*	11 mm	16	1.8
pH 8.5	0.237	+++	11 mm*	11 mm	21	2.3
pH 9.0	0.261	+++	6 mm*	11 mm	16	1.8
pH 9.5	0.047	++	10 mm*	4 mm	16	1.8
pH 10.0	0.043	+	-	-	10	1.1
Besiyeri ve pH (15 saat ön aktifleştirme, %1 inokülasyon, 55°C, 120 rpm, 48 saat)						
pH 7.5 - Tuzsuz TSB	0.200	++	8 mm*	9 mm	13	1.4
pH 8.0 - Tuzsuz TSB	0.160	+++	8 mm*	10 mm	11	1.2
pH 8.5 - Tuzsuz TSB	0.061	+++	11 mm*	9 mm	12	1.3
pH 7.5 - Tuzsuz NB	0.121	+++	9 mm	-	12	1.3
pH 8.0 - Tuzsuz NB	0.115	+++	9 mm*	10 mm*	13	1.4
pH 8.5 - Tuzsuz NB	0.112	+++	11 mm*	16 mm*	13	1.4
Sıcaklık (Tuzsuz NB, 15 saat ön aktifleştirme, %1 inokülasyon, pH 8.5, 120 rpm, 48 saat)						
50°C	0.121	+++	5 mm	4 mm	19	2.1
55°C	0.112	+++	11 mm*	9 mm	23	2.6
60°C	0.085	++	2 mm*	-	6	0.7
65°C	0.061	+	2 mm*	-	6	0.7

*: şeffaf zon,

** : Verim katsayısı = İlk AgNP'lerin ağırlığı (mg)/Son AgNP'lerin ağırlığı (mg)

+: renk değişimi zayıf

++: renk değişimi orta düzey

+++ : renk değişimi güçlü

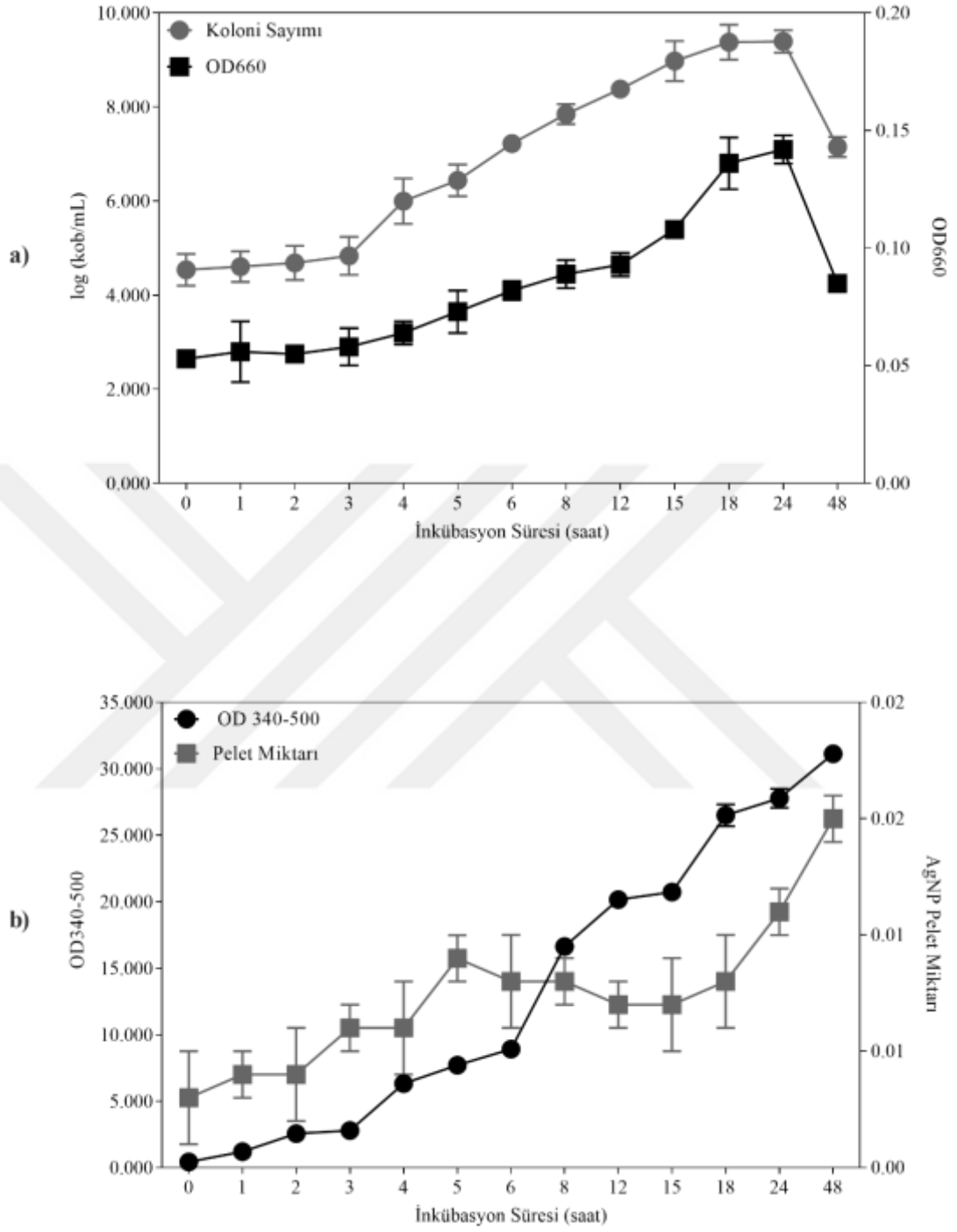
4.4 SGC-R'nin Büyüme Eğrisi ve AgNP'lerin 48 Saatlik Zamana Bağlı Üretimi

Tamamlanan tüm optimizasyon çalışmaları neticesinde belirlenen nihai koşullar ile 48 saat süresince geliştirilen kültürden 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 15, 18, 24 ve 48. saatlerde numuneler alınarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir. SGC-R öncelikle TSA besiyerinde 55°C'de 18-24 saat süresince geliştirilmiştir. Bu kültürden NB besiyerine OD 0.4-0.6 bulanıklıkta olacak şekilde inoküle edildikten sonra önceki çalışmalar neticesinde belirlenen ön aktiveleştirme süresi olan 15 saat boyunca 55°C'de çalkalamalı koşullarda (120 rpm/dk) geliştirilmiştir. Ön aktiveleştirmenin tamamlanmasının ardından yine belirlenen değer olan pH 8.5 değerine ayarlanan NB besiyerine %1 oranında inoküle edilmiştir. Kültür optimizasyon çalışmaları sonucu seçilen inkübasyon sıcaklığında (55°C) 48 saat çalkalamalı koşullarda (120 rpm/dk) inkübasyona bırakılmıştır.

Kültürden belirtilen 13 farklı zaman aralığında 3 adet 5'er ml'lik numuneler alınmıştır. Bu numuneler ile hem UV-Vis spektroskopisinde 660 nm'deki bakteri absorbansı ölçümü hem de seri dilüsyonlar yapılarak koloni sayımı gerçekleştirilmiştir. Sayım işlemleri log₁₀ tabanına çevrilerek mL başına düşen koloni oluşturan birim (kob/mL) dikkate alınarak hesaplanmıştır. İlgili saatlerde alınan numunelerin 660 nm dalga boyunda okutulmasıyla elde edilen optik yoğunluklar ve gerçekleştirilen koloni sayımlarının sonuçları ile bir büyüme eğrisi oluşturulmuştur. Oluşturulan büyüme eğrisi Şekil 4.8a'da sunulmuştur. Bakterinin mikrobiyal gelişimi incelendiğinde; 0-3 saat arasında lag fazı (gecikme fazı) olduğu anlaşılmaktadır. Bu faz aktif bölünmenin henüz başlamadığı bunun yerine büyüme ve bölünme için gerekli enzimlerin üretildiği ve yeni ortam koşullarına uyum sağlamak için metabolik faaliyetlerin gerçekleştiği fazdır (Madigan vd. 2017, Willey vd. 2023). Grafiğe bakıldığında hem koloni sayısının hem de OD₆₆₀ değerinin oldukça düşük ve genellikle sabit olduğu görülmektedir. 3-18 saat arası log fazı (eksponansiyel veya üstel faz) olarak tespit edilmiştir. Bu fazda, bakteriler aktif bir şekilde bölünmekte ve logaritmik bir şekilde çoğalmaktadır. Yani bu faz, hücrelerin bölünme hızının maksimumda olduğu ve üstel büyümenin gerçekleştiği dönemdir (Madigan vd. 2017, Willey vd. 2023). Grafikte de görüldüğü üzere bu saat aralığında koloni sayımında ve beraberinde OD₆₆₀ değerinde belirgin bir artış olmaktadır. Yani hücreler bu fazda aktif olarak çoğalmaktadır. 18-24 saat arası durağan faz olarak kabul edilebilir. Durağan faz,

hücre bölünme hızı ile ölüm hızının birbirine eşit olduğu aşamadır. Ortamdaki besin maddeleri tükenirken, atık maddeler birikmektedir. Toplam hücre sayısı en yüksek değere ulaşır ve büyük ölçüde sabit kalır. Aynı zamanda mikrobiyal stres yanıtlarının, ikincil metabolit üretimlerinin ve sporülasyon gibi biyolojik süreçlerin gerçekleştiği faz durağan fazdır (Madigan vd. 2017, Willey vd. 2023). Grafikten de anlaşıldığı üzere, 18. saatten sonra koloni sayısında ve OD₆₆₀ değerinde kayda değer bir artış olmamaktadır. 24-48 saat arası ölüm fazıdır. Bu fazda hücre ölüm hızı hücre bölünme hızından daha yüksektir. Bu fazda hücreler artık çoğalamaz ve canlı nüfus azalır (Madigan vd. 2017, Willey vd. 2023). Grafik incelendiğinde de canlı hücre sayısındaki azalma çok net bir şekilde görülmektedir.

Mikrobiyal üreme evrelerinin tespiti gerçekleştirildikten sonra kalan numunelerin hücresiz süpernatantları kullanılarak Bölüm 3.2.4'te anlatıldığı şekilde AgNP'lerin elde edilmiştir. Elde edilen AgNP'lerin pelet miktarları belirlenmiş ve AgNP'lerin peletleri distile su eklenerek çözülmüştür. AgNP'leri içeren koloidal solüsyonlar, UV-Vis spektroskopisinde 350 ila 500 nm arasında taranarak absorpsiyon pikleri tespit edilmiştir. AgNP'lerin OD değerleri ve pelet miktarlarının yer aldığı grafik Şekil 4.8b'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde hem OD değerinin hem de pelet miktarının 12. saatten itibaren arttığı ve 48. saatte en yüksek seviyeye ulaştığı gözlenmiştir.



Şekil 4.8 (a) *SGC-R*'nin 48 saat boyunca takip edilen mikrobiyal gelişimi ve (b) *SGC-R*'nin AgNP'lerinin üretimi

4.5 AgNP'lerin Üretiminin Süpernatant Düzeyinde Optimizasyon Sonuçları

AgNP'lerin üretiminin mikrobiyal gelişim düzeyinde optimizasyonu aşamasında belirlenmiş olan optimal kültür koşullarında geliştirilen SGC-R'nin NB besiyerindeki hücresiz süpernatantı bu aşamada AgNP'lerin üretiminin süpernatant düzeyinde optimize edilmesi amacıyla kullanılmıştır. Bu amaçla sırasıyla AgNO₃ konsantrasyonu (1.0, 1.5, 1.75 ve 2.0 mM), süpernatant pH'sı (7.0, 7.5, 8.0, 8.5 ve 9.0), inkübasyon sıcaklığı (50°C, 55°C, 60°C ve 65°C) ve inkübasyon süresi (24, 48 ve 72 saat) parametrelerinin optimizasyonu çalışılmıştır. Denenen tüm farklı parametreler neticesinde elde edilen AgNP'ler Bölüm 3.2.5'te anlatılan 4 adımlı tayine tabi tutularak en ideal süpernatant koşulları seçilmiştir.

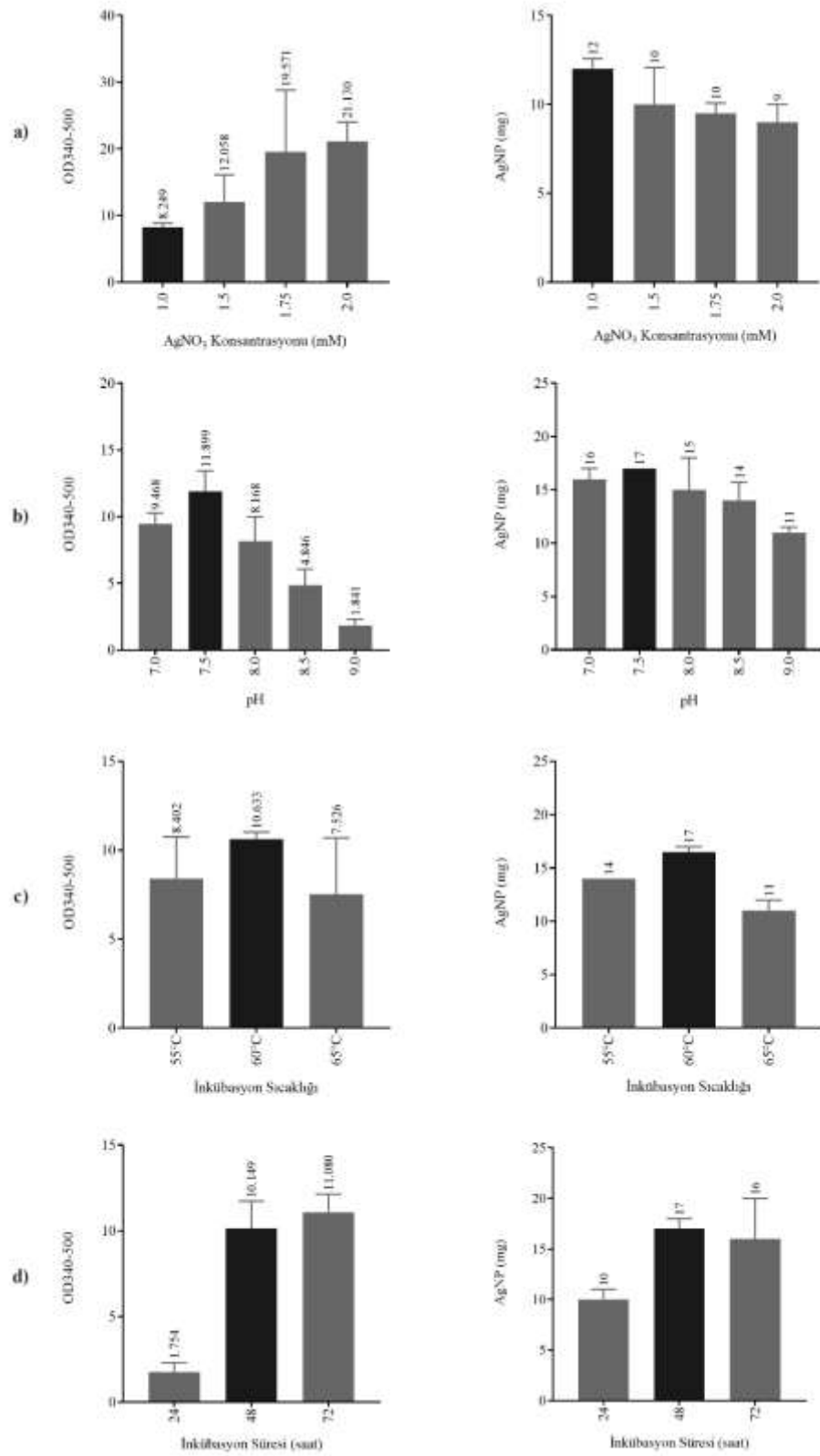
İdeal AgNO₃ konsantrasyonunu belirlemek için, taze olarak hazırlanan 100 mM AgNO₃ ana stok çözeltisinden son konsantrasyon 1 mM (0.001 M), 1.5 mM (0.0015 M), 1.75 (0.00175 M) ve 2 mM (0.002 M) olacak şekilde hücresiz süpernatantlara ilave edilmiştir. AgNO₃ çözeltisi eklenen süpernatantlar, 55°C'de 48 saat çalkalamalı koşullarda (120 rpm/dk) inkübe edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre (Şekil 4.9a) süpernatanta eklenen AgNO₃ konsantrasyonu arttıkça AgNP'lerin OD değerlerinin artmasına karşın, ölçülen AgNP'lerin pelet miktarlarının azaldığı görülmüştür. Ag⁺'in indirgenmesi Ag'nin detoksifikasyon yöntemidir fakat sistem doyumluğa ulaştığında indirgeme devam etmemekte ve biriken Ag⁺ hücreler üzerinde toksik etkiler yaratabilmektedir. Her zaman yüksek AgNO₃ konsantrasyonlarının daha fazla üretime yol açmadığı görülmekte ve bunun enzim doyumluğundan kaynaklandığı düşünülmektedir (Parikh vd. 2008, Gurunathan vd. 2009, Sharma vd. 2010, Singh vd. 2013). Antimikrobiyal aktivite sonucu oluşan zonlar incelendiğinde (Çizelge 4.3), AgNO₃ konsantrasyonu arttıkça oluşan zon çaplarında arttığı görülmüştür. Fakat indirgeyici tuz miktarının fazla olmasının sağlıklı hücreler üzerinde de toksisiteye sebep olma riski olduğundan bundan sonraki çalışmalarda eklenecek son konsantrasyonun 1 mM olmasına karar verilmiştir.

Hücresiz süpernatantların pH'ları 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 ve 9.0 olmak üzere beş farklı pH değerine ayarlandıktan sonra son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde AgNO₃ eklenerek 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. 350-500 nm aralığında OD okumaları gerçekleştirilerek

AgNP'lerin taraması ve AgNP'lerin pelet miktarları belirlenmiştir (Şekil 4.9b). Sonuçlara bakıldığında AgNP'lerin üretiminin en yüksek olduğu pH değerinin 7.5 olduğu saptanmıştır. Nihai kararı vermek adına antimikrobiyal aktivite yapılmış ve bu çalışmaya ait sonuçlar Çizelge 4.3'te sunulmuştur. İki farklı patojene karşı oluşturdukları zonlar göz önünde bulundurulduğunda yine pH 7.5 değerinin en iyi sonucu verdiğine karar verilmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda süpernatant pH değeri 7.5 olarak ayarlanarak devam edilmiştir.

Hücresiz süpernatant pH'sı 7.5 olarak ayarlandıktan ve süpernatanta son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde AgNO₃ çözeltisi eklendikten sonra 50°C, 55°C, 60°C ve 65°C olmak üzere 4 farklı sıcaklıkta AgNP'lerin eldesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.9c ve Çizelge 4.3'te sunulmuştur. AgNP'lerin üretim sonuçları değerlendirildiğinde; 50°C'de inkübe edilen süpernatantın AgNP'ler üretmediği belirlenmiştir. AgNP'ler için karakteristik OD aralığı olan 400 ila 450 nm arasında pik vermemiştir. Şekil 4.9c ve Çizelge 4.3'te AgNP'lerin üretimi bakımından pozitif olan sonuçlar sunulmuştur. Hem AgNP'lerin OD ölçümlerinin hem de pelet miktarının 60°C inkübasyon sonrası daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Patojenlere karşı oluşturdukları zonlar incelendiğinde yine en etkili koşulun 60°C inkübasyon olduğu görülmüştür.

Hücresiz süpernatant pH'sı 7.5 olarak ayarlanıp, süpernatanta son konsantrasyonu 1 mM (0.001 M) olacak şekilde AgNO₃ çözeltisi eklendikten sonra 60°C sıcaklıkta 24, 48 ve 72 saatlik sürelerle inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen OD değerleri ve pelet miktarlarına bakıldığında 24 saatlik örneklerde sonuçlar çok düşük, 48 ve 72 saatlik örneklerin sonuçları ise yüksektir (Şekil 4.9d). Fakat antimikrobiyal aktivite sonuçları incelendiğinde zon çaplarının 48 saatlik örneklerde daha iyi olduğu, 72 saat inkübasyonun biyolojik aktiviteyi düşürdüğü anlaşılmaktadır (Çizelge 4.3).



Şekil 4.9 Denenen farklı süpernatant parametreleri neticesinde elde edilen AgNP'lerin OD₃₄₀₋₅₀₀ ölçüm sonuçları ve kuru ağırlıkları. (a) AgNO₃ konsantrasyonu, (b) süpernatant pH'sı, (c) inkübasyon sıcaklığı ve (d) inkübasyon süresi

Çizelge 4.3 SGC-R'den elde edilen süpernatant koşullarının optimizasyonu sonucu elde edilen AgNP'lerin belirlenen patojenlere karşı antimikrobiyal aktivite taraması

Optimizasyon parametreleri	Renk değişimi	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 (mm)	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 (mm)	AgNP'lerin ortalama peletleri (mg)	AgNP'lerin verim katsayısı**
AgNO ₃ konsantrasyonu (55°C, pH 8.5, 48 saat, 120 rpm)					
1 mM	++	6 mm*	5 mm*	12	1.0
1.5 mM	++	7 mm*	5 mm*	10	0.8
1.75 mM	+++	7 mm*	7 mm*	10	0.8
2 mM	+++	10 mm*	10 mm*	9	0.8
pH (1mM AgNO ₃ , 55°C, 48 saat, 120 rpm)					
pH 7.0	+++	8 mm*	7 mm*	16	1.3
pH 7.5	+++	8 mm*	8 mm*	17	1.4
pH 8.0	+++	8 mm*	7 mm	15	1.3
pH 8.5	++	9 mm*	3 mm	14	1.2
pH 9.0	+	8 mm*	-	11	0.9
Sıcaklık (1mM AgNO ₃ , pH 7.5, 48 saat, 120 rpm)					
55°C	+++	9 mm*	9 mm*	14	1.2
60°C	+++	8 mm*	10 mm*	17	1.4
65°C	++	7 mm*	5 mm*	11	0.9
İnkübasyon süresi (1mM AgNO ₃ , 60°C, pH 7.5, 120 rpm)					
24 saat	++	7 mm*	9 mm*	10	0.8
48 saat	+++	8 mm*	10 mm*	17	1.4
72 saat	+++	6 mm*	7 mm	16	1.3

*: şeffaf zon,

**: Verim katsayısı = İlk AgNP'lerin ağırlığı (mg)/Son AgNP'lerin ağırlığı (mg)

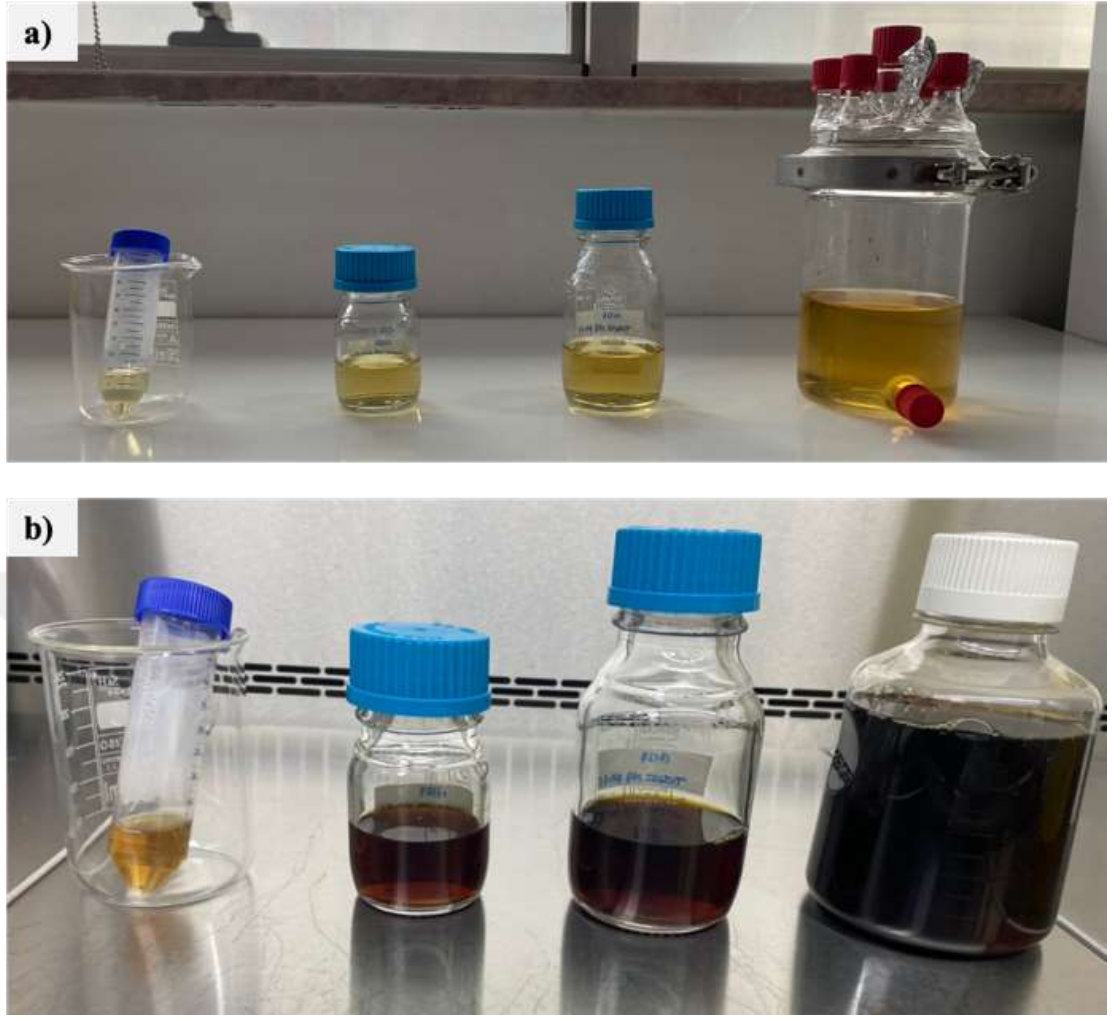
+: renk değişimi zayıf

++: renk değişimi orta düzey

+++ : renk değişimi güçlü

4.6 Laboratuvar Ölçeğinde (Lab-Scale) AgNP'lerin Üretimi

Tezin bu aşamasında SGC-R'nin lab-scale üretimi belirlenen optimal gelişim koşullarında (15 saat ön aktifleştirme, %1 inokülasyon, Tuzsuz NB, pH 8.5, 55°C, 48 saat inkübasyon) hazırlanan kültürün 10 mL'den 500 mL'ye kadar ölçeklendirilen hacimlerinde gerçekleştirilmiştir. Artan üretim hacimlerindeki AgNP'lerin üretim kapasitesini gözlemlemek amacıyla farklı hacimlerdeki kültürlerden elde edilen hücresiz süpernatantlar ile yine daha önce gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları neticesinde karar verilen koşullar kullanılarak (1 mM AgNO₃, pH 7.5, 60°C, 48 saat inkübasyon) AgNP'ler sentezlenmiştir. 10 mL'den 500 mL'ye kadar gerçekleştirilen ölçeklendirme çalışmasına ait deney görüntüleri Şekil 4.10'da verilmiştir.

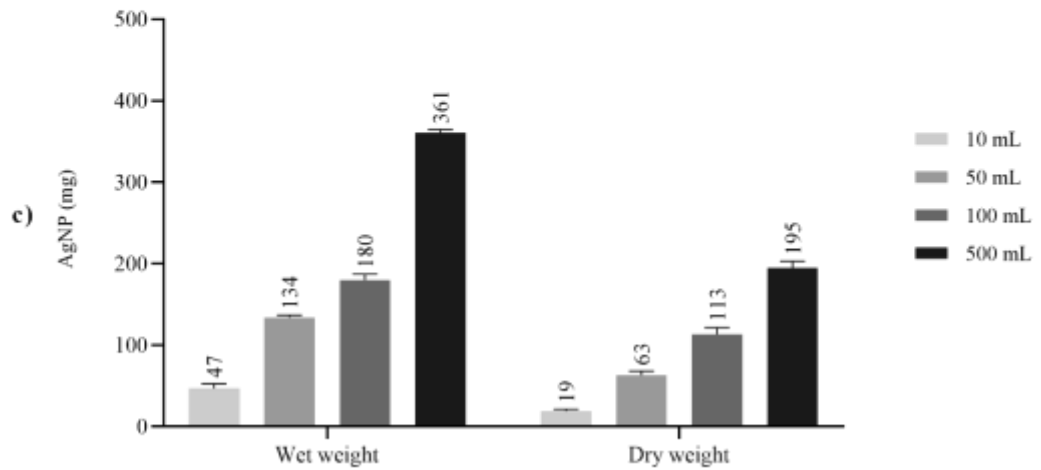
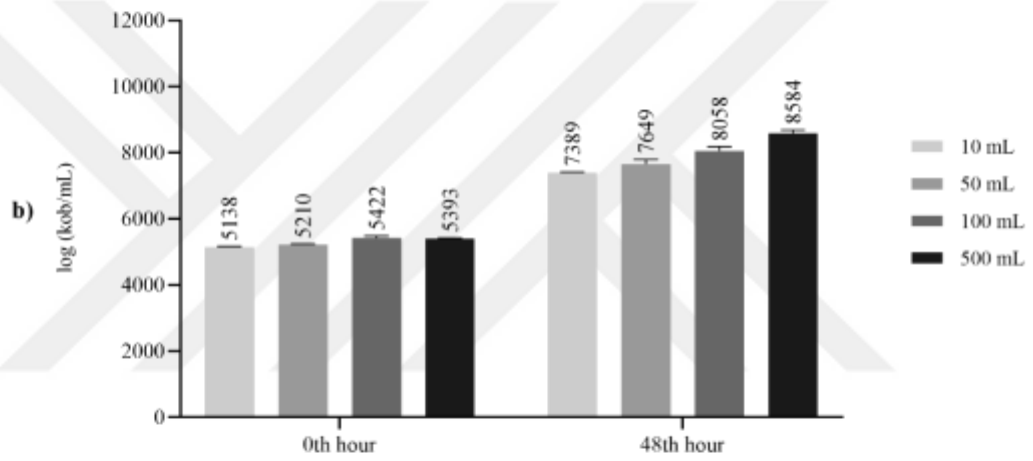
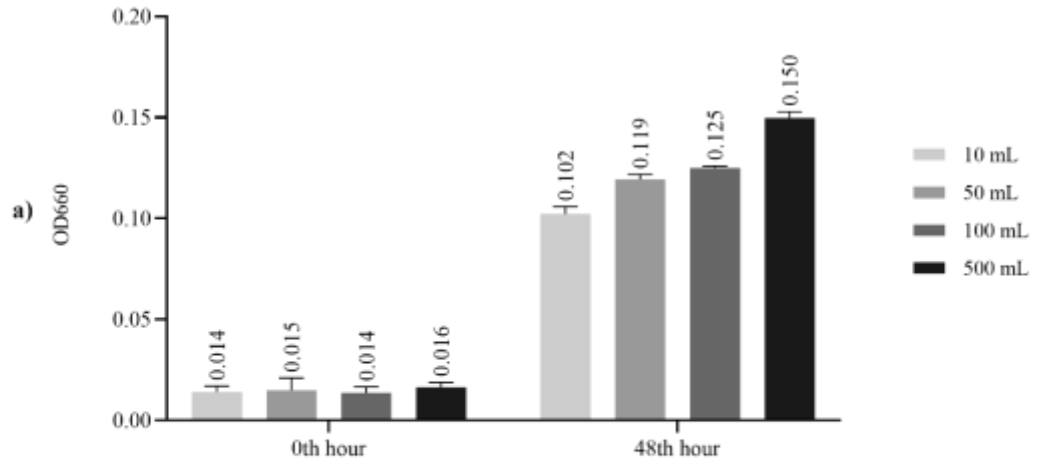


Şekil 4.10 (a) Sırasıyla 10, 50, 100 ve 500 mL olarak geliştirilen kültür ve (b) 48 saatlik kültürün hücresiz süpernatantından elde edilen SGC-R'ye ait AgNP'ler

Lab-scale gerçekleştirilen üretim neticesinde öncelikle 0. ve 48. saatlerde farklı hacimlerdeki kültür ortamlarının 660 nm dalga boyunda kültür yoğunluğu ölçülerek hacim büyütmenin bakteri gelişimi üzerine etkileri belirlenmiştir. 0. ve 48. saatlerdeki kültür yoğunluğunun ölçüm sonuçları Şekil 4.11a'da verilmiştir. 660 nm dalga boyunda elde edilen kültür yoğunluklarına bakıldığında; 10 mL besiyerinde gelişen kültürde 7.3 kat artış olurken, 50 mL besiyerinde gelişen kültürde 7.9 kat artış, 100 mL besiyerinde gelişen kültürde 8.9 kat artış ve 500 mL besiyerinde gelişen kültürde 9.4 kat artış olmuştur. Bu durum ölçek büyütmenin kültür yoğunluğunun oranını artırdığını göstermiştir.

Yine 0. ve 48. saatlerde farklı hacimlerdeki kültür ortamlarından koloni sayımı gerçekleştirilmiştir. Sayım sonuçları Şekil 4.11b’de verilmiştir. 10, 50, 100 ve 500 mL hacimlerde geliştirilen kültürün 0. ve 48. saatlerde gerçekleştirilen koloni sayımı sonucunda; 10 mL besiyerinde gelişen kültürde 1.4, 50 mL besiyerinde gelişen kültürde 1.5, 100 mL besiyerinde gelişen kültürde 1.5 ve 500 mL besiyerinde gelişen kültürde 1.6 kat artış olmuştur. Kültür yoğunluğuyla paralel şekilde koloni sayımı da kültür hacmi arttıkça daha yüksek oranda artmıştır.

48. saat sonunda farklı hacimlerdeki kültür ortamları santrifüj edilerek hücresiz süpernatant elde edilmiştir. Elde edilen hücresiz süpernatantlardan AgNP’lerin biyosentezi gerçekleştirilmiş ve oluşan AgNP’lerin yaş ve kuru ağırlıkları belirlenmiştir. AgNP’lerin ağırlıklarına ait sonuçlar Şekil 4.11c’de sunulmuştur. Bir önceki çalışma olan süpernatant optimizasyonu çalışmasının sonunda, tüm ideal koşulların belirlenmesi neticesinde 5 mL’lik hücresiz kültür süpernatantıyla üretilen AgNP’lerin kuru ağırlığı 17 mg olarak ölçülmüştür. Bu sonuç ilk AgNP’lerin verimi olarak kabul edilerek, ölçeklendirme çalışması neticesinde farklı hacimlerden elde edilen AgNP’lerin kuru ağırlıkları ile bir verim katsayısı hesabı gerçekleştirilmiştir [Verim katsayısı = İlk AgNP’lerin verimi (mg)/Son AgNP’lerin verimi (mg)]. Bu durumda 10 mL kültürden elde edilen AgNP’lerin kuru ağırlığında 1.1, 50 mL kültürden elde edilen AgNP’lerin kuru ağırlığında 3.7, 100 mL kültürden elde edilen AgNP’lerin kuru ağırlığında 6.6 ve 500 mL kültürden elde edilen AgNP’lerin kuru ağırlığında **11.5 kat artış** olmuştur.

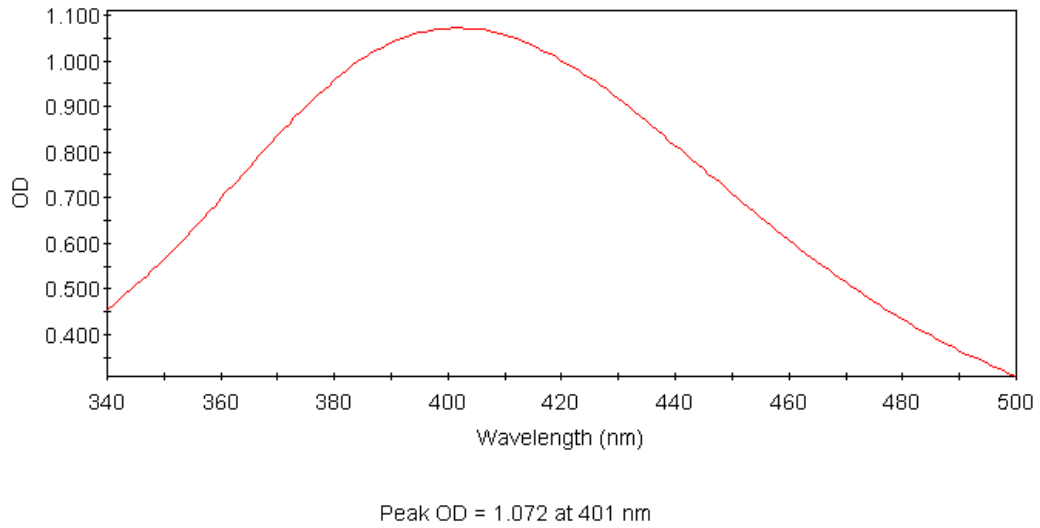


Şekil 4.11 (a) 10, 50, 100 ve 500 mL olarak ölçeklendirilmesi yapılan kültürlerin 0. ve 48. saatlerde 660 nm dalga boyunda elde edilen kültür yoğunlukları, (b) kültürlerin 0. ve 48. saatlerde elde edilen koloni sayımları ve (c) kültürlerin hücresiz süpernatantlarından elde edilen AgNP'lerin yaş ve kuru ağırlıkları

4.7 Üretilen AgNP'lerin Karakterizasyonu

4.7.1 UV-Vis spektroskopisi

Büyük hacimde (500 mL) gerçekleştirilen üretim neticesinde elde edilen ve gelecek çalışmalarda kullanılmak üzere kurutulmuş halde muhafaza edilen AgNP'ler distile su ile çözülerek koloidal bir çözelti elde edilmiştir. UV-Vis spektroskopisinde 350-500 nm dalga boyu aralığında ve 1 nm çözünürlükte gerçekleştirilen tarama grafiği Şekil 4.12'de sunulmuştur. Gümüş nanopartiküller için karakteristik emilim aralığına (400-450 nm) giren 401 nm'de net bir yüzey plazmon rezonansı zirvesi gözlenmiştir. Ek olarak, zirvenin keskinliği ve ikincil zirvelerin yokluğu, nanopartiküllerin muhtemelen küresel, monodispers ve kümelenmemiş olduğunu göstermektedir. Bu da sentezlenen AgNP'lerin kararlılığını ve tekdüzeliğini desteklemektedir (De Leersnyder vd. 2019).



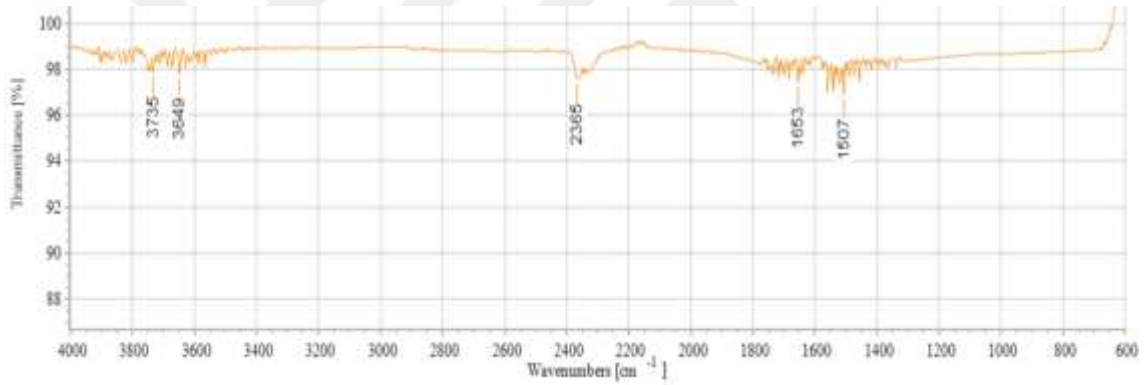
Şekil 4.12 SGC-R'nin AgNP'lerinin UV-Vis spektroskopisinde 340-500 nm arasında gerçekleştirilen tarama sonucu (401 nm'de ölçülen Yüzey Plazmon Rezonans Piki OD: 1.072 ve seyreltme faktörü: 4 (OD: 4.288))

4.7.2 FT-IR

Sentezlenen AgNP'lerin FT-IR spektrumu, yaklaşık 3735, 3649, 2365, 1653 ve 1507 cm^{-1} 'de belirgin emilim bantları göstermiştir (Şekil 4.13). Yaklaşık 3735 ve 3649 cm^{-1} 'deki pikler, O-H ve N-H gerilme titreşimlerinin karakteristiği olan yüksek dalga sayısı

bölgesindedir ve numunede hidroksil ve/veya amin gruplarının varlığını göstermektedir (Mondal vd. 2020). 2365 cm^{-1} 'de gözlemlenen daha zayıf bir bant, genellikle numunedeki fonksiyonel bir gruptan ziyade, spektrometrede emilen atmosferik CO_2 'ye ($\text{O}=\text{C}=\text{O}$ asimetrik gerilme) atfedilir (Socrates 2004).

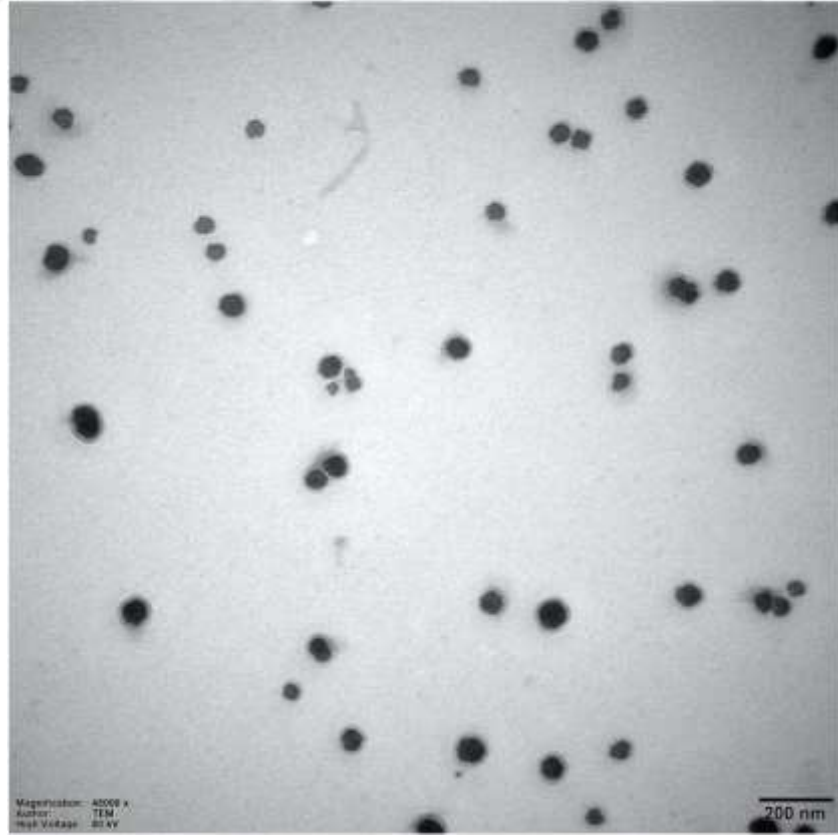
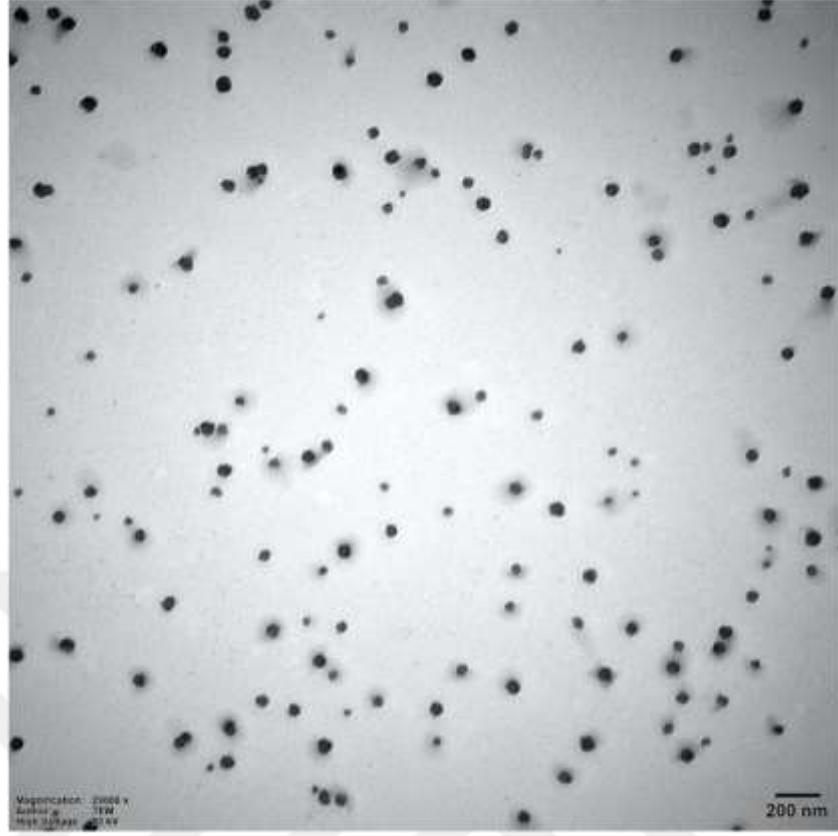
Parmak izi bölgesinde, 1653 cm^{-1} 'deki güçlü bir emilim, peptit bağlarının $\text{C}=\text{O}$ gerilmesine (amid I bandı) işaret eder. 1507 cm^{-1} 'deki tepe noktası, $\text{C}-\text{N}$ gerilmesiyle birleşen $\text{N}-\text{H}$ bükülmesine (amid II bandı) karşılık gelir. Bu iki bant, amid I ve II, proteinli malzemelerin karakteristiği olup, proteinlerden veya peptitlerden gelen amid bağlarının varlığını gösterir. Özetle, FT-IR sonuçları, AgNP'lerde bulunan biyomoleküllerle ilişkili olması muhtemel olan $\text{O}-\text{H}/\text{N}-\text{H}$ (hidroksil veya amin) ve amid (peptit) titreşimleriyle tutarlı fonksiyonel grupları ortaya koymaktadır (Mondal vd. 2020).



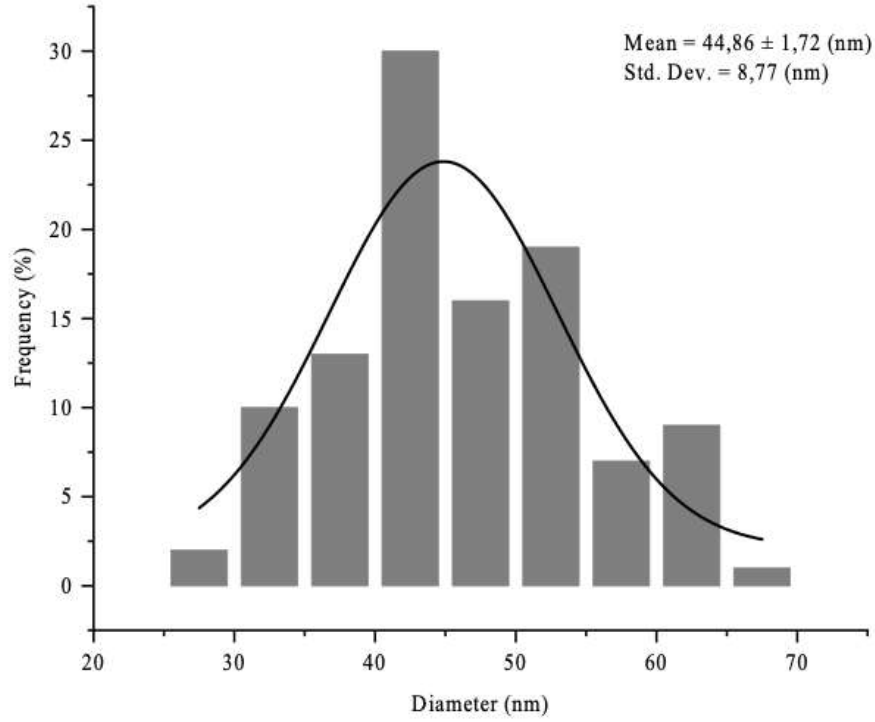
Şekil 4.13 SGC-R AgNP'lerinin FT-IR spektrumları

4.7.3 TEM

Sentezlenen AgNP'lerin morfolojik analizi TEM ile gerçekleştirilmiş olup sonuçların görüntüleri Şekil 4.14'te gösterilmiştir. AgNP'lerin boyut analizleri ImageJ programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. TEM görüntüsü AgNP'lerin küresel bir şekle sahip olduğunu göstermektedir. Tüm AgNP'lerin parçacık boyutları 26.67 ile 66.67 nm arasındadır. TEM analizinin sonuçlarına dayanarak OriginLab programıyla histogram grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.15). Grafikte görülebileceği üzere nanopartiküllerin ortalama parçacık boyutları $44.86\text{ nm} \pm 1.72$ olarak ölçülmüş ve parçacık boyutlarının standart sapması 8.77 nm olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.14 SGC-R AgNP'lerinin TEM mikrografi



Şekil 4.15 SGC-R AgNP'lerinin partikül boyutlarının histogramı

4.8 Üretilen SGC-R AgNP'lerinin Biyolojik Özellikleri

4.8.1 Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) yöntemiyle antimikrobiyal aktivite sonuçları

Bu aşamada elde edilen AgNP'ler ile minimum inhibisyon konsantrasyonu testi bölüm 3.2.11.1'de bahsedildiği şekilde yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.4'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre SGC-R aracılı AgNP'lerin çeşitli patojenik mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki sergilediği görülmektedir.

AgNP'lerin 78.13 µg/mL konsantrasyon ile en düşük MİK değerini sergilediği yani en etkili olduğu mikroorganizmalar Gram-pozitif bir bakteri olan *S. epidermidis* ATCC 35984 ve mantar türleri olan *C. albicans* ATCC 10231 ile *C. parapsilosis* ATCC 22019 olarak dikkat çekmektedir. Bunları 156.25 µg/mL konsantrasyonla Gram-negatif

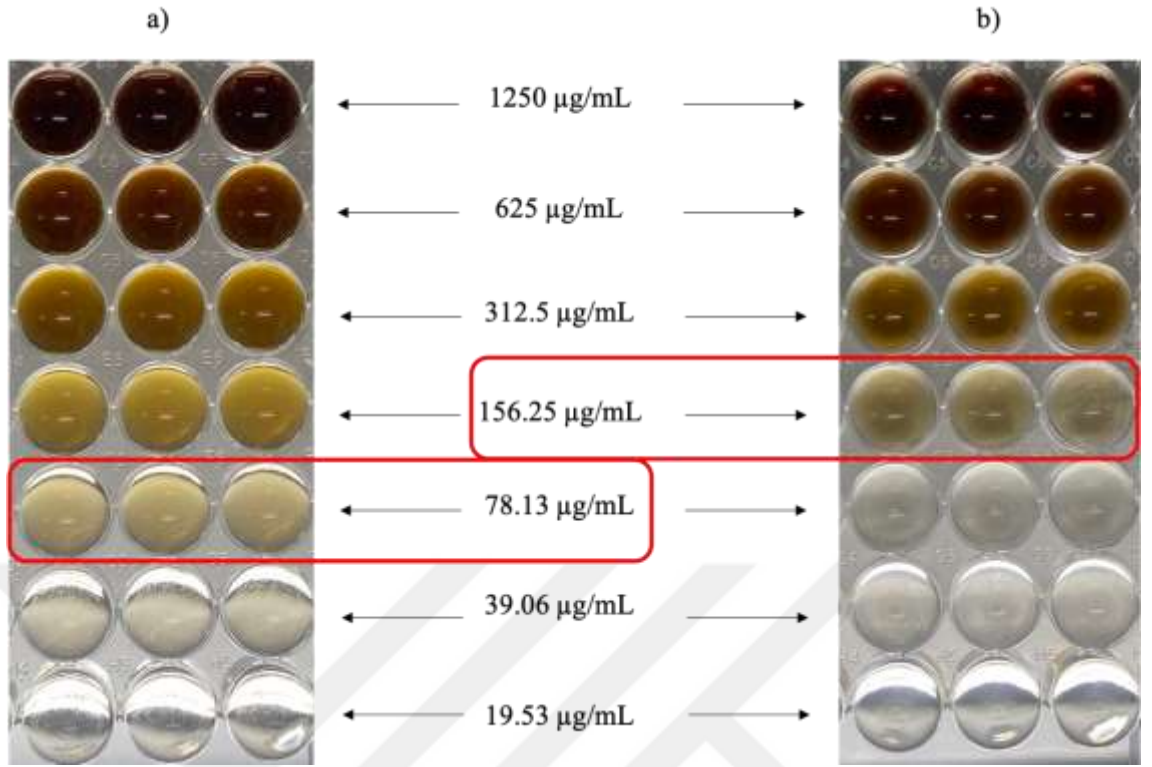
bakteriler olan *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *A. baumannii* ATCC 19606 ile 312.50 µg/mL konsantrasyonla Gram-negatif bir bakteri olan *K. pneumoniae* ATCC 13883, Gram-pozitif bakteriler olan Metisilin Dirençli *S. aureus* ATCC 43300 ve *L. monocytogenes* NCTC 5348 takip etmektedir. Belirlenen bu etkiler, biyolojik sentezle elde edilen bu AgNP'lerin çoklu ilaç direnci profiline sahip önemli patojenlere karşı da etkili olduğunu göstermektedir. Yine Gram-pozitif bakteriler olan *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25923 ve *S. mutans* ATCC 25175 ile Gram-negatif bakteriler olan *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O157:H7 ATCC 35150 patojenleri üzerinde 625 µg/mL konsantrasyonunda antimikrobiyal etki tespit edilmiştir.

Deneyde, kimyasal sentezle elde edilen ve 28-48 nm, 48-78 nm ve 100 nm olmak üzere farklı boyutlara sahip olan ticari kimyasal AgNP'ler de aynı patojenler üzerinde denenmiş ve tez kapsamında biyolojik olarak elde edilen AgNP'ler ile antimikrobiyal etkinlikleri bakımından karşılaştırma yapılması hedeflenmiştir. Ancak bu kimyasal AgNP'lerin denenilen konsantrasyon aralıklarında başarılı şekilde antimikrobiyal etkiler sergilemediği, yalnızca *L. monocytogenes* NCTC 5348, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *C. albicans* ATCC 10231 ve *C. parasilosis* ATCC 22019 patojenlerinde 1250-2500 µg/mL gibi yüksek konsantrasyonlarda etki gösterdikleri saptanmıştır. Son olarak da saptanan MİK değerlerinin bakterisidal veya fungisidal etkiler sergileyip sergilemedikleri kontrol edilmiştir. Bu amaçla MİK değerlerinin belirlendiği her bir kuyucuktan örnekler alınarak TSA besiyerine ekilmiştir. Belirlenmiş hiçbir MİK değerinde, denenilen patojenlerde gelişim gözlemlenmemiş ve elde edilen biyolojik AgNP'lerin bakterisidal veya fungisidal etkisi olduğu doğrulanmıştır.

Çizelge 4.4 Gram-negatif, Gram-pozitif ve ökaryotik mikroorganizmalardan oluşan 16 farklı patojene karşı gerçekleştirilen antimikrobiyal aktivite taraması sonucu elde edilen minimum inhibisyon konsantrasyonları

	Taranan Patojen	Biyolojik SGC-R AgNP'ler (µg/mL)	Ticari Kimyasal AgNP'ler (28-48 nm) (µg/mL)	Ticari Kimyasal AgNP'ler (48-78 nm) (µg/mL)	Ticari Kimyasal AgNP'ler (100 nm) (µg/mL)
Gram- pozitif patojenler	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	625	-	-	-
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	625	-	-	-
	Metisilin Dirençli <i>S. aureus</i> ATCC 43300	312.50	-	-	-
	<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	78.13	-	-	-
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	1250	-	-	-
	<i>E. faecium</i> [(NJ-1) (WHO-3)]	1250	-	-	-
	<i>S. mutans</i> ATCC 25175	625	-	-	-
	<i>L. monocytogenes</i> NCTC 5348	312.50	2500	2500	-
Gram- negatif patojenler	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	156.25	-	-	2500
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	625	-	-	-
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 35150	625	-	-	-
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ATCC 13311	1250	-	-	-
	<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	156.25	-	-	-
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	312.50	-	-	-
Ökaryotik patojenler	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	78.13	2500	2500	-
	<i>C. parasilosis</i> ATCC 22019	78.13	1250	1250	2500

Gerçekleştirilen MİK çalışmasında *C. parasilosis* ATCC 22019 ve *S. epidermidis* ATCC 35984'e karşı gerçekleştirilen MİK test sonuçları Şekil 4.16'da verilmiştir. Ayrıca optimizasyon çalışmaları kapsamında, denenen farklı parametreler nihayetinde elde edilen AgNP'lerin antimikrobiyal etkilerinin karşılaştırılması amacıyla gerçekleştirilen damla plaka testine ait örnek bir görüntü Şekil 4.17'de sunulmuştur.



Şekil 4.16 SGC-R AgNP'lerinin (a) *C. parasilosis* ATCC 22019 ve (b) *S. epidermidis* ATCC 35984'e karşı gerçekleştirilen MİK test sonucu

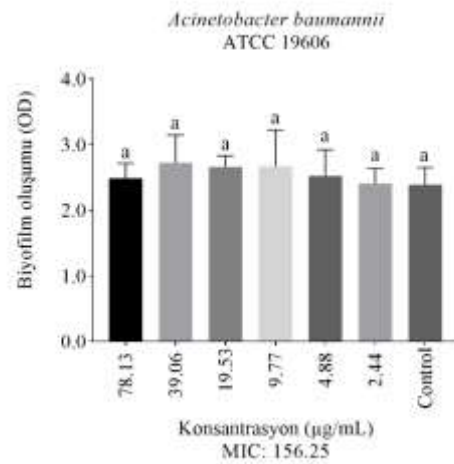
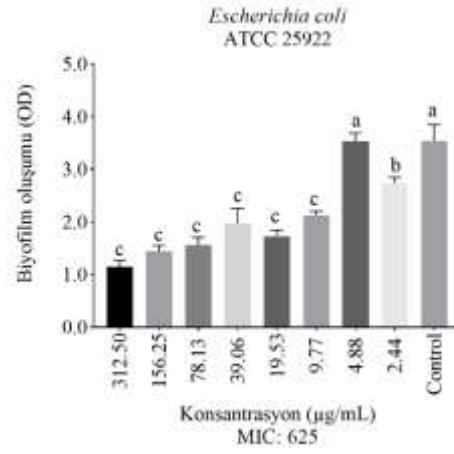
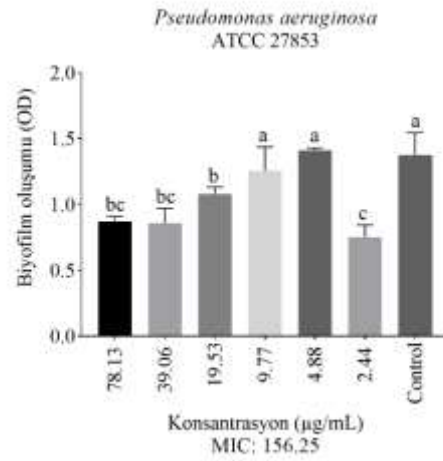


Şekil 4.17 Farklı koşullar altında (pH 7.5 ve pH 8.0) damla plaka testi ile elde edilen *P. aeruginosa* ATCC 27853'e karşı SGC-R AgNP'lerinin inhibisyon zonları

4.8.2 Antibiyofilm aktivitesi sonuçları

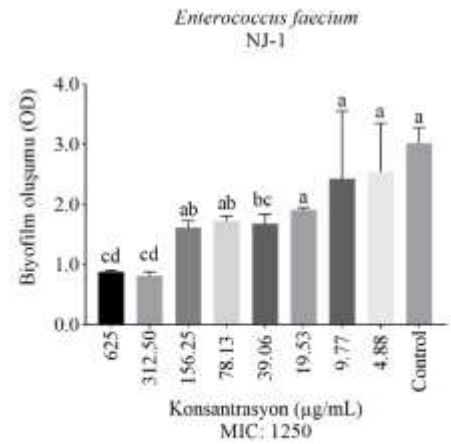
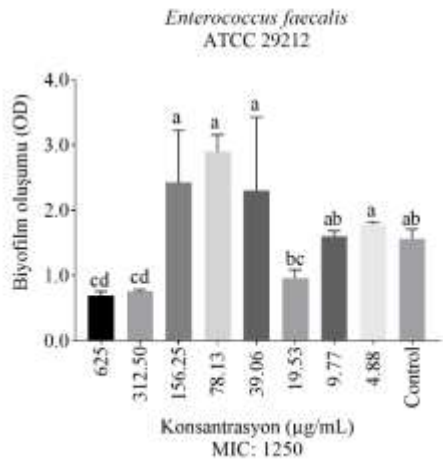
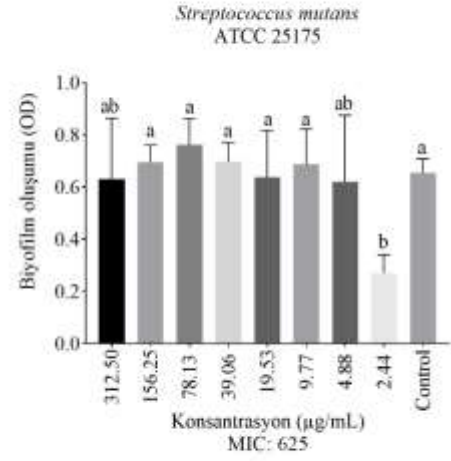
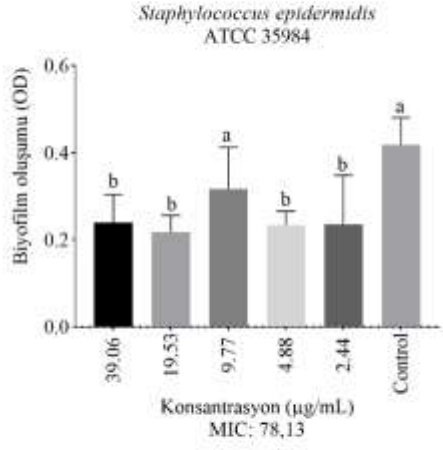
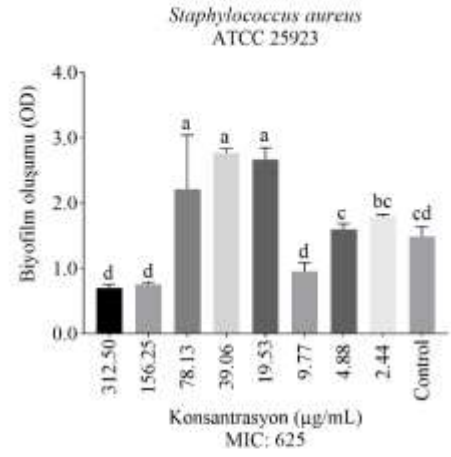
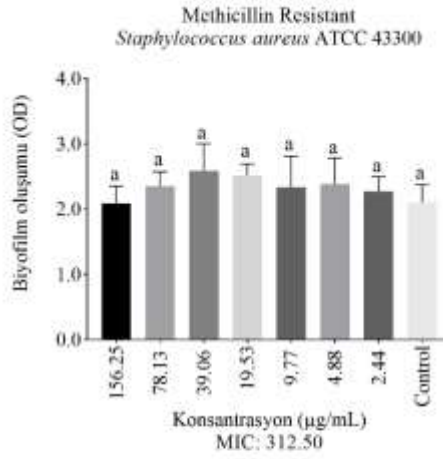
AgNP'lerin çeşitli patojenlerin biyofilmleri üzerine olan etkilerini tespit edebilmek adına; her patojene karşı MİK testi sonucunda elde edilen minimum inhibisyon konsantrasyonlarının altında kalan konsantrasyonlar (alt-MİK) denenmiştir. AgNP'lerin alt-MİK konsantrasyonlarının çeşitli patojenlerin biyofilm oluşumu üzerine etkileri olduğu bulunmuştur.

AgNP'lerin Gram-negatif patojenlerin biyofilmleri üzerine olan etkilerine bakıldığında (Şekil 4.16), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (MİK: 156.25 µg/mL) için 9.77 ve 4.88 µg/mL konsantrasyonlarda AgNP'lerin biyofilm oluşumunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı görülürken, kalan tüm AgNP konsantrasyonlarında biyofilm inhibisyonu ölçülmüştür ($p<0.0001$). *E. coli* ATCC 25922 (MİK: 625 µg/mL) için, biyofilm oluşumunda 4.88 µg/mL konsantrasyonda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma görülmezken, diğer tüm konsantrasyonlardaki AgNP'lerin biyofilm oluşumunu büyük ölçüde azaltmıştır ($p<0.0001$). *A. baumannii* ATCC 19606 (MİK: 156.25 µg/mL) için hiçbir alt-MİK konsantrasyonun kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı olmadığı bulunmuştur ($p=0.7253$).



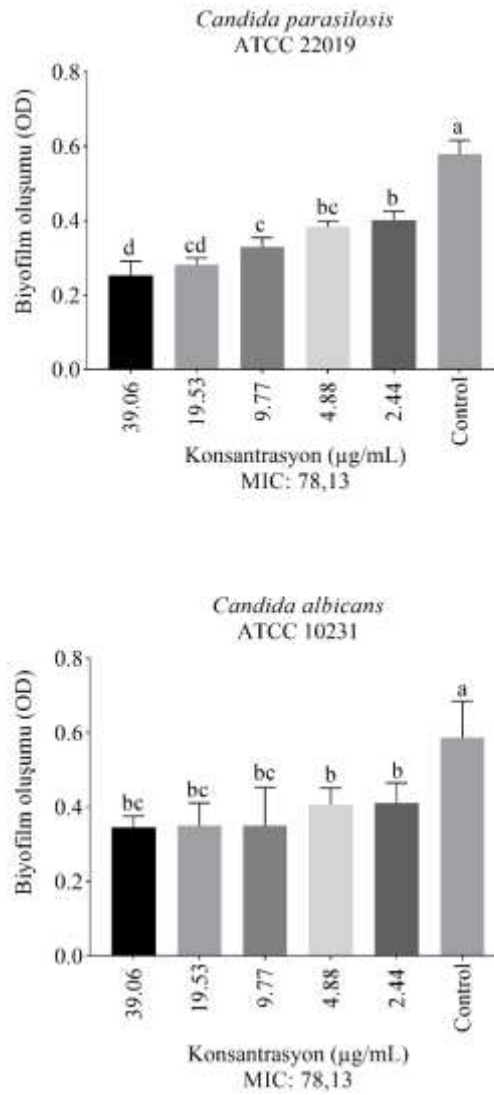
Şekil 4.18 SGC-R AgNP'lerinin Gram-negatif patojenlerin biyofilm üretimleri üzerine olan etkileri. Çubukların üzerindeki farklı harfler her panel içinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları ($p<0.05$; $p<0.01$; $p<0.001$; $p<0.0001$) gösterir. Tek yönlü ANOVA ve Tukey Testi yürütülmüştür (MIC değerleri µg/mL cinsinden verilmiştir)

AgNP'lerin Gram-pozitif patojenlerin biyofilmleri üzerine olan etkileri Şekil 4.17'de sunulmuştur. *S. aureus* ATCC 43300 (MİK: 312.50 µg/mL) için yine aynı şekilde hiçbir alt-MİK konsantrasyonun biyofilm inhibisyonu bakımından etkili olmadığı görülmüştür ($p=0.3149$). *S. aureus* ATCC 25923 (MİK: 625 µg/mL) için, orta alt-MİK konsantrasyonları olan 78.13 µg/mL ile 19.53 µg/mL ve en düşük alt-MİK konsantrasyonu olan 2.44 µg/mL konsantrasyonlarının biyofilm oluşumunu kontrole kıyasla artırdığı görülürken, kalan konsantrasyonlardaki (312.50-156.25 ve 9.77 µg/mL) AgNP'ler azaltmıştır ($p<0.0001$). *S. epidermidis* ATCC 35984 (MİK: 78.13 µg/mL) için, 9.77 µg/mL konsantrasyonda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmazken, diğer tüm AgNP konsantrasyonları biyofilm oluşumunu az da olsa engellemiştir ($p=0.0076$). *S. mutans* ATCC 25175 (MİK: 625 µg/mL) için en düşük alt-MİK olan 2.44 µg/mL'de biyofilm inhibisyonu ölçülürken, kalan konsantrasyonlar biyofilmi anlamlı ölçüde inhibe etmemiştir ($p=0.0096$). *E. faecalis* ATCC 29212 (MİK: 1250 µg/mL) için, orta alt-MİK konsantrasyonları olan 78.13 ve 19.53 µg/mL ile en düşük alt-MİK konsantrasyonu olan 4.88 µg/mL'lik AgNP'lerin biyofilm oluşumunu kontrolle karşılaştırıldığında artırırken, 9.77 µg/mL AgNP'ler anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır. Kalan AgNP konsantrasyonlarının tamamı biyofilm inhibisyonunu desteklemiştir ($p<0.0001$). *E. faecium* NJ-1'de (MİK: 1250 µg/mL), biyofilm oluşumu yüksek alt-MİK konsantrasyonlarında (625-312.50 µg/mL) anlamlı bir şekilde azalırken, orta alt-MİK konsantrasyonlarında (156.25-39.06 µg/mL) az da olsa azalmıştır. Diğer düşük AgNP konsantrasyonlarında ise kontrole göre anlamlı bir azalma olmamıştır ($p<0.0001$).



Şekil 4.19 SGC-R AgNP'lerinin Gram-pozitif patojenlerin biyofilm üretimleri üzerine olan etkileri. Çubukların üzerindeki farklı harfler her panel içinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları ($p<0.05$; $p<0.01$; $p<0.001$; $p<0.0001$) gösterir. Tek yönlü ANOVA ve Tukey Testi yürütülmüştür (MIC değerleri $\mu\text{g/mL}$ cinsinden verilmiştir)

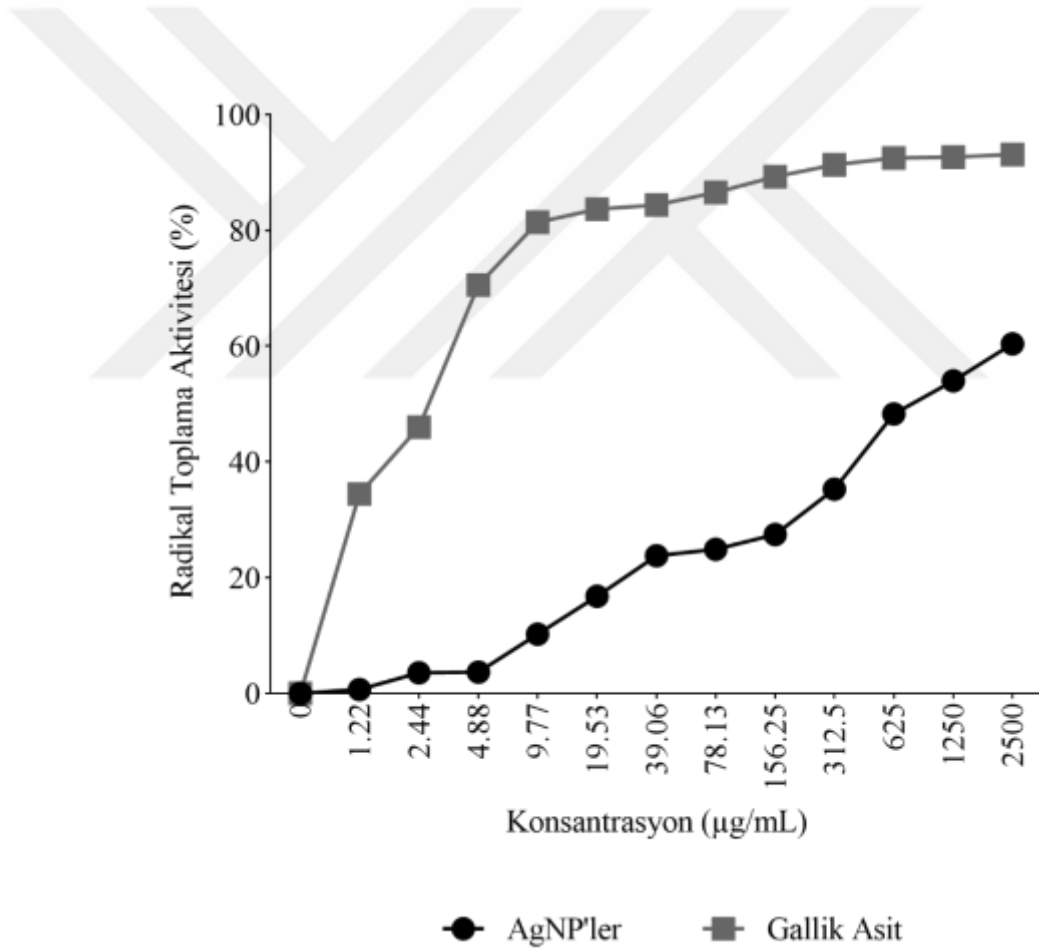
Ökaryotik patojenler olan, *C. parapsilosis* ATCC 22019 (MİK: 156.25 µg/mL) için 39.06 µg/mL ve 9.77 µg/mL AgNP'lerin konsantrasyonları biyofilm oluşumunda en büyük azalmaya neden olurken, 4.88 µg/mL ve 2.44 µg/mL'lik AgNP konsantrasyonlarında daha hafif bir etki göstermiştir ($p<0.0001$). *C. albicans* ATCC 10231 (MİK: 312.50 µg/mL), biyofilmlerine karşı test edilen tüm alt-MİK AgNP konsantrasyonlarının biyofilm oluşumu engellediği bulunmuştur ($p=0.0009$) (Şekil 4.18).



Şekil 4.20 SGC-R AgNP'lerinin ökaryotik patojenlerin biyofilm üretimleri üzerine olan etkileri. Çubukların üzerindeki farklı harfler her panel içinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları ($p<0.05$; $p<0.01$; $p<0.001$; $p<0.0001$) gösterir. Tek yönlü ANOVA ve Tukey Testi yürütülmüştür (MIC değerleri µg/mL cinsinden verilmiştir)

4.8.3 Antioksidan aktivite sonuçları

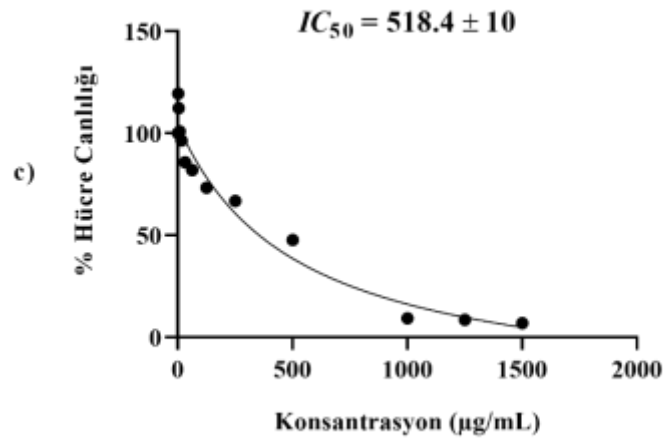
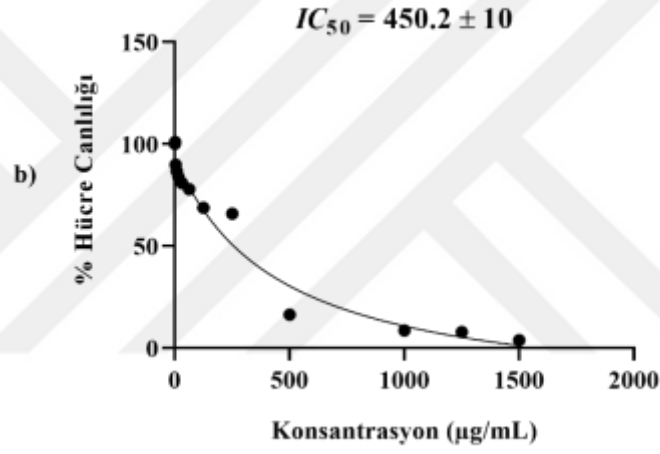
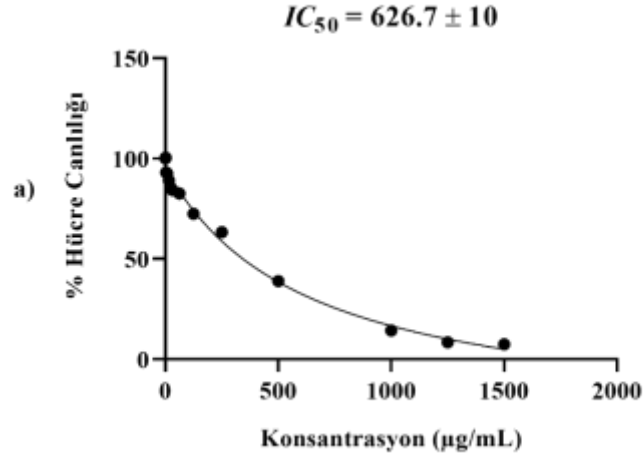
AgNP'lerin antioksidan potansiyeli DPPH serbest radikal toplama aktivitesi açısından değerlendirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.21'de sunulmuştur. AgNP'lerin DPPH radikal toplama aktivitesinin doza bağımlı olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; en yüksek antioksidan etkiler 2500 µg/mL konsantrasyonda %60.41, 1250 µg/mL konsantrasyonda %54.05 ve 625 µg/mL konsantrasyonda %48.30 olarak saptanmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan gallik asit ise 2500 µg/mL konsantrasyonda %93.12, 1250 µg/mL konsantrasyonda %92.71 ve 625 µg/mL konsantrasyonda %92.51 değerinde aktivite göstermiştir.



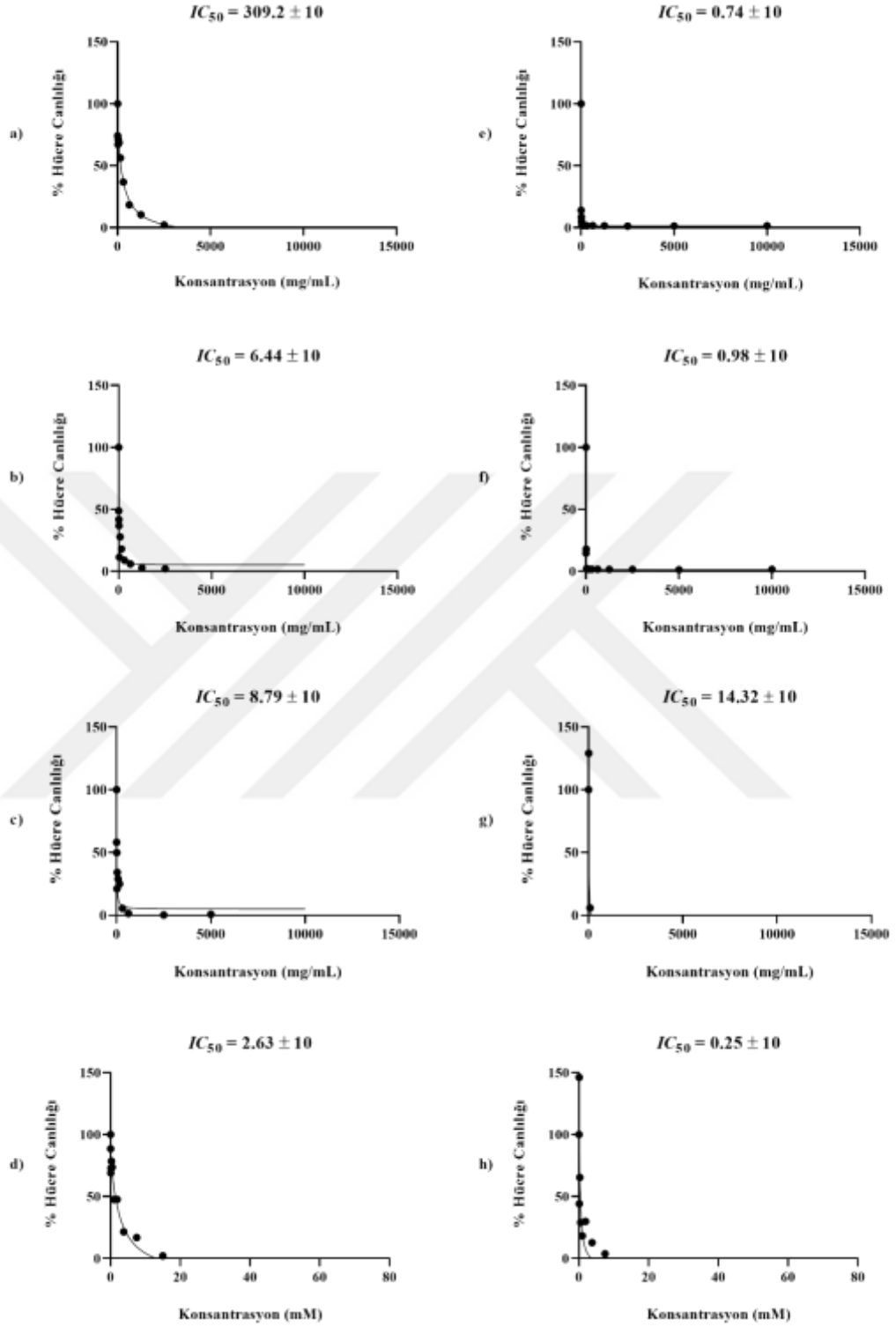
Şekil 4.21 SGC-R AgNP'lerinin ve standart gallik asit çözeltisinin antioksidan aktivitesi

4.8.4 Sağlıklı hücre hatlarına karşı sitotoksikite sonuçları

Üretilen AgNP'lerin hücrelerin canlılığı üzerindeki etkisi, sağlıklı hücre hatları L929, HDF ve HaCaT üzerinde MTT analizi ile araştırılmıştır. Canlılıktaki azalma, yalnızca hücre içeren ve AgNP'ler ile tedavi edilmeyen negatif kontrole kıyasla hesaplanmıştır. AgNP'lerin IC₅₀ değerleri, L929 hücre hattı için 626.7 µg/mL, HDF hücre hattı için 450.2 µg/mL ve HaCaT hücre hattı için 518.4 µg/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.22). 1 mM AgNO₃ uygulanan kuyucuklarda hücre canlılığı saptanmazken, 28-48 nm, 48-78 nm ve 100 nm boyutlarındaki ticari kimyasal nanopartiküllerin IC₅₀ değerleri HDF hücre hattı için sırasıyla 309.2, 6.44, 8.79 µg/mL ve HaCaT hücre hattı için sırasıyla 0.74, 0.98, 14.32 µg/mL olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.23). Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında, üretilen AgNP'lerin hem ticari kimyasal nanopartiküller ve hem de AgNO₃ ile karşılaştırıldığında, sağlıklı hücreler üzerinde çok düşük toksik etki gösterdiği ve biyolojik uygulamalar için uygun olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.22 SGC-R AgNP'lerinin (a) L929, (b) HDF ve (c) HaCaT sağlıklı hücre hatlarına karşı hesaplanan IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) konsantrasyon değerleri

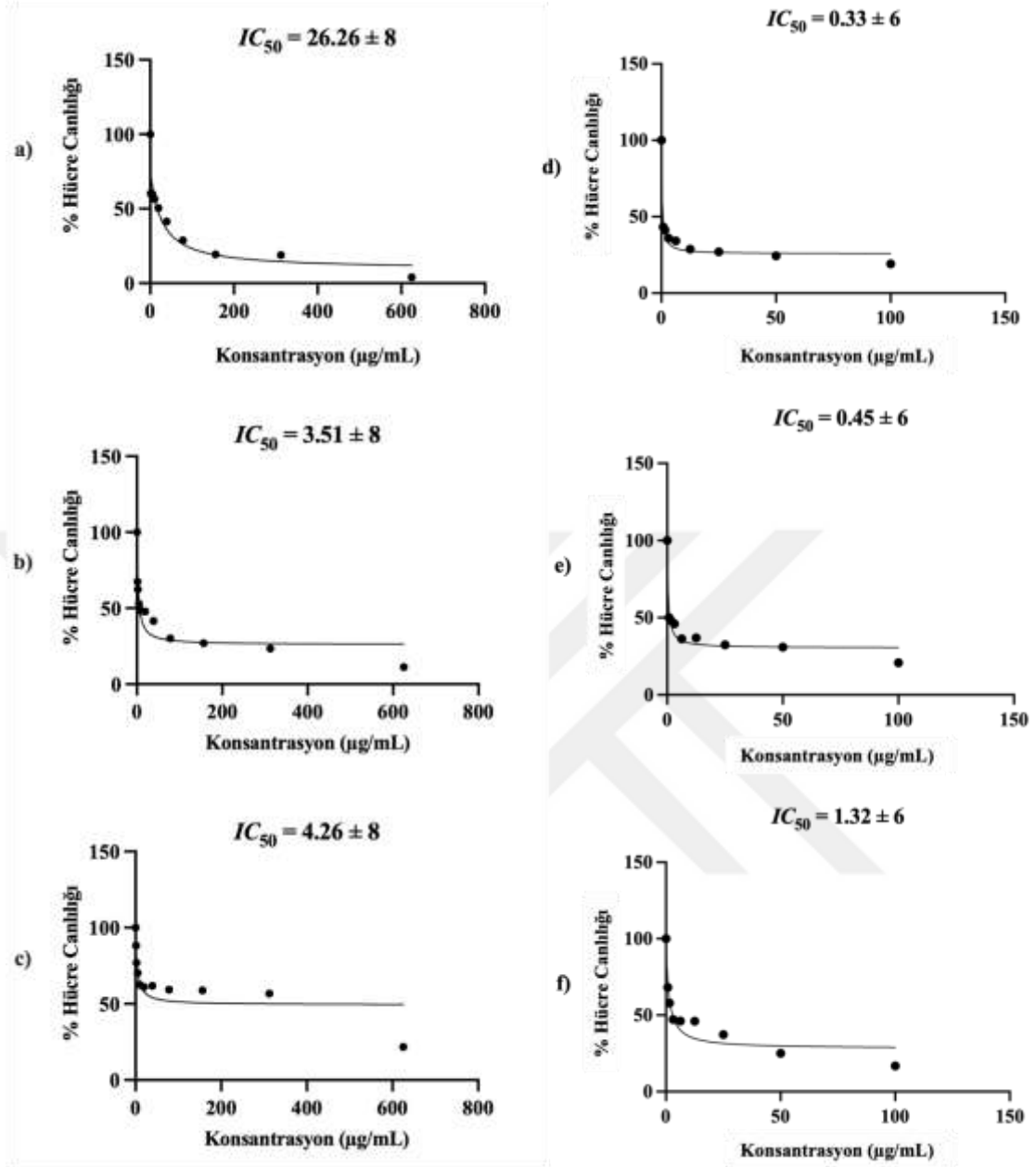


Şekil 4.23 HDF hücre hatlarına karşı (a) 28-48 nm, (b) 48-78 nm, (c) 100 nm boyutlarındaki ticari kimyasal nanopartiküllerin, (d) AgNO₃ ve HaCaT hücre hatlarına karşı (e) 28-48 nm, (f) 48-78 nm, (g) 100 nm boyutlarındaki ticari kimyasal nanopartiküllerin, (h) AgNO₃ uygulaması sonucu hesaplanan IC_{50} (μ g/mL) konsantrasyon değerleri

4.8.5 Kanser hücre hatlarına karşı sitotoksikite sonuçları

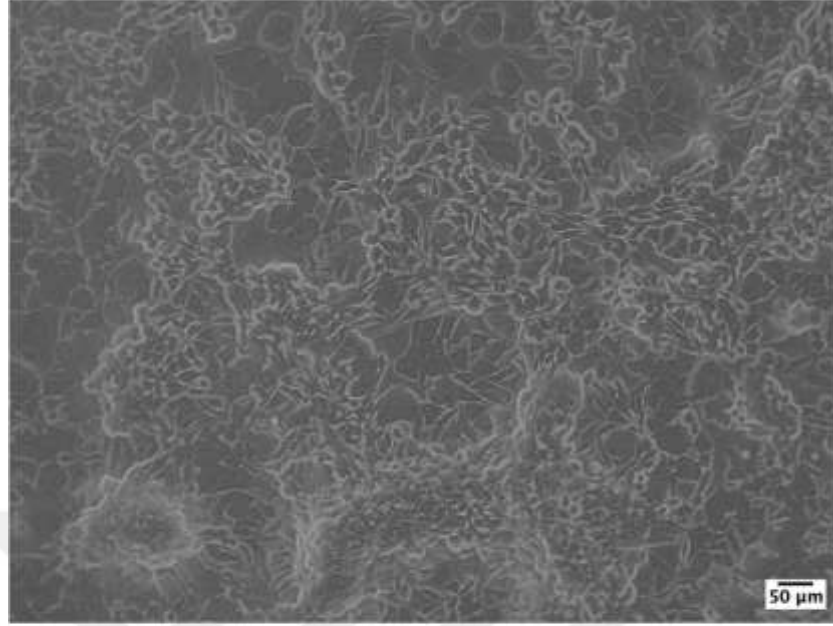
AgNP'lerin kanser hücreleri üzerindeki canlılığı yine MTT analizi ile incelendiğinde MCF7 hücre hattı için 26.26 $\mu\text{g/mL}$, HT-29 hücre hattı için 3.51 $\mu\text{g/mL}$ ve A549 hücre hattı için 4.26 $\mu\text{g/mL}$ IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. AgNP'lere ek olarak kemoterapik bir ajan olan 5-FU, tüm kanser hücre hatlarına uygulanmış ve yine IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. MCF7 hücre hattı için 0.33 $\mu\text{g/mL}$, HT-29 hücre hattı için 0.45 $\mu\text{g/mL}$ ve A549 hücre hattı için 1.32 $\mu\text{g/mL}$ IC_{50} değerleri bulunmuştur (Şekil 4.23). Kanser hücreleri için hesaplanan tüm IC_{50} konsantrasyonları sağlıklı hücreler için hesaplanan IC_{50} konsantrasyonlarından düşük bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar sağlıklı hücre hatları için sitotoksik olmayan daha düşük dozların kanser hücre hatları için sitotoksik olduğunu göstererek elde edilen AgNP'lerin seçici etkiler gösterebildiğine ve biyolojik kullanım potansiyeline işaret etmektedir.

Hesaplanan bu IC_{50} değerleri sonucunda, MCF7 hücre hattı için toksik doz olan 78.125 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda AgNP'ler ile 48 saat muamele edilen hücrelerin ve AgNP'lerin uygulanmadığı kontrol grubu hücrelerinin mikroskop görüntüleri Şekil 4.24'te sunulmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kanser hücrelerinin ciddi şekilde hasara uğradığı görülmektedir.

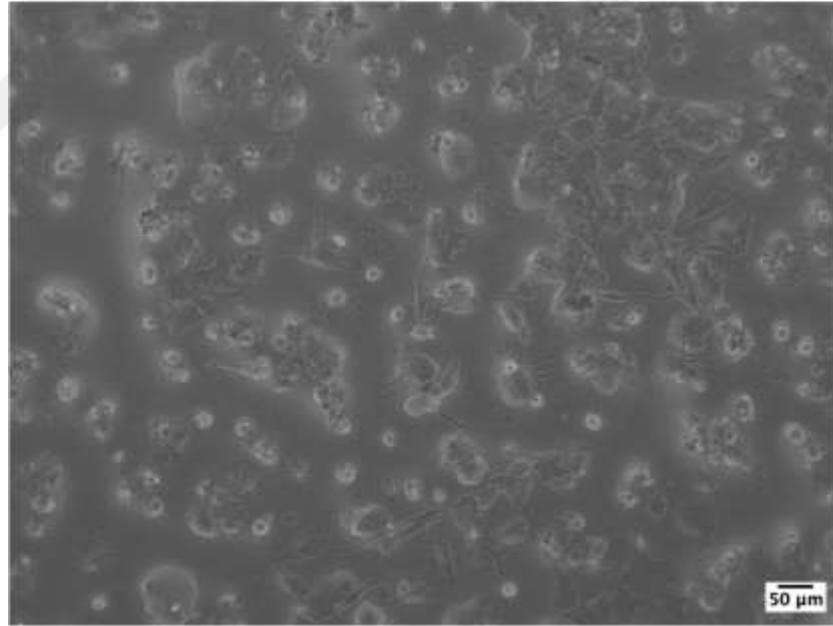


Şekil 4.24 SGC-R AgNP'lerinin (a) MCF7, (b) HT-29 ve (c) A549 kanser hücre hatlarına karşı hesaplanan IC_{50} (µg/mL) konsantrasyon değerleri ve 5-FU kemoterapi ilacının (d) MCF7, (e) HT-29 ve (f) A549 kanser hücre hatlarına karşı hesaplanan IC_{50} (µg/mL) konsantrasyon değerleri

Kontrol

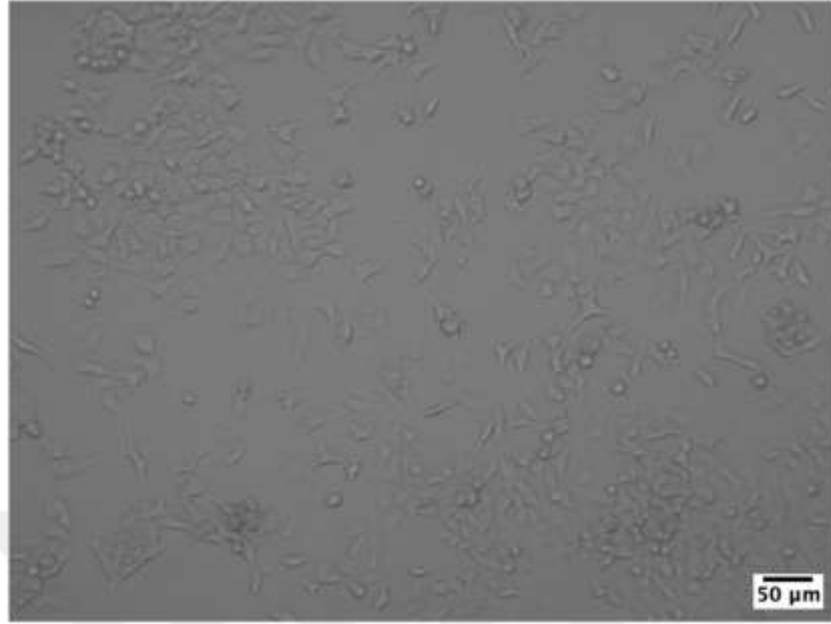


78,125 µg/mL AgNP'ler

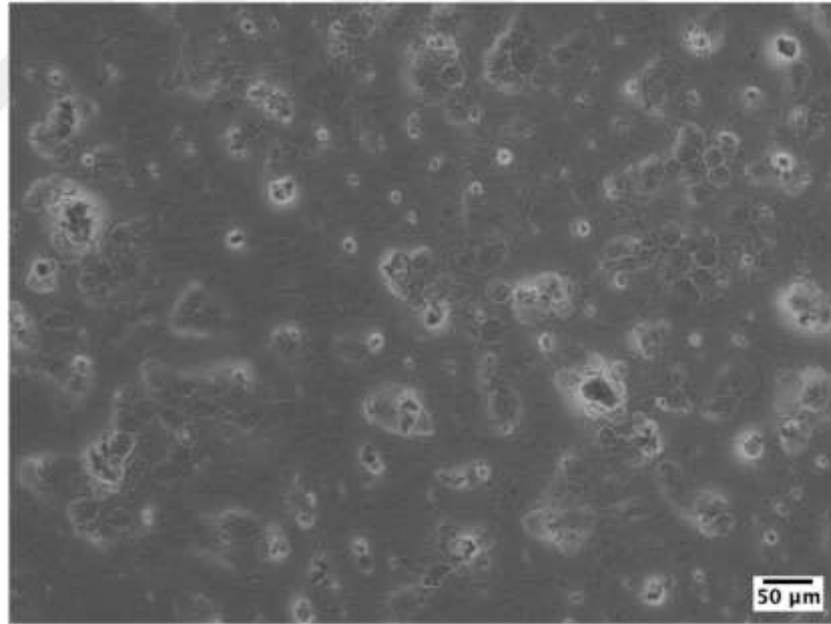


Şekil 4.25 SGC-R AgNP'lerinin 78,125 µg/mL konsantrasyonunun 48 saat boyunca MCF7 hücre hattı üzerindeki etkisi

Kontrol



78,125 µg/mL AgNP'ler



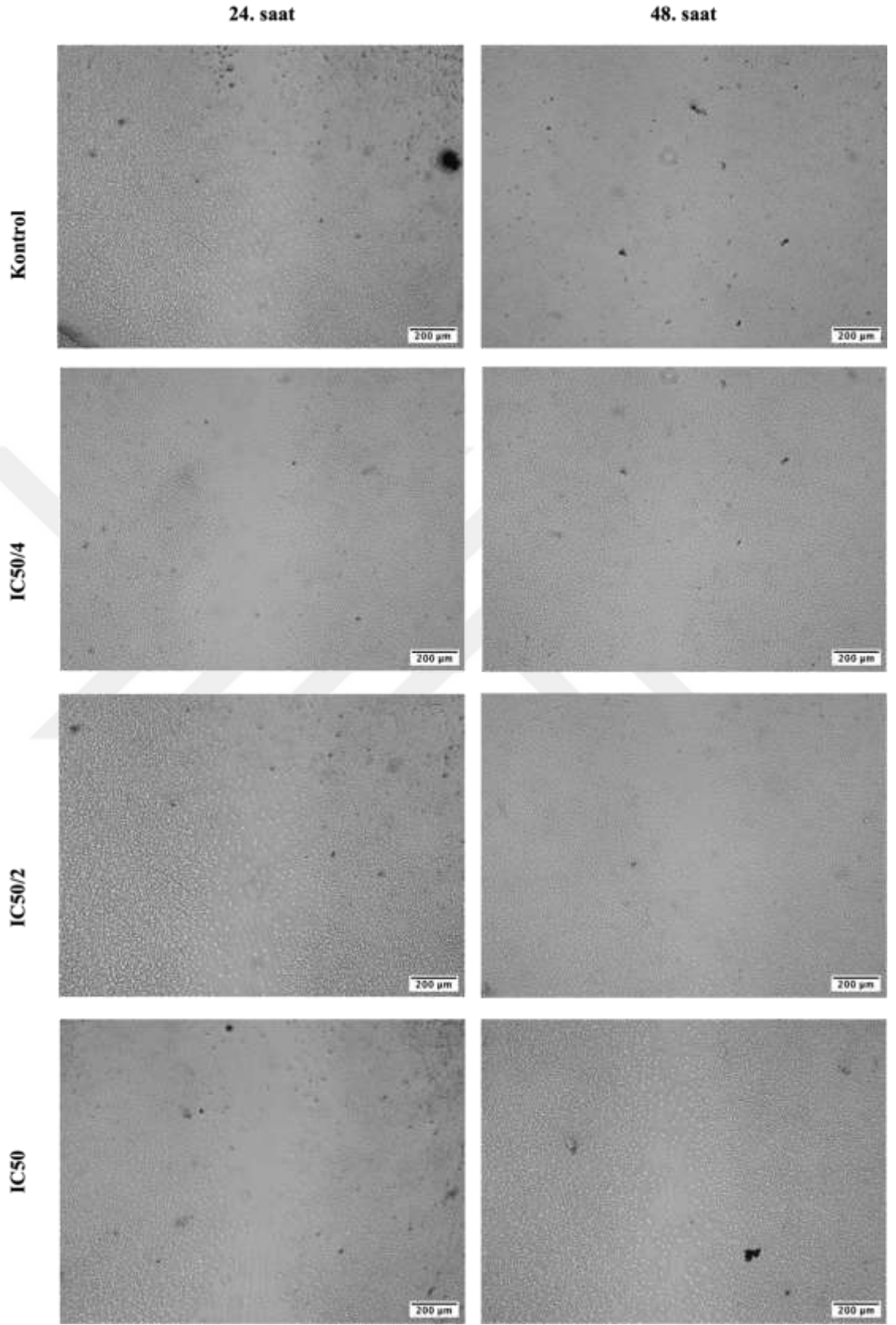
Şekil 4.26 SGC-R AgNP'lerinin 78,125 µg/mL konsantrasyonunun 48 saat boyunca HT-29 hücre hattı üzerindeki etkisi

4.9 *In Vitro* Yara Modeli ve Yara Kapanma Sonuçları (Scratch Assay)

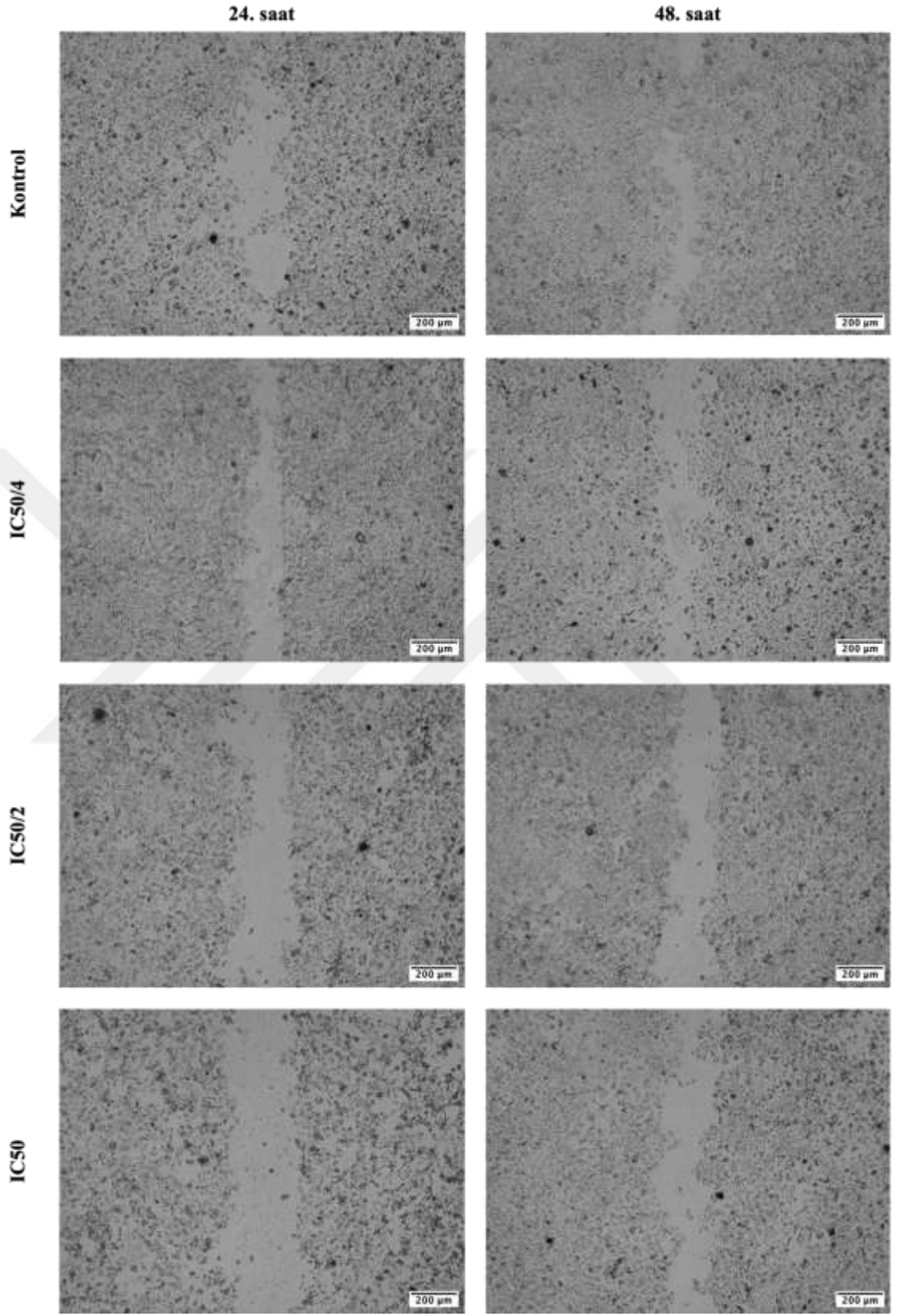
Tez kapsamında *SGC-R* AgNP'lerinin HDF ve HaCaT hücre hatlarında hücre göçü üzerindeki etkileri, *in vitro* yara modeli kullanılarak değerlendirilmiştir. Hücre tabakaları üzerinde oluşturulan çizik sonrasında hücrelerin boş alana doğru göçü 24. ve 48. saatlerde izlenmiş (Şekil 4.27 ve Şekil 4.28), yara boşluklarının mesafeleri ölçülerek yüzde yara kapanma oranları hesaplanmıştır (Şekil 4.29 ve Şekil 4.30).

Elde edilen bulgular, hem HDF hem de HaCaT hücre hatlarında kontrol grubunda, çizik oluşturulmasını takiben hücrelerin 24. saat sonunda yara sınırından boş alana doğru göç ettiğini ortaya koymuştur. Benzer şekilde, farklı dozlarda *SGC-R* AgNP'lerine maruz bırakılan hücre gruplarında da 24. saatte hücre göçünün gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu durum, erken zaman noktasında AgNP uygulamasının her iki hücre hattında hücre göçü üzerinde belirgin bir baskılayıcı etki oluşturmadığını göstermektedir.

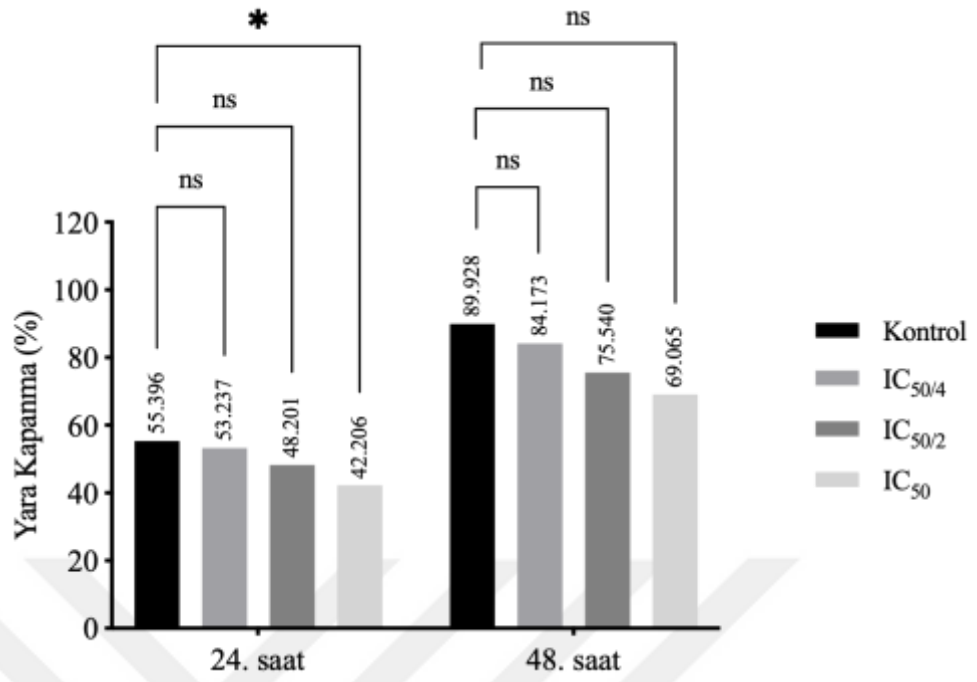
48. saat sonunda yapılan değerlendirmelerde, farklı dozlarda AgNP uygulanan gruplar ile kontrol grubu arasında hücre göçü açısından genel olarak benzer bir eğilim gözlenmiştir. Özellikle $IC_{50/4}$ konsantrasyonunda *SGC-R* AgNP'leri ile muamele edilen hücrelerde, göç yoğunluğunun kontrol grubuna oldukça yakın olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular, söz konusu konsantrasyonda *SGC-R* AgNP'lerinin HDF ve HaCaT hücrelerinin yara kapanma sürecine katkı sağlayan hücre göçü mekanizmalarını olumsuz yönde etkilemediğini ve hücresel göç yeteneğinin büyük ölçüde korunduğunu göstermektedir.



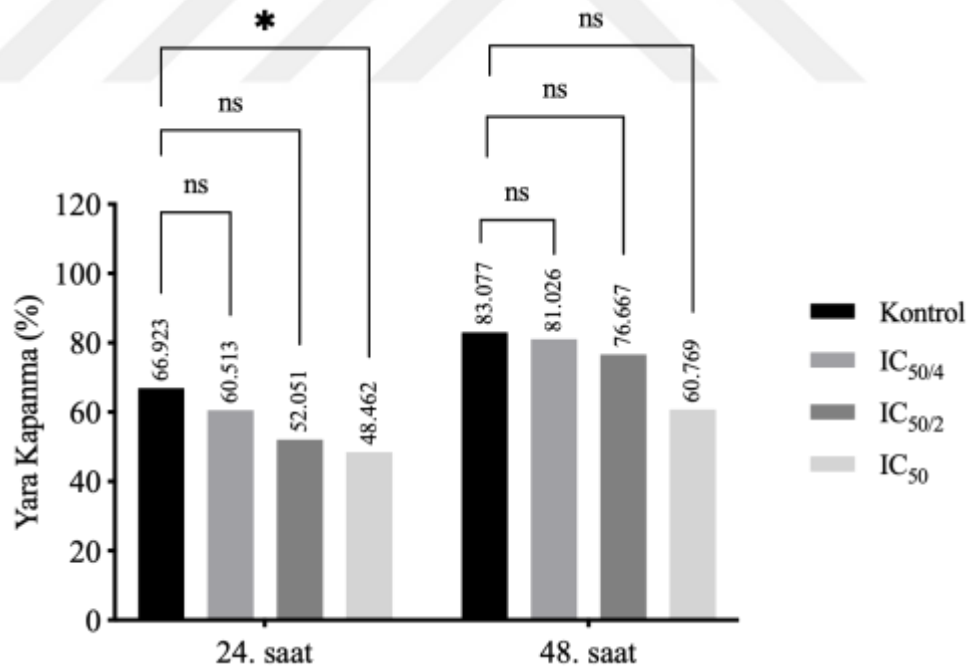
Şekil 4.27 SGC-R AgNP'lerinin uygulandığı *in vitro* yara modelindeki HDF hücrelerinin göçü



Şekil 4.28 SGC-R AgNP'lerinin uygulandığı in vitro yara modelindeki HaCaT hücrelerinin göçü



Şekil 4.29 HDF hücrelerinde oluşturulan yara bölgesinin test edilen grup ve saatlerdeki kapanma miktarları



Şekil 4.30 HaCaT hücrelerinde oluşturulan yara bölgesinin test edilen grup ve saatlerdeki kapanma miktarları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Boyutlar genellikle 1-100 nm arasında değişen gümüş nanopartiküllerin sahip oldukları yüksek yüzey alanı/hacim oranları, nanopartiküllerin boyut ve şekil çeşitlilikleri; nanopartiküllerin erime sıcaklığı, redoks potansiyeli, manyetik davranış ve iyon salınım kinetiği gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerini klasik (makro) gümüşten farklı kılmaktadır. Bununla birlikte, geleneksel kimyasal ve fiziksel sentez yöntemleri; toksik reaktiflerin kullanılması, çevresel riskler, yüksek enerji gereksinimi, stabilite sorunları, yüksek maliyet ve büyük ölçekli üretimde karşılaşılan zorluklar nedeniyle önemli sınırlılıklar ve dezavantajlar taşımaktadır (Khodashenas ve Ghorbani 2019, Fahim vd. 2024). Bu nedenle son yıllarda çevre dostu, düşük maliyetli ve sürdürülebilir yöntemler olan “biyolojik (yeşil) sentez” yaklaşımları giderek daha fazla tercih edilmektedir. Son yıllarda bakteri, mantar, maya vb. mikroorganizmalar aracılığıyla gümüş nanopartiküllerin biyosentezi geleneksel kimyasal ve fiziksel yöntemlere kıyasla çevre dostu, ekonomik ve sürdürülebilir bir alternatif olarak yaygın biçimde benimsenmiştir (Dhaka vd. 2023, Vanlalveni vd. 2024). Özellikle bakterilerin kolay kültüre edilebilir olmaları, hızlı üremeleri, genetik olarak manipüle edilebilmeleri ve ekstrem koşullara uyum sağlayabilmeleri sayesinde sürdürülebilir ve biyouyumlu üretim avantajları sunan bakteriyojenik gümüş nanopartikül üretimi geniş ilgi görmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, farklı türlerden elde edilen bakterilerin, morfolojik olarak çeşitli şekillere sahip (küresel, çubuk, üçgen vb.) ve farklı boyut aralıklarında gümüş nanopartiküller üretebildiğini göstermektedir. Tüm bu bulgular, farklı mikroorganizmaların farklı boyut ve şekillerde nanopartikül sentezleyebilmesi sayesinde gümüş nanopartiküllerin geniş bir uygulama alanına sahip olduğunu ve biyosentez yöntemlerinin bu alanda giderek daha kritik hale geldiğini göstermektedir (Mabey vd. 2019, Khalifa vd. 2023, El. Fadly vd. 2024). Farklı bakteriyel türlerin gümüş nanopartikül üretimi açısından araştırılması hem biyolojik sentez yöntemlerinin çeşitlenmesini sağlayacak hem de biyoteknolojik uygulamalar için önemli yeni fırsatların doğmasına katkıda bulunmaktadır. Bakteriyel biyosentez için çoğunlukla *Pseudomonas* ve *Bacillus* gibi mezofilik bakteri cinslerinin üyeleri incelenmiştir (Klaus vd. 1999, Elbeshehy vd. 2015, Singh vd. 2018). Bununla birlikte, patojenik olabilen bu mezofilik bakteriler tarafından sentezlenen gümüş nanopartiküllerin kullanımında kısıtlamalar bulunabilmektedir. *SGC-R* gibi termofilik

bakterilerin gümüş nanopartikül biyosentezi için kullanılması, sürecin kontaminasyonunu ve diğer mikrobiyolojik yan ürünlerin oluşumunu önlemektedir. Güvenilir, kararlı ve düşük maliyetli olmasının yanı sıra termofilik süreçler reaktant aktivitesini ve ürün eldesini kolaylaştıran süreçlerdir (Zeikus 1979, Jahan vd. 2024). Tüm bu sebeplerle tekstil, gıda depolama ve kişisel bakım ürünleri gibi birçok endüstriyel kullanım alanı olan gümüş nanopartiküllerin, termofilik proseslerle sentezlenmesi tıp alanında da uygulanabilirliğini artırmaktadır. Mevcut tez çalışması kapsamında da literatürde gümüş nanopartikül üretimi açısından değerlendirilmemiş *SGC-R* koduyla ifade edilen termofilik bir bakteriden gümüş nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiştir.

Tez kapsamındaki çalışmalarda; *SGC-R* suşunda PCR ile test edilen 11 toksisite geninden hiçbirinin saptanmaması, bu suşun bilinen enterotoksin/hemolitik toksisite genlerine sahip olmadığını göstermektedir. Bu, gümüş nanopartikül biyosentezi için “güvenli” bir üretici aday olduğunu göstermektedir. Literatürde bakteriyel gümüş nanopartikül sentezinde, non-patojenik ya da genel güvenli kabul edilen mikroorganizmaların tercih edilmesinin hem üretim güvenliği hem de olası uygulamalarda toksisite riskinin azaltılması açısından önemli olduğu vurgulanmaktadır (Al-Asbahi vd. 2024). Bakteriyel nanopartikül üretimi, disimilasyon ve asimilasyon nitrat indirgemeleri, denitrifikasyon ve azot fiksasyonu olmak üzere dört indirgeme yolu ve nitrifikasyon ve anammoks olmak üzere iki oksidasyon yolu içeren azot metabolizmasıyla ilişkilidir. Özellikle bazı bakteri suşlarında nitrat redüktaz enzimlerinin, Ag^{+} 'in Ag^0 'e indirgenmesinde anahtar rol oynadığı rapor edilmiştir. Örneğin, *Lactobacillus plantarum* CAM 4 suşunun ürettiği nitrat redüktaz aktiviteleri optimize edilerek gümüş nanopartiküller elde edilmiştir (Loi vd. 2023). *In silico* analizlerimiz *SGC-R*'nin azot metabolizmasına dair periplazmik nitrat redüktaz (NapAB), membran/solunum zarı bağlı nitrat redüktaz kompleksleri (NarGHI/NarB) ve sitoplazmik asimilasyon nitrat redüktazları (NasAB) gibi geniş bir gen/enzim setine sahip olduğunu göstermektedir. Bu genetik potansiyel, suşun nitrat/azot metabolizması yoluyla Ag^{+} 'in indirgenmesine uygun biyokimyasal altyapıyı açıklamaktadır. Bu mekanizma, literatürde bildirilen nitrat redüktaz aracılı mikroorganizma temelli gümüş nanopartikül sentezi ile tutarlıdır (Loi vd. 2023). *SGC-R* kodlu bakterinin toksisite genlerini barındırmaması, literatürde çok az sayıdaki termofilik bakteri tarafından başarılı şekilde gümüş nanopartikül sentezi yapılması, *in silico*

analizlerin azot metabolizması ve nitrat redüktaz potansiyelini göstermesi, bu termofilik bakterinin gümüş nanopartikül biyolojik üretimi için güçlü bir aday olduğunu işaret etmektedir. Bu bağlamda, SGC-R ile gümüş nanopartikül biyosentezi gerçekleştirmek hem sürdürülebilirlik hem biyogüvenlik hem de uygulama uygunluğu açısından literatürde artan eğilimle uyumludur. Bu bulgular, hem literatürdeki modern eğilimleri desteklemekte hem de tez çalışmasının özgünlük ve uygulanabilirlik potansiyelini vurgulamaktadır.

Çeşitli fiziksel ve kimyasal faktörler gümüş nanopartikül üretimini etkilemektedir. Tez kapsamında, sentez koşullarının optimizasyonu ile bu sentezin en yüksek verimde gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Optimizasyon çalışması kapsamında denenen farklı parametreler, çeşitli adımlar ile sınanmış ve böylece pek çok açıdan en iyi koşullar seçilmiştir. Bu adımlardan ilki gümüş nitrat eklenen süpernatantın inkübasyon sonunda renk değişimidir. Bir diğer adım gümüş nanopartiküllerin 400-450 nm aralığında sergilediği karakteristik LSPR pikleridir. Ek olarak farklı koşullardan elde edilen gümüş nanopartiküllerin antimikrobiyal aktiviteleri, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *S. aureus* ATCC 29213 patojenleri kullanılarak değerlendirilmiştir. *S. aureus*, deri ve nazal açıklıkların yaygın bir kolonizatörü olan Gram-pozitif bir patojendir. Yüzeysel lezyonlardan invaziv hastalıklara kadar pek çok deri ve yumuşak doku enfeksiyonunun en önemli nedenlerinden biri olup, kuruluk, düşük pH ve antimikrobiyal peptitler gibi konak savunmalarının üstesinden gelebilmektedir (Gehrke vd. 2023, Touaitia vd. 2025). *P. aeruginosa* ise toprak ve suda yaygın olarak bulunan, nemli ortamlarda gelişebilen, Gram-negatif, gelişmiş antibiyotik direnç mekanizmalarına sahip, fırsatçı bir patojendir. İmmün sistemi baskılanmış bireylerde, yanık yaralarında ve kronik yaralarda enfeksiyonlarla ilişkilidir (Morin vd. 2021).

Farklı partikül üretim faktörlerinden biri de tuzluluktur. Özellikle klorür gibi halojen tuzlarının, yüksek bağlanma afinitesine sahip olduğunu; Ag^+ ve Cl^- aynı anda solüsyon içinde bulunduklarında suda çözünmeyen $AgCl$ yapılarının kendiliğinden oluştuğunu göstermektedir. Gümüş nanopartikül üretiminde, bakteri kültür ortamında bulunan $NaCl$ optimize edilmesi bir diğer önem arz eden hususlardandır. Yapılan çalışmalar Cl^- varlığının gümüş nanopartikül sentezinin verimini düşürebileceğini göstermektedir

(Mabey vd. 2019). Yapılan bu tez çalışmasında %0.5 NaCl içeren ve NaCl içermeyen besiyeri içerikleri hem bakterinin kültür gelişimi bakımından hem de gümüş nanopartikül sentezi bakımından değerlendirilmiştir. NaCl içermeyen besiyerinde geliştirilen bakterinin hücresiz süpernatantından üretilen gümüş nanopartiküllerin pelet miktarının ve UV-Vis 400-450 nm aralığındaki absorpsiyon piklerinin yüksek gözlenmesine ek olarak antimikrobiyal aktivitelere de daha yüksek etki göstermiştir. Bu bulgu, tuzun mikroorganizma metabolizması ve nanopartikül sentezi üzerindeki inhibe edici etkisini destekleyen önceki çalışmalara paralellik göstermektedir (Loi vd. 2023).

Optimizasyon sürecinde, 15 saatlik ön aktifleştirme süresi ve %1 inokülasyon miktarı gümüş nanopartikül üretiminde maksimum verimi sağlamıştır. Bu sonuçlar, mikroorganizma aktivitesinin yeterli büyüme ve enzimatik aktiviteyi desteklemesi açısından literatürde bildirilen ideal süre ve inokülasyon yoğunlukları ile uyumludur (Lavecchia vd. 2024). Araştırılan faktörlerden bir diğeri ise inkübasyon süresidir. Kültür süpernatantları ile gümüş kaynağının birlikte muamele edildiği süre gümüş nanopartikül üretimini etkilemektedir (Mabey vd. 2019, Sharma ve Kumar 2021, Rai vd. 2020). Mevcut tez çalışmasında ön aktifleştirme ve inokülasyon miktarına ek olarak inkübasyon süresi optimize edilmiştir. 24, 48 ve 72 saat denenerek literatür verilerine paralel olarak süre arttıkça absorbans değerinin de arttığı görülmüştür. 48 saatte elde edilen gümüş nanopartiküllerin antimikrobiyal aktivite zonlarının daha büyük çapa sahip olduğu görülmüştür. 72 saatin biyoteknolojik açıdan uzun bir süre olması da göz önünde bulundurulduğunda 48 saat optimal süre olarak seçilmiştir.

Gümüş nanopartikül üretiminde pH değeri, üretim üzerine etkisi en yüksek olan parametrelerden biridir. pH'nın nanopartikül sentezi üzerindeki etkisi, enzimlerin yapısal stabilitesi ve indirgenme reaksiyonlarının etkinliği ile ilişkilidir. Çalışmalar, genellikle pH 6.0-8.0 arasındaki değerlerin partikül sentezi için optimal değerler olduğunu göstermektedir (Mabey vd. 2019, Li vd. 2021). Genel olarak, alkali koşulların bakteriler tarafından nanopartikül sentez hızını ve verimini artırdığı bildirilmektedir (El-Baghdady vd. 2018, Peiris vd. 2018). Mevcut tez çalışmasında gümüş nanopartikül sentezi besiyeri pH'sının 7.0 ve üzerinde olduğu değerlerde mümkün olmuş, özellikle pH 8.5 optimal besiyeri pH değeri olarak belirlenmiştir. Süpernatanttan gümüş nanopartikül üretimi için

optimal pH değeri olarak ise pH 7.5 seçilmiştir. Bu sonuçlar, bakteri kaynaklı partikül sentezinde hafif alkali pH'ların enzim aktivitesi ve nanopartikül stabilitesi açısından avantaj sağladığını ortaya koyan önceki çalışmaları destekler niteliktedir (Zerrin ve Yıldız 2022).

Gümüş nanopartikül üretiminde sentezi etkileyen en kritik parametrelerden biri de AgNO_3 konsantrasyonudur. Çoğu çalışma göstermektedir ki AgNO_3 konsantrasyonu arttıkça gümüş nanopartikül üretimi artmaktadır. Ancak Ag^+ iyonunun Ag^0 'e indirgendiği düşünüldüğünde, sistem doygunluğa ulaştığında biriken Ag^+ iyonlarının hücre üzerinde toksik etkileri olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca gümüş nitrat konsantrasyonu arttıkça gümüş iyonlarının ve fonksiyonel grupların varlığıyla birlikte nanopartiküllerin büyüklüklerinin ve agregasyonun arttığı da bildirilmiştir (Mabey vd. 2019, Sharma ve Kumar 2021). Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar incelendiğinde, AgNO_3 konsantrasyonundaki artışın, gümüş nanopartikül üretiminde absorpsiyon pikini artırmasına karşın, pelet miktarındaki azalma enzimin doygunluğuna ve yüksek Ag^+ iyonlarının hücreler üzerinde toksisite yaratmasına bağlanmaktadır. Bu durum, daha önce farklı çalışmalarda bildirilen enzimatik indirgenme kapasitesinin sınırlarını destekler niteliktedir (Parikh vd. 2008, Gurunathan vd. 2009, Sharma vd. 2010). Tez çalışmasında optimal konsantrasyonun 1 mM olarak belirlenmesi, hem yüksek verim hem de düşük toksisiteyi sağlama açısından önem arz etmektedir.

İnkübasyon sıcaklığı da en önemli sentez faktörlerinden biridir. Yapılan çalışmalarda yüksek sıcaklıklarda Ag^+ iyonunun Ag^0 formuna indirgenmesinin daha hızlı olduğu ve sıcaklık arttıkça nispeten daha küçük nanopartiküller üretildiği gözlemlenmiştir (Mabey vd. 2019, Sharma ve Kumar 2021). Tez çalışmasında kültürün inkübasyon sıcaklığı optimizasyonunda 55°C 'nin gümüş nanopartikül üretiminde en verimli sıcaklık olduğu tespit edilmiştir. Süpernatant inkübasyon sıcaklığı olarak ise 60°C optimal olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, termofilik bakterilerin enzimatik aktivitelerinin ve metabolik işlevlerinin bu sıcaklıklarda zirveye ulaşması ve nanopartikül sentezinde katalitik işlev görmesi ile uyumludur (Singh vd. 2022).

Bu kapsamlı optimizasyon çalışması, *SGC-R*'nin biyolojik gümüş nanopartikül sentezi için hem mikrobiyal büyüme hem de sentez açısından ideal koşullarının belirlenmesi ve uygulanabilirlik potansiyelinin artırılması açısından önemli katkılar sağlamaktadır. Ek olarak, süpernatant düzeyinde gerçekleştirilen optimizasyon, biyolojik gümüş nanopartikül sentezinin verim ve fonksiyonel etkinliğini artırmak için kritik parametrelerin belirlenmesini sağlamış, bu da biyoteknolojik uygulamalarda kullanımı için önemli bir adım olarak değerlendirilmiştir.

SGC-R'nin büyüme dinamiklerinin belirlenmesi ve gümüş nanopartikül sentezinin zamanlamasının optimizasyonu, biyosentezin etkinliği açısından kritik öneme sahiptir. Elde edilen büyüme eğrisi, klasik mikrobiyal gelişim fazlarını net biçimde ortaya koymaktadır; 0-3 saat arası gecikme (lag) fazında metabolik uyumun gerçekleştiği, 3-18 saat arasında hızlı çoğalma (log) fazının devam ettiği ve 18-24 saat arası durağan faza geçildiği tespit edilmiştir (Madigan vd. 2017, Willey vd. 2023). Bu evrelerin bilinmesi, gümüş nanopartikül üretimi için uygun inkübasyon süresinin belirlenmesini sağlamaktadır. Gümüş nanopartikül üretim verilerinin 12. saatten itibaren artmaya başlaması, bu zaman diliminin log fazının ilerleyen kısmına denk gelmesiyle uyumludur. Log fazında bakterilerin metabolik aktivitesinin ve enzimatik reaksiyonlarının maksimuma çıkması, biyolojik nanopartikül sentezinin artmasını desteklemektedir (Das vd. 2021). 48. saatte gümüş nanopartikül pelet miktarlarının maksimuma ulaşması, durağan fazın başlangıcına denk düşerek hücrel metabolizmanın yoğun olduğu dönemin nanopartikül üretimi için en verimli zaman aralığı olduğuna işaret etmektedir. Büyüme ve nanopartikül sentezinin zamanlaması üzerine yapılan çalışmalar, biyolojik sentezde mikroorganizmanın gelişim fazına göre nanopartikül üretiminin değişkenlik gösterebileceğini göstermektedir (Karthik vd. 2022). Bu bağlamda, *SGC-R*'nin büyüme eğrisine göre seçilen inkübasyon süreleri ve üretim zamanlaması, sentezin verimliliğini artırmaktadır. Sonuç olarak, hem mikrobiyal büyüme hem de gümüş nanopartikül sentezi açısından yapılan zaman bazlı takip çalışmaları, *SGC-R*'nin biyosentez potansiyelinin değerlendirilmesi ve optimum üretim protokolünün oluşturulması için temel veri sağlamıştır.

Lab-scale ölçeklendirme alışmaları, *SGC-R*'nin biyolojik gümüş nanopartikül sentez kapasitesinin farklı kùltür hacimlerinde arttığını göstermiştir. 10 mL'lik tüplerden 500 mL'lik CDC reaktörle yapılan üretimlerde hem mikrobiyal yoğunluk hem de koloni sayımlarında anlamlı artışlar gözlenmiş, bu da kùltür hacminin bakteriyel gelişim ve metabolik aktiviteyi desteklediğini ortaya koymuştur. Literatürde, bakteriyel kùltür hacminin artırılmasının hücre yoğunluğunu ve metabolik ürün verimini artırdığı sıkça rapor edilmektedir (Kumar vd. 2020, Li vd. 2022). Mevcut tez bulguları da bu raporlarla paralellik göstermektedir. Gümüş nanopartikül verim katsayısının kùltür hacmi ile orantılı olarak artması, ölçeklendirme sürecinde biyosentez sürecinin etkinliğinin korunup artırıldığını göstermektedir. Özellikle 500 mL kùltürün geliştirildiği reaktörde gözlenen 11.5 kat artış, termofilik *SGC-R*'nin büyük hacimlerde bile stabil nanopartikül üretimini sürdürebildiğine işaret etmektedir. Bu sonuç, sürdürülebilir ve ekonomik biyolojik nanopartikül üretimi için önemli bir avantajdır (Zhang vd. 2021). Ayrıca, kùltür hacminin artışının bakteriyel büyümeyi desteklemesiyle birlikte gümüş nanopartikül sentez veriminin artması, mikroorganizma kaynaklı nanoteknoloji uygulamalarında ölçeklendirme stratejilerinin önemini vurgulamaktadır. Bu kapsamda, laboratuvar ölçeğinden pilot ölçeğe geçişte optimizasyonun korunması kritik olup (Singh ve Sharma 2023), *SGC-R*'nin bu parametrelerde gösterdiği performans gelecek daha büyük hacimli biyoteknolojik üretim uygulamaları için umut vericidir.

Ekstraselüler gümüş nanopartikül üretiminin ilk işareti gümüş nitrat eklenen açık sarı renkteki süpernatantın inkübasyon sonunda koyu kahverengi renge dönüştüğünü gözlemlemektir. Bu renk değişimi yüzey plazmon rezonansına bağlanmaktadır. Öte yandan; metalik nanopartiküllerin yüzeyinde plazmon rezonans uyarımı nedeniyle UV-Vis spektroskopisinde belirli bölgelerde bir emilim bandı bulunmaktadır ve gümüş nanopartiküllerin bilinen karakteristik aralığı 400-450 nm aralığındadır (Yang 2021, Cekuolyte vd. 2023). Ek olarak, gümüş nanopartiküllerin şekli, boyutu, dağılımı gibi yapısal analizleri ve karakterizasyonu için SEM, TEM, DLS, AFM, FT-IR ve XRD gibi teknikler kullanılmaktadır (Zhang vd. 2016, Yaqoob vd. 2020, Pryshchepa vd. 2020). Bu tez çalışmasında laboratuvar ölçeğinde sentezlenen ve kurutularak muhafaza edilen gümüş nanopartiküllerin yeniden distile suda çözülmesiyle elde edilen kolloidal çözeltinin optik, kimyasal ve morfolojik özellikleri çok yönlü olarak değerlendirilmiştir.

Elde edilen UV-Vis, FT-IR ve TEM bulguları, sentezlenen gümüş nanopartiküllerin tipik gümüş nanopartikül karakteristiklerini taşıdığını ve biyosentetik yaklaşımın başarılı şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

UV-Vis analizinde 401 nm’de belirgin bir LSPR piki gözlenmesi, gümüş nanopartiküllerin sentezlendiğini doğrulayan temel bulgulardan biridir. Yapılan çalışmalar, sentezlenen gümüş nanopartiküller için LSPR piklerinin çoğunlukla 400-450 nm aralığında ortaya çıktığını bildirmektedir (Yang 2021, Cekuolyte vd. 2023). Bu doğrultuda, 401 nm’de tek ve keskin bir pikin görülmesi, nanopartiküllerin monodispers ve kümelenmemiş olma olasılığını güçlendirmektedir. Ayrıca ikincil piklerin görülmemesi, biyosentez yöntemlerinde sıklıkla karşılaşılan organik artık kaynaklı genişleme veya agregasyon problemlerinin minimal olduğunu düşündürmektedir. Güncel literatürde, monodispersite ile korelasyon gösteren dar ve iyi tanımlanmış LSPR bantlarının özellikle stabil kolloidal gümüş nanopartikül sistemlerinin ayırt edici özelliği olduğu belirtilmektedir (De Leersnyder vd. 2019, Raj vd. 2021).

FT-IR spektrumunda gözlenen 3735 ve 3649 cm^{-1} ’deki yüksek dalga sayılı bantlar, hidroksil ve/veya amin gruplarının varlığına işaret etmektedir. Son yıllardaki çalışmalar, bitkisel veya mikrobiyal kaynaklı sentezlerde O–H ve N–H titreşimlerinin genellikle nanopartikül yüzeyini kaplayan özellikle fenolik bileşikler, proteinler veya alkaloidler gibi biyokaplayıcı moleküllerden kaynaklandığını göstermektedir. Bu durumda, sentez ortamında bulunan biyomoleküller indirgeme ve stabilizasyon ajanı olarak rol oynamaktadır (Arif ve Uddin 2021, Okka vd. 2023). 2365 cm^{-1} ’de görülen zayıf bandın atmosferik CO_2 ’ye ait olması, FT-IR analizlerinde yaygın olarak rapor edilen bir durumdur ve numunenin kimyasal yapısına dair anlamlı bir katkı sağlamamaktadır. Bununla birlikte parmak izi bölgesinde yer alan 1653 cm^{-1} (Amid I) ve 1507 cm^{-1} (Amid II) bantları, protein benzeri yapıların varlığına işaret etmektedir. Güncel çalışmalar, biyosentezlenen gümüş nanopartiküllerin yüzeyinin çoğunlukla peptit/protein içerikli kaplayıcılar tarafından stabilize edildiğini ve bu kaplamanın partiküllerin hem boyut kontrolüne hem de uzun süreli kararlılığına katkıda bulunduğunu vurgulamaktadır (Nkosi vd. 2024).

TEM analizleri SGC-R partiküllerinin küresel morfolojide olduğunu göstermiştir. Boyut dağılımının 26.67-66.67 nm arasında olması ve ortalama partikül boyutunun 44.86 ± 1.72 nm olarak belirlenmesi, biyolojik gümüş nanopartiküllerin üretiminde sıkça bildirilen boyut aralığıyla uyumludur. Literatürde farklı biyosentez yöntemleri ile elde edilen gümüş nanopartiküllerin çoğunlukla 10-80 nm aralığında toplandığı ve küresel morfolojinin biyolojik sentezlerde en yaygın form olduğu vurgulanmaktadır. Bu bağlamda mevcut tez çalışmasının sonuçları güncel araştırmalarla önemli ölçüde örtüşmektedir (Dhaka vd. 2023, Kumar vd. 2024, Nkosi vd. 2024). Standart sapmanın 8.77 nm olması, partiküllerin genel olarak dar bir dağılım sergilediğini göstermekte ve UV-Vis analizinde gözlenen keskin SPR pikiyle de tutarlılık oluşturmaktadır. Ayrıca küresel morfoloji, gümüş nanopartiküllerin optik özellikleriyle doğrudan ilişkilidir, yani TEM analizi bulguları, UV-Vis sonuçlarının yorumunu destekleyen niteliktedir.

Çizelge 5.1 Gümüş nanopartikül sentezi gerçekleştiren termofilik bakteriler

Yeşil Sentezde Kullanılan Termofilik Bakteriler	Kullanılan Besiyeri İçerikleri	Partikül Boyutu (nm)/Şekli	Gerçekleştirilen Karakterizasyon	Taranan Biyolojik Aktiviteler	Kaynak
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	1 g/L glikoz, 4 g/L maya özütü, 10 g/L pepton ve 4 g/L KNO ₃	14±4 Küresel	TEM, DLS, FTIR	Antimikrobiyal Aktivite	El-Batal vd. 2013
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Geobacillus stearothermophilus</i> (IBRC-M 10771, DSM 1550)	NB	30-90, 15-50 Küresel	XRD, TEM	Antimikrobiyal Aktivite	Ghasemi vd. 2018
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Ts-1	NB	10-50	SEM, FTIR, EDX	Metilen Mavisinin Bozunması	Chandra ve Sreelatha 2020
<i>Bacillus</i> sp.Б ₁	1 g/L sığır eti özütü, 2 g/L maya özütü, 5 g/L pepton ve 5 g/L NaCl	22.9-75,7	XRD	-	Gunashova vd. 2021
Thermophilic Bacterium Strain KY2	1 g/L sığır eti özütü, 2 g/L maya özütü, 5 g/L pepton ve 5 g/L NaCl	-	-	-	Gunashova 2022
<i>Anoxybacillus</i> sp. ST7	-	20 Küresel	FTIR, XRD, SEM, EDX	Antimikrobiyal Aktivite, DPPH Aktivitesi, DNA Parçalama Aktivitesi, Demir Şelatlama Aktivitesi, Antibiyofilm Aktivite	Gonca 2021

Çizelge 5.1 Gümüş nanopartikül sentezi gerçekleştiren termofilik bakteriler (devam)

Yeşil Sentezde Kullanılan Termofilik Bakteriler	Kullanılan Besiyeri İçerikleri	Partikül Boyutu (nm)/Şekli	Gerçekleştirilen Karakterizasyon	Taranan Biyolojik Aktiviteler	Kaynak
<i>Thermus thermophilus</i> strain SAMU	-	10 Küresel	FTIR, TEM, DLS	Antimikrobiyal Aktivite	Romano vd. 2022
<i>Caldibacillus thermoamylovorans</i> SA1	Walnut Shell Medium,	13.33-40 Küresel, Kübik	FTIR, XRD, SEM	Antimikrobiyal Aktivite	Akkaya vd. 2024
<i>Geobacillus</i> spp.	10 g/L pepton, 5 g/L et özütü ve 5 g/L NaCl	<100 Küresel	SEM, DLS, Zeta potential	Antimikrobiyal Aktivite	Cekuolyte vd. 2023, Cekuolyte vd. 2024
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> AZ1	LB	1.44-16.3 Küresel	FTIR, XRD, EDX, TEM	Antimikrobiyal Aktivite, Antibiyofilm Aktivite	Youssif vd. 2020
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	TSB	5-35 Küresel	XRD, TEM	-	Mohammed Fayaz vd. 2011
<i>Ureibacillus thermosphaericus</i>	Thermus broth	10-100 Küresel	FTIR, XRD, EDX, TEM	-	Juibari vd. 2011

Termofilik bakteriler aracılığıyla gümüş nanopartikül biyosentezinin araştırıldığı çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Gerçekleştirilen bir çalışmada termofilik bir bakteri olan *U. thermosphaericus* ile gümüş nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiştir. Bakteri geliştirildikten sonra hücresiz kültür süpernatantına 10 mM AgNO₃ eklenerek gümüş nanopartikül elde edilmiştir. UV-Vis spektroskopisinde 420 nm’de rezonans piki elde edilmiştir. Elde edilen nanopartiküller TEM analizi ile incelendiğinde 10-100 nm çapında ve küresel oldukları bulunmuştur (Juibari vd. 2011). Fayaz ve arkadaşlarının termofilik bir bakteri olan *G. stearothermophilus* ile yaptıkları çalışmada *G. stearothermophilus* geliştirildikten sonra hücresiz kültür süpernatantı elde edilmiş ve süpernatanta toplam 1 mM olacak şekilde AgNO₃ eklenerek gümüş nanopartikül eldesi amaçlanmıştır. Yapılan deneyler sonucunda UV-Vis spektroskopisinde 423 nm’de rezonans piki elde edilmiştir. TEM sonuçlarına göre nanopartiküllerin dağılımlarının çoklu dağılım modeline uygun ve genellikle küresel şekilde olduğu ve ortalama 5-35 nm boyutlara sahip oldukları görülmüştür (Fayaz vd. 2011). *B. stearothermophilus* süpernatantı kullanılarak ve 1 mM AgNO₃ eklenerek gerçekleştirilen başka bir çalışmada UV-Vis spektroskopisinde 431 nm’de rezonans piki veren, TEM analizi sonucu yaklaşık 14 nm boyutlarında ve küresel şekilli olduğu bulunan nanopartiküller saptanmıştır (El-Batal vd. 2013). Youssif ve arkadaşları tarafından 2020 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada termofilik *G. thermodenitrificans* kullanılarak, hücresiz süpernatanta 1 mM AgNO₃ eklenerek gümüş nanopartikül sentezlenmiştir. UV-Vis spektroskopisinde 410 nm’de rezonans piki saptanmıştır. Üretilen nanopartiküllerin 1.44-16.3 nm boyutlarında ve küresel şekillerde olduğu TEM analizi ile belirlemiştir (Youssif vd. 2020). Başka bir çalışmada termofilik *Bacillus* sp. B1 süpernatantına 1 mM konsantrasyonda AgNO₃ eklenerek gümüş nanopartikül elde edilmiştir. UV-Vis spektroskopisinde 410-420 nm arasında rezonans pikleri görülmüştür. Partikül boyutlar XRD analizi ile, 22.9-75.7 nm arasında belirlenmiştir (Gunashova vd. 2021). Cekuolyte ve arkadaşları tarafından 4 adet *Geobacillus* cinsi termofilik izolatla gerçekleştirilen çalışmada, hücresiz süpernatantlara 2 mM AgNO₃ eklenerek gümüş nanopartikül üretimi yapılmıştır. UV-Vis spektroskopisinde partiküllerin 410-425 nm arasında rezonans piki verdiği bulunmuştur. SEM analiziyle 100 nm’den az çapa sahip küresel partiküllerin varlığı tespit edilmiştir (Cekuolyte vd. 2023).

Literatür, biyomoleküllerle kaplanmış gümüş nanopartiküllerin uzun süreli kararlılık, düşük aglomerasyon ve yüksek dispersite gösterdiğini belirtmektedir; bu da onları farmasötik, antimikrobiyal, antibiyofilm, sensör, ilaç salımı, yara örtüsü veya çevresel uygulamalar için cazip kılmaktadır (Raj vd. 2021, Dhaka vd. 2023). Tez kapsamında elde edilen optik, fonksiyonel grup ve morfoloji analizleri birlikte değerlendirildiğinde, kullanılan biyosentez yöntemin yüksek derecede stabil, küresel şekilli ve monodispers partiküller olduğu sonucuna varılmaktadır. Bu nedenle elde edilen gümüş nanopartiküller, gelecekte ileri antimikrobiyal, katalitik veya biyomedikal uygulamalara yönelik çalışmalarda kullanılabilecek niteliktedir.

SGC-R nanopartiküllerinin farklı Gram-pozitif, Gram-negatif ve ökaryotik fungal patojenler üzerindeki antimikrobiyal ve antibiyofilm etkileri kapsamlı olarak değerlendirilmiştir. Mikroorganizmaların neden olduğu hastalıklar bir halk sağlığı sorunudur. Özellikle antibiyotiklerin yanlış ve bilinçsiz kullanımı nedeniyle ortaya çıkan çoklu ilaç dirençli mikroorganizmalar dünya çapında bir endişe kaynağı olmaktadır. Bakterilerin elementel gümüşe karşı direncinin genellikle düşük olması, antibiyotik dirençli patojenlere karşı potansiyel antimikrobiyal ajan olarak gümüş nanopartiküllerin kullanımına yönelik ilgiyi ve araştırmaları artırmaktadır (Erjaee vd. 2017, Ottoni vd. 2017).

Elde edilen MİK değerleri incelendiğinde, biyolojik olarak sentezlenen gümüş nanopartiküllerin özellikle *S. epidermidis*, *C. albicans* ve *C. parapsilosis* üzerinde düşük MİK değerleri (78.13 µg/mL) ile yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği görülmektedir. Literatür, *Candida* türlerinin gümüş nanopartiküllere karşı bakterilerden daha duyarlı olduğunu desteklemektedir (Al-Shabib vd. 2021, Prabhu vd. 2024). *C. albicans* için 50-100 µg/mL aralığında MİK değerleri yaygın olarak rapor edilmiş olup, bu da çalışma bulgularıyla tamamen uyumludur (He vd. 2020). Gram-negatif patojenler üzerinde elde edilen MİK değerleri (156.25-312.50 µg/mL), bu türlerin dış membran yapıları nedeniyle gümüş nanopartiküllere karşı daha dirençli olduğuna ilişkin güncel bilgiyi doğrulamaktadır (Rónavári vd. 2022). *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* için elde edilen sonuçlar (156.25 µg/mL), biyolojik olarak sentezlenen nanopartikül çalışmalarında raporlanan 125-500 µg/mL aralığıyla uyumludur (Martínez-Gutiérrez vd. 2021). *K.*

pneumoniae için belirlenen 312.50 µg/mL değeri de benzer şekilde literatür sınırları içerisinde. Gram-pozitif patojenlere karşı elde edilen MİK değerleri de literatürle tutarlıdır. MRSA için 312.50 µg/mL değerinin belirlenmesi, önceki çalışmalarda bildirilen 200-400 µg/mL aralığı ile örtüşmektedir (Singh vd. 2023). *L. monocytogenes* için elde edilen MİK (312.50 µg/mL) de aynı şekilde daha önceki çalışmalarda elde edilen sonuçlarla paraleldir (Barros vd. 2023). Tüm seçilen MİK kuyucuklarının TSA'ya pasajlandığında üreme gözlenmemesi, gümüş nanopartiküllerin bu patojenlere karşı bakterisidal ve fungisidal özellikte olduğunu da göstermektedir. Bu sonuçlar sentezlenen gümüş nanopartiküllerin membran bozulması, oksidatif stres indüksiyonu ve DNA/protein etkileşimleri gibi ölümcül mekanizmalara etki ettiğini bildiren güncel çalışmalarla uyumludur (Zhang vd. 2025). Tez kapsamında 28-48 nm, 48-78 nm ve 100 nm gibi farklı boyutlara sahip kimyasal sentezle elde edilen ticari kimyasal gümüş nanopartiküller ile de MİK testi yapılmıştır. Değerlendirilen ticari kimyasal gümüş nanopartiküllerin ancak 1250-2500 µg/mL gibi yüksek konsantrasyonlarda ancak etkili olabildiği saptanırken, biyolojik gümüş nanopartiküllerin 78.13-312.50 µg/mL aralığında dahi etkili olduğu bulunmuştur. Biyolojik kökenli gümüş nanopartiküllerin, kimyasal sentezle üretilen gümüş nanopartiküllere kıyasla çok daha düşük konsantrasyonlarda güçlü antimikrobiyal aktivite göstermesi, literatürde de daha önce vurgulanmıştır. Mevcut tez çalışmasında elde edilen sonuçlarda biyolojik sentezin avantajlarını açıkça göstermektedir. Bu farkın başlıca nedeni, biyosentez ürünlerinin yüzeyinde bulunan proteinler, fenolik gruplar ve polisakkaritlerin nanopartiküllere daha yüksek stabilite, hücre duvarına daha iyi bağlanabilirlik ve ROS üretimini artırma gibi özellikler kazandırmasıdır (Ali vd. 2022, Prabhu vd. 2024). Ek olarak kimyasal gümüş nanopartiküller agregasyona daha yatkındır ve bu durum aktif yüzey alanlarının azalmasına ve etkinliğinin düşmesine neden olmaktadır (Rónavári vd. 2022). Elde edilen sonuçlar, diğer termofilik bakteriler tarafından sentezlenen gümüş nanopartiküllerin sergilediği antimikrobiyal aktivitelere benzemektedir (Youssif vd. 2020, Ghasemi vd. 2018, Cekuolyte vd. 2024). Tez çalışmasının bu anlamda literatürden en büyük farkı; aynı çalışmada bu kadar fazla çeşitlilik ve sayıda patojenin incelenmemiş olmasıdır.

Bakteriyel gümüş nanopartikül ile biyofilm oluşumunun engellenebileceği veya mevcut biyofilmlerin uzaklaştırılabileceğine dair çalışmalar mevcuttur (Gaidhani vd. 2013). Bir

başka çalışmada, termofilik bakteriler tarafından sentezlenen gümüş nanopartiküllerin *P. aeruginosa* ve *S. aureus* biyofilmlerine karşı antibiyofilm aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (Youssif vd. 2020). *P. aeruginosa* ve *E. coli* biyofilmleri üzerinde alt-MİK konsantrasyonlarının bir kısmında anlamlı etki görülmemesi, ancak orta ve yüksek alt-MİK düzeylerinde güçlü inhibisyon gözlenmesi, literatürde tanımlanan konsantrasyona bağlı gümüş nanopartikül etkisi ile uyumludur (Martínez-Gutiérrez vd. 2021). *A. baumannii* biyofilmleri üzerinde anlamlı bir inhibisyon elde edilememesi de beklenen bir durumdur; çünkü gümüş nanopartiküllere karşı biyofilm düzeyinde en dirençli patojenlerden biri olarak tanımlanan türlerdendir (Barros vd. 2023). *S. aureus* suşlarında düşük alt-MİK konsantrasyonlarının biyofilm artışına neden olması, literatürde “sublethal dose biofilm enhancement (öldürücü olmayan dozda biyofilm geliştirme)” olarak bilinen ve metal nanopartiküllerle ilişkili olduğu bildirilen stres yanıtı ile açıklanabilmektedir (Singh vd. 2023). Bu sonuç, gümüş nanopartikül ile muamele edilen *S. aureus* suşlarının bazı dozlarda savunma amaçlı biyofilm üretimini artırabileceğini gösteren çalışmalarla uyumludur. *S. epidermidis* için birçok konsantrasyonda biyofilm inhibisyonunun gözlenmesi, bu türün gümüş nanopartiküllere karşı diğer Gram-pozitiflere göre daha duyarlı olduğunu bildiren güncel araştırmalarla paraleldir (He vd. 2020). *E. faecalis* ve *E. faecium* suşları için yalnızca yüksek alt-MİK konsantrasyonlarında anlamlı azalma elde edilmesi, bu türlerin kalın peptidoglikan tabakası ve kompleks biyofilm matriksleri nedeniyle gümüş nanopartiküllere karşı daha dirençli olduğu yönündeki bulgularla desteklenebilmektedir (Zhang vd. 2025). *C. albicans* ve *C. parapsilosis* biyofilmlerinin uygulanan alt-MİK konsantrasyonların çoğunda inhibe edilmesi, gümüş nanopartiküllerin *Candida* biyofilmlerine karşı bakteriyel biyofilmlerden daha yüksek etkiler gösterdiğini savunan son yıllardaki çalışmalarla uyum göstermektedir (Al-Shabib vd. 2021, Prabhu vd. 2024).

Ayrıca *SGC-R* gümüş nanopartiküllerinin antioksidan potansiyeli DPPH serbest radikal toplama aktivitesi analiziyle değerlendirilmiş ve aktivitenin konsantrasyona bağımlı olarak arttığı belirlenmiştir. En yüksek DPPH radikal toplama etkinliğinin 2500 µg/mL’de %60.41’e ulaştığı görülmüş, bu değer pozitif kontrol gallik aside (%93 civarında) kıyasla daha düşük olsa da literatürde biyolojik sentezli gümüş nanopartiküllerin antioksidan kapasitesine ilişkin raporlarla uyumlu bulunmuştur (Khuda

vd. 2022). Son yıllarda yapılan çalışmalar, gümüş nanopartiküllerin antioksidan aktivitesinin büyük ölçüde biyosentez sırasında yüzeye bağlanan polifenolik ve fenolik bileşiklere bağlı olduğunu vurgulamaktadır (Ghramh vd. 2019, Mohammadlou vd. 2020, Chinnasamy vd. 2022). Bu nedenle gallik asit gibi güçlü bir kimyasal antioksidanla karşılaştırıldığında daha düşük aktivite gözlenmesi beklenen bir durumdur (Khorrami vd. 2018).

Mevcut tez çalışmasında antimikrobiyal, antibiyofilm ve antioksidan etkilerin yanı sıra biyolojik olarak sentezlenen gümüş nanopartiküllerin farklı hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkileri *in vitro* olarak MTT testi ile değerlendirilmiştir. İlk olarak gümüş nanopartiküllerin sağlıklı hücre hatları olan L929 fare fibroblastı, HDF insan dermal fibroblastı ve HaCaT ölümsüzleştirilmiş insan keratinositi üzerindeki hücre canlılığı etkileri araştırılmıştır. Bu kapsamda hücre canlılığı baz alınarak hesaplanan IC₅₀ değerlerinin sırasıyla 626.7, 450.2 ve 518.4 µg/mL gibi nispeten yüksek konsantrasyonlarda olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, sentezlenen gümüş nanopartiküllerin sağlıklı hücreler üzerinde düşük toksisite sergilediğini göstermektedir. Literatürde biyolojik olarak sentezlenen gümüş nanopartiküllerin ticari ve/veya kimyasal olarak üretilmiş nanopartiküllere kıyasla daha düşük sitotoksisite gösterdiği ve bunun biyolojik kaplayıcı moleküllerin hücrelere karşı koruyucu etkisinden kaynaklanabileceği sıkça rapor edilmektedir (Naseer vd. 2020, Singh vd. 2021, Manikandan vd. 2023). Ticari kimyasal gümüş nanopartiküller ile yapılan testlerde hücre canlılığı çok düşük bulunmuş ve hücreler AgNO₃ ile muamele edildiğinde canlılık gözlenmemiştir. Tezden elde edilen bu sonuçlar biyolojik olarak sentezlenen gümüş nanopartiküllerin teröpatik çalışmalarda kullanımına ve biyomedikal uygulamalar için uygunluğuna dair ışık tutmaktadır. Sağlıklı hücrelere ek olarak, sentezlenen gümüş nanopartiküllerin kanser hücre hatları olan MCF7 insan meme bezi karsinomu, HT-29 kolorektal adenokarsinomu, A549 adenokarsinom insan alveolar bazal epitel hücre hatları üzerindeki hücre canlılığı etkileri de araştırılmıştır. Hesaplanan IC₅₀ değerlerinin sırasıyla 26.26, 3.51 ve 4.26 µg/mL gibi daha düşük konsantrasyonlarda olduğu görülmüştür. Sağlıklı hücrelere karşı hesaplanan IC₅₀ değerleri yüksek konsantrasyonlardayken, kanser hücrelerine karşı hesaplanan IC₅₀ değerlerinin daha düşük konsantrasyonlarda olması, sentezlenen partiküllerin “seçici sitotoksik etki” gösterebildiğine işaret etmektedir. Yakın tarihli araştırmalar, özellikle

bitki ekstreleriyle sentezlenen gümüş nanopartiküllerin sağlıklı hücrelere göre kanser hücrelerinde daha güçlü toksisite oluşturduğunu, bu durumun da artmış ROS üretimi, mitokondriyal bozulma, DNA hasarı veya apoptotik yolların aktive edilmesi gibi mekanizmalarla ilişkili olduğunu bildirmektedir (Khan vd. 2020, El-Naggar vd. 2022, Abbasi vd. 2023). Tez çalışmasından elde edilen sağlıklı hücrelerde düşük, kanser hücrelerinde yüksek toksisite profili bu literatür bulgularıyla uyumludur. Ek olarak, MCF7 ve HT-29 hücre hatlarının 78.125 µg/mL konsantrasyonda gümüş nanopartikülle 48 saat muamele edildiğinde mikroskopik olarak belirgin morfolojik bozulma göstermesi, MTT verilerini desteklemekte ve gümüş nanopartiküllerin kansere özgü sitotoksik etkisini güçlendirmektedir. Benzer biçimde, son yıllarda yapılan çalışmalar da gümüş nanopartikül uygulamasının hücre membran bütünlüğünün bozulması, apoptotik cisimcikler ve yoğunlaşmış çekirdek morfolojisi gibi hasar belirteçlerine yol açtığını göstermektedir (Rastogi vd. 2019, Abdelghany vd. 2020).

In vitro yara modeli oluşturularak elde edilen bulgular, gümüş nanopartiküllerin HDF ve HaCaT hücrelerinde kontrol ve gümüş nanopartiküller ile muamele edilen gruplarda 24. saatte belirgin bir hücre göçü gözlenmiş, 48. saatte özellikle IC_{50/4} konsantrasyonundaki gümüş nanopartiküllerin uygulamalarında göç yoğunluğunun kontrol grubuna yakın olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, SGC-R gümüş nanopartiküllerinin düşük dozlarda hücre göçünü önemli ölçüde baskılamadığını göstermektedir. Bu bulgular literatürde rapor edilen önceki çalışmalarla kısmen uyumludur. Gümüş nanopartiküllerin düşük konsantrasyonlarının fibroblast ve keratinosit hücrelerinin göçünü ve proliferasyonunu desteklediği, böylece yara kapama süreçlerini olumlu etkilediği bildirilmiştir. Bu etki hücre tipi ve gümüş nanopartiküllerin konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Gümüş nanopartiküllerin kontrollü iyon salınımı, antibakteriyel etkinlik ve hücre proliferasyonunu teşvik etmesi yara iyileşmesinde yararlı olarak gösterilmiştir (Balaure vd. 2025). Bununla birlikte literatürde, gümüş nanopartiküllerin yalnızca pozitif yönde etkisinin olmayabileceğine dair bulgular da vardır. Bazı çalışmalarda gümüş nanopartiküllerin yüksek dozlarının fibroblast göçünü ve ekstraselüler matriks üretimini azaltarak hücre fonksiyonlarını olumsuz etkileyebileceği belirtilmiştir. Bu etki özellikle yüksek konsantrasyonlar ve belirli fizikokimyasal nanopartikül özellikleri için geçerlidir (Vieira vd 2017). Bu durum, gümüş nanopartiküllerin her koşulda yara iyileşmesini

destekleyen maddeler olmadığını; doz, formülasyon ve uygulama koşullarına bağlı olarak farklı etkiler gösterebileceğini vurgulamaktadır. Bununla birlikte, düşük doz gümüş nanopartikül uygulamalarında hücre morfolojisi, adezyonu ve genel canlılık düzeylerinde belirgin bir bozulma gözlenmemesi, biyolojik olarak sentezlenen nanopartiküllerin düşük konsantrasyonlarda fibroblast ve keratinosit hücreleri için toksik olmadığı izlenimini vermektedir. Literatürde de düşük doz gümüş nanopartiküllerin varlığında hücre canlılığını koruyabildiği ve yalnızca yüksek konsantrasyonlarda proliferasyon veya migrasyon üzerinde olumsuz etkilerin görülebildiği bildirilmektedir. Ayrıca literatürde, gümüş nanopartikül uygulamalarının hücre tipine göre farklı yanıtlar oluşturduğu da ifade edilmektedir. Özellikle keratinositlerin göç ve proliferasyon yanıtlarının fibroblastlara kıyasla farklı olabileceği; bunun da yara iyileşmesinin epidermal ve dermal bileşenlerindeki farklı mekanizmalarla ilişkili olduğu raporlanmıştır (Liu, vd. 2010). Bu bağlamda HaCaT hücre hattı için gözlenen göç etkinliği, gümüş nanopartiküllerin epidermal re-epitelyalizasyonu destekleyen özellikleriyle uyumludur. Elde edilen bulgular, literatürde AgNP'lerin antibakteriyel, antiinflamatuvar ve hücre proliferasyonunu etkileyen özelliklerinin yanı sıra, uygun konsantrasyonlarda hücre göçünü engellemeden yara kapama dinamiklerine katkı sağlayabileceğini göstermektedir (Nqakala vd. 2021). Bu bağlamda çalışmamızdaki 48. saat sonuçlarının literatürde düşük doz nanopartiküllerin göç üzerindeki sınırlı negatif etkisi ile uyumlu olması, gümüş nanopartiküllerin hücre göçü üzerine doz-bağımlı ve hücre tipine özgü yanıt oluşturduğunu desteklemektedir. Sonuç olarak, SGC-R AgNP'lerinin düşük konsantrasyonlarının fibroblast ve keratinosit göçünü kontrol grubuna benzer şekilde sürdürdüğü bu tez çalışmasının bulguları, AgNP'lerin yara iyileşmesindeki potansiyel yararlı etkileriyle literatürde rapor edilen mekanistik çalışmalara uygun bir çerçeve sunmaktadır.

Literatürdeki çeşitli çalışmalara bakıldığında; biyolojik olarak üretilmiş gümüş nanopartiküllerin 3T3 fibroblast hücrelerinde yapılan yara modeli deneylerinde %96'ya varan yara kapanma oranı elde edildiği rapor edilmiştir; bu çalışmada, gümüş nanopartiküllerin hücreler üzerinde “aşırı toksik olmayan” konsantrasyonlarda kullanıldığı ve hem antimikrobiyal hem de yara iyileştirici etkinlik gösterdiği belirtilmiştir (Vijayakumar vd. 2023). Benzer biçimde, kimyasal olarak stabilize edilmiş

gümüş nanopartiküllerin kollajen/kitosan bir iskelet içinde kullanıldığı çalışmada; fibroblast migrasyonunun hızlandığı ve *in vivo* hayvan modelinde yara iyileşmesinde belirgin derece artış sağlandığı bildirilmiştir (You vd. 2017). Ancak bu olumlu etkilerin çoğunlukla gümüş nanopartiküllerin biyopolimer, nanofiber, hidrojel ya da kollajen/kitosan matrisi gibi nanokompozit sistemler içinde kullanıldığı çalışmalara ait olduğu görülmektedir. Örneğin; guar gumu/kurkumin stabilize gümüş nanopartikül içeren hidrojel kompozit, insan dermal fibroblastlarında proliferasyonu, migrasyonu ve kollajen üretimini artırırken; *in vivo* modelde yara kapanmasını ve bakteri sayısını azaltmayı başarmıştır (Bhubhanil vd. 2021). Başka bir çalışmada, jelatin/fukoidan ile hazırlanan nanojel kaplı gümüş nanopartiküller, fibroblast hücrelerinde sitotoksik etki göstermediği gibi yara iyileşmesini desteklemiştir (Hao vd. 2025).

Bu veriler ışığında; mevcut tez çalışmasında *SGC-R* gümüş nanopartiküllerinin düşük konsantrasyonlarının fibroblast ve keratinosit göçünü kontrol grubuna benzer şekilde sürdürdüğü ve tez çalışmasının bulgularının, gümüş nanopartiküllerin yara iyileşmesindeki potansiyel yararlı etkileriyle literatürde rapor edilen mekanistik çalışmalara uygun bir çerçevede olduğu görülmektedir. Kullanılacak formülasyonun, taşıyıcının veya dozun doğru seçilmesi durumunda güvenli ve etkin bir yara bakım materyali olarak değerlendirilmesi mümkündür. Özellikle düşük doz ve hidrojel, nanofiber, biyopolimer kompozitleri gibi biyouyumlu taşıyıcı kullanımı; hem hücre canlılığını koruyabilecek hem de güçlü antimikrobiyal etkisi sayesinde enfeksiyon riskini azaltarak yara iyileşmesine dolaylı olarak destek sağlayabilecektir. Sonuç olarak, gümüş nanopartiküllerin yara iyileştirici içeriklerde kullanımı; hücre göçünü doza bağlı etkilemekle birlikte, düşük dozlarda toksik olmamaları ve güçlü antimikrobiyal özellikleri nedeniyle bilimsel açıdan değerli bir seçenek oluşturmaktadırlar.

Tüm bu bilgiler neticesinde, bu tez çalışması kapsamında toksisite genlerine sahip olmadığı bilinen termofilik *SGC-R* bakterisinin azot metabolizması araştırılmıştır. Bakterinin üreme ve hücresiz süpernatant koşullarının gümüş nanopartikül biyosentezine etkisi ortaya koyulmuş ve bu bakterinin yüksek saflıkta ve miktarda monodispers, küresel morfolojide ve kolloidal açıdan stabil gümüş nanopartiküller üretebildiği açığa çıkarılmıştır. UV-Vis, FT-IR ve TEM analizlerinden elde edilen veriler biyosentetik

süreçlerin etkinliğini doğrularken, *SGC-R* nanopartiküllerinin geniş spektrumlu antimikrobiyal ve antibiyofilm aktivitelerinin yanı sıra anlamlı düzeyde antioksidan kapasite sergilediği belirlenmiştir. Ayrıca sağlıklı hücrelerde düşük sitotoksikite ve kanser hücrelerinde belirgin seçici toksisite gösteren bu nanopartiküller, biyomedikal uygulamalar açısından dikkate değer bir terapötik potansiyel sunmaktadır. Gümüş nanopartiküllerin bir sistem aracı olmadan hücreler üzerine uygulandığında migrasyon kapasitesini artırmasa da, düşük dozlarda toksik etkiler göstermemesi ve sahip olduğu güçlü antimikrobiyal etkisi bir arada düşünüldüğünde doğrudan veya özellikle taşıyıcı sistemlerle birlikte nanokompozitler olarak kullanıldığında etkin yara bakım materyali olma potansiyeli, bu nanopartiküllerin klinik ve biyomedikal uygulamalarda önemli bir seçenek olabileceğine işaret etmektedir. Tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde, literatürde ilk kez *SGC-R* bakterisi aracılığıyla gerçekleştirilen biyosentez çevresel uyumluluk, biyogüvenlik, verimlilik ve uygulanabilirlik bakımından mevcut biyolojik nanopartikül üretim stratejilerine önemli bir katkı sağlayacak ve ileride gerçekleştirilebilecek daha kapsamlı partikül katkılı medikal araç veya topikal krem formülasyonları geliştirmeye yönelik ileri klinik çalışmalar için bir nanopartikül kaynağı olarak kullanılabilme potansiyeli barındıracaktır.

KAYNAKLAR

- Abbasi, B. A., Iqbal, J., Mahmood, T., Khalil, A. T., Hameed, S., Kanwal, S., & Uddin, S. (2023). *Recent advances in green-synthesized silver nanoparticles and their anticancer activities*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 80, 104107.
- Abdel-Halim, E. S., & Al-Deyab, S. S. (2011). Utilization of hydroxypropyl cellulose for green and efficient synthesis of silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 86(4), 1615–1622.
- Abdelghany, T. M., Al-Rajhi, A. M., Al Abboud, M. A., et al. (2020). *Recent advances in green synthesized nanoparticles and their applications in cancer therapeutics*. *Applied Nanoscience*, 10, 1025–1040.
- Abdelmoneim, H. M., Taha, T. H., Alhudhaibi, A. M., Afifi, F. M., Faqihi, A. A., Alsalamah, S. A., & Bendif, H. (2025). Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Polymeric Nanofiber Composites: Fabrications, Mechanisms, and Applications. *Polymers*, 17(17), 2327.
- Adeyemi, O. S., & Sulaiman, F. A. (2015). Evaluation of metal nanoparticles for drug delivery systems. *Journal of Biomedical Research*, 29(2), 145–149.
- Adhikari, U., Ghosh, A., & Chandra, G. (2013). Nano particles of herbal origin: A recent eco-friend trend in mosquito control. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 3(2), 167.
- Ahmad, A., Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Khan, M. I., Kumar, R., & Sastry, M. (2003). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 28(4), 313-318.
- Ahmed, K. B. A., Kalla, D., Uppuluri, K. B., & Anbazhagan, V. (2014). Green synthesis of silver and gold nanoparticles employing levan, a biopolymer from *Acetobacter xylinum* NCIM 2526, as a reducing agent and capping agent. *Carbohydrate Polymers*, 112, 539–545.
- Ahmed, T., Shahid, M., Noman, M., Niazi, M. B. K., Zubair, M., Almatroudi, A., ... & Li, B. (2020). Bioprospecting a native silver-resistant *Bacillus safensis* strain for green synthesis and subsequent antibacterial and anticancer activities of silver nanoparticles. *Journal of advanced research*, 24, 475-483.
- Ajitha, B., Reddy, Y. A. K., Shameer, S., Rajesh, K. M., Suneetha, Y., & Reddy, P. S. (2015). Lantana camara leaf extract mediated silver nanoparticles: antibacterial, green catalyst. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 149, 84-92.
- Akkaya, S. N., Omeroglu, M. A., Nadaroglu, H., & Adiguzel, A. (2024). Eco-Friendly Synthesis of Silver Nanoparticles Using Thermophilic Bacteria (*Caldibacillus thermoamylovorans*) and Walnut Shells: Promising Antibacterial Agents for Diverse Applications.

- Al-Asbahi, M. G., Al-Ofiry, B. A., Saad, F. A., Alnehia, A., & Al-Gunaid, M. Q. (2024). Silver nanoparticles biosynthesis using mixture of *Lactobacillus* sp. and *Bacillus* sp. growth and their antibacterial activity. *Scientific Reports*, 14(1), 10224.
- Al-Shabib, N. A., Khan, M. S., & Ahmad, J. (2021). Antifungal and antibiofilm mechanisms of silver nanoparticles against *Candida* species. *Frontiers in Microbiology*, 12, 667–679.
- Alexander, Wesley, J. 2009. History of the medical use of silver. *Surgical Infections*, 10(3), 289–294.
- Ali, S., Khan, M., & Ahmad, F. (2022). Green-synthesized silver nanoparticles and their antimicrobial potential against multidrug-resistant pathogens. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(3), 115–129.
- Altammar, K. A. (2023). A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1155622.
- Ammar, H. A. M., & El-Desouky, T. A. (2016). Green synthesis of nanosilver particles by *Aspergillus terreus* HA1N and *Penicillium expansum* HA2N and its antifungal activity against mycotoxigenic fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 121(1), 89–100.
- Anil Kumar, S., Abyaneh, M. K., Gosavi, S.W., Kulkarni, S. K., Pasricha, R., Ahmad, A. ve Khan, M. I. 2007. Nitrate reductase-mediated synthesis of silver nanoparticles from AgNO₃, *Biotechnology letters*, 29(3), 439–445.
- Anonymous. 2024. Web Sitesi: <http://www.kegg.jp/blastkoala> Erişim Tarihi:25/12/2025
- Arif, R., & Uddin, R. (2021). A review on recent developments in the biosynthesis of silver nanoparticles and its biomedical applications. *Medical Devices & Sensors*, 4(1), e10158.
- AshaRani, P. v., Sethu, S., Lim, H. K., Balaji, G., Valiyaveetil, S., & Hande, M. P. (2012). Differential regulation of intracellular factors mediating cell cycle, DNA repair and inflammation following exposure to silver nanoparticles in human cells. *Genome Integrity*, 3.
- Asz, J., Asz, D., Moushey, R., Seigel, J., Mallory, S. B., & Foglia, R. P. (2006). Treatment of toxic epidermal necrolysis in a pediatric patient with a nanocrystalline silver dressing. *Journal of Pediatric Surgery*, 41(12), e9.
- Aziz, N., Faraz, M., Sherwani, M.A., Fatma, T. ve Parasad, R. 2019. Illuminating the anticancerous efficacy of a new fungal chassis for silver nanoparticle synthesis. *Front Chem*, 7, 65.
- Bahrulolum, H., Nooraei, S., Javanshir, N., Tarrahimofrad, H., Mirbagheri, V. S., Easton, A. J., ve Ahmadian, G. 2021. Green synthesis of metal nanoparticles using microorganisms and their application in the agrifood sector. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 1-26.
- Balaji, D. S., Basavaraja, S., Deshpande, R., Mahesh, D. B., Prabhakar, B. K., & Venkataraman, A. (2009). Extracellular biosynthesis of functionalized silver nanoparticles by strains of *Cladosporium cladosporioides* fungus. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 68(1), 88–92.

- Balaure, P. C., Niculescu, A. G., Anghel, D., Grumezescu, A. M., & Alberts, A. (2025). Role of Silver Nanoparticles in Wound Healing: Mechanisms, Efficacy, and Clinical Applications. *Inorganics*, 13(12), 401.
- Baldi, F., Daniele, S., Gallo, M., Paganelli, S., Battistel, D., Piccolo, O., Faleri, C., Puglia, A. M., & Gallo, G. (2016). Polysaccharide-based silver nanoparticles synthesized by *Klebsiella oxytoca* DSM 29614 cause DNA fragmentation in *E. coli* cells. *BioMetals*, 29(2), 321–331.
- Bao, Z., & Lan, C. Q. (2019). Advances in biosynthesis of noble metal nanoparticles mediated by photosynthetic organisms—A review. In *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (Vol. 184). Elsevier B.V.
- Bar, H., Bhui, D. K., Sahoo, G. P., Sarkar, P., Pyne, S., & Misra, A. (2009). Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Jatropha curcas*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 348(1–3), 212–216.
- Barros, C. H., Casey, E., & McAuley, K. (2023). Silver nanoparticles disrupt Gram-positive and Gram-negative bacterial biofilms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 222, 113–128.
- Barros, C. H., Fulaz, S., Stanisic, D., & Tasic, L. (2018). Biogenic nanosilver against multidrug-resistant bacteria (MDRB). *Antibiotics*, 7(3), 69.
- Baudot, C., Tan, C. M., & Kong, J. C. 2010. FTIR spectroscopy as a tool for nano-material characterization. *Infrared Physics and Technology*, 53(6), 434–438.
- Begum, N. A., Mondal, S., Basu, S., Laskar, R. A., & Mandal, D. (2009). Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of Black Tea leaf extracts. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 71(1), 113–118.
- Beyene, H. D., Werkneh, A. A., Bezabh, H. K., Ambaye, T. G. 2017. Synthesis paradigm and applications of silver nanoparticles (AgNPs), a review. *Sustainable Materials and Technologies*, 13, 18-23.
- Bhainsa, K. C., & D'Souza, S. F. (2006). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 47(2), 160–164.
- Bhol, K. C., & Schechter, P. J. (2007). Effects of nanocrystalline silver (NPI 32101) in a rat model of ulcerative colitis. *Digestive diseases and sciences*, 52(10), 2732-2742.
- Bhubhanil, S., Talodthaisong, C., Khongkow, M., Namdee, K., Wongchitrat, P., Yingmema, W., ... & Kulchat, S. (2021). Enhanced wound healing properties of guar gum/curcumin-stabilized silver nanoparticle hydrogels. *Scientific Reports*, 11(1), 21836.
- Biao, L., Tan, S., Wang, Y., Guo, X., Fu, Y., Xu, F., Zu, Y. ve Liu, Z. 2017. Synthesis, characterization and antibacterial study on the chitosan-functionalized Ag nanoparticles. *Materials Science and Engineering*, 76, 73-80.
- Bindhu, M. R., & Umadevi, M. (2015). Antibacterial and catalytic activities of green synthesized silver nanoparticles. *Spectrochimica acta part A: molecular and biomolecular spectroscopy*, 135, 373-378.

- Blanco-Andujar, C., & Thanh, N. T. (2010). Synthesis of nanoparticles for biomedical applications. *Annual Reports Section "A" (Inorganic Chemistry)*, 106, 553-568.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- Bo, L., Yang, W., Chen, M., Gao, J., & Xue, Q. (2009). A simple and "green" synthesis of polymer-based silver colloids and their antibacterial properties. *Chemistry and Biodiversity*, 6(1), 111–116.
- Boonpavanitchakul, K., Pimpha, N., Kangwansupamonkon, W., & Magaraphan, R. (2020). Processing and antibacterial application of biodegradable sponge nanocomposite materials of silver nanoparticles and silk sericin. *European Polymer Journal*, 130.
- Borase, H. P., Salunke, B. K., Salunkhe, R. B., Patil, C. D., Hallsworth, J. E., Kim, B. S., & Patil, S. v. (2014). Plant extract: A promising biomatrix for ecofriendly, controlled synthesis of silver nanoparticles. In *Applied Biochemistry and Biotechnology* (Vol. 173, Issue 1, pp. 1–29). Humana Press Inc.
- Bowler, P. G., Duerden, B. I., & Armstrong, D. G. (2001). Wound microbiology and associated approaches to wound management. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 14, Issue 2, pp. 244–269).
- Brayner, R., Barberousse, H., Hemadi, M., Djedjat, C., Yéprémian, C., Coradin, T., ... & Couté, A. (2007). Cyanobacteria as bioreactors for the synthesis of Au, Ag, Pd, and Pt nanoparticles via an enzyme-mediated route. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 7(8), 2696-2708.
- Buachan, P., Chularojmontri, L. and Wattanapitayakul, S.K. 2014. Selected activities of Citrus Maxima merr. Fruits on human endothelial cells: Enhancing cell migration and delaying cellular aging. *Nutrients*, 6(4), 1618–1634.
- Buszewski, B., Railean-Plugaru, V., Pomastowski, P., Rafińska, K., Szultka-Mlynska, M., Golinska, P., Wypij, M., Laskowski, D., & Dahm, H. (2018). Antimicrobial activity of biosilver nanoparticles produced by a novel *Streptacidiphilus durhamensis* strain. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 51(1), 45–54.
- Butler, K. S., Peeler, D. J., Casey, B. J., Dair, B. J., & Elespuru, R. K. (2015). Silver nanoparticles: correlating nanoparticle size and cellular uptake with genotoxicity. *Mutagenesis*, 30(4), 577-591.
- Carlson, C., Hussein, S. M., Schrand, A. M., Braydich-Stolle, L. K., Hess, K. L., Jones, R. L., & Schlager, J. J. (2008). Unique cellular interaction of silver nanoparticles: Size-dependent generation of reactive oxygen species. *Journal of Physical Chemistry B*, 112(43), 13608–13619.
- Castro-Longoria, E., Moreno-Velásquez, S. D., Vilchis-Nestor, A. R., Arenas-Berumen, E., & Avalos-Borja, M. (2012). Production of platinum nanoparticles and nanoaggregates using *Neurospora crassa*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(7), 1000–1004.

- Castro-Longoria, E., Vilchis-Nestor, A. R., & Avalos-Borja, M. (2011). Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 83(1), 42–48.
- Cekuolyte, K., Gudiukaite, R., Klimkevicius, V., Mazrimaite, V., Maneikis, A., & Lastauskiene, E. (2023). Biosynthesis of Silver Nanoparticles Produced Using *Geobacillus* spp. *Bacteria. Nanomaterials*, 13(4), 702.
- Cekuolyte, K., Šapaitė, D., Žemgulytė, E., Gudiukaitė, R., & Lastauskienė, E. (2024). Induction of apoptosis with silver nanoparticles obtained using thermophilic bacteria. *Journal of Functional Biomaterials*, 15(6), 142.
- Chandra, S., & Sreelatha, B. (2020). Biosynthesis of silver nanoparticles and exopolysaccharide using novel thermophilic strain Ts-1 of *Bacillus amyloliquefaciens* [Preprint]. ResearchGate.
- Chandran, S. P., Chaudhary, M., Pasricha, R., Ahmad, A., & Sastry, M. (2006). Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract. *Biotechnology Progress*, 22(2), 577–583.
- Chaudhari, A. A., Vig, K., Baganizi, D. R., Sahu, R., Dixit, S., Dennis, V., Singh, S. R., & Pillai, S. R. 2016. Future prospects for scaffolding methods and biomaterials in skin tissue engineering: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12).
- Chen, J., Han, C. M., Lin, X. W., Tang, Z. J., & Su, S. J. (2006). Effect of silver nanoparticle dressing on second degree burn wound. *Zhonghua wai ke za zhi [Chinese journal of surgery]*, 44(1), 50-52.
- Chen, J., Ouyang, J., Kong, J., Zhong, W., & Xing, M. M. (2013). Photo-cross-linked and pH-sensitive biodegradable micelles for doxorubicin delivery. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 5(8), 3108–3117.
- Chernousova, S., & Eppe, M. (2013). *Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle, and metal*. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(6), 1636–1653.
- Chinnasamy, G., Chandrasekhar, S., Thankappan, S. et al. (2022). *Green synthesis of silver nanoparticles and their antioxidant and cytotoxic activities*. *Materials Chemistry and Physics*, 290, 126558.
- Chopade, B., Ghosh, Patil, Ahire, Kitture, Jabgunde, Kale, Pardesi, Cameotra, Bellare, & Dhavale. (2012). Synthesis of silver nanoparticles using *Dioscorea bulbifera* tuber extract and evaluation of its synergistic potential in combination with antimicrobial agents. *International Journal of Nanomedicine*, 483.
- Christensen, L., Vivekanandhan, S., Misra, M., ve Kumar Mohanty, A. 2011. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Murraya koenigii* (curry leaf): An investigation on the effect of broth concentration in reduction mechanism and particle size. *Advanced Materials Letters*, 2(6), 429-434.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2016) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th edition. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute. ISBN 978-1-68440-032-4.
- Coelho, C. ve Romao, M.J. 2015. Structural and mechanistic insights on nitrate reductases. *Protein Sci*, 24, 1901–1911.

- Coleri, A., 2007. Bazı termofilik *Bacillus* türlerinin termostabil α -glukozidaz üretim kapasiteleri ve enzim/lerin kısmi karakterizasyonu. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Das, S. K., & Thatoi, H. (2020). Mangrove plant-mediated green synthesis of nanoparticles and their pharmaceutical applications: an overview. *Biotechnological Utilization of Mangrove Resources*, 355-370.
- Das, S., Patra, C. R., & Jana, S. (2021). Microbial synthesis of silver nanoparticles and their biomedical applications: A review. *Biotechnology Reports*, 29, e00592.
- Das, T. K., Ganguly, S., Bhawal, P., Mondal, S., & Das, N. C. (2018). A facile green synthesis of silver nanoparticle-decorated hydroxyapatite for efficient catalytic activity towards 4-nitrophenol reduction. *Research on Chemical Intermediates*, 44(2), 1189–1208.
- Das, V. L., Thomas, R., Varghese, R. T., Soniya, E. V., Mathew, J. ve Radhakrishnan, E. K. 2014. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by the *Bacillus* strain CS11 isolated from industrialized area. *Biotech*, 4(2), 121–126.
- Dawadi, S., Katuwal, S., Gupta, A., Lamichhane, U., Thapa, R., Jaisi, S., Lamichhane, G., Bhattarai, D. P. ve Parajuli, N. 2021. Current research on silver nanoparticles: synthesis, characterization, and applications. *Journal of nanomaterials*, 2021(1), 6687290.
- De Leersnyder, I., De Gelder, L., Van Driessche, I., & Vermeir, P. (2019). Revealing the importance of aging, environment, size and stabilization mechanisms on the stability of metal nanoparticles: A case study for silver nanoparticles in a minimally defined and complex undefined bacterial growth medium. *Nanomaterials*, 9(12), 1684.
- Deb, S., Ghosh, K., & Shetty, S. D. (2015). Nanoimaging in cardiovascular diseases: Current state of the art. *The Indian Journal of Medical Research*, 141(3), 285.
- Debabov, V. G., Voeikova, T. A., Shebanova, A. S., Shaitan, K. v., Emel'yanova, L. K., Novikova, L. M., & Kirpichnikov, M. P. (2013). Bacterial synthesis of silver sulfide nanoparticles. *Nanotechnologies in Russia*, 8(3–4), 269–276.
- Deepa, S., Kanimozhi, K., & Panneerselvam, A. (2013). Antimicrobial activity of extracellularly synthesized silver nanoparticles from marine derived actinomycetes. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 2(2), 223-230.
- Deepak, V., Umamaheshwaran, P. S., Guhan, K., Nanthini, R. A., Krithiga, B., Jaithoon, N. M. H., & Gurunathan, S. (2011). Synthesis of gold and silver nanoparticles using purified URAK. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86(2), 353–358.
- Deljou, A., & Goudarzi, S. (2016). Green extracellular synthesis of the silver nanoparticles using thermophilic *Bacillus* sp. AZ1 and its antimicrobial activity against several human pathogenetic bacteria. *Iranian journal of biotechnology*, 14(2), 25.
- Devanesan, S., & Alsalhi, M. S. 2021. Green synthesis of silver nanoparticles using the flower extract of *abelmoschus esculentus* for cytotoxicity and antimicrobial studies. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 3343–3356.

- Devi, L. S., & Joshi, S. R. (2012). Antimicrobial and synergistic effects of silver nanoparticles synthesized using: Soil fungi of high altitudes of Eastern Himalaya. *Mycobiology*, 40(1), 27–34.
- Dhaka, A., Mali, S. C., Sharma, S., & Trivedi, R. (2023). A review on biological synthesis of silver nanoparticles and their potential applications. *Results in Chemistry*, 6, 101108.
- Dhandapani, K. V., Anbumani, D., Gandhi, A. D., Annamalai, P., Muthuvenkatachalam, B. S., Kavitha, P., & Ranganathan, B. (2020). Green route for the synthesis of zinc oxide nanoparticles from *Melia azedarach* leaf extract and evaluation of their antioxidant and antibacterial activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24(January), 101517.
- Dhandapani, P., Prakash, A. A., AlSalhi, M. S., Maruthamuthu, S., Devanesan, S., & Rajasekar, A. (2020). Ureolytic bacteria mediated synthesis of hairy ZnO nanostructure as photocatalyst for decolorization of dyes. *Materials Chemistry and Physics*, 243.
- Dhoondia, Z. H., & Chakraborty, H. (2012). Lactobacillus mediated synthesis of silver oxide nanoparticles. *Nanomaterials and nanotechnology*, 2, 15.
- dos Santos, C. A., Seckler, M. M., Ingle, A. P., Gupta, I., Galdiero, S., Galdiero, M., Gade, A., & Rai, M. (2014). Silver nanoparticles: Therapeutical uses, toxicity, and safety issues. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(7), 1931–1944.
- Durán, N., Marcato, P. D., Conti, R. D., Alves, O. L., Costa, F., & Brocchi, M. (2010). Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21, 949-959.
- Dwivedy, A. K., Upadhyay, N., Asawa, S., Kumar, M., Prakash, B., & Dubey, N. K. (2019). Therapeutic Potential of Plant-Based Metal Nanoparticles: Present Status and Future Perspectives. *Nanomaterials in Plants, Algae and Microorganisms*, 169-196.
- Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Guinebretiere, M. H., Lindback, T., Andersson, M., Schulz, A., & Scherer, S. 2005. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology*, 151(1), 183-197.
- Elangovan, K., Elumalai, D., Anupriya, S., Shenbhagaraman, R., Kaleena, P. K., & Murugesan, K. (2015). Phyto mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Andrographis echinoides* and its bio-efficacy on anticancer and antibacterial activities. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 151, 118-124.
- El-Baghdady, K. Z., El-Shatoury, E. H., Abdullah, O. M. ve Khalil, M. M. H. 2018. Biogenic production of silver nanoparticles by *Enterobacter cloacae* Ism26. *Turkish journal of biology = Turk biyoloji dergisi*, 42(4), 319–321.
- El-Batal, A. I., Hashem, A. A. M., & Abdelbaky, N. M. (2013). Gamma radiation mediated green synthesis of gold nanoparticles using fermented soybean-garlic aqueous extract and their antimicrobial activity. *SpringerPlus*, 2(1), 129.

- Elbeshehy, E. K., Elazzazy, A. M. ve Aggelis, G. 2015. Silver nanoparticles synthesis mediated by new isolates of *Bacillus* spp., nanoparticle characterization and their activity against Bean Yellow Mosaic Virus and human pathogens. *Frontiers in microbiology*, 6, 453.
- El-Fadly, E. B., Salah, A. S., Abdella, B., Al Ali, A., AlShmrany, H., ElBaz, A. M., ... & El-Kemary, M. A. (2024). Mapping a sustainable approach: biosynthesis of lactobacilli-silver nanocomposites using whey-based medium for antimicrobial and bioactivity applications. *Microbial Cell Factories*, 23(1), 195.
- El-Naggar, N. E., Hassan, M. A., El-Salam, S. S., & Fouda, A. (2022). *Green biosynthesis of silver nanoparticles and their anticancer potential*. *Scientific Reports*, 12, 1–14.
- El-Saadony, M. T., El-Wafai, N. A., Abd El-Fattah, H. I., & Mahgoub, S. A. (2018). Biosynthesis, optimization and characterization of silver nanoparticles biosynthesized by *Bacillus subtilis* ssp *spizizenii* MT5 isolated from heavy metals polluted soil. *Zagazig Journal of Agricultural Research*, 45(6), 2439-2454.
- El-Saadony, M. T., El-Wafai, N. A., El-Fattah, H. I. A., & Mahgoub, S. A. (2019). Biosynthesis, optimization and characterization of silver nanoparticles using a soil isolate of *Bacillus pseudomycoloides* MT32 and their antifungal activity against some pathogenic fungi. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 7(4), 238-249.
- El-Seedi, H. R., El-Shabasy, R. M., Khalifa, S. A. M., Saeed, A., Shah, A., Shah, R., Iftikhar, F. J., Abdel-Daim, M. M., Omri, A., Hajrahand, N. H., Sabir, J. S. M., Zou, X., Halabi, M. F., Sarhan, W., & Guo, W. (2019). Metal nanoparticles fabricated by green chemistry using natural extracts: Biosynthesis, mechanisms, and applications. In *RSC Advances* (Vol. 9, Issue 42, pp. 24539–24559). Royal Society of Chemistry.
- El-Shanshoury, A. E.-R. R., ElSilk, S. E., & Ebeid, M. E. (2011). Extracellular Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Escherichia coli* ATCC 8739, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, and *Streptococcus thermophilus* ESh1 and Their Antimicrobial Activities . *ISRN Nanotechnology*, 2011, 1–7.
- Elumalai, E. K., Prasad, T. N. V. K. V., Hemachandran, J., Therasa, S. V., Thirumalai, T., & David, E. J. (2010). Extracellular synthesis of silver nanoparticles using leaves of *Euphorbia hirta* and their antibacterial activities. *J Pharm Sci Res*, 2(9), 549-554.
- Eming, S. A., Krieg, T., & Davidson, J. M. (2007). Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(3), 514-525.
- Erjaee, H., Rajaian, H., & Nazifi, S. (2017). Synthesis and characterization of novel silver nanoparticles using *Chamaemelum nobile* extract for antibacterial application. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 8(2), 025004.
- Fahim, M., Shahzaib, A., Nishat, N., Jahan, A., Bhat, T. A., & Inam, A. (2024). Green synthesis of silver nanoparticles: A comprehensive review of methods, influencing factors, and applications. *JCIS Open*, 16, 100125.

- Fayaz, A. M., Girilal, M., Rahman, M., Venkatesan, R., & Kalaichelvan, P. T. (2011). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using thermophilic bacterium *Geobacillus stearothermophilus*. *Process Biochemistry*, 46(10), 1958–1962.
- Fei, X., Jia, M., Du, X., Yang, Y., Zhang, R., Shao, Z., Zhao, X., & Chen, X. (2013). Green synthesis of silk fibroin-silver nanoparticle composites with effective antibacterial and biofilm-disrupting properties. *Biomacromolecules*, 14(12), 4483–4488.
- Fesharaki, P. J., Nazari, P., Shakibaie, M., Rezaie, S., Banoee, ; Maryam, Abdollahi, M., Ahmad, ;, & Shahverdi, R. (2010). Biosynthesis of Selenium Nanoparticles Using *Klebsiella Pneumoniae* and Their Recovery by a Simple Sterilization Process. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 461–466.
- Firdhouse, M. J., & Lalitha, P. (2015). *Biosynthesis of silver nanoparticles and its applications*. *Journal of Nanotechnology*, 2015, Article ID 829526.
- Fouda, M. M., Abdelsalam, N. R., El-Naggar, M. E., Zaitoun, A. F., Salim, B. M., Bin-Jumah, M., Allam, A. A., Abo-Marzoka, S. A. ve Kandil, E. E. 2020. Impact of high throughput green synthesized silver nanoparticles on agronomic traits of onion. *International journal of biological macromolecules*, 149, 1304-1317.
- Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Sierra-Rivera, C. A., Gómez-Flores, R. A., Zapata-Benavides, P., Castillo-Tello, P., ... & Rodríguez-Padilla, C. (2010). Antitumor activity of colloidal silver on MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 29(1), 1-7.
- Fronza, M., Heinzmann, B., Hamburger, M., Laufer, S., & Merfort, I. 2009. Determination of the wound healing effect of *Calendula* extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*, 126(3), 463–467.
- Gade, A., Gaikwad, S., Tiwari, V., Yadav, A., Ingle, A., & Rai, M. (2010). Biofabrication of silver nanoparticles by *Opuntia ficus-indica*: in vitro antibacterial activity and study of the mechanism involved in the synthesis. *Current Nanoscience*, 6(4), 370-375.
- Gahlawat, G., Shikha, S., Chaddha, B. S., Chaudhuri, S. R., Mayilraj, S., & Choudhury, A. R. (2016). Microbial glycolipoprotein-capped silver nanoparticles as emerging antibacterial agents against cholera. *Microbial Cell Factories*, 15(1).
- Gaidhani, S., Singh, R., Singh, D., Patel, U., Shevade, K., Yeshvekar, R., & Ananda Chopade, B. (2013). Biofilm disruption activity of silver nanoparticles synthesized by *Acinetobacter calcoaceticus* PUCM 1005. *Materials Letters*, 108, 324–327.
- Gaikwad, S., Ingle, A., Gade, A., Rai, M., Falanga, A., Incoronato, N., Russo, L., Galdiero, S., & Galdiero, M. (2013). Anti-viral activity of mycosynthesized silver nanoparticles against herpes simplex virus and human parainfluenza virus type 3. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 4303–4314.
- Gajbhiye, M., Kesharwani, J., Ingle, A., Gade, A., & Rai, M. (2009). Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in

- combination with fluconazole. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 5(4), 382-386.
- Gan, J., Liu, C., Li, H., Wang, S., Wang, Z., Kang, Z., ... & Dong, L., Accelerated wound healing in diabetes by reprogramming the macrophages with particle-induced clustering of the mannose receptors, *Biomaterials*, 219 (2019) 119340.
- Gao, X., Wei, L., Yan, H., & Xu, B. (2011). Green synthesis and characteristic of core-shell structure silver/starch nanoparticles. *Materials Letters*, 65(19–20), 2963–2965.
- Garcia-Hernandez, C., Freese, A. K., Rodriguez-Mendez, M. L., & Wanekaya, A. K. (2019). In situ synthesis, stabilization and activity of protein-modified gold nanoparticles for biological applications. *Biomaterials Science*, 7(6), 2511–2519.
- Garg, D., Sarkar, A., Chand, P., Bansal, P., Gola, D., Sharma, S., Khantwal, S., Surabhi, Mehrotra, R., Chauhan, N. ve Bharti R. K. 2020. Synthesis of silver nanoparticles utilizing various biological systems: mechanisms and applications—a review. *Prog Biomater*, 9, 81–95.
- Garibo D, Borbón-Núñez HA, de León JND, García Mendoza E, Estrada I, Toledano-Magaña Y, Tiznado H, Ovalle-Marroquin M, Soto-Ramos AG, Blanco A, Rodríguez JA, Romo OA, Chávez-Almazán LA, Susarrey-Arce A (2020) Green synthesis of silver nanoparticles using *Lysiloma acapulcensis* exhibit high-antimicrobial activity. *Scientific Reports*, 10(1), 1–11.
- Ge, L., Li, Q., Wang, M., Ouyang, J., Li, X., & Xing, M. M. Q. (2014). Nanosilver particles in medical applications: Synthesis, performance, and toxicity. In *International Journal of Nanomedicine* (Vol. 9, Issue 1, pp. 2399–2407). Dove Medical Press Ltd.
- Geethalakshmi, R., & Sarada, D. V. L. (2013). Characterization and antimicrobial activity of gold and silver nanoparticles synthesized using saponin isolated from *Trianthema decandra* L. *Industrial Crops and Products*, 51, 107–115.
- Gehrke, A.-K. E., Giaí, C. ve Gómez, M. I. 2023. Staphylococcus aureus Adaptation to the Skin in Health and Persistent/Recurrent Infections. *Antibiotics*, 12(10), 1520.
- Ghasemi, S. M., Dormanesh, B., Hosseini Abari, A., Aliasghari, A., & Farahnejad, Z. (2018). Comparative characterization of silver nanoparticles synthesized by spore extract of *Bacillus subtilis* and *Geobacillus stearothermophilus*. *Nanomedicine Journal*, 5(1), 46–51.
- Ghasemzadeh, G., Momenpour, M., Omid, F., Hosseini, M. R., Ahani, M., & Barzegari, A. (2014). Applications of nanomaterials in water treatment and environmental remediation. In *Frontiers of Environmental Science and Engineering* (Vol. 8, Issue 4, pp. 471–482). Higher Education Press.
- Ghorbani, H. R., Safekordi, A. A., Attar, H., & Sorkhabadi, S. M. (2011). Biological and non-biological methods for silver nanoparticles synthesis. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 25(3), 317-326.

- Ghramh, H. A., Khan, K. A., & Ansari, M. (2019). *Antioxidant and anticancer activities of silver nanoparticles synthesized using plant extracts*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(6), 1189–1198.
- Giri, V. P., Pandey, S., Kumari, M., Paswan, S. K., Tripathi, A., Srivastava, M., Rao, C. V., Katiyar, R., Nautiyal, C. S., & Mishra, A. (2019). Biogenic silver nanoparticles as a more efficient contrivance for wound healing acceleration than common antiseptic medicine. *FEMS Microbiology Letters*, 366(16), 1–10.
- Gliga, A. R., Skoglund, S., Odnevall Wallinder, I., Fadeel, B., & Karlsson, H. L. (2014). Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Particle and fibre toxicology*, 11(1), 1-17.
- Golińska, P., Wypij, M., Rathod, D., Tikar, S., Dahm, H., & Rai, M. (2016). Synthesis of silver nanoparticles from two acidophilic strains of *Pilimelia columellifera* subsp. *pallida* and their antibacterial activities. *Journal of Basic Microbiology*, 56(5), 541–556.
- Gonca, S. (2021). Green synthesis of silver, zinc, and cerium nanoparticles using thermophilic anoxybacillus SP. ST7 strain and investigation of their various biological activities. *Journal of Scientific Reports-A*, (047), 246-268.
- Gong, P., Li, H., He, X., Wang, K., Hu, J., Tan, W., ... & Yang, X. (2007). Preparation and antibacterial activity of Fe₃O₄@ Ag nanoparticles. *Nanotechnology*, 18(28), 285604.
- Gonzalez, A. C. D. O., Andrade, Z. D. A., Costa, T. F., & Medrado, A. R. A. P. 2016. Wound healing - A literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 91(5), 614–620.
- Gopinathan, P., Ashok, A. M., & Selvakumar, R. (2013). Bacterial flagella as biotemplate for the synthesis of silver nanoparticle impregnated bionanomaterial. *Applied Surface Science*, 276, 717–722.
- Gopinath, V., & Velusamy, P. (2013). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Bacillus* sp. GP-23 and evaluation of their anti-fungal activity towards *Fusarium oxysporum*. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 106, 170–174.
- Gour, A., & Jain, N. K. (2019). Advances in green synthesis of nanoparticles. In *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* (Vol. 47, Issue 1, pp. 844–851). Taylor and Francis Ltd.
- Goutam, S.P., Saxena, G., Roy, D., Yadav, A.K., Bharagava, R.N. 2020. Green Synthesis of Nanoparticles and Their Applications in Water and Wastewater Treatment. In: Saxena, G., Bharagava, R. (eds) *Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety*. Springer, Singapore.
- Govindaraju, K., Basha, S. K., Kumar, V. G., & Singaravelu, G. (2008). Silver, gold and bimetallic nanoparticles production using single-cell protein (*Spirulina platensis*) Geitler. *Journal of Materials Science*, 43(15), 5115–5122.
- Govindaraju, K., Kiruthiga, V., Kumar, V. G., & Singaravelu, G. (2009). Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a marine alga, *Sargassum wightii* Grevilli

- and their antibacterial effects. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9(9), 5497-5501.
- Guinebretière, M. H., Broussolle, V., & Nguyen-The, C. 2002. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *Journal of clinical microbiology*, 40(8), 3053-3056.
- Gunashova, G. Y. (2022). Synthesis of silver nanoparticles using a thermophilic bacterium strain isolated from the spring Yukhari istisu of the Kalbajar region (Azerbaijan). *Advances in Biology and Earth Sciences*, 7(3), 198-204.
- Gunashova, G. Y., Ahmadova, F. R., & Khalilov, R. I. (2021). Biosynthesis of silver nanoparticles using thermophilic *Bacillus* Sp. B1. *Advances in Biology & Earth Sciences*, 6(2), 142-145.
- Guo, D., Dou, D., Ge, L., Huang, Z., Wang, L., & Gu, N. (2015). A caffeic acid mediated facile synthesis of silver nanoparticles with powerful anti-cancer activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 134, 229-234.
- Gupta, A., Briffa, S. M., Swingler, S., Gibson, H., Kannappan, V., Adamus, G., Kowalczyk, M., Martin, C., & Radecka, I. (2020). Synthesis of Silver Nanoparticles Using Curcumin-Cyclodextrins Loaded into Bacterial Cellulose-Based Hydrogels for Wound Dressing Applications. *Biomacromolecules*, 21(5), 1802–1811.
- Gurunathan, S. (2015). Biologically synthesized silver nanoparticles enhances antibiotic activity against Gram-negative bacteria. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 29, 217–226.
- Gurunathan, S., Han, J. W., Dayem, A. A., Eppakayala, V., Park, J. H., Cho, S. G., ... & Kim, J. H. (2013). Green synthesis of anisotropic silver nanoparticles and its potential cytotoxicity in human breast cancer cells (MCF-7). *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 19(5), 1600-1605.
- Gurunathan, S., Han, J. W., Dayem, A. A., Eppakayala, V., Park, M. R., & Kim, J. H. (2009). Rapid synthesis of silver nanoparticles by a *Bacillus* sp. and their antimicrobial potential. *Nanoscale Research Letters*, 4(9), 854–860.
- Gurunathan, S., Han, J. W., Eppakayala, V., Jeyaraj, M., & Kim, J. H. (2013). Cytotoxicity of biologically synthesized silver nanoparticles in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *BioMed research international*, 2013.
- Gurunathan, S., Han, J. W., Kwon, D. N., & Kim, J. H. (2014). Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Nanoscale Research Letters*, 9(1), 1–17.
- Gurunathan, S., Jeong, J. K., Han, J. W., Zhang, X. F., Park, J. H., & Kim, J. H. (2015). Multidimensional effects of biologically synthesized silver nanoparticles in *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and human lung (L132) and lung carcinoma A549 cells. *Nanoscale research letters*, 10(1), 1-17.
- Gurunathan, S., Kalishwaralal, K., Vaidyanathan, R., Venkataraman, D., Pandian, S. R. K., Muniyandi, J., Hariharan, N., & Eom, S. H. (2009). Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74(1), 328–335.

- Gurunathan, S. (2019). Rapid biological synthesis of silver nanoparticles and their enhanced antibacterial effects against *Escherichia fergusonii* and *Streptococcus mutans*. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(2), 168-180.
- Hao, J., Liu, X., & Du, Y. (2025). Fabrication of gelatine/fucoidan nanogel-coated silver nanoparticles for the treatment of wound healing therapy and nursing care. *Regenerative Therapy*, 29, 282-291.
- Harisha, K. S., Shilpa, M., Asha, S., Parushuram, N., Ranjana, R., Narayana, B., & Sangappa, Y. (2019). Synthesis of silver nanoparticles using *Bombyx mori* silk fibroin and antibacterial activity. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 577(1).
- He, Y., Wei, F., Ma, Z., & Zhang, H. (2020). Comparative antibacterial activity of biogenic and chemical silver nanoparticles. *Materials Science & Engineering C*, 109, 110550.
- Hidouri, M., Dorozhkin, S. V., & Albeladi, N. (2019). Thermal Behavior, Sintering and Mechanical Characterization of Multiple Ion-Substituted Hydroxyapatite Bioceramics. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 29(1), 87–100.
- Hosseini-Abari, A., Emtiazi, G., & Ghasemi, S. M. (2013). Development of an eco-friendly approach for biogenesis of silver nanoparticles using spores of *Bacillus athrophaeus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(12), 2359–2364.
- Hosseini, H., Zirakjou, A., Goodarzi, V., Mousavi, S. M., Khonakdar, H. A., & Zamanlui, S. (2020). Lightweight aerogels based on bacterial cellulose/silver nanoparticles/polyaniline with tuning morphology of polyaniline and application in soft tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 152, 57–67.
- Hu, D., Gu, X., Si, W., Qin, W., Jiao, J., & Hao, Y. F. (2019). Biosynthesis of Silver nanoparticles using *Bauhinia acuminata* flower extract and their effect to promote osteogenesis of MSCs and improve meniscus injury healing. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 197(June), 111536.
- Huang, J., Zhan, G., Zheng, B., Sun, D., Lu, F., Lin, Y., Chen, H., Zheng, Z., Zheng, Y., & Li, Q. (2011). Biogenic silver nanoparticles by *Cacumen Platycladi* extract: Synthesis, formation mechanism, and antibacterial activity. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 50(15), 9095–9106.
- Huang, Y., Li, X., Liao, Z., Zhang, G., Liu, Q., Tang, J., Peng, Y., Liu, X., & Luo, Q. (2007). A randomized comparative trial between Acticoat and SD-Ag in the treatment of residual burn wounds, including safety analysis. *Burns*, 33(2), 161–166.
- Husain, S., Nandi, A., Simnani, F. Z., Saha, U., Ghosh, A., Sinha, A., Sahay, A., Samal, S. K., Panda, P. K., & Verma, S. K. (2023). Emerging Trends in Advanced Translational Applications of Silver Nanoparticles: A Progressing Dawn of Nanotechnology. *Journal of Functional Biomaterials*, 14(1), 47. <https://doi.org/10.3390/jfb14010047>

- Hussain, M. A., Shah, A., Jantan, I., Shah, M. R., Tahir, M. N., Ahmad, R., & Bukhari, S. N. A. (2015). Hydroxypropylcellulose as a novel green reservoir for the synthesis, stabilization, and storage of silver nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 2079–2088.
- Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S. v., & Zolfaghari, B. (2014). Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. In *Research in Pharmaceutical Sciences* (Vol. 9, Issue 6).
- Iravani, S., & Zolfaghari, B. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles using Pinus eldarica bark extract. *BioMed Research International*, 2013.
- Jacob, S. J. P., Finub, J. S., & Narayanan, A. (2012). Synthesis of silver nanoparticles using Piper longum leaf extracts and its cytotoxic activity against Hep-2 cell line. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 91, 212-214.
- Jadoun, S., Chauhan, N.P.S., Zarrintaj, P., Barani, M., Varma, R.S., Chinnam, S. ve Rahdar, A. 2022. Synthesis of nanoparticles using microorganisms and their applications: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 20, 3153–3197.
- Jahan, I., Matpan Bekler, F., Tunç, A. ve Güven, K. 2024. The Effects of Silver Nanoparticles (AgNPs) on Thermophilic Bacteria: Antibacterial, Morphological, Physiological and Biochemical Investigations. *Microorganisms*, 12(2), 402.
- Jain, D., Kumar Daima, H., Kachhwaha, S., & Kothari, S. L. (2009). Synthesis Of Plant-Mediated Silver Nanoparticles Using Papaya Fruit Extract And Evaluation Of Their Anti Microbial Activities. In *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* (Vol. 4, Issue 3).
- Jamaledin, R., Di Natale, C., Onesto, V., Taraghdari, Z. B., Zare, E. N., Makvandi, P., Vecchione, R., & Netti, P. A. (2020). Progress in microneedle-mediated protein delivery. *Journal of Clinical Medicine*, 9(2).
- Jamaledin, R., Yiu, C. K. Y., Zare, E. N., Niu, L. N., Vecchione, R., Chen, G., Gu, Z., Tay, F. R., & Makvandi, P. (2020). Advances in Antimicrobial Microneedle Patches for Combating Infections. *Advanced Materials*, 32(33), 1–29.
- Javaid, A., Oloketuyi, S. F., Khan, M. M., & Khan, F. (2018). Diversity of Bacterial Synthesis of Silver Nanoparticles. In *BioNanoScience* (Vol. 8, Issue 1, pp. 43–59). Springer New York LLC.
- Jayaprakash, N., Suresh, R., Rajalakshmi, S., Raja, S., & Sundaravadivel, E. (2019). *An assortment of synthesis methods of silver nanoparticles: A review*. *Asian Journal of Chemistry*, 31(7), 1359-1368.
- Jeyaraj, M., Rajesh, M., Arun, R., MubarakAli, D., Sathishkumar, G., Sivanandhan, G., ... & Ganapathi, A. (2013). An investigation on the cytotoxicity and caspase-mediated apoptotic effect of biologically synthesized silver nanoparticles using Podophyllum hexandrum on human cervical carcinoma cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 708-717.
- Jeyaraj, M., Sathishkumar, G., Sivanandhan, G., MubarakAli, D., Rajesh, M., Arun, R., ... & Ganapathi, A. (2013). Biogenic silver nanoparticles for cancer treatment: an experimental report. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 106, 86-92.

- Jo, Y. K., Kim, B. H., & Jung, G. (2009). Anti-fungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. *Plant disease*, 93(10), 1037-1043.
- Joudeh, N., & Linke, D. (2022). *Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists*. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(262).
- Juibari, M. M., Abbasalizadeh, S., Jouzani, G. S., & Noruzi, M. (2011). Intensified biosynthesis of silver nanoparticles using a native extremophilic *Ureibacillus thermosphaericus* strain. *Materials Letters*, 65(6), 1014–1017.
- Kaabipour, S., & Hemmati, S. (2021). *A review on the green and sustainable synthesis of silver nanoparticles and one-dimensional silver nanostructures*. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 12, 102–136.
- Kalashnikova, I., Das, S., & Seal, S. (2015). Nanomaterials for wound healing: scope and advancement. *Nanomedicine*, 10(16), 2593-2612.
- Kalimuthu, K., Suresh Babu, R., Venkataraman, D., Bilal, M., & Gurunathan, S. (2008). Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65(1), 150–153.
- Kalishwaralal, K., Deepak, V., Ram Kumar Pandian, S. B., Kottaisamy, M., BarathManiKanth, S., Kartikeyan, B., & Gurunathan, S. (2010). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Brevibacterium casei*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 77(2), 257–262.
- Kalpana, D., & Lee, Y. S. (2013). Synthesis and characterization of bactericidal silver nanoparticles using cultural filtrate of simulated microgravity grown *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 52(3), 151–156.
- Kamareddine, L. (2012). The biological control of the malaria vector. *Toxins*, 4(9), 748-767.
- Kanmani, P., & Lim, S. T. (2013). Synthesis and structural characterization of silver nanoparticles using bacterial exopolysaccharide and its antimicrobial activity against food and multidrug resistant pathogens. *Process Biochemistry*, 48(7), 1099–1106.
- Kannan, N., Mukunthan, K. S., & Balaji, S. (2011). A comparative study of morphology, reactivity and stability of synthesized silver nanoparticles using *Bacillus subtilis* and *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86(2), 378–383.
- Kaplan, A., Akalin Ciftci, G., & Kutlu, H. M. (2016). Cytotoxic, anti-proliferative and apoptotic effects of silver nitrate against H-ras transformed 5RP7. *Cytotechnology*, 68(5), 1727-1735.
- Karaca, B. 2018. Farklı çevresel koşulların süt ürünleri endüstrisinde sorun teşkil eden *geobacillus* ve *anoxybacillus* biyofilmleri üzerine olan etkilerinin ve biyogiderim mekanizmalarının belirlenmesi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Karakeçili, A., Topuz, B., Ersoy, F. Ş., Şahin, T., Günyaktı, A., & Demirtaş, T. T. 2022. UiO-66 metal-organic framework as a double actor in chitosan scaffolds:

- Antibiotic carrier and osteogenesis promoter. *Biomaterials Advances*, 136, 212757.
- Karthik, C., & Radha, K. V. (2012). Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Enterobacter aerogenes*: a kinetic approach. *Dig J Nanomater Biostruct*, 7(3), 1007-1014.
- Karthik, R., Rajeshkumar, S., & Malarkodi, C. (2022). Microbial synthesis of silver nanoparticles and their biomedical applications: A review. *Journal of Nanomaterials*, 2022, Article ID 6789321.
- Kathiresan, K., Manivannan, S., Nabeel, M. A., & Dhivya, B. (2009). Studies on silver nanoparticles synthesized by a marine fungus, *Penicillium fellutanum* isolated from coastal mangrove sediment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 71(1), 133–137.
- Kato, Y., Yoshimura, E. ve Suzuki, M. 2019. Synthesis of gold nanoparticles by extracellular components of *Lactobacillus casei*. *Chemistry Select*, 4(24), 7331-7337.
- Kawasaki, M., & Nishimura, N. (2006). 1064-nm laser fragmentation of thin Au and Ag flakes in acetone for highly productive pathway to stable metal nanoparticles. *Applied Surface Science*, 253(4), 2208–2216.
- Kemp, M. M., Kumar, A., Mousa, S., Park, T. J., Ajayan, P., Kubotera, N., Mousa, S. A., & Linhardt, R. J. (2009). Synthesis of gold and silver nanoparticles stabilized with glycosaminoglycans having distinctive biological activities. *Biomacromolecules*, 10(3), 589–595.
- Kesharwani, J., Yoon, K. Y., Hwang, J., & Rai, M. (2009). Phytofabrication of silver nanoparticles by leaf extract of *Datura metel*: hypothetical mechanism involved in synthesis. *Journal of Bionanoscience*, 3(1), 39-44.
- Khaleghi, M., Khorrami, S., & Ravan, H. (2019). Identification of *Bacillus thuringiensis* bacterial strain isolated from the mine soil as a robust agent in the biosynthesis of silver nanoparticles with strong antibacterial and anti-biofilm activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, 101047.
- Khalifa, E., Abdel Rafea, M., Mustapha, N., Sultan, R., & Hafez, E. (2023). Silver nanoparticles synthesized by probiotic bacteria and antibacterial role in resistant bacteria. *AMB Express*, 13(1), 140.
- Khan, I., Saeed, K. ve Khan, I. 2020. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian journal of chemistry*, 12(7), 908-931.
- Khan, S. U., Saleh, T. A., Wahab, A., Khan, M. H. U., Khan, D., Khan, W. U., Rahim, A., Kamal, S., Khan, F. U., & Fahad, S. (2018). Nanosilver: New ageless and versatile biomedical therapeutic scaffold. In *International Journal of Nanomedicine* (Vol. 13, pp. 733–762). Dove Medical Press Ltd.
- Khan, Y., Sadia, H., Ali Shah, S. Z., et al. (2022). *Classification, synthetic, and characterization approaches to nanoparticles, and their applications in various fields of nanotechnology: A review*. *Catalysts*, 12(11), 1386.
- Khandel, P., Yadaw, R. K., Soni, D. K., Kanwar, L., & Shahi, S. K. (2018). Biogenesis of metal nanoparticles and their pharmacological applications: present status and

- application prospects. In *Journal of Nanostructure in Chemistry* (Vol. 8, Issue 3, pp. 217–254). Springer Medizin.
- Khandelwal, N., Kaur, G., Chaubey, K. K., Singh, P., Sharma, S., Tiwari, A., Singh, S. V., & Kumar, N. (2014). Silver nanoparticles impair Peste des petits ruminants virus replication. *Virus Research*, 190, 1–7.
- Khodashenas, B. ve Ghorbani, H. R. 2019. Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8), 1823-1838.
- Khorrami, S., Zarrabi, A., Khaleghi, M., Danaei, M., & Mozafari, M. R. (2018). Selective cytotoxicity of green synthesized silver nanoparticles against the MCF-7 tumor cell line and their enhanced antioxidant and antimicrobial properties. *International journal of nanomedicine*, 8013-8024.
- Khuda, F., Jamil, M., Khalil, A. A. K., Ullah, R., Ullah, N., Naureen, F., ... & Ahn, M. J. (2022). Assessment of antioxidant and cytotoxic potential of silver nanoparticles synthesized from root extract of *Reynoutria japonica* Houtt. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(12), 104327.
- Kılıç, T., Karaca, B., Özel, B.P., Özcan, B., Çökmüş C. ve Çöleri Cihan A. 2017. Biofilm characteristics and evaluation of the sanitation procedures of thermophilic *Aeribacillus pallidus* E334 biofilms. *Biofouling*, 33(4), 352-367.
- Kibeche, A., Dionne, A., Brion-Roby, R., Gagnon, C., & Gagnon, J. (2015). Simple and green technique for sequestration and concentration of silver nanoparticles by polysaccharides immobilized on glass beads in aqueous media. *Chemistry Central Journal*, 9(1).
- Kim, K. J., Sung, W. S., Moon, S. K., Choi, J. S., Kim, J. G., & Lee, D. G. (2008). Anti-fungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *Journal of microbiology and biotechnology*, 18(8), 1482-1484.
- Kim, S., Yoo, B. K., Chun, K., Kang, W., Choo, J., Gong, M. S., & Joo, S. W. (2005). Catalytic effect of laser ablated Ni nanoparticles in the oxidative addition reaction for a coupling reagent of benzylchloride and bromoacetonitrile. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 226(2), 231–234.
- Kiran, G. S., Sabu, A., & Selvin, J. (2010). Synthesis of silver nanoparticles by glycolipid biosurfactant produced from marine *Brevibacterium casei* MSA19. *Journal of Biotechnology*, 148(4), 221-225.
- Klaus, T., Joerger, R., Olsson, E. ve Granqvist, C.-G. 1999. Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), 13611–13614.
- Koh, T. J., & DiPietro, L. A. (2011). Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 13(July), 1–12.
- Konop, M., Damps, T., Misicka, A., & Rudnicka, L. (2016). Certain Aspects of Silver and Silver Nanoparticles in Wound Care: A Minireview. In *Journal of Nanomaterials* (Vol. 2016). Hindawi Limited.
- Korbekandi, H., Iravani, S., & Abbasi, S. (2012). Optimization of biological synthesis of silver nanoparticles using *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 87(7), 932–937.

- Krishnaraj, C., Jagan, E. G., Rajasekar, S., Selvakumar, P., Kalaichelvan, P. T., & Mohan, N. (2010). Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(1), 50–56.
- Krishnaraj, C., Ramachandran, R., Mohan, K., & Kalaichelvan, P. T. (2012). Optimization for rapid synthesis of silver nanoparticles and its effect on phytopathogenic fungi. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 93, 95–99.
- Krishnaraj, R. N., & Berchmans, S. (2013). In vitro antiplatelet activity of silver nanoparticles synthesized using the microorganism *Gluconobacter roseus*: An AFM-based study. *RSC Advances*, 3(23), 8953–8959.
- Kruis, F. E., Fissan, H., & Rellinghaus, B. (2000). Sintering and evaporation characteristics of gas-phase synthesis of size-selected PbS nanoparticles. In *Materials Science and Engineering*.
- Kulkarni, R. R., Shaiwale, N. S., Deobagkar, D. N., & Deobagkar, D. D. (2015). Synthesis and extracellular accumulation of silver nanoparticles by employing radiation-resistant *Deinococcus radiodurans*, their characterization, and determination of bioactivity. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 963–974.
- Kumar, B., Smita, K., Cumbal, L., & Debut, A. (2018). *Green synthesis of silver nanoparticles using Andean blackberry fruit extract*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2), 313–317.
- Kumar, C. G., & Mamidyala, S. K. (2011). Extracellular synthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84(2), 462–466.
- Kumar, C. G., Mamidyala, S. K., Das, B., Sridhar, B., Sarala Devi, G., & Karuna, M. S. L. (2010). Synthesis of biosurfactant-based silver nanoparticles with purified rhamnolipids isolated from *Pseudomonas aeruginosa* BS-161R. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(7), 1061–1068.
- Kumar, S. S. D., Rajendran, N. K., Houreld, N. N., & Abrahamse, H. (2018). Recent advances on silver nanoparticle and biopolymer-based biomaterials for wound healing applications. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 115, pp. 165–175). Elsevier B.V.
- Kumar, V., Parida, S. N., Dhar, S., Bisai, K., Sarkar, D. J., Panda, S. P., & Das, B. K. (2024). Biogenic synthesis of silver nanoparticle by *Cytobacillus firmus* isolated from the river sediment with potential antimicrobial properties against *Edwardsiella tarda*. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1416411.
- Kumar, V., Singh, S., & Srivastava, R. (2020). Scale-up strategies for microbial biosynthesis of nanoparticles: A review. *Biotechnology Reports*, 27, e00498.
- Kumari, R., Barsainya, M., & Singh, D. P. (2017). Biogenic synthesis of silver nanoparticle by using secondary metabolites from *Pseudomonas aeruginosa* DM1 and its anti-algal effect on *Chlorella vulgaris* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(5), 4645–4654.

- Kushwaha, A., Singh, V. K., Bhartariya, J., Singh, P., & Yasmeen, K. (2015). Isolation and identification of *E. coli* bacteria for the synthesis of silver nanoparticles: characterization of the particles and study of antibacterial activity. *Eur J Exp Biol*, 5(1), 65–70.
- Langer, V., Bhandari, P. S., Rajagopalan, S., & Mukherjee, M. K. 2015. Negative pressure wound therapy as an adjunct in healing of chronic wounds. *International Wound Journal*, 12(4), 436–442.
- Lara, H. H., Ayala-Núñez, N. V., Ixtapan-Turrent, L., & Rodríguez-Padilla, C. (2010). Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *Journal of nanobiotechnology*, 8(1), 1–10.
- Laudenslager, M. J., Schiffman, J. D., & Schauer, C. L. (2008). Carboxymethyl chitosan as a matrix material for platinum, gold, and silver nanoparticles. *Biomacromolecules*, 9(10), 2682–2685.
- Lavecchia, R., García-Martínez, J. B., Contreras-Ropero, J. E., Barajas-Solano, A. F., & Zuurro, A. (2024). Antibacterial and photocatalytic applications of silver nanoparticles synthesized from *Lactocaseibacillus rhamnosus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(21), 11809.
- Law, N., Ansari, S., Livens, F. R., Renshaw, J. C., & Lloyd, J. R. (2008). Formation of nanoscale elemental silver particles via enzymatic reduction by *Geobacter sulfurreducens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(22), 7090–7093.
- León, O., Soto, D., Antúnez, A., Fernández, R., González, J., Piña, C., Muñoz-Bonilla, A., & Fernandez-García, M. (2019). Hydrogels based on oxidized starches from different botanical sources for release of fertilizers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 813–822.
- Li, C., Zhang, Y., Wang, M., Zhang, Y., Chen, G., Li, L., Wu, D., & Wang, Q. (2014). In vivo real-time visualization of tissue blood flow and angiogenesis using Ag₂S quantum dots in the NIR-II window. *Biomaterials*, 35(1), 393–400.
- Li, J., Chen, X., & Zhao, Y. (2022). Impact of culture conditions on microbial nanoparticle synthesis and scale-up challenges. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1), 100.
- Li, S., Shen, Y., Xie, A., Yu, X., Qiu, L., Zhang, L., & Zhang, Q. (2007). Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annuum* L. extract. *Green Chemistry*, 9(8), 852–858.
- Li, W.-R., Xie, X.-B., Shi, Q.-S., Zeng, H.-Y., Ou-Yang, Y.-S., & Chen, Y.-B. (2010). Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), 1115–1122.
- Li, X., Wang, Y., Liu, Z., & Jiang, Z. (2021). pH-dependent synthesis of silver nanoparticles and their enhanced antibacterial activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 197, 111387.
- Li, X., Xu, H., Chen, Z.-S., & Chen, G. (2011). *Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications*. *Journal of Nanomaterials*, 2011, Article ID 270974.
- Liang, C. C., Park, A. Y., & Guan, J. L. 2007. In vitro scratch assay: A convenient and

- inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, 2(2), 329–333.
- Lim, J., You, M., Li, J., & Li, Z. (2017). Emerging bone tissue engineering via Polyhydroxyalkanoate (PHA)-based scaffolds. *Materials Science and Engineering C*, 79, 917–929.
- Lin, P. C., Lin, S., Wang, P. C., & Sridhar, R. 2014. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology Advances*, 32(4), 711–726.
- Lithi, I. J., Nakib, K. I. A., Chowdhury, A. M. S., & Hossain, M. S. (2025). A review on the green synthesis of metal (Ag, Cu, and Au) and metal oxide (ZnO, MgO, Co₃O₄, and TiO₂) nanoparticles using plant extracts for developing antimicrobial properties. *Nanoscale Advances*, 7(4), 2446–2473.
- Liu, M., Yu, T., Huang, R., Qi, W., He, Z., & Su, R. (2020). Fabrication of nanohybrids assisted by protein-based materials for catalytic applications. In *Catalysis Science and Technology* (Vol. 10, Issue 11, pp. 3515–3531). Royal Society of Chemistry.
- Liu, X., Lee, P. Y., Ho, C. M., Lui, V. C., Chen, Y., Che, C. M., ... & Wong, K. K. (2010). Silver nanoparticles mediate differential responses in keratinocytes and fibroblasts during skin wound healing. *ChemMedChem*, 5(3), 468–475.
- Liu, Y., Chen, S., Zhong, L., & Wu, G. (2009). Preparation of high-stable silver nanoparticle dispersion by using sodium alginate as a stabilizer under gamma radiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 78(4), 251–255.
- Loi, H. R., Abbasiliasi, S., Raja, P. B., Mohamed, M. S., Tan, W.-N., Su, H., & Lan, J. C.-W. (2023). Biosynthesis of silver nanoparticles using nitrate reductase produced by *Lactobacillus plantarum* CAM 4: Characterization and in vitro evaluation of its antimicrobial efficiency. *Journal of Molecular Liquids*, 376, 121476.
- Lozoya-Rodriguez, D. A., De Lima, R., Fraceto, L. F., Pérez, A. L., Domínguez, M. B., Batres, R. G., Rojas, A. R., & Carmona, V. O. (2017). Development of HA/Ag-NPs composite coating from green process for hip applications. *Molecules*, 22(8), 65–70.
- Lukman, A. I., Gong, B., Marjo, C. E., Roessner, U., & Harris, A. T. (2011). Facile synthesis, stabilization, and anti-bacterial performance of discrete Ag nanoparticles using *Medicago sativa* seed exudates. *Journal of Colloid and Interface Science*, 353(2), 433–444.
- Lyu, Y., Yu, M., Liu, Q., Zhang, Q., Liu, Z., Tian, Y., Li, D., & Changdao, M. (2020). Synthesis of silver nanoparticles using oxidized amylose and combination with curcumin for enhanced antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers*, 230.
- Mabey, T., Andrea Cristaldi, D., Oyston, P., Lymer, K.P., Stulz, E., Wilks, S., William Keevil, C. ve Zhang, X. 2019. Bacteria and nanosilver: the quest for optimal production. *Critical reviews in biotechnology*, 39(2), 272–287.
- Madani, M., & Tarakanova, A. (2020). Characterization of Mechanics and Tunability of Resilin Protein by Molecular Dynamics Simulation. *Biophysical Journal*, 118(3), 45a–46a.

- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. 2017. Brock biology of microorganisms (Vol. 14). ISBN 9780321928358. Upper Saddle River, NJ: Prentice hall.
- Madhumathi, K., Kumar, S., Abhilash, S., Sreeja, V., Tamura, H., Manzoor, K., ... & Jayakumar, R. (2010). Development of novel chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(2), 807-813
- Magnusson, M. H., Deppert, K., Malm, J.-O., Bovin, J.-O., & Samuelson, L. (1999). Gold nanoparticles: Production, reshaping, and thermal charging. In *Journal of Nanoparticle Research* (Vol. 1).
- Mahdieh, M., Zolanvari, A., Azimee, A. S., & Mahdieh, M. (2012). Green biosynthesis of silver nanoparticles by *Spirulina platensis*. *Scientia Iranica*, 19(3), 926–929.
- Mahmoud, W. M., Abdelmoneim, T. S., & Elazzazy, A. M. (2016). The impact of silver nanoparticles produced by *Bacillus pumilus* as antimicrobial and nematicide. *Frontiers in microbiology*, 7, 1746.
- Makvandi, P., Ali, G. W., Della Sala, F., Abdel-Fattah, W. I., & Borzacchiello, A. (2019). Biosynthesis and characterization of antibacterial thermosensitive hydrogels based on corn silk extract, hyaluronic acid and nanosilver for potential wound healing. *Carbohydrate Polymers*, 223(June), 115023.
- Makvandi, P., Ali, G. W., Della Sala, F., Abdel-Fattah, W. I., & Borzacchiello, A. (2020). Hyaluronic acid/corn silk extract based injectable nanocomposite: A biomimetic antibacterial scaffold for bone tissue regeneration. *Materials Science and Engineering C*, 107(June 2019), 110195.
- Makvandi, P., Esposito Corcione, C., Paladini, F., Gallo, A. L., Montagna, F., Jamaledin, R., Pollini, M., & Maffezzoli, A. (2018). Antimicrobial modified hydroxyapatite composite dental bite by stereolithography. *Polymers for Advanced Technologies*, 29(1), 364–371.
- Makvandi, P., Ghomi, M., Padil, V. V., Shalchy, F., Ashrafizadeh, M., Askarinejad, S., ... & Tay, F. R. (2020). Biofabricated nanostructures and their composites in regenerative medicine. *ACS Applied Nano Materials*, 3(7), 6210-6238.
- Makvandi, P., Gu, J. T., Zare, E. N., Ashtari, B., Moeini, A., Tay, F. R., & Niu, L. N. (2020). Polymeric and inorganic nanoscopical antimicrobial fillers in dentistry. *Acta biomaterialia*, 101, 69-101.
- Makvandi, P., Wang, C. yu, Zare, E. N., Borzacchiello, A., Niu, L. na, & Tay, F. R. (2020). Metal-Based Nanomaterials in Biomedical Applications: Antimicrobial Activity and Cytotoxicity Aspects. In *Advanced Functional Materials* (Vol. 30, Issue 22). Wiley-VCH Verlag.
- Malachová, K., Praus, P., Rybková, Z., & Kozák, O. (2011). Antibacterial and antifungal activities of silver, copper and zinc montmorillonites. *Applied Clay Science*, 53(4), 642-645.
- Mallikarjuna, K., Narasimha, G., Dillip, G. R., Praveen, B., Shreedhar, B., Lakshmi, C. S., Reddy, B. V. S., Deva, B., & Raju, P. (n.d.). Green Synthesis Of Silver

- Nanoparticles Using Ocimum Leaf Extract And Their Characterization. In *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* (Vol. 6, Issue 1).
- Manikandan, R., Anjali, R., Beulaja, M., Prabhu, N. M., Koodalingam, A., Saiprasad, G., Chitra, P., & Arumugam, M. (2019). Synthesis, characterization, anti-proliferative and wound healing activities of silver nanoparticles synthesized from *Caulerpa scalpelliformis*. *Process Biochemistry*, 79(September 2018), 135–141.
- Manikandan, R., Manikandan, B., Raman, T., Arunagirinathan, K., Prabhu, N. M., Basu, M. J., ... & Munusamy, A. (2015). Biosynthesis of silver nanoparticles using ethanolic petals extract of *Rosa indica* and characterization of its antibacterial, anticancer and anti-inflammatory activities. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 138, 120-129.
- Manikandan, V., Rajendran, R., & Balasubramanian, K. (2023). *Biogenic AgNPs and their selective cytotoxicity on cancer cells*. *Journal of Molecular Structure*, 1280, 135050.
- Manikprabhu, D., Cheng, J., Chen, W., Sunkara, A. K., Mane, S. B., Kumar, R., ... & Li, W. J. (2016). Sunlight mediated synthesis of silver nanoparticles by a novel actinobacterium (*Sinomonas mesophila* MPKL 26) and its antimicrobial activity against multi drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 158, 202-205.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Senthilkumar, K., Sivakumar, K., & Kim, S. K. (2013). Biosynthesis, antimicrobial and cytotoxic effect of silver nanoparticles using a novel *Nocardiosis* sp. MBRC-1. *BioMed Research International*, 2013.
- Manti, A., Boi, P., Falcioni, T., Canonico, B., Ventura, A., Sisti, D., Pianetti, A., Balsamo, M., & Papa, S. (2008). Bacterial Cell Monitoring in Wastewater Treatment Plants by Flow Cytometry. *Water Environment Research*, 80(4), 346–354.
- Marr, A. K., McGwire, B. S., & McMaster, W. R. (2012). Modes of action of Leishmanicidal antimicrobial peptides. *Future microbiology*, 7(9), 1047-1059.
- Martínez-Gutiérrez, F., Boegli, L., & Grande, R. (2021). Silver nanoparticles for biofilm control: mechanisms and efficacy. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 1233–1250.
- Mathur, P., Jha, S., Ramteke, S., & Jain, N. K. (2018). Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles. In *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* (Vol. 46, Issue sup1, pp. 115–126). Taylor and Francis Ltd.
- Merga, G., Wilson, R., Lynn, G., Milosavljevic, B. H., & Meisel, D. (2007). Redox catalysis on “naked” silver nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C*, 111(33), 12220–12226.
- Mijnendonckx, K., Leys, N., Mahillon, J., Silver, S., & Van Houdt, R. 2013. Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance. *Biometals*, 26(4), 609-621.
- Moeini, A., Pedram, P., Makvandi, P., Malinconico, M., & Gomez d’Ayala, G. (2020). Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: A review. *Carbohydrate Polymers*,

233(January), 115839.

- Mohammadlou, M., Maghsoudi, H., & Jafarizadeh-Malmiri, H. (2020). *A review on green-synthesized AgNPs and their antioxidant properties*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28, 101711.
- Mohammed Fayaz, A., Ao, Z., Girilal, M., Chen, L., Xiao, X., Kalaichelvan, P. T., & Yao, X. (2012). Inactivation of microbial infectiousness by silver nanoparticles-coated condom: A new approach to inhibit HIV- and HSV-transmitted infection. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5007–5018.
- Mohammed Fayaz, A., Girilal, M., Rahman, M., Venkatesan, R., & Kalaichelvan, P. T. (2011). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using thermophilic bacterium *Geobacillus stearothermophilus*. *Process Biochemistry*, 46(10), 1958–1962.
- Mohandes, Fatemeh, & Salavati-Niasari, M. (2014). Simple morphology-controlled fabrication of hydroxyapatite nanostructures with the aid of new organic modifiers. *Chemical Engineering Journal*, 252, 173–184.
- Mohanpuria, P., Rana, N. K., & Yadav, S. K. (2008). Biosynthesis of nanoparticles: Technological concepts and future applications. In *Journal of Nanoparticle Research* (Vol. 10, Issue 3, pp. 507–517).
- Mohanta, Y. K., & Behera, S. K. (2014). Biosynthesis, characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles by *Streptomyces* sp. SS2. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(11), 2263–2269.
- Mondal, A. H., Yadav, D., Ali, A., Khan, N., Jin, J. O., & Haq, Q. M. R. (2020). Antibacterial and anti-candidal activity of silver nanoparticles biosynthesized using *Citrobacter* spp. MS5 culture supernatant. *Biomolecules*, 10(6), 944.
- Monteiro, D. R., Silva, S., Negri, M., Gorup, L. F., de Camargo, E. R., Oliveira, R., Barbosa, D. B., & Henriques, M. (2012). Silver nanoparticles: Influence of stabilizing agent and diameter on anti-fungal activity against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Letters in Applied Microbiology*, 54(5), 383–391.
- Morin, C. D., Déziel, E., Gauthier, J., Levesque, R. C. ve Lau, G. W. 2021. An Organ System-Based Synopsis of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *Virulence*, 12(1), 1469–1507.
- Mormile MR, Biesen MA, Gutierrez MC, Ventosa A, Pavlovich JB, Onstott TC, Fredrickson JK (2003) Isolation of *Halobacterium salinarum* retrieved directly from halite brine inclusions, *Environmental Microbiology*, 5(11): 1094-1102
- Morsy, F. M., Nafady, N. A., Abd-Alla, M. H., & Elhady, D. A. (2014). Green Synthesis of Silver Nanoparticles by Water Soluble Fraction of the Extracellular Polysaccharides/Matrix of the Cyanobacterium *Nostoc Commune* and its Application as a Potent Fungal Surface Sterilizing Agent of Seed Crops. *Universal Journal of Microbiology Research*, 2(2), 36–43.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.

- Mouxing, F. U., Qingbiao, L. I., Daohua, S. U. N., Yinghua, L. U., Ning, H. E., Xu, D. E. N. G., ... & Huang, J. (2006). Rapid preparation process of silver nanoparticles by bioreduction and their characterizations. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 14(1), 114-117.
- Muhammad Tahir, H., Saleem, F., Ali, S., Ain, Q. ul, Fazal, A., Summer, M., Mushtaq, R., Tariq Zahid, M., Liaqat, I., & Murtaza, G. (2020). Synthesis of sericin-conjugated silver nanoparticles and their potential antimicrobial activity. *Journal of Basic Microbiology*, 60(5), 458–467.
- Mukherjee, P., Ahmad, A., Mandal, D., Senapati, S., Sainkar, S. R., Khan, M. I., ... & Sastry, M. (2001). *Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: A novel biological approach to nanoparticle synthesis*. *Nano Letters*, 1(10), 515–519.
- Muthulakshmi, K., & Uma, C. (2019). Antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* silver nanoparticles. *Frontiers in Bioscience-Elite*, 11(1), 89-101.
- Nadhman, A., Nazir, S., Khan, M. I., Arooj, S., Bakhtiar, M., Shahnaz, G., & Yasinza, M. (2014). PEGylated silver doped zinc oxide nanoparticles as novel photosensitizers for photodynamic therapy against *Leishmania*. *Free Radical Biology and Medicine*, 77, 230-238.
- Nadworny, P. L., Landry, B. K., Wang, J., Tredget, E. E., & Burrell, R. E. (2010). Does nanocrystalline silver have a transferable effect? *Wound repair and regeneration*, 18(2), 254-265.
- Nadworny, P. L., Wang, J. F., Tredget, E. E., & Burrell, R. E. (2008). Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver in a porcine contact dermatitis model. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 4(3), 241–251.
- Naik, M. M., Prabhu, M. S., Samant, S. N., Naik, P. M., & Shirodkar, S. (2017). Synergistic action of silver nanoparticles synthesized from silver resistant estuarine *Pseudomonas aeruginosa* strain SN5 with antibiotics against antibiotic resistant bacterial human pathogens. *Thalassas*, 33(1), 73–80.
- Najitha Banu, A., Balasubramanian, C., & Moorthi, P. V. (2014). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Bacillus thuringiensis* against dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 113(1), 311–316.
- Nanda, A., & Saravanan, M. (2009). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 5(4), 452–456.
- Namasivayam, S. K. R., Christo, B. B., Arasu, S. K., Kumar, K. A. M., & Deepak, K. (2013). Anti biofilm effect of biogenic silver nanoparticles coated medical devices against biofilm of clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Global Journal of Medical Research*, 13(3), 1-7.
- Nambiar, S., Osei, E., Fleck, A., Darko, J., Mutsaers, A. J., & Wettig, S. (2018). Synthesis of curcumin-functionalized gold nanoparticles and cytotoxicity studies in human prostate cancer cell line. *Applied Nanoscience (Switzerland)*, 8(3), 347–357.
- Narayanan, K. B., & Sakthivel, N. (2011). Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic

- eukaryotes and biocompatible agents. *Advances in Colloid and Interface Science*, 169(2), 59–79.
- Naseer, M., Aslam, U., Khalid, B., & Chen, B. (2020). *Green route synthesis of silver nanoparticles and their biological applications*. *Materials Science & Engineering C*, 112, 110901.
- Nasrollahzadeh, M., Atarod, M., Sajjadi, M., Sajadi, S. M., & Issaabadi, Z. (2019). Plant-mediated green synthesis of nanostructures: mechanisms, characterization, and applications. In *Interface science and technology* (Vol. 28, pp. 199–322). Elsevier.
- Nkosi, N. C., Basson, A. K., Ntombela, Z. G., Dlamini, N. G., & Pullabhotla, R. V. (2024). Green synthesis, characterization and application of silver nanoparticles using bioflocculant: A review. *Bioengineering*, 11(5), 492.
- Nowack, B., Krug, H. F., & Height, M. (2011). *120 years of nanosilver history: Implications for policy makers*. *Environmental Science & Technology*, 45(4), 1177–1183.
- Nqakala, Z. B., Sibuyi, N. R., Fadaka, A. O., Meyer, M., Onani, M. O., & Madiehe, A. M. (2021). Advances in nanotechnology towards development of silver nanoparticle-based wound-healing agents. *International journal of molecular sciences*, 22(20), 11272.
- Ogar, A., Tylko, G., & Turnau, K. (2015). Anti-fungal properties of silver nanoparticles against indoor mould growth. *Science of the Total Environment*, 521–522, 305–314.
- Okka, E. Z., Tongur, T., Aytas, T. T., Yilmaz, M., Topel, Ö., & Sahin, R. (2023). Green Synthesis and the formation kinetics of silver nanoparticles in aqueous *Inula Viscosa* extract. *Optik*, 294, 171487.
- Orlowski, P., Tomaszewska, E., Gniadek, M., Baska, P., Nowakowska, J., Sokolowska, J., Nowak, Z., Donten, M., Celichowski, G., Grobelny, J., & Krzyzowska, M. (2014). Tannic acid modified silver nanoparticles show anti-viral activity in herpes simplex virus type 2 infection. *PLoS ONE*, 9(8).
- Otaqsara, S. T. (2011). Biosynthesis of quasi-spherical Ag nanoparticle by *Pseudomonas aeruginosa* as a bioreducing agent. *The European Physical Journal-Applied Physics*, 56(3).
- Otari, S. v., Patil, R. M., Ghosh, S. J., Thorat, N. D., & Pawar, S. H. (2015). Intracellular synthesis of silver nanoparticle by actinobacteria and its antimicrobial activity. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136(PB), 1175–1180.
- Otoni, C. A., Simões, M. F., Fernandes, S., Dos Santos, J. G., Da Silva, E. S., de Souza, R. F. B., & Maiorano, A. E. (2017). Screening of filamentous fungi for antimicrobial silver nanoparticles synthesis. *AMB Express*, 7, 1–10.
- Ouoba, L. I. I., Thorsen, L., & Varnam, A. H. 2008. Enterotoxins and emetic toxins production by *Bacillus cereus* and other species of *Bacillus* isolated from Soumbala and Bikalga, African alkaline fermented food condiments. *International journal of food microbiology*, 124(3), 224–230.

- Oves, M., Khan, M. S., Zaidi, A., Ahmed, A. S., Ahmed, F., Ahmad, E., Sherwani, A., Owais, M., & Azam, A. (2013). Antibacterial and Cytotoxic Efficacy of Extracellular Silver Nanoparticles Biofabricated from Chromium Reducing Novel OS4 Strain of *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS ONE*, 8(3).
- Pandurangan, M., Enkhtaivan, G., Venkitasamy, B., Mistry, B., Noorzai, R., Jin, B. Y., & Kim, D. H. (2016). Time and concentration-dependent therapeutic potential of silver nanoparticles in cervical carcinoma cells. *Biological trace element research*, 170(2), 309–319.
- Pantidos, N. (2014). Biological Synthesis of Metallic Nanoparticles by Bacteria, Fungi and Plants. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 05(05).
- Parikh, R. Y., Kothari, V. M., Kulkarni, R. M., & Ahmad, A. (2008). Biogenic synthesis of silver nanoparticles using *Bacillus* species. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(6), 1183–1188.
- Parikh, R. Y., Ramanathan, R., Coloe, P. J., Bhargava, S. K., Patole, M. S., Shouche, Y. S., & Bansal, V. (2011). Genus-wide physicochemical evidence of extracellular crystalline silver nanoparticles biosynthesis by *Morganella* spp. *PLoS ONE*, 6(6).
- Parikh, R. Y., Singh, S., Prasad, B. L. V., Patole, M. S., Sastry, M., & Schouche, Y. S. (2008). Extracellular synthesis of crystalline silver nanoparticles and molecular evidence of silver resistance from *Morganella* sp.: Towards understanding biochemical synthesis mechanism. *ChemBioChem*, 9(9), 1415–1422.
- Park, Y. (2014). A new paradigm shift for the green synthesis of antibacterial silver nanoparticles utilizing plant extracts. *Toxicological Research*, 30(3), 169–178.
- Patel, R. R., Singh, S. K., & Singh, M. (2023). Green synthesis of silver nanoparticles: methods, biological applications, delivery and toxicity. *Materials Advances*, 4(8), 1831–1849.
- Paulkumar, K., Rajeshkumar, S., Gnanajobitha, G., Vanaja, M., Malarkodi, C., & Annadurai, G. (2013). Biosynthesis of Silver Chloride Nanoparticles Using *Bacillus subtilis* MTCC 3053 and Assessment of Its Anti-fungal Activity. *ISRN Nanomaterials*, 2013, 1–8.
- Peiris, M. M. K., Fernando, S. S. N., Jayaweera, P. M., Arachchi, N. D. H. & Guansekara, T. D. C. P. 2018. Comparison of Antimicrobial Properties of Silver Nanoparticles Synthesized from Selected Bacteria. *Indian journal of microbiology*, 58(3), 301–311.
- Piao, M. J., Kang, K. A., Lee, I. K., Kim, H. S., Kim, S., Choi, J. Y., Choi, J., & Hyun, J. W. (2011). Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology Letters*, 201(1), 92–100.
- Pourali, P., & Yahyaei, B. (2016). Biological production of silver nanoparticles by soil isolated bacteria and preliminary study of their cytotoxicity and cutaneous wound healing efficiency in rat. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 34, 22–31.
- Pourali, P., Baserisalehi, M., Afsharnezhad, S., Behravan, J., Alavi, H., & Hosseini, B. B. A. (2012). Biological synthesis of silver and gold nanoparticles by bacteria in

- different temperatures (37 °C and 50 °C). *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 6(2), 757-763.
- Prabhu, D., Arulvasu, C., Babu, G., Manikandan, R., & Srinivasan, P. (2013). Biologically synthesized green silver nanoparticles from leaf extract of *Vitex negundo* L. induce growth-inhibitory effect on human colon cancer cell line HCT15. *Process Biochemistry*, 48(2), 317-324.
- Prabhu, S., & Poulouse, E. K. (2012). Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International nano letters*, 2(1), 1-10.
- Prabhu, S., Rajan, R., & Ramesh, S. (2024). Biogenic silver nanoparticles inhibit *Candida albicans* biofilms: dose-dependent analysis. *Mycopathologia*, 189, 451–466.
- Prakash, A., Sharma, S., Ahmad, N., Ghosh, A., & Sinha, P. (2011). Synthesis of Agnps By *Bacillus Cereus* Bacteria and Their Antimicrobial Potential. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 02(02), 155–161.
- Prasad, T. N. V. K. V., & Elumalai, E. (2011). Biofabrication of Ag nanoparticles using *Moringa oleifera* leaf extract and their antimicrobial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(6), 439-442.
- Priyadarshini, S., Gopinath, V., Meera Priyadarshini, N., MubarakAli, D., & Velusamy, P. (2013). Synthesis of anisotropic silver nanoparticles using novel strain, *Bacillus flexus* and its biomedical application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 232–237.
- Pryshchepa, O., Pomastowski, P. ve Buszewski, B. 2020. Silver nanoparticles: Synthesis, investigation techniques, and properties. *Advances in Colloid and Interface Science*, 284, 102246.
- Pugazhenthiran, N., Anandan, S., Kathiravan, G., Udaya Prakash, N. K., Crawford, S., & Ashokkumar, M. (2009). Microbial synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus* sp. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(7), 1811–1815.
- Pyatenko, A., Yamaguchi, M., & Suzuki, M. (2007). Synthesis of spherical silver nanoparticles with controllable sizes in aqueous solutions. *Journal of Physical Chemistry C*, 111(22), 7910–7917.
- Quester, K., Avalos-Borja, M., & Castro-Longoria, E. (2013). Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. In *Micron* (Vols. 54–55, pp. 1–27).
- Raheman, F., Deshmukh, S., Ingle, A., Gade, A., & Rai, M. (2011). Silver nanoparticles: Novel antimicrobial agent synthesized from an endophytic fungus *Pestalotia* sp. Isolated from leaves of *Syzygium cumini* (L). *Nano Biomedicine and Engineering*, 3(3), 174–178.
- Rahman, S., Rahman, L., Khalil, A. T., Ali, N., Zia, D., Ali, M., & Shinwari, Z. K. (2019). Endophyte-mediated synthesis of silver nanoparticles and their biological applications. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 103, Issue 6, pp. 2551–2569). Springer Verlag.
- Rai, M., Yadav, A., Gade, A., & Santos, C. (2020). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27(1), 76–83.

- Railean-Plugaru, V., Pomastowski, P., Wypij, M., Szultka-Mlynska, M., Rafinska, K., Golinska, P., Dahm, H., & Buszewski, B. (2016). Study of silver nanoparticles synthesized by acidophilic strain of Actinobacteria isolated from the of *Picea sitchensis* forest soil. *Journal of Applied Microbiology*, 120(5), 1250–1263.
- Raj, S., Trivedi, R., & Soni, V. (2021). Biogenic synthesis of silver nanoparticles, characterization and their applications—a review. *Surfaces*, 5(1), 67-90.
- Rajkuberan, C., Sudha, K., Sathishkumar, G., & Sivaramakrishnan, S. (2015). Antibacterial and cytotoxic potential of silver nanoparticles synthesized using latex of *Calotropis gigantea* L. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136(PB), 924–930.
- Rajora, N., Kaushik, S., Jyoti, A., & Kothari, S. L. 2016. Rapid synthesis of silver nanoparticles by *Pseudomonas stutzeri* isolated from textile soil under optimised conditions and evaluation of their antimicrobial and cytotoxicity properties. *IET Nanobiotechnology*, 10(6), 367–373.
- Ramanathan, R., O'Mullane, A. P., Parikh, R. Y., Smooker, P. M., Bhargava, S. K., & Bansal, V. (2011). Bacterial kinetics-controlled shape-directed biosynthesis of silver nanoplates using *Morganella psychrotolerans*. *Langmuir*, 27(2), 714–719.
- Ramanathan, S., & Gopinath, S. C. B. (2017). Potentials in synthesizing nanostructured silver particles. In *Microsystem Technologies* (Vol. 23, Issue 10, pp. 4345–4357). Springer Verlag.
- Ramesh, A., Sundari, M. T., & Thirugnanam, P. E. (2015). Microbial molecular mechanisms in biosynthesis of nanoparticles. *Bio-Nanoparticles: Biosynthesis and Sustainable Biotechnological Implications*, 53-81.
- Rane, A. N., Baikar, V. v., Ravi Kumar, D. v., & Deopurkar, R. L. (2017). Agro-industrial wastes for production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* ANR 88 and its application in synthesis of silver and gold nanoparticles. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR).
- Rani, K., Singh, P., & Kumar, V. (2024). *Synthesis and characterization of silver nanoparticles using bottom-up approach*. *Journal of Nanomaterials Research*, 12(3), 201-215.
- Rastogi, A., Singh, A., & Ali, S. (2019). *Mechanisms of silver nanoparticle-induced cytotoxicity*. *Toxicology in Vitro*, 59, 12–20
- Rasulov, B., Rustamova, N., Yili, A., Zhao, H. Q., & Aisa, H. A. (2016). Synthesis of silver nanoparticles on the basis of low and high molar mass exopolysaccharides of *Bradyrhizobium japonicum* 36 and its antimicrobial activity against some pathogens. *Folia Microbiologica*, 61(4), 283–293.
- Rathod, D., Golinska, P., Wypij, M., Dahm, H., & Rai, M. (2016). A new report of *Nocardiopsis valliformis* strain OT1 from alkaline Lonar crater of India and its use in synthesis of silver nanoparticles with special reference to evaluation of antibacterial activity and cytotoxicity. *Medical Microbiology and Immunology*, 205(5), 435–447.

- Raveendran, P., Fu, J., & Wallen, S. L. (2003). Completely “green” synthesis and stabilization of metal nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 125(46), 13940-13941.
- Ravindra, S., Murali Mohan, Y., Narayana Reddy, N., & Mohana Raju, K. (2010). Fabrication of antibacterial cotton fibres loaded with silver nanoparticles via “Green Approach.” *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 367(1–3), 31–40.
- Rehan, M., Mashaly, H. M., Mowafi, S., Abou El-Kheir, A., & Emam, H. E. (2015). Multi-functional textile design using in-situ Ag NPs incorporation into natural fabric matrix. *Dyes and Pigments*, 118, 9–17.
- Rezvani Amin, Z., Khashyarmansh, Z., & Fazly Bazzaz, B. S. (2016). Different behavior of *Staphylococcus epidermidis* in intracellular biosynthesis of silver and cadmium sulfide nanoparticles: more stability and lower toxicity of extracted nanoparticles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(9).
- Romano, I., Vitiello, G., Gallucci, N., Di Girolamo, R., Cattaneo, A., Poli, A., & Di Donato, P. (2022). Extremophilic microorganisms for the green synthesis of antibacterial nanoparticles. *Microorganisms*, 10(10), 1885.
- Rónavári, A., Igaz, N., & Kónya, Z. (2022). Size- and coating-dependent antibacterial and antibiofilm activity of silver nanoparticles. *Nanomaterials*, 12(4), 645.
- Rose, G., Soni, R., Rishi, P. ve Soni, S. 2019. Optimization of the biological synthesis of silver nanoparticles using *Penicillium oxalicum* GRS-1 and their antimicrobial effects against common food-borne pathogens. *Green Processing and Synthesis*, 8, 144-156.
- Rossi-Bergmann, B., Pacienza-Lima, W., Marcato, P. D., De Conti, R., & Durán, N. (2012). Therapeutic potential of biogenic silver nanoparticles in murine cutaneous leishmaniasis. In *Journal of Nano Research* (Vol. 20, pp. 89-97). Trans Tech Publications Ltd.
- Sadhasivam, S., Shanmugam, P., & Yun, K. S. (2010). Biosynthesis of silver nanoparticles by *Streptomyces hygroscopicus* and antimicrobial activity against medically important pathogenic microorganisms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81(1), 358–362.
- Saeed, S., Iqbal, A., & Ashraf, M. A. (2020). Bacterial-mediated synthesis of silver nanoparticles and their significant effect against pathogens. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(30), 37347-37356.
- Safaepour, M., Shahverdi, A. R., Shahverdi, H. R., Khorramizadeh, M. R., & Gohari, A. R. (2009). Green synthesis of small silver nanoparticles using geraniol and its cytotoxicity against fibrosarcoma-wehi 164. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 1(2), 111.
- Saha, S., Pal, A., Kundu, S., Basu, S., & Pal, T. (2010). Photochemical green synthesis of calcium-alginate-stabilized ag and au nanoparticles and their catalytic application to 4-nitrophenol reduction. *Langmuir*, 26(4), 2885–2893.

- Sayah, E., Brouiri, D., Wu, Y., Musi, A., Da Costa, P., & Massiani, P. (2011). A TEM and UV–visible study of silver reduction by ethanol in Ag–alumina catalysts. *Applied Catalysis A: General*, 406, 94–101.
- Shah, J., Pandya, A., Goyal, P., Misra, S. K., & Singh, S. (2020). BSA-Decorated Magnesium Nanoparticles for Scavenging Hydrogen Peroxide from Human Hepatic Cells. *ACS Applied Nano Materials*, 3(4), 3355–3370.
- Saifuddin, N., Wong, C. W., & Yasumira, A. N. (2009). Rapid biosynthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of bacteria with microwave irradiation. *Journal of Chemistry*, 6(1), 61–70.
- Salunke, G. R., Ghosh, S., Santosh Kumar, R. J., Khade, S., Vashisth, P., Kale, T., Chopade, S., Pruthi, V., Kundu, G., Bellare, J. R., & Chopade, B. A. (2014). Rapid efficient synthesis and characterization of silver, gold, and bimetallic nanoparticles from the medicinal plant *Plumbago zeylanica* and their application in biofilm control. *International Journal of Nanomedicine*, 9(1), 2635–2653.
- Samadi, N., Golkaran, D., Eslamifar, A., Jamalifar, H., Fazeli, M. R., & Mohseni, F. A. (2009). Intra/extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by an autochthonous strain of *proteus mirabilis* isolated from photographic waste. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 5(3), 247–253.
- Santhoshkumar, T., Rahuman, A. A., Rajakumar, G., Marimuthu, S., Bagavan, A., Jayaseelan, C., Zahir, A. A., Elango, G., & Kamaraj, C. (2011). Synthesis of silver nanoparticles using *Nelumbo nucifera* leaf extract and its larvicidal activity against malaria and filariasis vectors. *Parasitology Research*, 108(3), 693–702.
- Saravana Kumar, P., Balachandran, C., Duraipandiyan, V., Ramasamy, D., Ignacimuthu, S., & Al-Dhabi, N. A. (2015). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticle using *Streptomyces* sp. 09 PBT 005 and its antibacterial and cytotoxic properties. *Applied Nanoscience (Switzerland)*, 5(2), 169–180.
- Saravanan, C., Rajesh, R., Kaviarasan, T., Muthukumar, K., Kavitate, D., & Shetty, P. H. (2017). Synthesis of silver nanoparticles using bacterial exopolysaccharide and its application for degradation of azo-dyes. *Biotechnology Reports*, 15, 33–40.
- Sathishkumar, M., Sneha, K., Won, S. W., Cho, C. W., Kim, S., & Yun, Y. S. (2009). Cinnamon *zeylanicum* bark extract and powder mediated green synthesis of nano-crystalline silver particles and its bactericidal activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73(2), 332–338.
- Sathiyarayanan, G., Seghal Kiran, G., & Selvin, J. (2013). Synthesis of silver nanoparticles by polysaccharide bioflocculant produced from marine *Bacillus subtilis* MSBN17. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 13–20.
- Satpute, S. K., Banat, I. M., Dhakephalkar, P. K., Banpurkar, A. G., & Chopade, B. A. (2010). Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. In *Biotechnology Advances* (Vol. 28, Issue 4, pp. 436–450).
- Selvakannan, P. R., Swami, A., Srisathiyarayanan, D., Shirude, P. S., Pasricha, R., Mandale, A. B., & Sastry, M. (2004). Synthesis of aqueous Au core-Ag shell

- nanoparticles using tyrosine as a pH-dependent reducing agent and assembling phase-transferred silver nanoparticles at the air-water interface. *Langmuir*, 20(18), 7825–7836.
- Seshadri, S., Prakash, A., & Kowshik, M. (2012). Biosynthesis of silver nanoparticles by marine bacterium, *Idiomarina* sp. PR58-8. *Bulletin of Materials Science*, 35(7), 1201-1205.
- Shah, S. A., Sohail, M., Khan, S., Minhas, M. U., de Matas, M., Sikstone, V., Hussain, Z., Abbasi, M., & Kousar, M. 2019. Biopolymer-based biomaterials for accelerated diabetic wound healing: A critical review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139, 975–993.
- Shahverdi, A. R., Fakhimi, A., Shahverdi, H. R., & Minaian, S. (2007). Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3(2), 168–171.
- Shahverdi, A. R., Minaeian, S., Shahverdi, H. R., Jamalifar, H., & Nohi, A. A. (2007). Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of Enterobacteria: A novel biological approach. *Process Biochemistry*, 42(5), 919–923.
- Shameli, K., Ahmad, M. B., Jazayeri, S. D., Shabanzadeh, P., Sangpour, P., Jahangirian, H., & Gharayebi, Y. (2012). Investigation of antibacterial properties silver nanoparticles prepared via green method. *Chemistry Central Journal*, 6(1).
- Shanthi, S., David Jayaseelan, B., Velusamy, P., Vijayakumar, S., Chih, C. T., & Vaseeharan, B. (2016). Biosynthesis of silver nanoparticles using a probiotic *Bacillus licheniformis* Dab1 and their antibiofilm activity and toxicity effects in *Ceriodaphnia cornuta*. *Microbial Pathogenesis*, 93, 70–77.
- Sharma, A. ve Kumar, S. 2021. Synthesis and Green Synthesis of Silver Nanoparticles. In *Polymer Nanocomposites Based on Silver Nanoparticles*. Lal, H.M., Thomas, S., Li, T., Maria, H.J. (eds), Springer, Cham, 25-64.
- Sharma, G., Jasuja, N. D., Kumar, M., ve Ali, M. I. 2015. Biological synthesis of silver nanoparticles by cell-free extract of *Spirulina platensis*. *Journal of nanotechnology*, 2015(1), 132675.
- Sharma, V. K., Yngard, R. A., & Lin, Y. (2010). Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*, 145(1–2), 83–96.
- Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao, P., & Dash, D. (2007). Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 18(22), 225103.
- Sibbald, R. G., Contreras-Ruiz, J., Coutts, P., Fierheller, M., Rothman, A., & Woo, K. (2007). Bacteriology, inflammation, and healing: a study of nanocrystalline silver dressings in chronic venous leg ulcers. *Advances in skin & wound care*, 20(10), 549-558.
- Siddiqi, K.S., Husen, A. & Rao, R.A.K. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J Nanobiotechnol* 16, 14 (2018).

- Singh, J., Dutta, T., Kim, K. H., Rawat, M., Samddar, P., & Kumar, P. (2018). "Green" synthesis of metals and their oxide nanoparticles: Applications for environmental remediation. In *Journal of Nanobiotechnology* (Vol. 16, Issue 1). BioMed Central Ltd.
- Singh, J., Kumar, V., Kim, K. et al. (2021). *Biological synthesis of metallic nanoparticles and their therapeutic applications*. *Micromachines*, 12(10), 1215.
- Singh, P., Kim, Y. J., Singh, H., Mathiyalagan, R., Wang, C., & Yang, D. C. (2015). Biosynthesis of anisotropic silver nanoparticles by *bhargavaea indica* and their synergistic effect with antibiotics against pathogenic microorganisms. *Journal of Nanomaterials*, 2015.
- Singh, P., Kim, Y. J., Zhang, D., & Yang, D. C. (2022). Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 38(1), 52–68.
- Singh, P., Pandit, S., Jers, C., Joshi, A. S., Garnæs, J., & Mijakovic, I. (2021). Silver nanoparticles produced from *Cedecea* sp. exhibit antibiofilm activity and remarkable stability. *Scientific Reports*, 11(1), 1–13.
- Singh, P., Singh, H., Kim, Y. J., Mathiyalagan, R., Wang, C., & Yang, D. C. (2016). Extracellular synthesis of silver and gold nanoparticles by *Sporosarcina koreensis* DC4 and their biological applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 86, 75–83.
- Singh, R., & Sharma, N. (2023). Microbial synthesis of silver nanoparticles: Scale-up and application perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(1), 45–60.
- Singh, R., Shedbalkar, U. U., Wadhwani, S. A., & Chopade, B. A. (2015). Bacteriogenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism, and applications. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 99, Issue 11, pp. 4579–4593). Springer Verlag.
- Singh, R., Shukla, A., & Dubey, P. (2023). Silver nanoparticle-induced stress responses and biofilm modulation in MRSA. *Microbial Pathogenesis*, 178, 106–213.
- Singh, R., Wagh, P., Wadhwani, S., Gaidhani, S., Kumbhar, A., Bellare, J., & Chopade, B. A. (2013). Synthesis, optimization, and characterization of silver nanoparticles from *Acinetobacter calcoaceticus* and their enhanced antibacterial activity when combined with antibiotics. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 4277–4290.
- Singhal, G., Bhavesh, R., Kasariya, K., Sharma, A. R., & Singh, R. P. (2011). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Ocimum sanctum* (Tulsi) leaf extract and screening its antimicrobial activity. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(7), 2981–2988.
- Sintubin, L., de Windt, W., Dick, J., Mast, J., van der Ha, D., Verstraete, W., & Boon, N. (2009). Lactic acid bacteria as reducing and capping agent for the fast and efficient production of silver nanoparticles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(4), 741–749.

- Socrates, G. (2004). Infrared and Raman characteristic group frequencies: Tables and charts (3rd ed.). John Wiley & Sons.
- Sondi, I., & Salopek-Sondi, B. (2004). *Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275(1), 177–182.
- Song, J. Y., & Kim, B. S. (2009). Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32(1), 79–84.
- Sre, P. R., Reka, M., Poovazhagi, R., Kumar, M. A., & Murugesan, K. (2015). Antibacterial and cytotoxic effect of biologically synthesized silver nanoparticles using aqueous root extract of *Erythrina indica* lam. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 135, 1137–1144.
- Sriram, M. I., Kalishwaralal, K., Barathmanikanth, S., & Gurunathani, S. (2012). Size-based cytotoxicity of silver nanoparticles in bovine retinal endothelial cells. *Nanoscience Methods*, 1(1), 56–77.
- Sriram, M. I., Kalishwaralal, K., & Gurunathan, S. (2012). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Bacillus licheniformis*. In *Nanoparticles in biology and medicine* (pp. 33–43). Humana Press, Totowa, NJ.
- Srivastava, P., Bragança, J., Ramanan, S. R., & Kowshik, M. (2013). Synthesis of silver nanoparticles using haloarchaeal isolate *Halococcus salifodinae* BK3. *Extremophiles*, 17(5), 821–831.
- Srivastava, S. K., & Constanti, M. (2012). Room temperature biogenic synthesis of multiple nanoparticles (Ag, Pd, Fe, Rh, Ni, Ru, Pt, Co, and Li) by *Pseudomonas aeruginosa* SM1. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(4).
- Şeker Karatoprak, G., Aydin, G., Altinsoy, B., Altinkaynak, C., Koşar, M., & Ocsoy, I. (2017). The Effect of *Pelargonium endlicherianum* Fenzl. root extracts on formation of nanoparticles and their antimicrobial activities. *Enzyme and Microbial Technology*, 97, 21–26.
- Tahvilian, R., Zangeneh, M. M., Falahi, H., Sadrjavadi, K., Jalalvand, A. R., & Zangeneh, A. (2019). Green synthesis and chemical characterization of copper nanoparticles using *Allium saralicum* leaves and assessment of their cytotoxicity, antioxidant, antimicrobial, and cutaneous wound healing properties. *Applied Organometallic Chemistry*, 33(12), 1–16.
- Tai, C. Y., Wang, Y. H., & Liu, H. S. (2008). A green process for preparing silver nanoparticles using spinning disk reactor. *AIChE Journal*, 54(2), 445–452.
- Tamboli, D. P., & Lee, D. S. (2013). Mechanistic antimicrobial approach of extracellularly synthesized silver nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 260, 878–884.
- Tarannum, N., Divya, G., & Gautam, Y. K. (2019). *Facile green synthesis and applications of silver nanoparticles: A state-of-the-art review*. *RSC Advances*, 9, 34926–34948.
- Thomas, R., Janardhanan, A., Varghese, R. T., Soniya, E. V., Mathew, J., & Radhakrishnan, E. K. (2014). Antibacterial properties of silver nanoparticles

- synthesized by marine *Ochrobactrum* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45, 1221-1227.
- Thomas, R., Jasim, B., Mathew, J., & Radhakrishnan, E. K. (2012). Extracellular synthesis of silver nanoparticles by endophytic *Bordetella* sp. isolated from *Piper nigrum* and its antibacterial activity analysis. *Nano Biomedicine and Engineering*, 4(4), 183–187.
- Thorley, A. J., & Tetley, T. D. (2013). New perspectives in nanomedicine. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 140, Issue 2, pp. 176–185).
- Tian, J., Wong, K. K. Y., Ho, C. M., Lok, C. N., Yu, W. Y., Che, C. M., Chiu, J. F., & Tam, P. K. H. (2007). Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *ChemMedChem*, 2(1), 129–136.
- Tong, Z., Jiang, Y., Yang, D., Shi, J., Zhang, S., Liu, C., & Jiang, Z. (2014). Biomimetic and bioinspired synthesis of titania and titania-based materials. In *RSC Advances* (Vol. 4, Issue 24, pp. 12388–12403).
- Touaitia, R., Mairi, A., Ibrahim, N. A., Basher, N. S., Idres, T. ve Touati, A. 2025. *Staphylococcus aureus*: A Review of the Pathogenesis and Virulence Mechanisms. *Antibiotics*, 14(5), 470.
- Tsibakhashvili, N. Y., Kirkesali, E. I., Pataraya, D. T., Gurielidze, M. A., Kalabegishvili, T. L., Gvarjaladze, D. N., Tsertsvadze, G. I., Frontasyeva, M. V., Zinicovskaia, I. I., Wakstein, M. S., Khakhanov, S. N., Shvindina, N. V., & Shklover, V. Y. (2011). Microbial synthesis of silver nanoparticles by *Streptomyces glaucus* and *Spirulina platensis*. *Advanced Science Letters*, 4(11–12), 3408–3417.
- Tsuji, T., Iryo, K., Watanabe, N., & Tsuji, M. (2002). Preparation of silver nanoparticles by laser ablation in solution: influence of laser wavelength on particle size. *Appl Surf Sci.* 2002;202(1–2):80–85.
- Tummalapalli, M., Deopura, B. L., Alam, M. S., & Gupta, B. (2015). Facile and green synthesis of silver nanoparticles using oxidized pectin. *Materials Science and Engineering C*, 50, 31–36.
- Uthaman, A., Lal, H. M. ve Thomas, S. 2021. Fundamentals of Silver Nanoparticles and Their Toxicological Aspects. In: *Polymer Nanocomposites Based on Silver Nanoparticles*. Engineering Materials Lal, H.M., Thomas, S., Li, T., Maria, H.J. (eds). Springer, Cham, 1-24.
- Vahabi, K., Mansoori, G. A., & Karimi, S. (2011). Biosynthesis of Silver Nanoparticles by Fungus *Trichoderma Reesei* (A Route for Large-Scale Production of AgNPs). *Insciences Journal*, 65–79.
- van, J., Tuk, B., Barritault, D., & Tong, M. 2012. Heparan Sulfate Proteoglycan Mimetics Promote Tissue Regeneration: An Overview. *Tissue Regeneration - From Basic Biology to Clinical Application*, Martin 1997.
- Vanlalveni, C., Ralte, V., Zohmingliana, H., Das, S., Anal, J. M. H., Lallianrawna, S., & Rokhum, S. L. (2024). A review of microbes mediated biosynthesis of silver nanoparticles and their enhanced antimicrobial activities. *Heliyon*, 10(11).
- Vasanth, K., Ilango, K., MohanKumar, R., Agrawal, A., & Dubey, G. P. (2014). Anticancer activity of *Moringa oleifera* mediated silver nanoparticles on human

- cervical carcinoma cells by apoptosis induction. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 117, 354-359.
- Veerasamy, R., Xin, T. Z., Gunasagaran, S., Xiang, T. F. W., Yang, E. F. C., Jeyakumar, N., & Dhanaraj, S. A. (2011). Biosynthesis of silver nanoparticles using mangosteen leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(2), 113–120.
- Velluti, F., Mosconi, N., Acevedo, A., Borthagaray, G., Castiglioni, J., Faccio, R., ... & Torre, M. H. (2014). Synthesis, characterization, microbiological evaluation, genotoxicity and synergism tests of new nano silver complexes with sulfamoxole: X-ray diffraction of $[Ag_2(SMX)_2] \cdot DMSO$. *Journal of inorganic biochemistry*, 141, 58-69.
- Velusamy, P., Kumar, G. V., Jeyanthi, V., Das, J. ve Pachaiappan, R. 2016. Bio-inspired green nanoparticles: synthesis, mechanism, and antibacterial application. *Toxicological research*, 32, 95-102.
- Venegas, M. A., Bollaert, M. D., Jafari, A., Bondoc, J. M. G., Twilley, J., Thompson, W., & Movahedzadeh, F. 2018. Nanoparticles against resistant *Pseudomonas* spp. *Microbial Pathogenesis*, 118, 115–117.
- Venil, C. K., Sathishkumar, P., Malathi, M., Usha, R., Jayakumar, R., Yusoff, A. R. M., & Ahmad, W. A. (2016). Synthesis of flexirubin-mediated silver nanoparticles using *Chryseobacterium artocarpi* CECT 8497 and investigation of its anticancer activity. *Materials Science and Engineering C*, 59, 228–234.
- Venkatpurwar, V., & Pokharkar, V. (2011). Green synthesis of silver nanoparticles using marine polysaccharide: Study of in-vitro antibacterial activity. *Materials Letters*, 65(6), 999–1002.
- Verma, S. K., Jha, E., Panda, P. K., Mishra, A., Thirumurugan, A., Das, B., Parashar, S. K. S., & Suar, M. (2018). Rapid novel facile biosynthesized silver nanoparticles from bacterial release induce biogenicity and concentration dependent *in vivo* cytotoxicity with embryonic Zebrafish-A mechanistic insight. *Toxicological Sciences*, 161(1), 125–138.
- Vieira, L. F. D. A., Lins, M. P., Viana, I. M. M. N., Dos Santos, J. E., Smaniotto, S., & Reis, M. D. D. S. (2017). Metallic nanoparticles reduce the migration of human fibroblasts in vitro. *Nanoscale research letters*, 12(1), 200.
- Vigneshwaran, N., Ashtaputre, N. M., Varadarajan, P. V., Nachane, R. P., Paralikar, K. M., & Balasubramanya, R. H. (2007). Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. *Materials letters*, 61(6), 1413-1418.
- Vigneshwaran, N., Kathe, A. A., Varadarajan, P. v., Nachane, R. P., & Balasubramanya, R. H. (2006). Biomimetics of silver nanoparticles by white rot fungus, *Phaenerochaete chrysosporium*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 53(1), 55–59.
- Vigneshwaran, N., Nachane, R. P., Balasubramanya, R. H., & Varadarajan, P. v. (2006). A novel one-pot “green” synthesis of stable silver nanoparticles using soluble starch. *Carbohydrate Research*, 341(12), 2012–2018.

- Vijayakumar, G., Kim, H. J., & Rangarajulu, S. K. (2023). In vitro antibacterial and wound healing activities evoked by silver nanoparticles synthesized through probiotic bacteria. *Antibiotics*, 12(1), 141.
- Vilchis-Nestor, A. R., Sánchez-Mendieta, V., A. Camacho-López, Gómez-Espinosa, R. M., Camacho-López, M. A. ve Arenas-Alatorre, J. A. 2008. Solventless synthesis and optical properties of Au and Ag nanoparticles using *Camellia sinensis* extract. *Materials Letters*, 62(17-18), 3103-3105.
- Viorica, R. P., Pawel, P., Kinga, M., Michal, Z., Katarzyna, R., & Boguslaw, B. (2017). *Lactococcus lactis* as a safe and inexpensive source of bioactive silver composites. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(19), 7141–7153.
- Vlachou, E., Chipp, E., Shale, E., Wilson, Y. T., Papini, R., & Moiemmen, N. S. (2007). The safety of nanocrystalline silver dressings on burns: A study of systemic silver absorption. *Burns*, 33(8), 979–985.
- Wallin, R. F., & Arscott, E. F. 1998. A practical guide to ISO 10993-5: Cytotoxicity. *Medical Device and Diagnostic Industry*, 20, 96-98.
- Wang, C., Kim, Y. J., Singh, P., Mathiyalagan, R., Jin, Y., & Yang, D. C. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus methylotrophicus*, and their antimicrobial activity. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 44(4), 1127–1132.
- Wang, C., Singh, P., Kim, Y. J., Mathiyalagan, R., Myagmarjav, D., Wang, D., Jin, C. G., & Yang, D. C. (2016). Characterization and antimicrobial application of biosynthesized gold and silver nanoparticles by using *Microbacterium resistens*. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 44(7), 1714–1721.
- Wang, C. yu, Makvandi, P., Zare, E. N., Tay, F. R., & Niu, L. na. (2020). Advances in Antimicrobial Organic and Inorganic Nanocompounds in Biomedicine. *Advanced Therapeutics*, 3(8).
- Wang, H., Chen, H., Wang, Y., Huang, J., Kong, T., Lin, W., ... & Li, Q. (2012). Stable silver nanoparticles with narrow size distribution non-enzymatically synthesized by *Aeromonas* sp. SH10 cells in the presence of hydroxyl ions. *Current Nanoscience*, 8(6), 838-846.
- Wasilewska, A., Klekotka, U., Zambrzycka, M., Zambrowski, G., Święcicka, I., & Kalska-Szostko, B. 2023. Physico-chemical properties and antimicrobial activity of silver nanoparticles fabricated by green synthesis. *Food Chemistry*, 400.
- Wei, L., Lu, J., Xu, H., Patel, A., Chen, Z. S., & Chen, G. (2015). Silver nanoparticles: Synthesis, properties, and therapeutic applications. In *Drug Discovery Today* (Vol. 20, Issue 5, pp. 595–601). Elsevier Ltd.
- Wiley, B., Sun, Y., Mayers, B., & Xia, Y. (2005). Shape-controlled synthesis of metal nanostructures: The case of silver. In *Chemistry - A European Journal* (Vol. 11, Issue 2, pp. 454–463).
- Willey, J.M., Sherwood, L. and Woolverton, C.J. 2023. Prescott's microbiology (Vol. 12). ISBN 9781265123031. New York: McGraw-Hill.
- Witte, M. B., & Barbul, A. (1997). General principles of wound healing. *Surgical Clinics of North America*, 77(3), 509-528.

- Wong, C. K., Cheung, P. F., Ip, W. K., & Lam, C. W. (2007). Intracellular signaling mechanisms regulating toll-like receptor-mediated activation of eosinophils. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 37(1), 85-96.
- Wright, J. B., Lam, K., Buret, A. G., Olson, M. E., & Burrell, R. E. (2002). Early healing events in a porcine model of contaminated wounds: Effects of nanocrystalline silver on matrix metalloproteinases, cell apoptosis, and healing. *Wound Repair and Regeneration*, 10(3), 141–151.
- Wypij, M., Golinska, P., Dahm, H., & Rai, M. (2017). Actinobacterial-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic bacteria. *IET Nanobiotechnology*, 11(3), 336–342.
- Xiang, D. xi, Chen, Q., Pang, L., & Zheng, C. long. (2011). Inhibitory effects of silver nanoparticles on H1N1 influenza A virus in vitro. *Journal of Virological Methods*, 178(1–2), 137–142.
- Yadav, S. ve Khurana, J. M. 2015. Cinnamomum tamala leaf extract-mediated green synthesis of Ag nanoparticles and their use in pyranopyrazles synthesis. *Chinese Journal of Catalysis*, 36(7), 1042-1046.
- Yalcinoz, A. H., Gursoy Calis, G. E., Karaca, B., Eskizengin, H., & Coleri Cihan, A. 2025. Biosynthesis of silver nanoparticles by thermophilic spore-forming bacilli: screening for high-performance strains and characterization of silver nanoparticles from Anoxybacillus sp. D401a. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 1-23.
- Yang, J. Y., Huang, C. Y., Chuang, S. S., & Chen, C. C. (2007). A clinical experience of treating exfoliative wounds using nanocrystalline silver-containing dressings (Acticoat®). *Burns*, 33(6), 793-797.
- Yang, S. 2021. Characterization of Silver Nanoparticles. In: Polymer Nanocomposites Based on Silver Nanoparticles. Engineering Materials. Lal, H.M., Thomas, S., Li, T., Maria, H.J. (eds), Springer, Cham, 83-107.
- Yao, C., Zhu, J., Xie, A., Shen, Y., Li, H., Zheng, B., & Wei, Y. (2017). Graphene oxide and creatine phosphate disodium dual template-directed synthesis of GO/hydroxyapatite and its application in drug delivery. *Materials Science and Engineering C*, 73, 709–715.
- Yaqoob, A. A., Umar, K. ve Ibrahim, M. N. M. 2020. Silver nanoparticles: various methods of synthesis, size affecting factors and their potential applications—a review. *Appl Nanosci*, 10, 1369–1378.
- Yazdani-Arazi, S. N., Ghanbarzadeh, S., Adibkia, K., Kouhsoltani, M., & Hamishehkar, H. (2017). Histological evaluation of follicular delivery of arginine via nanostructured lipid carriers: a novel potential approach for the treatment of alopecia. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 45(7), 1379–1387.
- You, C., Li, Q., Wang, X., Wu, P., Ho, J. K., Jin, R., ... & Han, C. (2017). Silver nanoparticle loaded collagen/chitosan scaffolds promote wound healing via regulating fibroblast migration and macrophage activation. *Scientific reports*, 7(1), 10489.

- Youssif, A. M., Soliman, N. A., Sabry, S. A., & Ghozlan, H. A. (2020). Biosynthesis, characterization and application of silver nanoparticles by *Geobacillus thermodenitrificans* Az1 as antimicrobial, antibiofilm and dye catalyst. *Asian J. Microbiol. Biotech. Environ. Sci.*, 22, 50-56.
- Yumei, L., Yamei, L., Qiang, L., & Jie, B. (2017). Rapid biosynthesis of silver nanoparticles based on flocculation and reduction of an exopolysaccharide from *arthrobacter* sp. B4: Its antimicrobial activity and phytotoxicity. *Journal of Nanomaterials*, 2017.
- Yusuf, A., Almotairy, A. R., Henidi, H., Alshehri, O. Y., & Aldughaim, M. S. (2023). *Nanoparticles as drug delivery systems: A review of the implication of nanoparticles' physicochemical properties on responses in biological systems. Polymers*, 15(7), 1596.
- Zain, N. M., Stapley, A. G. F., & Shama, G. (2014). Green synthesis of silver and copper nanoparticles using ascorbic acid and chitosan for antimicrobial applications. *Carbohydrate Polymers*, 112, 195–202.
- Zaki, S., el Kady, M. F., & Abd-El-Haleem, D. (2011). Biosynthesis and structural characterization of silver nanoparticles from bacterial isolates. *Materials Research Bulletin*, 46(10), 1571–1576.
- Zangeneh, M. M., Saneei, S., Zangeneh, A., Tushmalani, R., Haddadi, A., Almasi, M., & Amiri-Paryan, A. (2019). Preparation, characterization, and evaluation of cytotoxicity, antioxidant, cutaneous wound healing, antibacterial, and anti-fungal effects of gold nanoparticles using the aqueous extract of *Falcaria vulgaris* leaves. *Applied Organometallic Chemistry*, 33(11), 1–17.
- Zare, E. N., & Makvandi, P. (2020). Antimicrobial metal-based nanomaterials and their industrial and biomedical applications. In *Engineered Antimicrobial Surfaces* (pp. 123-134). Springer, Singapore.
- Zeikus, J.G. 1979. Thermophilic bacteria: Ecology, physiology and technology. *Enzyme and Microbial Technology*, 1, 243-252.
- Zerrin, Ö., & Yıldız, Ş. (2022). Biosynthesis of silver nanoparticles produced using *Geobacillus* spp. bacteria. *Nanomaterials*, 13(4), 702.
- Zhaleh, M., Zangeneh, A., Goorani, S., Seydi, N., Zangeneh, M. M., Tahvilian, R., & Pirabbasi, E. (2019). In vitro and in vivo evaluation of cytotoxicity, antioxidant, antibacterial, anti-fungal, and cutaneous wound healing properties of gold nanoparticles produced via a green chemistry synthesis using *Gundelia tournefortii* L. as a capping and reducing agent. *Applied Organometallic Chemistry*, 33(9), 1–14.
- Zhang, D., Zhao, Y. X., Gao, Y. J., Gao, F. P., Fan, Y. S., Li, X. J., ... & Wang, H. (2013). Anti-bacterial and in vivo tumor treatment by reactive oxygen species generated by magnetic nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(38), 5100-5107.
- Zhang, H., Li, Q., Lu, Y., Sun, D., Lin, X., Deng, X., He, N., & Zheng, S. (2005). Biosorption and bioreduction of diamine silver complex by *Corynebacterium*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80(3), 285–290.

- Zhang, L., Chen, X., & Li, Y. (2025). Mechanistic insights into silver nanoparticle-mediated antimicrobial and antibiofilm activity. *Applied Nanoscience*, 15, 225–242.
- Zhang, Q., Li, N., Goebel, J., Lu, Z., & Yin, Y. (2011). A systematic study of the synthesis of silver nanoplates: is citrate a “magic” reagent? *Journal of the American Chemical Society*, 133(46), 18931-18939.
- Zhang, S., Tang, Y., & Vlahovic, B. (2016). A review on preparation and applications of silver-containing nanofibers. *Nanoscale research letters*, 11(1), 80.
- Zhang, X. F., Liu, Z. G., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), Article 1534.
- Zhang, Y., Liu, Q., & Wang, X. (2021). Advances in microbial nanoparticle biosynthesis: From lab-scale to industrial production. *Nanomaterials*, 11(7), 1709.
- Zhao, X., Zhou, L., Riaz Rajoka, M. S., Yan, L., Jiang, C., Shao, D., Zhu, J., Shi, J., Huang, Q., Yang, H., & Jin, M. (2018). Fungal silver nanoparticles: synthesis, application and challenges. In *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 38, Issue 6, pp. 817–835). Taylor and Francis Ltd.
- Zheng, Y., Xiao, L., Yu, C., Jin, P., Qin, D., Xu, Y., Yin, J., Liu, Z., & Du, Q. (2019). Enhanced Antiarthritic Efficacy by Nanoparticles of (-)-Epigallocatechin Gallate-Glucosamine-Casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(23), 6476–6486.
- Zhou, W., Qiao, Z., Nazarzadeh Zare, E., Huang, J., Zheng, X., Sun, X., Shao, M., Wang, H., Wang, X., Chen, D., Zheng, J., Fang, S., Li, Y. M., Zhang, X., Yang, L., Makvandi, P., & Wu, A. (2020). 4D-Printed Dynamic Materials in Biomedical Applications: Chemistry, Challenges, and Their Future Perspectives in the Clinical Sector. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(15), 8003–8024.