



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**JELATİN İLE MODİFİYE EDİLMİŞ GÜMÜŞ
NANOPARTİKÜLLERİN ANTİBAKTERİYEL
ETKİNLİĞİNİN VE UÇUCU YAĞLAR İLE
SİNERJİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Büşra ESİRGENLER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Şubat-2022
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü tarafından 201315003 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Büşra ESİRGENLER
Tarih: 10.02.2022

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

JELATİN İLE MODİFİYE EDİLMİŞ GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİN ANTİBAKTERİYEL ETKİNLİĞİNİN VE UÇUCU YAĞLAR İLE SİNERJİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Büşra ESİRGENLER

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Fatih ERCİ

2022, 59 Sayfa

Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Fatih ERCİ
Doç. Dr. Mustafa YÖNTEM
Dr. Öğr. Üyesi Fatih SEVGİ

Son yıllarda nanoteknoloji insan toplumunun vazgeçilmez bir parçası haline geldi. Çok sayıda potansiyel mühendislik ürünü nanomalzeme arasında, gümüş nanopartiküller (AgNP'ler) genellikle antimikrobiyal özellikleri sayesinde birçok alanda kullanılmaktadır. Özellikle, AgNP'ler toprak gibi çevresel alanlara doğrudan veya dolaylı olarak mikroorganizmalara etki edebilmektedir.

Bu çalışmada jelatin aracılı gümüş nanopartiküller (Gel-AgNP) sentezlendi. Sentezlenen Gel-AgNP'lerin karakterizasyonu, UV-vis spektroskopisi, FT-IR, XRD, TEM, DLS ve zeta potansiyel analizleri yoluyla gerçekleştirildi. Nanopartiküllerin, uçucu yağların ve bunların kombinasyonlarının antibakteriyel aktiviteleri hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif suşlara karşı agar difüzyon testi kullanılarak değerlendirildi. Ayrıca, tüm örnekler farklı konsantrasyonlarda toprağa uygulanarak toprak özellikleri, toprak solunumu ve toprak ekzoenzimleri (dehidrojenaz ve alkalen fosfataz) açısından analiz edildi.

Çalışma sonucunda, TEM görüntüleri ile sentezlenen AgNP'lerin küresel şekilli olduğu ve iyi bir homojen dağılım gösterdiği ortaya çıkarıldı. Zeta analizleri ile nanopartiküllerin pozitif yüklü olduğu belirlendi. AgNP'lerin en fazla antibakteriyel aktiviteyi *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı gösterdiği gözlemlendi. Genel olarak sonuçlar, AgNP'lerin hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif suşlar için antibakteriyel aktivitelerinin uçucu yağlar ile kombinasyonlarında artabileceğini gösterdi. Ayrıca, AgNP'lerin ve uçucu yağların topraktaki her iki ekzoenzim aktivitelerinde özellikle daha yüksek maruz kalma süreleri ve konsantrasyonlarda düşüşe yol açtığı sonucuna varıldı.

Sonuç olarak, jelatinin gümüş nanopartikül sentezinde hem indirgeyici hem de stabilize edici ajan olarak rol aldığı bulundu. Özellikle nanopartiküller ile uçucu yağ kombinasyonlarının gümüş nanopartiküllerin mikroorganizmalarla etkileşimde farklılık ortaya çıkardığı değerlendirildi. Tüm bu sonuçlar gümüş nanopartiküllerin farklı alanlarda kullanımında yeni stratejilerin gelişmesine katkıda bulunması beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antibakteriyel Aktivite, Gümüş Nanopartiküller, Jelatin, Toprak Enzimleri, Toprak Solunumu, Uçucu Yağ, Sinerjistik

ABSTRACT

MS THESIS

INVESTIGATION OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF GELATİN MODIFIED SILVER NANOPARTICLES AND THEIR SYNERGIES WITH ESSENTIAL OILS

Büşra ESİRGENLER

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY**

Advisor: Assist. Prof. Dr. Fatih ERCİ

2022, 60 Pages

Jury

Assist. Prof. Dr. Fatih ERCİ

Assoc. Prof. Dr. Mustafa YÖNTEM

Assist. Prof. Dr. Fatih SEVGİ

Nanotechnology has become an indispensable part of humanity in recent years. Among the many potential engineered nanomaterials, silver nanoparticles (AgNPs) are widely used in many fields due to their antimicrobial properties. AgNPs in particular can affect microorganisms directly or indirectly on environmental surfaces such as soils.

In this study, gelatin-mediated silver nanoparticles (Gel-AgNP) were synthesized. The synthesized Gel-AgNPs were characterized by UV-Vis spectroscopy, FT-IR, XRD, TEM, DLS and zeta potential analysis. The antibacterial effect of nanoparticles, essential oils and their combinations was evaluated using the agar diffusion test against Gram-positive and Gram-negative strains. In addition, all samples were applied to the soil at different concentrations and analyzed for soil properties, soil respiration and soil exoenzymes (dehydrogenase and alkaline phosphatase).

As a result of the study, TEM images showed that the synthesized AgNPs were spherical in shape and had good homogeneous distribution. Using zeta analysis, it was determined that the nanoparticles were positively charged. It was observed that AgNPs showed the most potent antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* bacteria. Overall, the results showed that the antibacterial activities of AgNPs can be enhanced for both gram-positive and gram-negative strains in combination with essential oils. Furthermore, it was concluded that AgNPs and essential oils caused a decrease in both exoenzyme activities in soil, especially at higher exposure times and concentrations.

As a result, it was found that gelatin plays role as both a reducing agent and a stabilizing agent in the synthesis of silver nanoparticles. In particular, it was evaluated that the combination of nanoparticles and essential oil led to different results in the interaction of silver nanoparticles with microorganisms. All these results will contribute to the development of new strategies for using silver nanoparticles in different fields.

Keywords: Antibacterial Activity, Silver Nanoparticles, Gelatin, Soil Enzymes, Soil Respiration, Essential Oil, Synergistic

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana her türlü yol gösterici olan desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen her zaman bilgi birikimiyle ve olumlu tavrıyla beni cesaretlendiren ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Fatih ERCİ'ye sonsuz teşekkür ederim.

Eğitim hayatımda dersleriyle bana vizyon katan çok kıymetli hocam Doç. Dr. Mustafa YÖNTEM'e, çalışmamın uygulama aşamasında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Vildan ERCİ ve Arş. Gör. Esra TANHAŞ hocalarıma teşekkür ederim. Son olarak tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen her zaman yanımda olan biricik anne ve babama teşekkürü bir borç bilirim.

Büşra ESİRGENLER
KONYA-2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Nanoteknoloji nedir?	4
2.2. Nanopartiküllerin Sınıflandırılması	5
2.2.1. Organik Nanopartiküller	5
2.2.2. İnorganik Nanopartiküller.....	6
2.2.3. Karbon Bazlı Nanoparçacıklar.....	7
2.3. Nanopartiküllerin Sentez Yöntemleri	8
2.3.1. Yukarıdan Aşağıya Doğru Sentez (Top-Down)	8
2.3.2. Aşağıdan Yukarıya Doğru Sentez (Bottom Up)	8
2.4. Nanopartikül Dizaynı	8
2.5. Gümüş Nanopartiküller.....	9
2.5.1. Gümüş Nanopartiküllerin Sentezi.....	10
2.5.2. Gümüş Nanopartiküllerin Uygulama Alanları.....	12
2.5.3. Gümüş Nanopartiküllerin Antibakteriyel Etkinlikleri	12
2.6. Gümüş Nanopartiküllerin Toprak Enzimleri Üzerindeki Etkinliği.....	13
2.7. Uçucu Yağların AgNP'ler ile Sinerjistik Etkinliği	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM	16
3.1. Nanopartikül Sentezi.....	16
3.2. Sentezlenen Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	16
3.3. Antibakteriyel Aktivite Ölçümleri	17
3.4. Test Toprağının Hazırlanması ve Toprak Özelliklerinin Belirlenmesi.....	17
3.5. Toprak Solunumunun ve Toprak Gümüş İçeriğinin Ölçülmesi.....	18
3.6. Nanopartiküllerin Toprak Enzim Aktiviteleri Üzerindeki Etkinliği.....	19
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	21
4.1. Nanopartiküllerin sentez ve karakterizasyonu	21

4.2. Sentezlenen Gümüş Nanopartiküllerin Antimikrobiyal Etkinlikleri ve Uçucu Yağlar ile Sinerjistik Etkisi.....	27
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	40
5.1. Sonuçlar	40
5.2. Öneriler	41
6. KAYNAKLAR	42
ÖZGEÇMİŞ	50



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

nm	nanometre
ppm	milyonda bir kısım
μ g	mikro gram
mL	mili litre
mg	mili gram
kg	kilo gram
cm	santimetre
kV	kilo Volt
mm	milimetre
g	gram
M	molar
°C	santigrat derece
h	saat
N	normalite
mmol	milimolar
v/v	hacim/hacim
μ S	mikro simens
sa	saat
μ l	mikrolitre
L	litre
a/h	ağırlık/hacim

Kısaltmalar

AgNP	gümüş nanopartikül
NP	nanopartikül
E	esansiyel yağ
Gel-AgNP	jelatin gümüş nanopartikül
Gel-Glu-AgNP	jelatin gümüş glukoz nanopartikül
MİK	minimum inhibitör konsantrasyonu
TK	tarla kapasitesi
SN	solma noktası
FSK	faydalı su kapasitesi
EC	elektriki iletkenlik
PDI	polidispersite indeksi
TPF	trifenilformazan
DLS	dinamik ışık saçılımı
UV-vis	UV-görünür bölge spektroskopisi
FTIR	fourier dönüşümü kızılötesi
XRD	X-ışını kırınımı difraktometresi
SEM	taramalı elektron mikroskopisi
SI	uluslararası birimler sistemi
ZS	zeta sizer
EDS	enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi
ICP-OES	indüktif eşleşmiş plazma atomik emisyon spektroskopisi

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Gümüş nanopartiküller içeren piyasadaki başlıca ürünler.....	9
Tablo 4.1. Toprak örneğinin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri	33



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Nano ölçeğin örnekler ile gösterimi	5
Şekil 2.2. Organik nanopartiküller: a) Dendrimerler, b) Liposomlar ve c) miseller	6
Şekil 2.3. Çeşitli biyolojik organizmalar kullanılarak gümüş nanopartiküllerin yeşil sentezi için prosedürün şematik gösterimi.....	11
Şekil 4.1. Sentezlenen Gel-AgNP ve Gel-H-AgNP'lerin Uv-Vis analizi	21
Şekil 4.2. Sentezlenen Gel-AgNP'lerin FTIR analizi.....	22
Şekil 4.3. Sentezlenen Gel-AgNP'lerin XRD analizi	23
Şekil 4.4. Sentezlenen Gel-AgNP'lerin SEM-EDX analizi	23
Şekil 4.5. Sentezlenen Gel-AgNP'lerin STEM analizleri	24
Şekil 4.6. Sentezlenen Gel-Glu-AgNP'lerin STEM analizleri	24
Şekil 4.7. Sentezlenen Gel-AgNP'lerin TEM analizleri.....	25
Şekil 4.8. Sentezlenen Gel-AgNP'lerin zeta potansiyel ölçümü.....	26
Şekil 4.9. Sentezlenen Gel-Glu-AgNP'lerin zeta potansiyel ölçümü	26
Şekil 4.10. Sentezlenen Gel-AgNP'lerin DLS ile büyüklük dağılımı ve PDI değeri	27
Şekil 4.11. Sentezlenen Gel-AgNP'lerin DLS ile büyüklük dağılımı ve PDI değeri	27
Şekil 4.12. Nanopartiküller ve uçucu yağların <i>Staphylococcus aureus</i> bakterisine karşı inhibisyon zonları (mm).	28
Şekil 4.13. Nanopartiküller ve uçucu yağların <i>Bacillus cereus</i> bakterisine karşı inhibisyon zonları (mm).	29
Şekil 4.14. Nanopartiküller ve uçucu yağların <i>Salmonella typhimurium</i> bakterisine karşı inhibisyon zonları (mm).	30
Şekil 4.15. Nanopartiküller ve uçucu yağların <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bakterisine karşı inhibisyon zonları (mm).....	31
Şekil 4.16. Nanopartiküller ve uçucu yağların <i>Echerichia coli</i> bakterisine karşı inhibisyon zonları (mm).	31
Şekil 4.17. Nanopartiküller ve uçucu yağların mikrororganizmalara karşı geliştiridkleri inhibisyon zonları.	32
Şekil 4.18. Örnekler ile muamele edilen toprak örnekleri.....	34
Şekil 4.19. Toprağa uygulanan örneklerin 3 doz olarak 0.2 mL (1.doz), 0.4 mL (2. Doz) ve 0.6 mL (3. Doz) olarak 10.gün sonudaki toprak solunumu üzerindeki etkinlikleri...	35
Şekil 4.20. Uygulama yapılan toprak örneklerinde dehidrojenaz ölçümü için hazırlanan standart eğri	36
Şekil 4.21. Toprağa uygulanan örneklerin doz ve zaman bağımlı toprak dehidrojenaz aktivitesi üzerindeki etkinlikleri	37
Şekil 4.22. Uygulama yapılan toprak örneklerinde alkalen fosfataz ölçümü için hazırlanan standart eğri.....	38
Şekil 4.23. Toprağa uygulanan örneklerin doz ve zaman bağımlı toprak alkalen fosfataz aktivitesi üzerindeki etkinlikleri	39

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji, geçen yüzyıldan beri bilinen bir araştırma alanıdır. “Nanoteknoloji”, Nobel ödüllü Richard P. Feynman tarafından, 1959'daki “There’s Plenty of Room at the Bottom” dersinde sunulduğundan beri, nanoteknoloji alanında çeşitli gelişmeler yaşanmıştır (Feynman, 1959). Nanoteknoloji, nano ölçekli düzeyde çeşitli türlerde malzemeler üretimini konu almaktadır. Nanopartiküller (NP’ler), en az 100 nm’den küçük bir boyutu olan partiküllü maddeleri içeren geniş bir malzeme sınıfıdır (Khan ve ark., 2019). Nanoteknoloji, en az bir boyuttaki en küçük fonksiyonel organizasyonu nanometre ölçeğinde veya bir metrenin milyarda biri olan malzeme ve cihazların tasarımı, sentezi, karakterizasyonu ve uygulamasında yer alan bilim ve mühendislik olarak tanımlanabilir (Silva, 2004).

Gümüş, yoğun antimikrobiyal aktivitesi ve memeli hücrelerine ile dokularına düşük toksisitesi nedeniyle birçok araştırmada potansiyel bir mikrobiyal inhibisyon ajanı olarak kabul edilmiştir. Bilinen en güçlü doğal dezenfektanlardan biridir. Biyomateryal ile ilişkili enfeksiyonlar yaygındır ve ciddi sağlık sorunlarına neden olabilmektedir. Özellikle, protez cihaz yüzeylerine (kateterler, kalp kapakçıkları, vb.) gümüş nanopartiküllerin kaplanması ciddi enfeksiyonlara yol açabilecek bakteri yapışmasını ve biyofilm oluşumunu önlemek için en etkili yaklaşımlardan biri olarak kabul edilmektedir (Jiang ve ark., 2004). Yüksek yüzey alanı / hacim oranına (100 nm’nin altında boyut) sahip nano ölçekli gümüş partiküller, hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilere karşı yüksek antimikrobiyal etkinlikleri nedeniyle dikkat çekmiştir (Gurunathan ve ark., 2014; Morones-Ramirez ve ark., 2013). Katyonik gümüş (Ag^+), iyi bilinen bir bakterisittir ve çeşitli ürünlerde kullanımı da mikroskobik biyota üzerindeki olumsuz etkilerin artmasına neden olmaktadır (Wijnhoven ve ark., 2009). AgNP’nin bakterilere toksisitesi üzerine yapılan çalışmalar, farklı yönde sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Çoğu çalışma, nanopartiküllerden salınan Ag^+ ’nin toksisiteye katkıda bulunan ana kimyasal tür olduğu sonucuna varmasına rağmen, bazı çalışmalar ise nanopartiküllerin oksidatif stres gibi spesifik etkilere yol açarak toksik etki gösterdiğini savunmuşlardır (Aruguete ve Hochella, 2010; Fabrega ve ark., 2009). Antimikrobiyal aktiviteye ek olarak, AgNP’lerin bazı hücre dışı enzimlerin aktivitelerini inhibe ettiği bilinmektedir (Peyrot ve ark., 2014). Nanopartiküllerin topraktaki biyolojik etkileri önemli ölçüde toprağın fiziko-kimyasal özelliklerine bağlıdır (Cornelis ve ark., 2014). Özellikle nanopartiküllerin toprak

biyolojisi üzerindeki etkinliğini ortaya çıkarmak için toprak enzimlerindeki etkinlik değişiminin anlaşılması önemlidir (Peyrot ve ark., 2014).

Malzeme biliminde, “yeşil” sentez, metal / metal oksit nanomalzemeler gibi çeşitli nanomalzemelerin sentezlenmesi için güvenilir, sürdürülebilir ve çevre dostu bir protokol olarak yoğun ilgi görmüştür. Bu nedenle, yeşil sentez, nanopartiküller için geleneksel sentez yöntemler ile ilişkili zararlı etkileri azaltmak için laboratuvarlarda ve endüstride yaygın olarak kullanılan önemli bir araç olarak kabul edilmektedir (Singh ve ark., 2018). Sentezlenen gümüş nanopartiküllerin insanlar tarafından etkili kullanımları için daha ucuz oranlarda sentezlenmesi önem arz etmektedir. Bunu sağlamak için, nanopartiküllerin elde edilmesinde çevresel ve ekonomik olarak uygun bir sentez yöntemine ihtiyaç duyulmaktadır (Prabhu ve Poulouse, 2012). Nanopartiküllerin biyolojik olarak sentezlenmesinde mevcut olan amino asitler, proteinler veya ikincil metabolitler partikül agregasyonunun önlenmesinde etkin rol almaktadırlar ve böylece sentez için gerekli ekstra adımlar ortadan kaldırılmaktadır (C. Zhang ve ark., 2016). Gümüş nanopartiküller (AgNP) birden fazla ilaca dirençli suşu yok edebilmektedir ve biyofilm oluşumunu önleyebilmektedir, bu da gümüş nanopartiküllerin antibakteriyel uygulamalarda önemli bir potansiyeli olduğunu göstermiştir (Qing ve ark., 2018).

Doğal bir biyopolimer olan jelatinin immünojenik olmaması, biyolojik olarak bozunabilirliği ve biyoyumluluğu nedeniyle, jelatin polimer implantlar için tercih edilen bir malzeme olarak nitelendirilmiştir (Rath, Hussain, Chauhan, Garg ve Kumar Goyal, 2016). Jelatin genellikle glisin, prolin, alanin ve hidroksiprolin gibi polar olmayan alifatik amino asitlerden oluşmaktadır. Hidroksiprolinin hidroksil grubu, AgNO_3 'ün indirgenmesini kolaylaştırırken, polar olmayan amino asitler AgNP'lerin stabilitesine katkıda bulunmaktadır (Nagarajan ve ark., 2012; Yiwei ve ark., 2007).

Hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar gibi doğal kaynaklardan elde edilen bileşikler, potansiyel antimikrobiyal alternatifler olarak önerilmiştir (Cardozo ve ark., 2013; Mandal ve Mandal, 2011; Perugini Biasi-Garbin ve ark., 2015). Günümüz dünyasında, gıda, yem ve lif bitkileri temel tarımsal ve ticari öneme sahip bitkiler olmakla kalmamıştır, aynı zamanda bulundurdıkları ikincil metabolitlerinin karakteristik aromatik veya terapötik özellikleri nedeniyle önemli hale gelmişlerdir (Sangwan ve ark., 2001). Bitkisel yağlar, doğal antimikrobiyal maddeler olarak, emülsiyon sistemlerin de etkinliklerini arttırmak ve bakteriyel büyümeyi engellemek için yağ fazı olarak kullanılmıştır (Langaroudi ve ark., 2019).

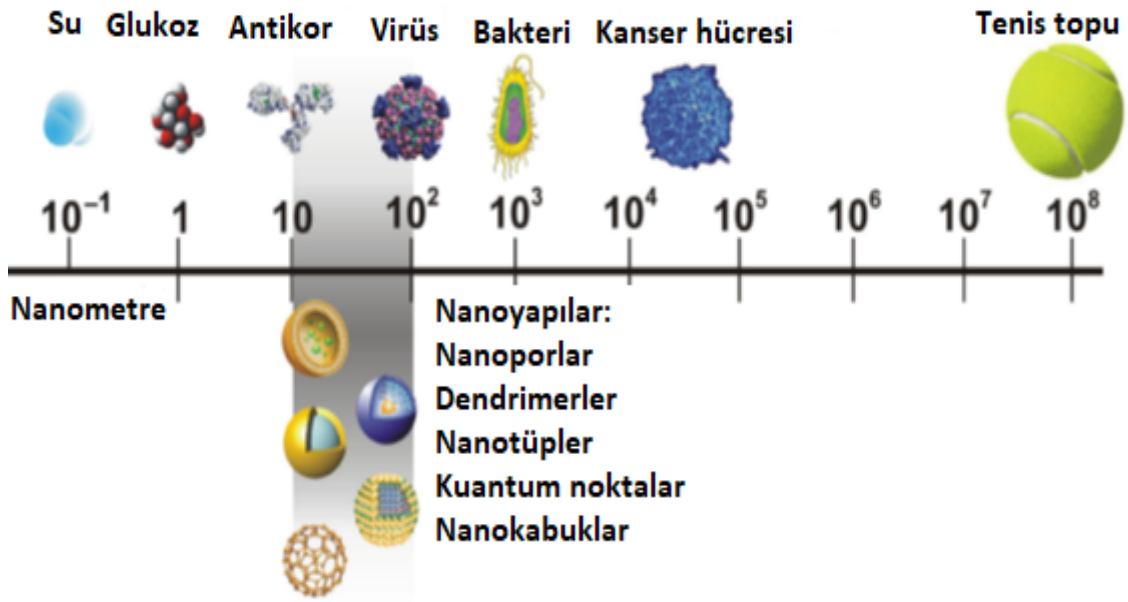
Bu tez çalışmanın amacı özellikle jelatin kullanarak sentezlenen gümüş nanopartiküllerin (AgNP) üretimi, çeşitli uçucu yağlar ile sinerjistik etkinliklerinin bazı bakteri suşlarına karşı değerlendirilmesini amaçlamıştır. Aynı zamanda sentezlenen AgNP'lerin toprak enzimleri ile toprak solunumuna etkisinin araştırılması da diğer bir hedef olarak gerçekleştirilmiştir.



2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Nanoteknoloji nedir?

“Nano” kelimesi Yunanca “cüce” kelimesinden türetilmiştir, örneğin nanoteknoloji, nanometre, nano aygıtlar veya nano robotlar gibi sözcükler geliştirmek için bir isim ile birleştirilmiştir ve bu bilim, mühendislik ve teknolojinin yeni bir dalı olarak ortaya çıkmıştır (J. N. Tiwari ve ark., 2012). Nanoteknoloji, geçen yüzyıldan beri bilinen bir araştırma alanıdır. Tokyo Bilim Üniversitesi Profesörü Norio Taniguchi 1974'te ilk kez nanoteknoloji terimini, tek atom ve molekül düzeyinde malzemelerin işlenmesini ve özelliklerini tanımlamak için kullanmıştır. Nanoteknoloji fikri derinlemesine araştırılmaya başlanmıştır ve K. Eric Drexler tarafından 1980'lerin sonunda “Engines of Creation-The Coming Era of Nanotechnology” adlı bir kitap yayınlanmıştır. 1991 yılında ise, Sumio Iijima'nın “Grafit karbonun sarmal mikrotübülleri” adlı yayını nanotüpler kavramını tanıtmıştır ve nanomalzemeler ile ilgili araştırmalar artmıştır (Zafar ve ark., 2017). Bir nanometre (nm), 10^{-9} metre uzunluğunu temsil eden SI (uluslararası birimler sistemi) birimidir. Nanopartiküllerin 1-100 nm boyutlarında atom kümeleri olduğu geniş çaplı bir kabul görmüştür (Abou El-Nour ve ark., 2010; Jeevanandam ve ark., 2018). Ne kadar küçük olduğunu hayal etmek zor olabilmektedir. Şekil 1'de nanomalzemelerin büyüklüğünü kavrayabilmek için bazı örnekler verilmiştir. Şekilde, bir insan DNA'sının çapının 2,5 nm, bir insan saçının yaklaşık olarak 80.000-100.000 nm genişliğinde, bir kâğıdın yaklaşık 100.000 nm kalınlığında, tek bir altın atomu nanometre çapının yaklaşık üçte biri ve tek duvarlı bir karbon nanotüp çapının ise 1 nm olduğu göz önüne alındığında, nanopartiküllerin boyutunu kavramak daha kolay olmaktadır (Zafar ve ark., 2017).



Şekil 2.1. Nano ölçeğin örnekler ile gösterimi (Zafar ve ark., 2017)

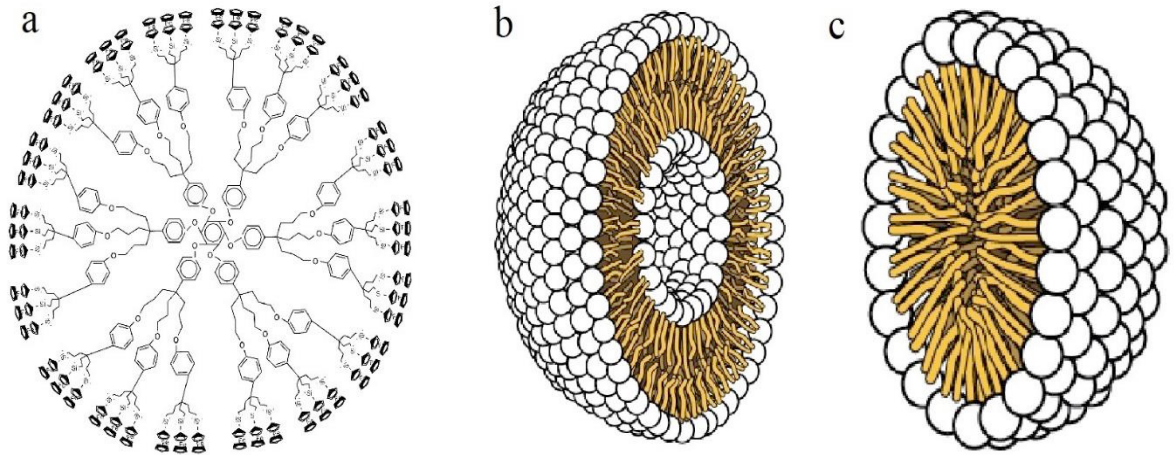
Nanoteknoloji, elektronik ve bilgi teknolojisi, sürdürülebilir enerji uygulaması, çevresel iyileştirme uygulamaları, tıp, diş hekimliği, gıda güvenliği ve ulaşım gibi birçok teknoloji ve endüstri sektörünün geliştirilmesine yardımcı olan devrim niteliğindeki bir alandır (Balshaw ve ark., 2005; Zafar ve ark., 2017). Nanomalzemeler erime noktası, ıslanabilirlik, elektriksel ve termal iletkenlik, katalitik aktivite, ışık Emilimi ve saçılımı gibi ayarlanabilir fizikokimyasal özelliklerinden ötürü, kendi emsallerine göre daha yüksek performansa yol açan teknolojik gelişmelerde öne çıkmışlardır (Jeevanandam ve ark., 2018). Nanomalzemeler, ultra küçük boyutlar, geniş yüzey alanı hacim oranı ve yüksek kimyasal reaktivite gibi gelişmiş ve benzersiz fizikokimyasal özellikleri nedeniyle çeşitli alanlarda kullanımları noktasında önemli hale gelmişlerdir (Song ve Ge, 2019).

2.2. Nanopartiküllerin Sınıflandırılması

Nanopartiküller genellikle organik, inorganik ve karbon bazlı olarak sınıflandırılmaktadır (Ealia ve Saravanakumar, 2017).

2.2.1. Organik Nanopartiküller

Moleküllerin tasarımı için kovalent olmayan (zayıf) etkileşimlerin kullanılması, organik nanopartiküllerin dendrimerler, miseller, lipozomlar ve polimer NP'ler gibi istenilen yapılara dönüştürülmesine yardımcı olmaktadır. Bu nanopartiküller biyobozunur ve toksik değildir. Miseller ve lipozomlar gibi bazı partiküller, nanokapsüller olarak da bilinen ısı ve ışık gibi termal ve elektromanyetik radyasyona karşı hassas olan içi boş bir çekirdeğe sahiptir (D. K. Tiwari ve ark., 2008).



Şekil 2.2. Organik nanopartiküller: a) Dendrimerler, b) Liposomlar ve c) miseller (Ealia ve Saravanakumar, 2017)]

2.2.2. İnorganik Nanopartiküller

İnorganik nanopartiküller, karbondan oluşmamış parçacıklardır. Metal ve metal oksit bazlı nanopartiküller, genel olarak inorganik nanopartiküller olarak sınıflandırılır. Bu NP'ler altın veya gümüş nanopartiküller gibi metaller, titanyum dioksit ve çinkooksit nanopartiküller gibi metal oksitler halinde sentezlenmektedirler (Jeevanandam ve ark., 2018).

Metal esaslı nanopartiküller, küçük boyut ve yüksek yüzey alanı ile karakterize edilmektedir. Metallerden nanometrik boyutlara kadar ya yıkıcı ya da yapıcı yöntemlerle sentezlenen nanopartiküller metal esaslı nanopartiküllerdir. Hemen hemen tüm metaller nanopartiküller şeklinde sentezlenebilmektedir (Ealia ve Saravanakumar, 2017). Metal nanopartiküllerin bakteriler üzerindeki toksisite mekanizması ise değişken olabilmektedir. Çoğu metal tüm hücre tipleri için toksiktir, ancak bakteriler arasında bu etkinlik değişkenlik gösterebilmektedir. Antibakteriyel aktivite yönünden çalışılan ve etkinlikleri bildirilen metal esaslı nanopartiküller gümüş, demir, demir oksit, bakır oksit, çinko oksit, alüminyum oksit, titanyum dioksit, altın ve galyum nanopartiküllerini içermektedir (Aderibigbe, 2017).

Metal ve oksijen elementleri hem yüksek hem de düşük erime noktalı metallerin bulunabileceği metal oksitleri oluşturmak için birleşir. Farklı elektronik yapılarına bağlı olarak metal oksitler metalik, yarı iletken ve yalıtkan özellikler sergiler. Metalik ve yarı iletken metal oksitler, periyodik tablonun 3-12 gruplarından metallerle oksitlerin bir araya gelmesiyle oluşturulurken, yalıtkan metal oksitler 1, 2 ve 13-18 gruplarındaki metallerden oluşturulur. Bu tür bir nanomalzeme sınıfı, 1 ila 100 nm arasında değişen ve farklı şekil

ve boyutlarda mevcut olan metal oksit (MeO) nanopartiküllerdir (NP'ler). Metal oksit nanopartikülleri, esasen artan reaktivite ve verimleri nedeniyle sentezlenmektedir. Bu nanopartiküller, metal benzerleriyle karşılaştırıldığında olağanüstü bir özelliğe sahiptir (Gangwar ve ark., 2016). Antibiyotiklere karşı mikrobiyal direnç kritik bir seviyeye ulaşmaktadır. Bu sorunu çözmek için çeşitli seçenekler araştırılırken, metal oksit nanopartikülleri gibi inorganik nanomalzemeler, organik olanlara kıyasla daha fazla dayanıklılık, daha düşük toksisite, daha yüksek stabilite ve seçiciliğe sahip olduklarından umut verici adaylar olarak ortaya çıkmıştır (Stankic ve ark., 2016)

2.2.3. Karbon Bazlı Nanoparçacıklar

Genel olarak, bu nanoparçacıklar karbon içerir ve içi boş tüpler, elipsoidler veya küreler gibi morfolojilerde bulunur. Karbon bazlı nanomalzemeler sp² hibritleştirilmiş karbon bağlarının ayırt edici özellikleri ile, nano ölçekte fizik ve kimyanın olağandışı özelliklerini birleştirmektedir (Mauter ve Elimelech, 2008). Karbon nanotüpler, 1 nm kadar küçük çaplı ve birkaç nm ile birkaç mikron uzunluğundaki tübüler karbon formudur. Nanotüpü oluşturan karbon atomlarının atomik düzenine bağlı olarak, doğada metalik veya yarı iletken halde olabilmektedir. Bu da benzersiz elektriksel, mekanik, optik ve termal özellikleri ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Bu nedenle karbon nanotüpler çeşitli uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Purohit ve ark., 2014). Fullerenin yapısı benzersiz kimyasal, optik ve yapısal özellikler göstermektedir (Mauter ve Elimelech, 2008). Fulleren, grafit ve elmasan sonra üçüncü alotropik karbon formu olarak kabul edilmektedir. 1985 yılında keşfedilen fullerenin oluşturduğu bir ikozahedral yapı simetrik olarak kapalı kafes şeklindedir. 20 altıgen ve 12 beşgen ile 7 Å çapında bir futbol topu şeklinde düzenlenmiş 60 karbon atomlu (C₆₀) bir moleküldür (Siqueira ve Oliveira, 2017). Grafen, benzersiz kimyasal, elektrik, malzeme, optik ve fiziksel özellikleri ile karakterize edilen, tek atomlu ve iki boyutlu bir karbon tabakadır. Son zamanlarda, bazı araştırmalar grafen-nanopartikül hibrit yapılarının algılama uygulamaları için arzu edilen ve avantaj sağlayan bir dizi benzersiz fizikokimyasal özellik sunmak için sinerjistik olarak etki edebileceğini göstermiştir. Bu grafen-nanoparçacık yapıları özellikle ilgi çekicidir, çünkü sadece nanoparçacıkların ve grafenin bireysel özelliklerini sergilemekle kalmaz, aynı zamanda çeşitli algılama mekanizmaları kullanarak elde edilebilir hassasiyet ve seçiciliği artıran ek özellikler de sergileyebilmektedirler (Yin ve ark., 2013).

2.3. Nanopartiküllerin Sentez Yöntemleri

Nanopartiküllerin sentezi için çeşitli yöntemler kullanılabilir, ancak bu yöntemler genel olarak iki ana sınıfa ayrılmıştır. Bunlar, aşağıdan yukarıya yaklaşım ve yukarıdan aşağıya yaklaşım olarak sınıflandırılmaktadır (Jamkhande ve ark., 2019).

2.3.1. Yukarıdan Aşağıya Doğru Sentez (Top-Down)

Bu yöntemde parçalayıcı yaklaşım kullanılmaktadır. Daha büyük molekülden başlayarak daha küçük birimlere ayrılan malzeme daha sonra da uygun NP'lere dönüştürülmektedir. Yukarıdan aşağıya yaklaşımda, uygun bir başlangıç materyali fiziksel veya kimyasal araçlar kullanılarak küçültülmektedir (Rajput, 2015). Yukarıdan aşağıya yaklaşımın en büyük dezavantajı, yüzey yapısının kusurudur. Yüzey yapısındaki bu tür kusurlar, yüksek en boy oranından dolayı metalik nanopartiküllerin fiziksel özellikleri ve yüzey kimyası üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilmektedir. Metalik nanopartiküllerin fiziksel sentezi için aşındırma ve piroliz gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Aşındırmada, makro ölçekli veya mikro ölçekli parçacıklar boyut küçültme mekanizması ile öğütülmektedir (Thakkar ve ark., 2010)

2.3.2. Aşağıdan Yukarıya Doğru Sentez (Bottom Up)

Aşağıdan yukarıya veya kendi kendine montaj, atom-atom, molekül-molekül veya küme-küme yapısının yapımını ifade etmektedir. Bu yaklaşımda, başlangıçta nanoyapılı yapı blokları (yani nanopartiküller) oluşturulmakta ve daha sonra sentez için kimyasal veya biyolojik prosedürler kullanılarak nihai materyale birleştirmektedir. Aşağıdan yukarıya yaklaşımın en belirgin avantajı, nispeten daha az kusurlu ve daha homojen kimyasal kompozisyonlar ile metalik nanopartikül elde etme olasılığının artmasıdır (Mukherjee ve ark., 2001; Thakkar ve ark., 2010).

2.4. Nanopartikül Dizaynı

Son yıllarda nano-biyolojik etkileşimler üzerine yapılan çalışmaların sonuçları nanopartikül tasarımı büyük ölçüde etkilemiştir. Boyut, şekil veya yüzey yükünün etkisi araştırıldıkça malzeme tasarımı da gelişmiştir. Bugüne kadar biyomedikal uygulamalar için, üç nesil nanopartikül tasarlanmıştır. Birinci nesil, biyouyumluluk ve toksisiteyi değerlendirmek için temel yüzey kimyası ile işlevselleştirilmiş yeni nanomalzemelerden oluşmuştur. Biyomedikal araştırmalarda yeni materyallerin potansiyel uygulamalarını göstermek için ilk nesil nanomalzemeler sentezlenmiştir. Birinci kuşak nanopartiküller hücre alımını ve toksisiteyi değerlendirmek için kullanılmıştır. Bu malzemelerin ana odağı yüzey yükünün etkilerini belirlemek olarak ortaya çıkmıştır. İkinci nesil, biyolojik sistemlerde istikrarı ve hedeflemeyi geliştiren optimize edilmiş yüzey kimyasına sahip

nanomalzemeler üretimini sağlamıştır. Üçüncü nesil nanomalzemeler “çevreye duyarlı” özelliklere sahip olarak ortaya çıkmıştır (Albanese ve ark., 2012).

2.5. Gümüş Nanopartiküller

Gümüş, tarih boyunca değerli bir metal olarak değerlendirilmiştir ve antik çağlarda altından daha değerli olduğu düşünülmüştür. Beyaz parlaklığı ile gümüş, saflığın sembolü olarak kabul edilmiştir. Simyacılar, gümüşü ayla ilişkilendirmişler ve bu nedenle onu beyinle ilgili rahatsızlıkları tedavi etmek için kullanmışlardır. Ayrıca, Arabistan'da vertigo ve epilepsi tedavisinde kullanılmıştır. Gümüşün tıbbi özellikleri 2.000 yıldan fazla bir süredir bilinmektedir. On dokuzuncu yüzyıldan beri gümüş bazlı bileşikler birçok antimikrobiyal uygulamada kullanılmaktadır. Gümüş iyonlarının ve gümüş bazlı bileşiklerin mikroorganizmalar için oldukça toksik olduğu bilinmektedir. Gümüşün bu yönü, tıbbi alanda birden fazla uygulama için oldukça önemlidir (Prabhu ve Poulouse, 2012). Koloidal gümüş, yara antiseptiği ve cilt enfeksiyonları için sitrat tuzları ile birleşim halinde kullanılmıştır. Yüzde bir ile iki oranında gümüş nitrat, yaklaşık 100 yıl önce “Oftalmia Neonatorum” tedavisi için kullanılmıştır. Kısa bir süre sonra gümüş asetat göz losyonları ve kremler halinde formüle edildi ve iyonize olmayan, suda çözünmeyen toz (%1) olan gümüş sülfadiazin, 1968'de yanık yaralarının tedavisi ve enfeksiyonların önlenmesi için kremlerde uygulanmıştır ve halen kullanılmaktadır (Ahearn ve ark., 1995). Ayrıca, AgNP'lerin eşsiz optik saçılma özellikleri, sinyal güçlendirme, optik algılama, biyobelirteçler (biyomarker) ve in-vivo görüntüleme ajanları için uygulamalarda kullanımı bulunmaktadır (Schrand ve ark., 2010). AgNP'lerin ilgili özelliklerinden dolayı birçok ticari üründe yer aldığı bilinmektedir. AgNP içeren ticari ürünlerin oranları Tablo 2.1.'de belirtilmiştir.

Tablo 2.1. Gümüş nanopartiküller içeren piyasadaki başlıca ürünler (Fabrega ve ark., 2011)

AgNP içeren ürün sınıfı	Bulunma oranı (%)
Krem ve Kozmetik ürünlerde	32.4
Tekstil ürünlerinde	18.0
Ev eşyalarında	16.4
Hava ve su filtrelerinde	12.3
Diğerleri	8.6
Deterjanlarda	8.2
Sağlık takviye ürünlerde	4.1

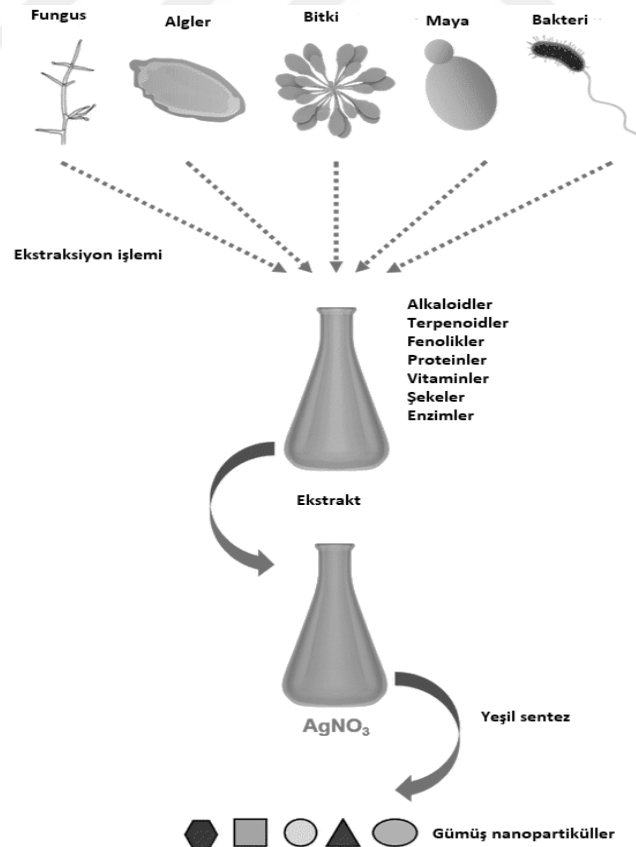
2.5.1. Gümüş Nanopartiküllerin Sentezi

Gümüş nanopartiküllerin sentezinde genel olarak, fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler dahil olmak üzere üç farklı yaklaşım kullanılmıştır (X.-F. Zhang ve ark., 2016). Buhar yoğunlaşması ve lazerle ablasyon en önemli fiziksel yaklaşımlardır (Abou El-Nour ve ark., 2010; Iravani ve ark., 2014) .

Gümüş NP'lerin sentezi için en yaygın yaklaşım organik ve inorganik indirgeme ajanları tarafından yapılan kimyasal indirgemedir. Yaygın olarak kullanılan indirgeyiciler borohidrit, sitrat, askorbat ve hidrojenidir. Gümüş iyonlarının (Ag^+) sulu çözeltideki indirgenmesi, genellikle birkaç nanometre parçacık çapları ile koloidal gümüş vermektedir. Başlangıçta, çeşitli komplekslerin Ag^+ iyonları ile indirgenmesi gümüş atomlarının (Ag^0) oluşumuna yol açar. Bunu oligomerik kümelerle aglomerasyon izler. Bu kümeler nihayetinde koloidal Ag parçacıklarının oluşumuna yol açar. Metal nanopartikül sentezi sırasında dispersif NP'leri stabilize etmek için koruyucu ajanların kullanılması ve topaklanmalarını engelleyerek nanopartikül yüzeylerine emilebilecek veya bağlanabilecek NP'lerin korunması önemlidir. Polivinil alkol, polivinilpirolidon, polietilen glikol, polimetakrilik asit ve polimetilmetakrilat gibi polimerik bileşiklerin, NP'leri stabilize etmek için etkili koruyucu ajanlar olduğu bilinmektedir. Kimyasal yöntemler, kriyokimyasal sentez, lazer ablasyonu, litografi, elektrokimyasal indirgeme, lazer ışıma, sonodekompozisyon, termaldekompozisyon ve kimyasal indirgeme gibi teknikleri içermektedir (Iravani ve ark., 2014; Oliveira ve ark., 2005; Wiley ve ark., 2005). Kimyasal aracılı nanopartikül sentezinin temel avantajı, kataliz, veri depolama, ilaç dağıtımı, görüntüleme ve algılama gibi birçok araştırma alanında yaygın olarak kullanılabilir parçacıkların üretilmesine izin vermesidir. Ayrıca, kimyasal nanopartikül sentezinin çalışma prensipleri kolayca tahmin edilebilir (Deepak ve ark., 2019). Diğer yandan, kimyasal nanoteknolojinin ortaya çıkışı yaşam standardını yükseltmesine rağmen, su ve hava kirliliği de dahil olmak üzere birçok kirliliğe sebep olmuştur. Nanoteknolojiye dayalı bu sorun canlı organizmalar için çok tehlikeli olmaktadır. Ek olarak biyolojik senteze göre pahalı bir yöntem olarak ortaya çıkmaktadır (Shinde ve ark., 2012).

Gümüş nanopartiküllerin üretiminde bitkilerin kullanımı, hızlı, çevre dostu, ekonomik olması ve biyosentetik süreçler için tek adımlı bir teknik sağlaması ve patojenik olmaması nedeniyle dikkat çekmektedir. Bitkilerin ağır metalleri biriktirme ve detoksifiye etme kabiliyetlerinin iyi olduğu kanıtlanmıştır. Genel olarak, gümüş metali nanopartiküllerin sentezlenmesi sürecinde biyo indirgeyici olarak kullanılır. Bir bitki özü, metal iyonlarının

azaltılmasından sorumlu bir dizi metabolit ve indirgeyici biyomoleküller içermektedir. Bunlar terpenoidler, flavonlar, ketonlar, aldehytler, amidler, karboksilik asitler, karbonhidratlar, proteinler ve vitaminler olarak sıralanmaktadır. Pek çok olası doğal ürün arasında, polisakaritler bu amaç için mükemmel bir iskeleyi temsil etmektedir. AgNP'lerin sentezi için nişasta ve kitosan gibi polisakaritlerin kullanımı son yıllarda önem kazanmıştır (Roy ve ark., 2019). Gümüş nanopartiküllerin biyosentezi, çoğunlukla indirgenme/yükseltgenme reaksiyonlarını içeren aşağıdan yukarıya bir yaklaşımdır. Biyolojik yöntemler kullanılarak nanopartiküllerin hazırlanmasında rol oynayan üç ana bileşen sentez için çözücü ortam, çevre dostu indirgeyici ajan ve toksik olmayan bir dengeleyici ajan olarak sıralanmaktadır (Prabhu ve Poulouse, 2012). Biyolojik yöntemler kimyasal yöntemlerle karşılaştırıldığında, öncüllerin miktarı, sıcaklık, pH, indirgeyici ve stabilize edici faktörlerin miktarı da dahil olmak üzere sentez yöntemlerinin optimizasyonu ile üretilen nanopartiküllerin şekil, büyüklük ve dağılımının kontrolü biyolojik yöntemlerle üretimde daha kolaydır (C. Zhang ve ark., 2016). Nanopartiküllerin sentezinde bitkiler, mantarlar ve bakteriler de dahil olmak üzere birçok biyolojik kaynak kullanılmıştır (Zhao ve ark., 2018).



Şekil 2.3. Çeşitli biyolojik organizmalar kullanılarak gümüş nanopartiküllerin yeşil sentezi için prosedürün şematik gösterimi (Roy ve ark., 2019).

2.5.2. Gümüş Nanopartiküllerin Uygulama Alanları

Tıp alanındaki çalışmalar, gümüşün geniş bir aktivite spektrumuna sahip 650'den fazla patojene karşı etkili olduğunu göstermiştir. Gümüşün nanopartiküller şeklinde kullanımı, bu özelliği geliştirerek çok çeşitli uygulamalarda kullanılmasına izin vermektedir (Salomoni ve ark., 2017). Antibakteriyel özellikleri nedeniyle, gümüş nanopartiküller sağlık endüstrisinde, gıda depolamasında, tekstil kaplamalarında ve bir dizi çevresel uygulamalarda en yaygın kullanılan nanopartiküllerdir. Onlarca yıldır kullanılmasına rağmen, gümüşün toksisitesinin kanıtlarının hala net olmadığına dikkat etmek önemlidir. Gümüş nanopartiküller ile hazırlanan ürünler, ABD FDA, ABD EPA, Japonya SIAA ve Kimya Endüstrisi Araştırma Enstitüsü ve FITI Test ve Araştırma Enstitüsü dâhil olmak üzere bir dizi akredite kuruluş tarafından onaylanmıştır (Ahmed ve ark., 2016)

2.5.3. Gümüş Nanopartiküllerin Antibakteriyel Etkinlikleri

Gümüş, süt şişelerinde mikroorganizmaların kontaminasyonunu engellemek için doğal bir biyosit olarak Fenikeliler tarafından kullanımına uzanan uzun bir antimikrobiyal kullanım geçmişine sahiptir. AgNP'ler birden fazla ilaca dirençli suşu yok edebilmekte ve biyofilm oluşumunu önleyebilmektedir, bu da antibakteriyel uygulamada önemli bir potansiyel ortaya çıkarmaktadır (Yun'an Qing ve ark., 2018). Hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif bakterilere karşı sergilenen geniş bakterisidal etkileri ve fizikokimyasal özellikleri sayesinde AgNP'ler, modern antimikrobiyal uygulamalarda en çok kullanılan metalik nanopartiküllerden birisidir (Burduşel ark., 2018). Mikroorganizmalar ile etkileşimde geniş yüzey alanına sahip küçük boyutlu AgNP'lerin daha büyük boyutlu AgNP'lerden daha fazla bakterisidal etki gösterdikleri bilinmektedir. AgNP'lerin sadece membran yüzeyi ile etkileşime girmesi değil, aynı zamanda bakterilerin içine de girmesi de mümkündür (Sharma ve ark., 2009). AgNP'lerin antibakteriyel mekanizmasında iki önerme yaygın olarak kabul edilmektedir. Bunlar direkt temas ile öldürme ve iyon aracılı öldürme olarak belirlenmiştir. AgNP'ler, yığın haldeki gümüşten daha farklı ve üstün fizyokimyasal ve biyolojik özelliklere sahiptir. AgNP'lerin bakteri hücre duvarına tutunabileceği ve sonuç olarak buna sızabileceği yapılan çalışmalarla rapor edilmiştir (Yun'an Qing ark., 2018). Nanopartiküller hücre zarına bağlanmakta ve bakterilerin içine nüfuz etmektedir. Bakteriyel zar ortamı sülfür içeren proteinler içerir ve gümüş nanopartiküller hücredeki bu proteinlerle ve DNA gibi fosfor içeren bileşiklerle etkileşmektedir. Nanopartiküller özellikle solunum zincirine saldırır ve hücre bölünmesi

devamında hücre ölümüne yol açmaktadır. Nanopartiküller bakteri hücrelerinde bakteri öldürücü aktivitelerini arttıran gümüş iyon salınımının etkisi de değerlendirilmiştir (Rai ve ark., 2009). Gümüş nanopartiküllerin antimikrobiyal özellikleri çevre koşulları (boyut, pH, iyonik kuvvet) ve kapaklama ajanı olmak üzere iki ana etkene bağlı olduğu ele alınmıştır (Ahmed ve ark., 2016).

2.6. Gümüş Nanopartiküllerin Toprak Enzimleri Üzerindeki Etkinliği

AgNP'lerin toprakta bulunması ve birikmesi nedeniyle toprak ekosistemi üzerindeki etkisi bir araştırma projesi olarak giderek daha popüler hale gelmektedir. Toprak sağlığının “sensörleri” olarak toprak enzimlerinin biyokimyasal ve mikrobiyolojik rolleri bulunmaktadır (Caldwell, 2005). Toprakta bulunan enzimler ya hücre içi (yani canlı organizmalarda bulunur) ya da hücre dışıdır (yani organizmalar tarafından salınır). Hücre dışı enzimler hem toprak çözeltisinde hem de toprak bileşenlerine bağlı olarak bulunabilir (M A Tabatabai, 2002). Mikrobiyal çeşitlilik, çeşitli biyojeokimyasal süreçler ve metabolik yollar üzerinde fonksiyonel önemi olan toprak enzimleri aracılığıyla ifade edilebilmektedir (Nannipieri ve ark., 2002). AgNP'ler için doğrudan kimyasal ve fiziksel olarak karmaşık bir sistem olan toprak ortamında birkaç toksikolojik çalışma yapılmıştır. Gümüşün toprak organik maddesi ve tiyol bileşikleri için yüksek bir afiniteye sahip olduğu bilinmektedir, bu nedenle AgNP'lerin toprak mikroorganizmaları üzerinde doğrudan etkileri ve amino asitler açısından zengin toprak enzimleri üzerinde dolaylı etkileri olabileceği düşünülmektedir (Jacobson ve ark., 2005; Wigginton ve ark., 2010). Toprakların AgNP kontaminasyonu çok sayıda toprak mikroorganizmasını doğrudan etkileyebilmekte, ancak toprak enzimleri üzerindeki etkileri yoluyla dolaylı etkileri de olabilmektedir. Topraklardaki AgNP kontaminasyonunun genel sonuçları, besin döngüsü ve mikrobiyal olarak aracılık edilen birçok biyojeokimyasal süreçte potansiyel olarak görülmektedir (Peyrot ve ark., 2014). Birçok araştırmacı, nanopartiküllerin saf topraktaki mikroorganizmalar ve enzimler üzerindeki etkilerini incelemiştir. Shin ve ark. (2012) AgNP'lerin 100-1000 µg/g kuru toprak konsantrasyonlarında, özellikle dehidrojenaz ve üreaz aktiviteleri üzerinde bariz inhibisyon gösterdiğini bulmuşlardır. Yapılan başka bir çalışmada ise gümüş nanopartiküller (0, 0.024, 0.24, 4.80 ve 9.60 µg/g kuru toprak) ile muamele edilmiş sulak alan bitkilerinin (*Iris wilsonii*, *Arundo donax* ve *Typha orientalis*) rizosferinde beş toprak ekzoenzimi (dehidrojenaz, üreaz, asit fosfataz, nötr fosfataz ve alkalin fosfataz) incelemiştir. Ag NP'lerin, bu çalışmada test edilen tüm ekzoenzim aktivitelerini inhibe

edebildiği bulunmuş, özellikle yüksek AgNP seviyelerinin (4.80 ve 9.60 µg/g kuru toprak) belirgin inhibisyon etkinliğinin olduğunu gözlemlemişlerdir (Cao ve ark., 2017).

2.7. Uçucu Yağların AgNP'ler ile Sinerjistik Etkinliği

Uçucu yağlar (EO'lar), aromaterapinin temel bileşenleridir ve bitkisel ilaç uygulamasında kullanımlarının kayıtları MÖ 4500'den beri bilinmektedir. Bitkilerin farklı kısımlarından ekstrakte edilen bitki esansiyel yağları (EO'lar), çeşitli aktif ve aromatik bileşiklerin karmaşık bir kombinasyonuna sahiptir (Plant ve ark., 2019). Her bir EO'nun bileşimi ve gücü, özütlendikleri bitkinin bölümüne bağlı olarak değişebilmektedir. EO'lar hidrokarbonlar, terpenler, fenoller ve aldehitlerin bir karışımı olarak ortaya çıkmakta ve 1 yağ 80 ile 300 farklı hidrokarbon içerebilmektedir (Shawn, 2015). Nane yağının hem tıbbi hem de gıdalarda lezzet verici bir ajan olarak bilinen bir kullanım öyküsü bulunmaktadır. Nane yağı ağız bakımı, şekerleme, kozmetik ve içecekler için kullanılmaktadır. Nane'nin tarihi Antik Mısırlılara kadar uzanmaktadır. Bu yağın, güçlü antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteler gösterdiği bilinmektedir (Elansary ve Ashmawy, 2013). Ayrıca üst solunum yolu enfeksiyonlarını, kaşıntıyı, inflamatuvar bağırsak sendromunu tedavi etmek ve anestezi olarak kullanılmaktadır. Mentol, yağın %29 ila %48'ini oluşturan ana bileşendir (Kligler ve Chaudary, 2007). Karanfil yağı, karanfil ağacından elde edilmektedir. Öjenol, öjenil asetat ve β-karyofillen vb. gibi ana bileşenlerle birlikte %84-95 fenol içermektedir. Karanfil yağının çeşitli bakteri ve mantar patojenlerine karşı da güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Ahmad ve ark., 2005; Myint ve ark., 1995).

Literatürde yapılan çalışmalar bakıldığında uçucu yağlar ve gümüş nanopartiküllerin birlikte kullanımının antimikrobiyal aktivitede sinerjistik etki oluşturduğu görülmüştür. Bu çalışmalardan bir tanesinde, *Fusarium oxysporum* tarafından üretilen biyolojik olarak sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerin ve *Oreganum vulgare* uçucu yağının kombinasyonunun, çoklu ilaca dirençli suşlar dahil olmak üzere Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı antibakteriyel etkisini değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, iki bileşiğin kombinasyonunun tek başına kullanılan AgNP'ye kıyasla MİK değerlerini ve etki süresini azaltan bir sinerjistik etki ortaya çıkardığını göstermiştir (Scandorieiro ve ark., 2016). Diğer bir çalışmada ise, öjenolün tek başına ve *Fusarium oxysporum* (AgNPbio) aracılığı ile üretilen gümüş nanopartiküllerle kombinasyon halinde kullanımının *Streptococcus agalactiae* üzerindeki etkisi incelenmiştir. Öjenolün tüm suşların planktonik hücrelerine karşı bakterisidal bir etki gösterdiği ve bu etkinin AgNP ile kombinasyonunda ise her iki bileşiğin MİK değerlerini

önemli ölçüde azaltan güçlü bir sinerjistik aktivite ile sonuçlandığı ortaya çıkarılmıştır (Perugini Biasi-Garbin ve ark., 2015).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Nanopartikül Sentezi

Gümüş nanopartikül sentezinde kullanılan jelatin (B tip, G6650 ürün numarası) ve diğer kimyasallar Sigma'dan temin edildi. Karanfil (*Eugenia caryophyllata*) ve nane (*Mentha piperita*) uçucu yağı %100 değerinde 10 mL hacminde (Mecitefendi markalı) ticari ürün olarak satın alındı. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar American Type Culture Collection'dan (ATCC, Rockville, MD) temin edildi. Deneyde kullanılan tüm cam kaplar kullanılmadan önce distile su ile yıkandı. Gel-AgNP'leri hazırlamak için, AgNO₃'ü AgNP'lere indirgemede toksik olmayan bir ajan olan jelatin çözeltisi kullanıldı. Kısaca, sulu jelatin solüsyonu (1 g, 100 mL) 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlandı. Daha sonra jelatin solüsyonuna 27 mg AgNO₃ (1 mL H₂O içinde) solüsyonu eklendi. Ev tipi mikrodalga (Arçelik, MD 574) kullanılarak orta şiddette reaksiyon 25 dakika boyunca gerçekleştirildi. Gel-Glu-AgNP'leri hazırlamak için ise sulu jelatin solüsyonu (1 g, 100 mL) 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılarak hazırlandıktan sonra içerisine 60 mg glukoz ilave edildi. Daha sonra jelatin solüsyonuna 27 mg AgNO₃ (1 mL H₂O içinde) solüsyonu eklenerek 80 °C' de 90 dakika boyunca sentez gerçekleştirildi.

3.2. Sentezlenen Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Sentezlenen Gel-AgNP'lerin optik (UV-Vis) spektrumları Cary 60 UV-Vis spektrofotometresi (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD) ile 200-800 nm dalga boyu aralığında kaydedildi. Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) incelemesi, 4000–400 cm⁻¹ aralığında bir Shimadzu IR Prestige-21 FTIR-ATR spektrometresi kullanılarak elde edildi. Gel-AgNP'lerin kristal yapısının belirlenmesinde, 20-80 derece aralığında ve 0.02 adım boyutunda X-ışını kırınım (XRD) sistemi (PANalytical Empyrean) kullanıldı. Sentezlenen NP'lerin kimyasal bileşim analizi ve morfolojisi taramalı elektron mikroskopuyla (SEM, Hitachi SU 1510) ilişkili bir EDS analizörü kullanılarak gerçekleştirildi. Aynı zamanda AgNP'lerin morfolojik ve boyut analizleri taramalı geçirimli elektron mikroskopu (STEM) modunda ZEISS GeminiSEM 500 cihazında incelendi. Gümüş nanopartiküllerin morfoloji açısından incelenmesi geçirimli elektron mikroskopu (TEM, Hitachi HighTech HT7700) analizi ile hava ile kurutulmuş numuneler üzerinde 120 kV hızlandırma voltajı ile gerçekleştirildi. Ayrıca, Gel-AgNP'lerin sonikasyonu gerçekleştirilmesinin ardından bir Malvern ZEN 3600 Nano ZS Zetasizer (Malvern Instruments, UK) kullanılarak Gel-AgNP'lerin ortalama yüzey

yükünü tanımlamak için nanopartiküller ultra saf su ile 1:2 oranında seyreltilerek ölçüm 633 nm'lik bir dalga boyu ve 173° geri yansıma açısı ile gerçekleştirildi. Yine aynı cihazda sentezlenen AgNP'lerin boyut dağılımı, dinamik ışık saçılması (DLS) kullanılarak belirlendi.

3.3. Antibakteriyel Aktivite Ölçümleri

Gel-AgNP'lerin ve uçucu yağların antibakteriyel aktivite değerlendirilmesi, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 25922, agar difüzyon testi ile değerlendirildi. Yaklaşık olarak 1×10^8 ve 2×10^8 arasında koloni oluşturan birim (KOB/mL) arasında bir bakteri süspansiyonuna karşılık gelen 0,5 McFarland standardı hazırlandı. Mueller Hinton agar (MHA, Lab M, Birleşik Krallık) plakalarında oluşturulan 7 mm çapındaki oyukların her birine örneklerden 50 µL ilave edildi. Temin edilen uçucu yağlar ise 62.5 µL alınarak 1 mL deiyonize su ile tamamlanarak çalışma konsantrasyonu elde edildi. Bu konsantrasyon en fazla aktivite gösteren karanfil yağının nanopartiküllere en yakın antibakteriyel konsantrasyonu olarak seçildi. Sinerjistik aktivite için ise, eşit hacimdeki nanopartikül ve uçucu yağ karışımı manyetik karıştırıcıda bir saat karıştırma işlemine tabi tutuldu ve her bir kuyuya 50 µL bu karışımdan ilave edildi. Daha sonra inhibisyon bölgelerinin çaplarının ölçümü (mm), plakaların 37 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra bir kumpas yardımı ile gerçekleştirildi. Denemeler üç tekrarlı şekilde gerçekleştirildi.

3.4. Test Toprağının Hazırlanması ve Toprak Özelliklerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan toprak örnekleri Konya ili Selçuk Üniversitesi kampüs bölgesinden 20 farklı konumdan toprak yüzeyinden (0-30 cm derinlik) toplandı. Topraklar tamamen karıştırıldıktan sonra artık malzemeler elimine edildi. Numune alındıktan sonra toprak numuneleri biyolojik analiz için 4 °C'de tutuldu. Havada kurutulmuş toprak örnekleri 2 mm çapındaki elekten geçirildi ve toprak örnekleri bazı fiziksel ve kimyasal analizleri için kullanıldı. Taze toprak örneklerinden 1 kg olacak şekilde saksılara yerleştirildi

Toprak özellikleri belirtilen standartlara göre analiz edildi. Kum (50–2000 µm), silt (20–50 µm), kil (<2 µm) olarak toprak fraksiyonlarını belirlemek için Bouyoucos hidrometre yöntemi kullanıldı (Gee ve Bauder, 1986). Organik madde, bir LECO CN-2000 aleti kullanılarak Dumas kuru yakma yöntemiyle gerçekleştirildi (Wright ve Bailey, 2001). Kalsiyum karbonat içeriğini (CaCO_3) ölçmek için Scheibler kalsimetresi kullanıldı (Nelson, 1983). Toprak agregat stabilitesi, Gugino ve ark. (2009) tarafından belirtilen

protokole göre yapay bir çökeltme simülatör cihazı ile belirlendi (Gugino ve ark., 2009). Tarla kapasitesi (TK), 33 kPa basınç altında toprak ağırlığında tutulan nemin yüzdesi olarak bir baskı plakası kullanılarak belirlendi. Kalıcı solma noktası (SN), 1500 kPa basınçta toprakta tutulan nemin yüzdesi olarak bir baskı plakası kullanılarak ortaya çıkarıldı (Klute, 1986). Daha sonra TK değerinden SN değeri çıkarılarak faydalı su kapasitesi (FSK) elde edildi. Toprak numunesinin pH'ı ve EC'si, sırasıyla dijital göstergeli cam elektrot pH metre ve iletkenlik ölçer kullanılarak 1:2.5 (a/h) toprak/saf su karışımında ölçüldü (McLean, 1983; Rhoades, 1982). Toprak özellikleri Tablo 4.1'de özetlendi.

3.5. Toprak Solunumunun ve Toprak Gümüş İçeriğinin Ölçülmesi

Gel-AgNP'ler, Gel-Glu-AgNP'ler, karanfil uçucu yağ ve nane uçucu yağı ile bunların kombinasyonları, saksılara yerleştirilen toprak örneklerine 0.2-0.4 ve 0.6 mL/250 g kuru toprak dozlarında iki tekerrür olacak şekilde uygulandı. Bu işlemin ardından toprak su içeriği belirlenen tarla kapasitesine getirilmiş ve daha sonra karıştırılarak belirlenen zaman periyotlarında inkübasyona bırakıldı. Saksılardaki toprak örnekleri enzim analizleri için 1., 5. ve 10. günlerde alındı. Toprak soluma testi için sadece 10. gün sonundaki örnekler değerlendirildi. Örneklerin toprak solunumu üzerindeki etkisini değerlendirmek için Cornell Toprak Sağlığı Değerlendirmesi eğitim kılavuzunu takip edildi (Moebius-Clune ve ark., 2016). Kısaca, havada kurutulan ve 2 mm elekten elenen toprak (20 g), bir kavanozun dibinde filtre kâğıdı bulunan delikli bir metal kap üzerine konuldu. Toprak 28°C'de 96 saat 9 mL 0.5 M potasyum hidroksit (KOH) ve 7.5 mL deiyonize su ile inkübe edildi. Kontrol numunelerine sadece deiyonize su ilave edildi. Daha sonra, her numune için KOH tuzağının EC'sini almak için bir EC probu kullanılarak elektriksel iletkenlik (EC) ölçümleri yapıldı ve ardından mg CO₂-C/g toprak olarak hesaplama gerçekleştirildi.

Deney boyunca topraklardaki Ag içerikleri, indüktif eşleşmiş plazma-atomik emisyon spektrometresi (Varian, vista\AX CCD Simultaneous ICP-OES, Varian, Avustralya) kullanılarak gerçekleştirildi. 0.5 g kurutulmuş ve öğütülmüş toprak örneklerine nitrik asit (HNO₃, 15 mL) ilave edildi ve daha sonra 120 °C'de 5 saat mikrodalga fırında (Mars-5, CEM) inkübe edildi. Daha sonra numuneler Whatman No. 42 filtre kâğıdı ile süzüldü. Ardından, elde edilen süzüntüler, işlenmiş toprak numunelerindeki toplam Ag'yi belirlemek için ICP-OES ile analiz edildi.

3.6. Nanopartiküllerin Toprak Enzim Aktiviteleri Üzerindeki Etkinliği

Gel-AgNP'ler, Gel-Glu-AgNP'ler, karanfil uçucu yağı ve nane uçucu yağı ile bunların karışımlarının toprak dehidrojenaz ve alkalen fosfataz aktiviteleri üzerindeki etkisini değerlendirmek için, önce toprak örnekleri tartıldı ve farklı dozlarda örnekler ile muamele edildi. Uygulamalardan önce toprak numuneleri, toprak süspansiyonlarında iyi bir homojenizasyon sağlamak için 1:1 (g toprak/mL deiyonize su) oranında deiyonize su ile muamele edildi. Eşzamanlı olarak, deney kontrol grubu da örnekler olmadan inkübe edildi.

Toprak numunelerindeki enzim aktiviteleri kolorimetrik yöntemler kullanılarak 1, 5, ve 10. gün sonunda değerlendirildi. Dehidrojenaz ve alkalen fosfataz aktiviteleri literatürdeki çalışmalar esas alınarak analiz edildi (M Ali Tabatabai ve Bremner, 1969; Thalmann, 1968). Kısaca, 1.0 g ve 6.0 g toprak, sırasıyla alkalen fosfataz ve dehidrojenaz aktivitesi için bir cam tüpe aktarıldı ve daha sonra tamponlu substrat çözeltilerinde süspanse edildi. Toprakların fosfataz aktivitesinin belirlenmesinde 1.0 g toprak örneği üzerine 4 mL MUB tampon (pH 11) ve 1 mL substrat çözeltisi (0.025 M p-nitrofenil fosfat) ilave edilmiş, karışım 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Aktivitenin belirlenmesi amacıyla, inkübasyon sonunda karışımın p-nitrofenol içeriği spektrofotometrik olarak belirlendi. Bu amaçla karışım, 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra üzerine 1 mL 0.5 M kalsiyum klorür (CaCl_2) ve 4 mL THAMNaOH (tris (hidroksimetil) aminometan, sodyum hidroksit) çözeltisi ilave edildikten sonra oluşan sarı rengin optik dansitesi 410 nm'de standart p-nitrofenol çözeltililerine karşılık gelecek şekilde spektrofotometrede belirlendi. Elde edilen sonuçlar ise μg p-nitrofenol/g kuru toprak cinsinden ifade edildi. Dehidrojenaz aktivitesi için ise, 6.0 gr taze toprak numunesi 50 mL'lik falkon tüplere konuldu. Örnek üzerine 1mL substrat çözeltisi (%3'lük TTC (2,3,5-trifeniltetrazolium)) ve 2.5 mL glikoz çözeltisi (%1,2'lik) ilave edilerek 24 saat boyunca 25 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda örnekler alınarak üzerine 10 mL metanol eklenerek Whatman No. 42 filtre kâğıdı ile süzüldü. Bu yıkama işlemi yaklaşık 3-4 defa tekrarlandıktan sonra falkon tüpleri son hacim 50 mL olacak şekilde metanol ile tamamlandı. Standart eğrinin oluşturulmasında ise standart TPF (trifenilformazan) çözeltisinden 0-2.5-5-7.5-10-12.5-15 mL ayrı ayrı alınarak son hacimleri 50 mL'ye tamamlanarak gerçekleştirildi. Oluşan kırmızı rengin optik dansiteleri 485 nm dalga boyunda spektrofotometre kullanılarak mikro plaka okuyucuda belirlendi. Elde edilen veriler $\mu\text{gTPF/g}$ (kuru toprak) / 24 h olarak ifade edildi. Bütün bu

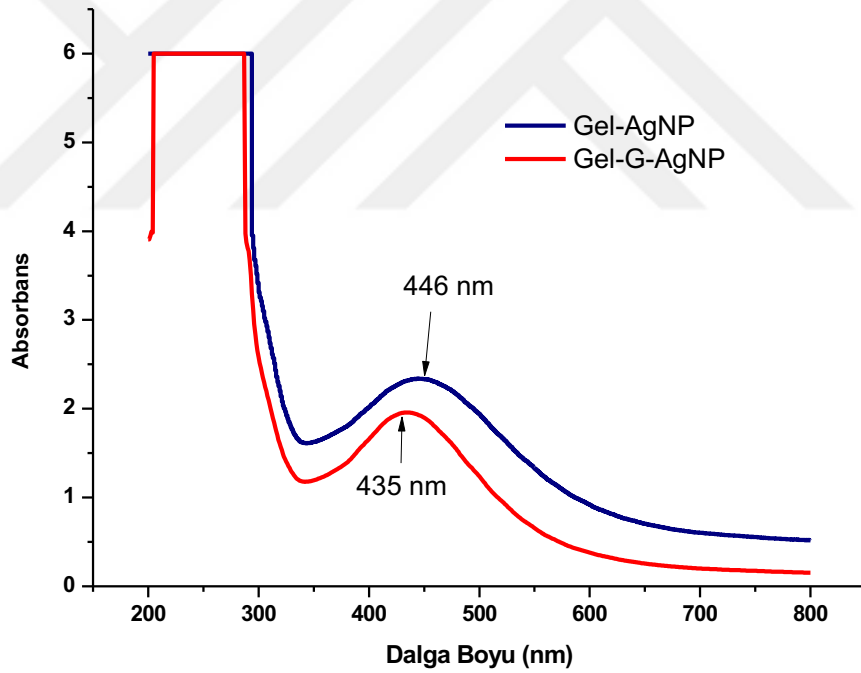
yapılan uygulamalar 3 tekerrür olacak şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak tek yönlü ANOVA ve Tukey testi ile analiz edildi ($p<0.05$)



4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Nanopartiküllerin sentez ve karakterizasyonu

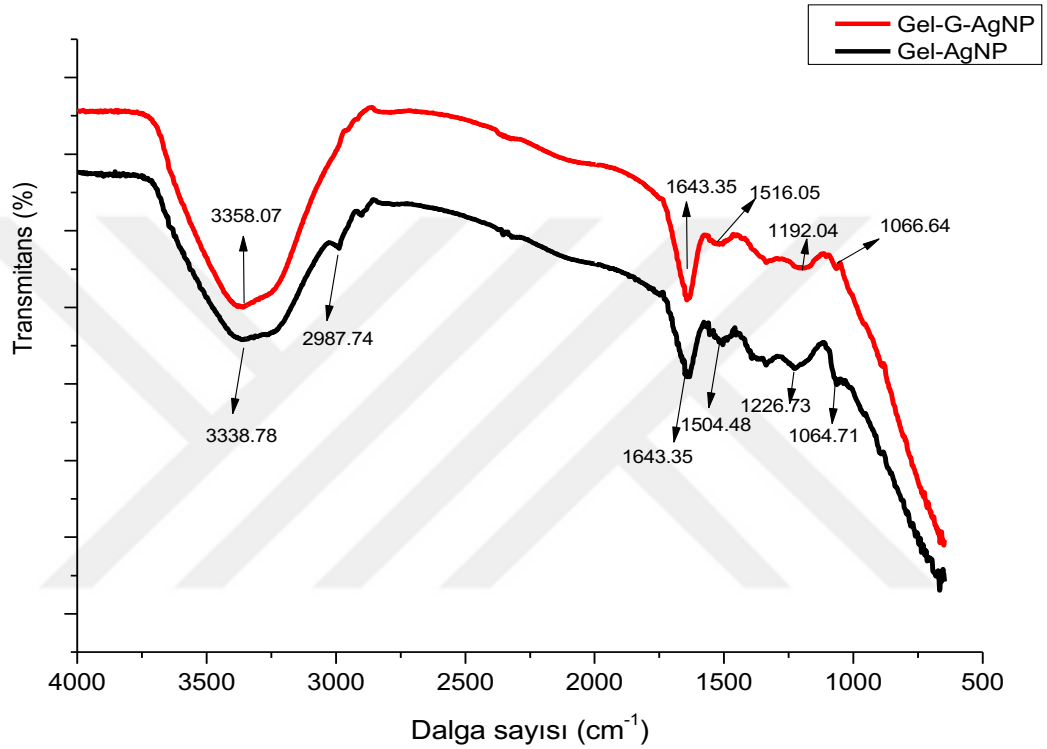
Mevcut araştırmada, jelatinin hem indirgeyici hem de stabilize edici ajan olarak kullanılmasıyla gümüş nanopartikül (AgNP) sentezi başarı ile gerçekleştirildi. Ag^+ iyonlarının indirgenmesi, AgNP'lerin oluşumuyla ilgili olarak gümüş metal NP'ler için benzersiz bir optik özellik olan kırmızımsı-kahverengi renk oluşumu ile doğrulandı. Jelatin AgNP'lerin sentezini izlemek için örneklerin absorbans ölçümleri UV-Vis spektroskopisi ile 200 ile 800 nm dalga boyu arasında gerçekleştirildi. Mikrodalgada gerçekleştirilen sentez 25 dakikada tamamlandı. Şekil 4.1.'de görüldüğü üzere, 446 ve 435 nm dalga boyunda kaydedilen karakteristik pikler sırası ile Gel-AgNP ve Gel-Glu-AgNP'lerin varlığını doğruladı. Bu sonuçlar gümüş nanopartiküller ile yapılan çalışmalar ile uyumluluk gösterdi (Behravan ve ark., 2019).



Şekil 4.1. Sentezlenen Gel-AgNP ve Gel-H-AgNP'lerin Uv-Vis analizi

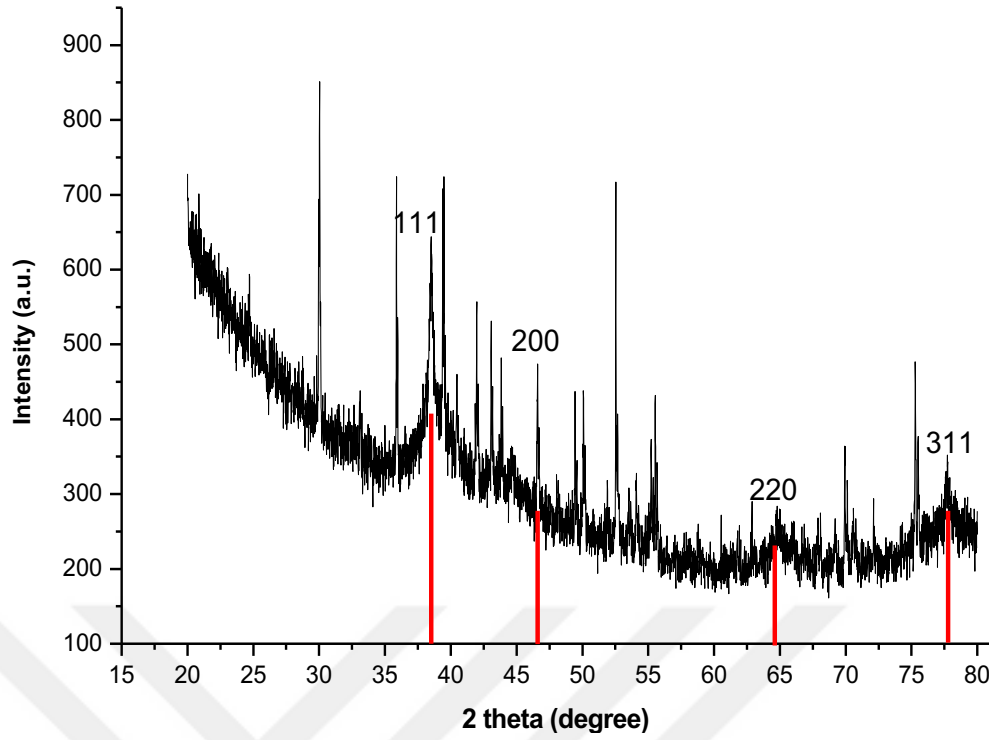
FTIR ile karakterizasyon, Gel-AgNP'lerde bulunan fonksiyonel grupları saptamak için gerçekleştirildi (Şekil 4.1.). Gel-AgNP'lerin FTIR spektrumları bantları 3338.78, 2987.74, 1643.35, 1504.48 1226.73 ve 1064.71 cm^{-1} 'de elde edildi. Gel-Glu-AgNP'lerin ise FTIR spektrumları bantları 3358.07, 1643.35, 1516.05 1192.04 ve 1066.64 cm^{-1} 'de elde edildi. Gel-AgNP'lerin spektrumunda 3338 cm^{-1} 'de geniş bant gözlemlendi, hidrojen bağı ile NH germe çiftine karşılık gelmektedir (Aewsiri ve ark., 2009). 1643 cm^{-1} 'deki

güçlü absorpsiyon piki, C=O germe titreşimini göstermektedir (Mahmoud ve Abbo, 2013). Jelatin bir poliamid proteini olduğundan, 1643 ve 1504 cm^{-1} 'de yer alan tepe noktaları proteinlerin amid I ve II gruplarının varlığını göstermektedir ve bunlar AgNP ile jelatin arasındaki elektrostatik etkileşimden dolayı ortaya çıkmaktadır (Burt ve ark., 2004). Bu piklerin varlığı gümüş nanopartiküllerin jelatin ile kaplı olduğunu doğrulamaktadır.



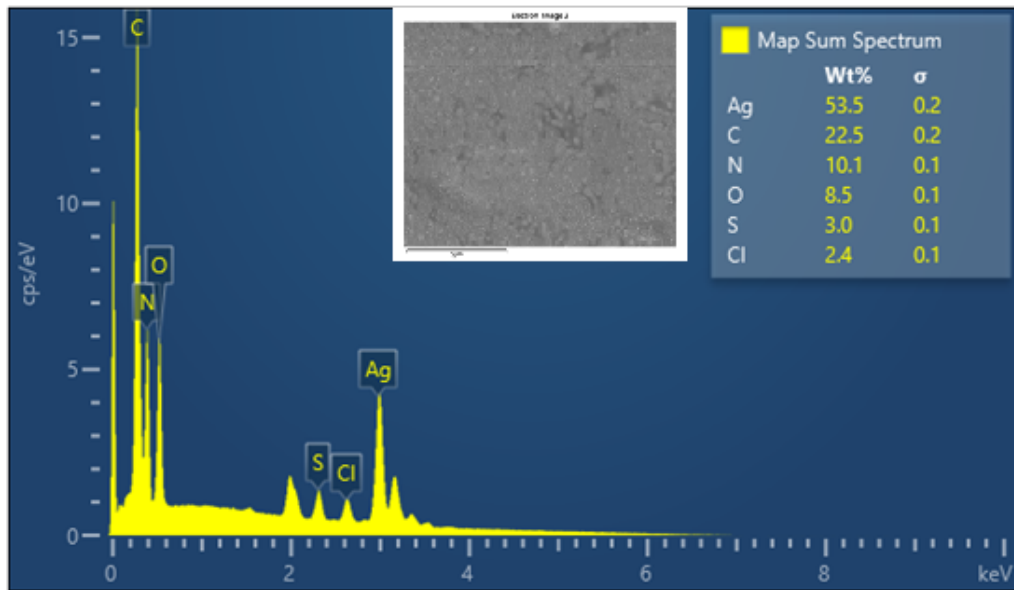
Şekil 4.2. Sentezlenen Gel-AgNP'lerin FTIR analizi

Bu çalışmada hazırlanan nanopartiküller, gümüş parçacıkların kristal ve nano yapısını doğrulamak için XRD analizleri ile karakterize edildi. XRD analizinde gözlemlenen karakteristik pikler ayrıca Gel-AgNP'lerin oluşumunu doğruladı (Şekil 4). Kristalografik düzlemlere (111), (200), (220) ve (311) karşılık gelen 38.51, 46.60, 64.78 ve 77.72'lik dört farklı kırınım tepe noktası, gümüş nanopartiküllerin doğada kristal yapısını göstermektedir (Su ve ark., 2017). XRD analizi 38.51'de (2θ) bir tepe gösterdi, bu da nanopartiküllerin saf gümüşten oluştuğunu ortaya çıkarmaktadır (Öztürk ve ark., 2020). Organik fazın kristalleşmesinin gümüş nanopartiküllerin yüzeyinde görüldüğünü gösteren bir veya iki atanmamış tepe de tespit edildi.



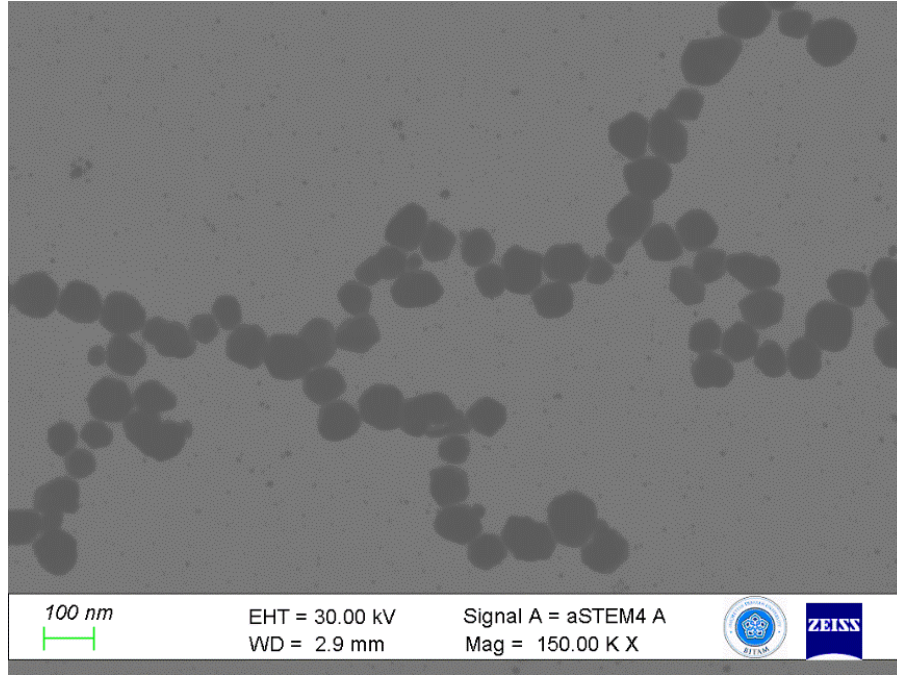
Şekil 4.3. Sentezlenen Gel-AgNP'lerin XRD analizi

Biyosentezlenmiş AgNP'lerin EDS profilleri, diğer elementler için eser miktarlar ile elemental gümüş için yüksek miktarda pik varlığını gösterdi. 3 keV'deki karakteristik optik absorpsiyon zirvesi, yüzey plazmon rezonanslarından dolayı metalik gümüş nanokristaller için tipiktir (Gomaa, 2017). C, N ve O'ya özgü piklerin mevcudiyeti, AgNP'lerin oluşumunda stabilize edici veya kapatma ajanlar olarak hareket eden farklı bileşenlerden kaynaklanmaktadır (Galvez ve ark., 2021).

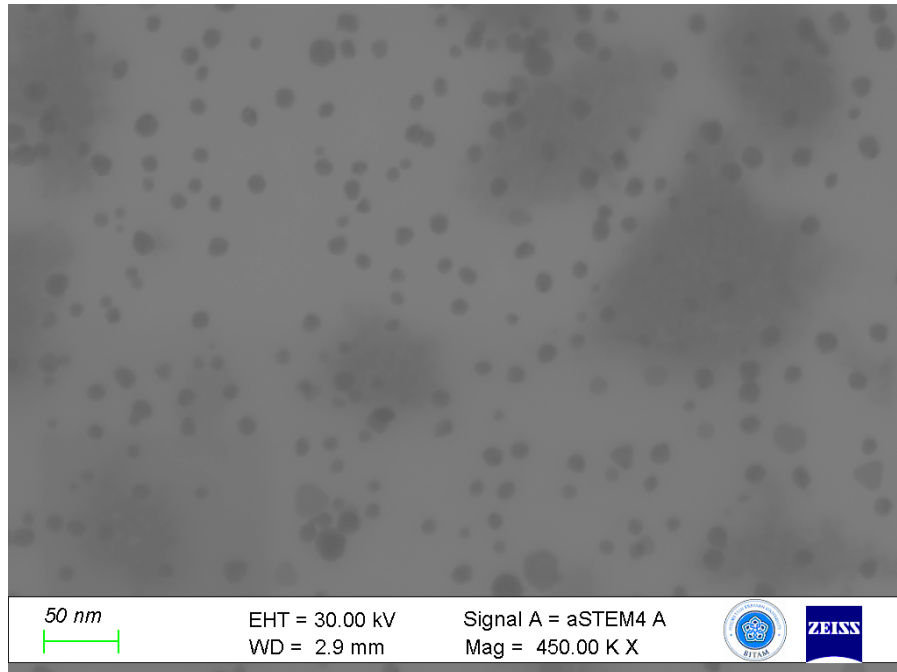


Şekil 4.4. Sentezlenen Gel-AgNP'lerin SEM-EDX analizi

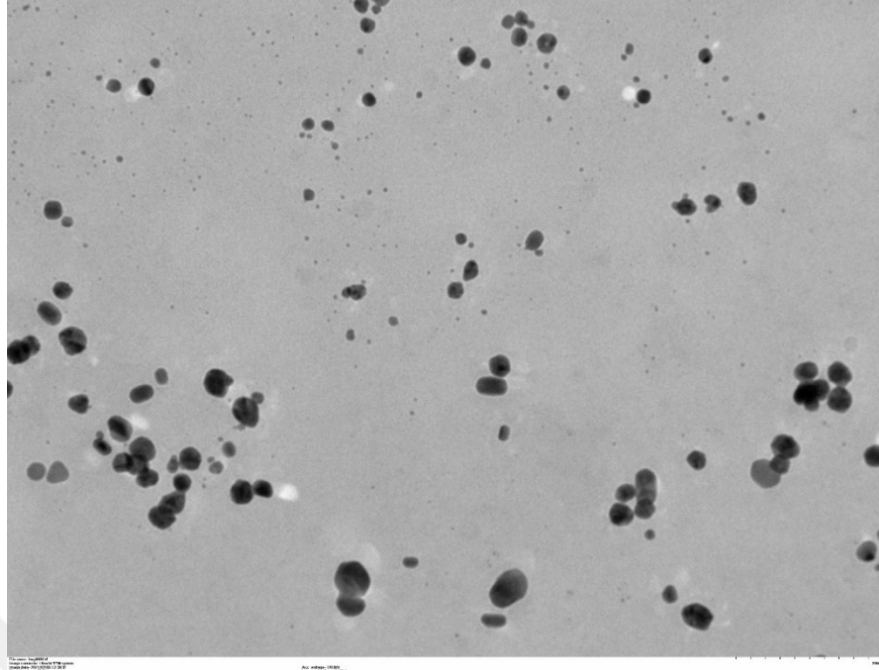
Gerçekleştirilen STEM ve TEM analizleri nanopartiküllerin şekil ve boyut yapısı hakkında bilgi edinmemizi sağladı (Şekil 4.5, 4.6. ve 4.7). Yapılan boyut ölçümlerinden Gel-AgNP'lerin büyüklüklerinin 20 ile 110 nm arasında değiştiği, Gel-Glu-AgNP'lerin ise 5-25 nm arasında değişkenlik gösterdiği belirlendi. Sonuçlar, sentezlenen gümüş nanopartiküllerin homojen dağılım halinde küresel şekilli olduğunu gösterdi.



Şekil 4.5. Sentezlenen Gel-AgNP'lerin STEM analizleri

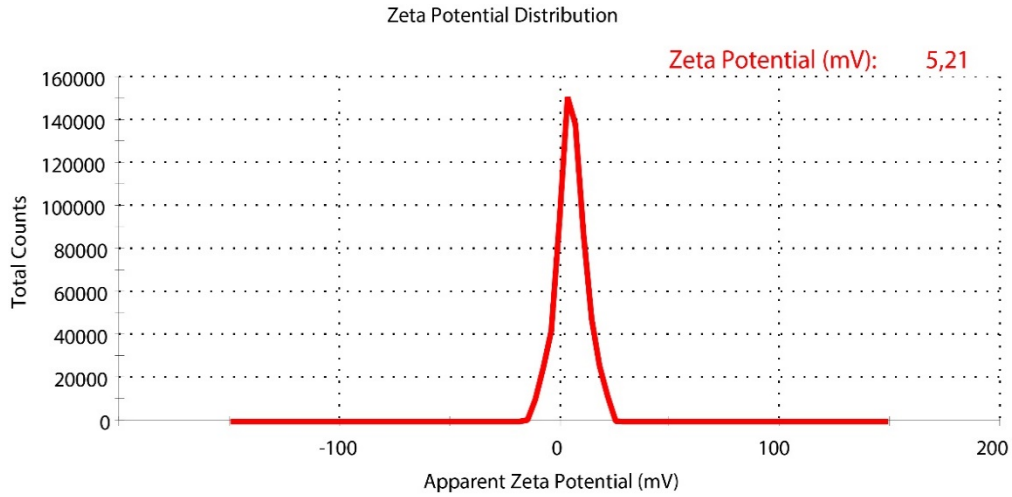


Şekil 4.6. Sentezlenen Gel-Glu-AgNP'lerin STEM analizleri

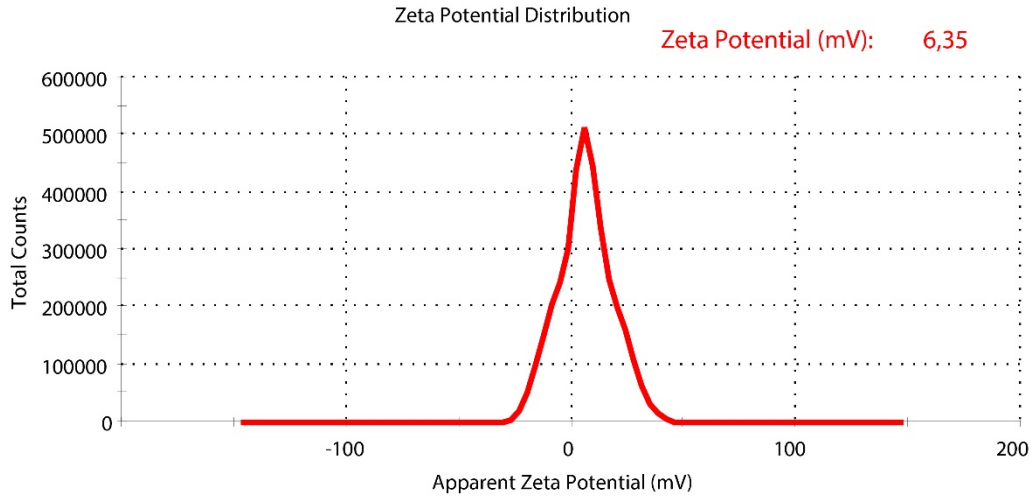


Şekil 4.7. Sentezlenen Gel-AgNP'lerin TEM analizleri

Şekil 4.8'de gösterilen zeta potansiyeli ölçümünün sonuçları, sentezlenen Gel-AgNP'lerin 5.21 (mV) zeta potansiyeline sahip olduğunu ortaya çıkardı. Diğer taraftan, Şekil 4.9'da görüldüğü üzere Gel-Glu-AgNP'lerin ise 6.35 (mV) zeta potansiyeline sahip olduğu gözlemlendi. Gel-AgNP'lerin zeta potansiyeli değerinin jelatinin yüzeyindeki pozitif yük fragmentleri ($[-NH-CNH_2-NH_2]^+$ ve $-NH_3^+$ gibi) nedeniyle olduğunu göstermektedir. Ag-NP'lerin daha küçük zeta potansiyeli değeri ise, iyonik olmayan şelatlayıcı jelatin gruplarına ($-SH$, $-OH$, ester ve amid gibi) ve $-COO^-$ anyonik gruplarına ek olarak, $-NH_2$ formundaki $-NH_3^+$ 'ün katyonik gruplarının şelatlama maddesi olarak çalıştığını göstermektedir (Pourjavadi ve Soleyman, 2011).

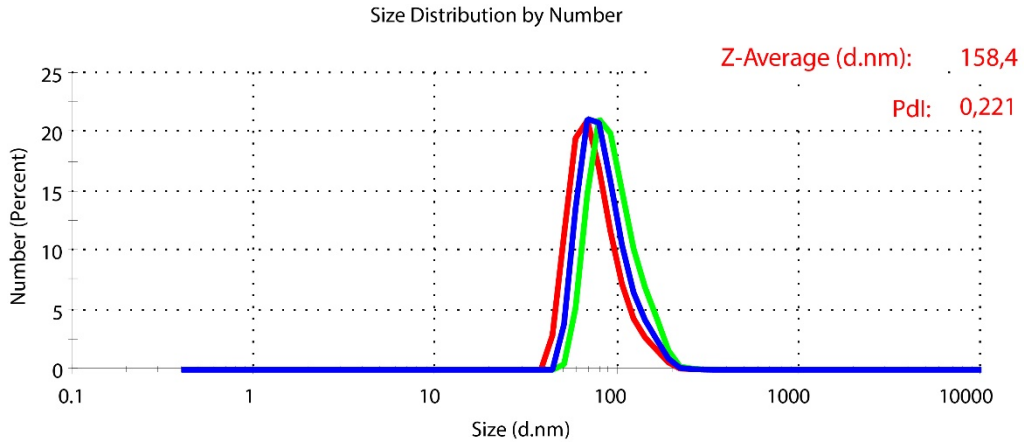


Şekil 4.8. Sentezlenen Gel-AgNP'lerin zeta potansiyel ölçümü

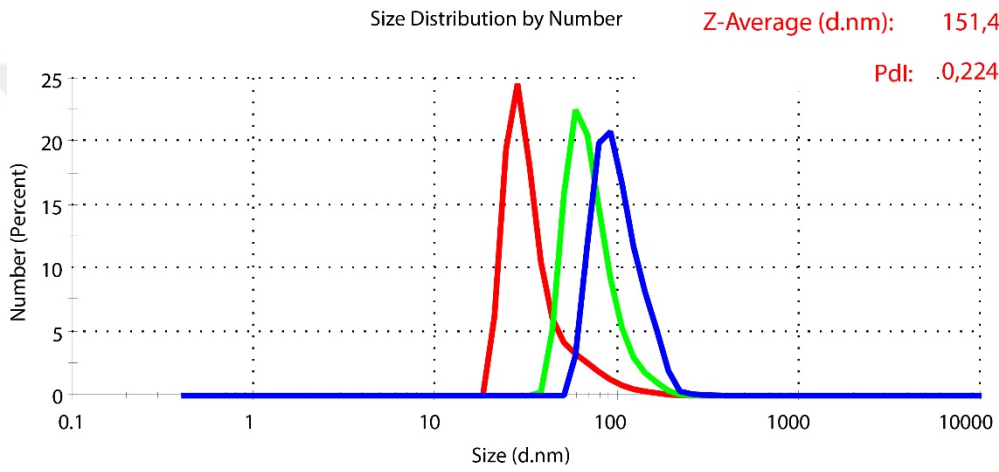


Şekil 4.9. Sentezlenen Gel-Glu-AgNP'lerin zeta potansiyel ölçümü

Gel-AgNP ve Gel-Glu-AgNP'lerden hazırlanan numunelerinin boyutu, Şekil 4.10 ve 4. 11'de gösterilen dinamik ışık saçılımı (DLS) ile ölçüldü. DLS analizinden Gel-AgNP'lerin 158.4 nm boyutunda olduğu ve polidispersite indeksinin (PDI) değerinin 0.221 olduğu ortaya çıkmıştır. Bu sonuç nanopartiküllerin büyüklük açısından oldukça dar dağılıma sahip olduğunu göstermektedir. Polidispersite indeksi boyutsuzdur ve 0,7'den büyük değerler numunenin çok geniş bir parçacık boyutu dağılımına sahip olduğunu gösterir (Nasiriboroumand ve ark., 2018). Gel-Glu-AgNP'lerin ise 151.4 nm boyutunda olduğu ve polidispersite indeksinin (PDI) değerinin 0.224 olduğu ortaya çıkmıştır. Ama grafikte daha geniş bir dağılım gösterdiği ortaya çıkarıldı.



Şekil 4.10. Sentezlenen Gel-AgNP'lerin DLS ile büyüklük dağılımı ve PDI değeri



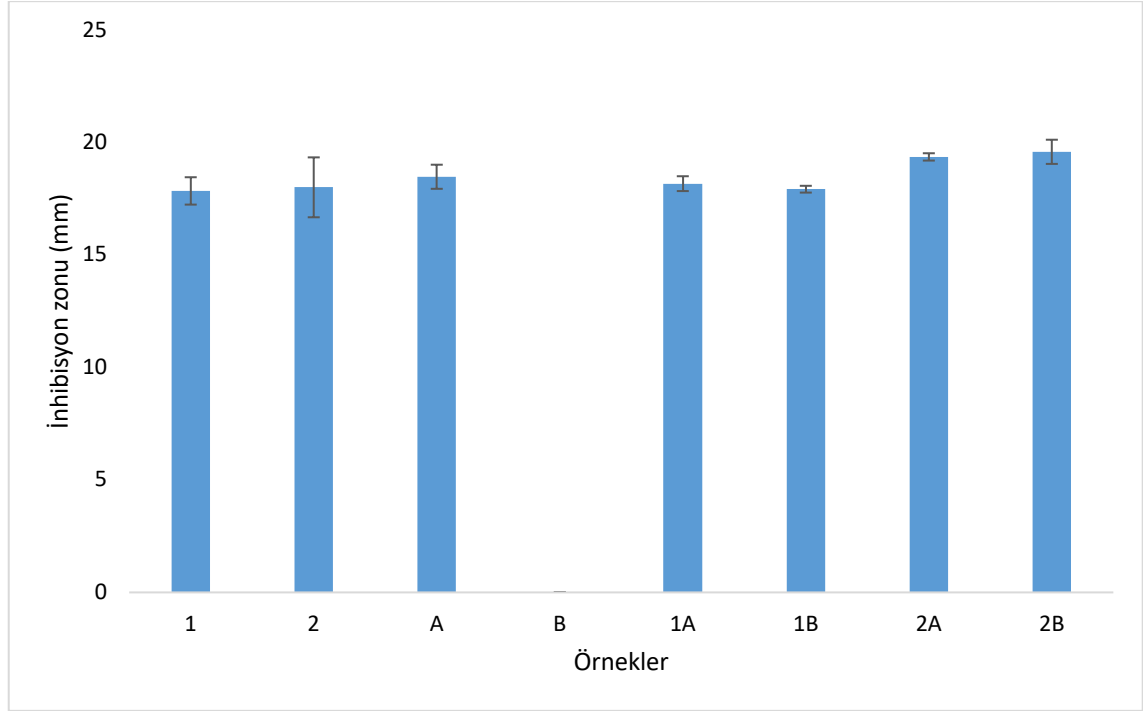
Şekil 4.11. Sentezlenen Gel-AgNP'lerin DLS ile büyüklük dağılımı ve PDI değeri

4.2. Sentezlenen Gümüş Nanopartiküllerin Antimikrobiyal Etkinlikleri ve Uçucu Yağlar ile Sinerjistik Etkisi

Bu çalışmanın kapsamını genişletmek için, agar difüzyon yöntemi kullanarak jelatin ile sentezlenmiş AgNP'lerin Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesi araştırıldı. Kuyuların etrafında oluşan inhibisyon bölgesinin çapı (mm) ölçüldü. Şekil 4.12,13,14,15 ve 16'daki sembollerden karanfil yağı A ile, nane yağı B ile, jelatin AgNP (Gel-AgNP) 1 ile, Jelatin + Glukoz AgNP (Gel-Glu-AgNP) ise 2 ile temsil edilmiştir.. Sembol 1A, 1B, 2A ve 2B ise ilgili nanopartiküller ile uçucu yağların ½ oranında eşit oranda karıştırılması ile elde edilen örneklerdir. Toplamda 50 µL örnek agar plakalarında oluşturulan 7 mm çapındaki kuyu içerisine ilave edilerek inhibisyon zonlarının ölçümü gerçekleştirildi.

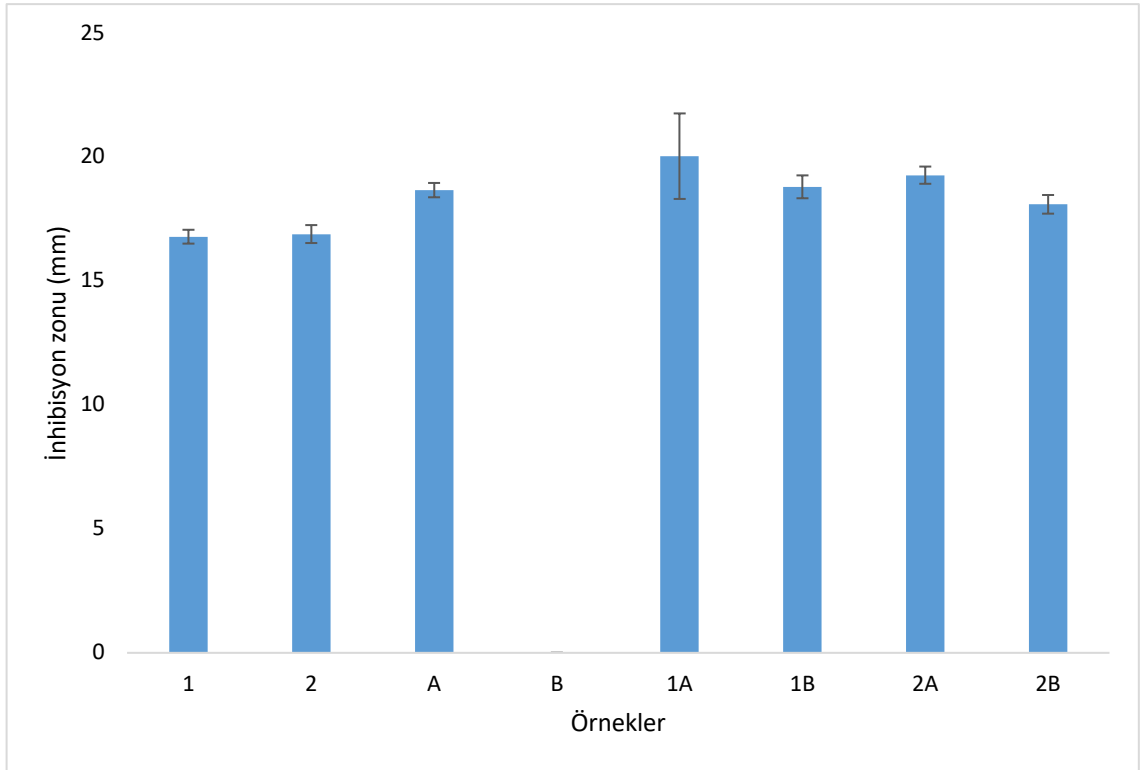
Şekil 4.12'de Gel-AgNP'lerin belirtilen konsantrasyonda *S. aureusa*'a karşı 17.88 ± 0.60 'lık bir inhibisyon zonu gösterdiğini, karanfil uçucu yağının ise 18.49 ± 0.53 'lük

bir inhibisyon zonu gösterdiği tespit edildi. Nane uçucu yağında ise ilgili konsantrasyonda herhangi bir inhibisyon gözlemlenmedi. Gel-AgNP ve karanfil yağının birlikte 18.18 ± 0.33 değerinde bir inhibisyon zonuna neden olduğu görüldü. Diğer taraftan Gel-Glu-AgNP'lerin ise hem karanfil ve hem de nane uçucu yağı ile sırası ile 19.37 ± 0.16 ve 19.60 ± 0.53 'lük inhibisyon zonu ile sinerjistik etki gösterdiği tespit edildi.



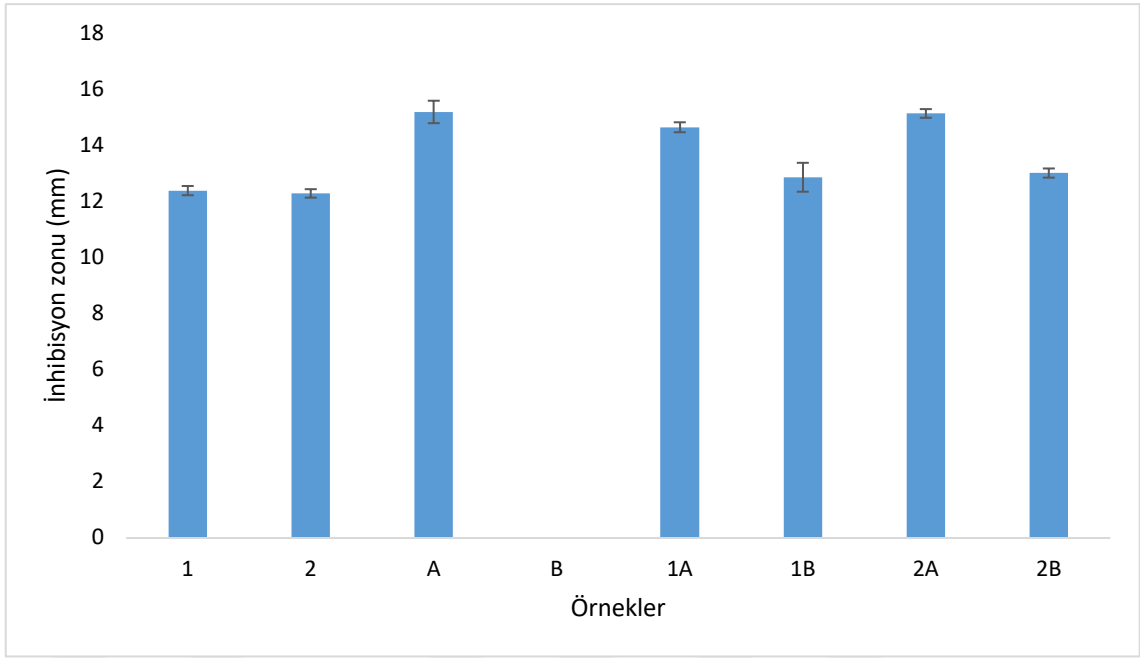
Şekil 4.12. Nanopartiküller ve uçucu yağların *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı inhibisyon zonları (mm).

Şekil 4.13'te *B. cereus*'a karşı Gel-AgNP'lerin belirtilen konsantrasyonda 16.79 ± 0.27 'lık bir inhibisyon zonu gösterdiğini, karanfil uçucu yağının ise 18.67 ± 0.28 'lik bir inhibisyon zonu gösterdiği tespit edildi. Gel-AgNP/karanfil yağının ve Gel-AgNP/nane yağının birlikte 20.04 ± 1.72 ve 18.81 ± 0.46 değerinde bir inhibisyon zonu oluşturduğu görüldü. *B. cereus*'a karşı sinerjistik etki gösterdiği bulundu. Nane uçucu yağında ilgili konsantrasyonda *B. cereus*'a karşı herhangi bir inhibisyon gözlemlenmedi. Diğer taraftan Gel-Glu-AgNP'lerin ise hem karanfil ve hem de nane uçucu yağı ile sinerjistik etki gösterdiği tespit edildi.



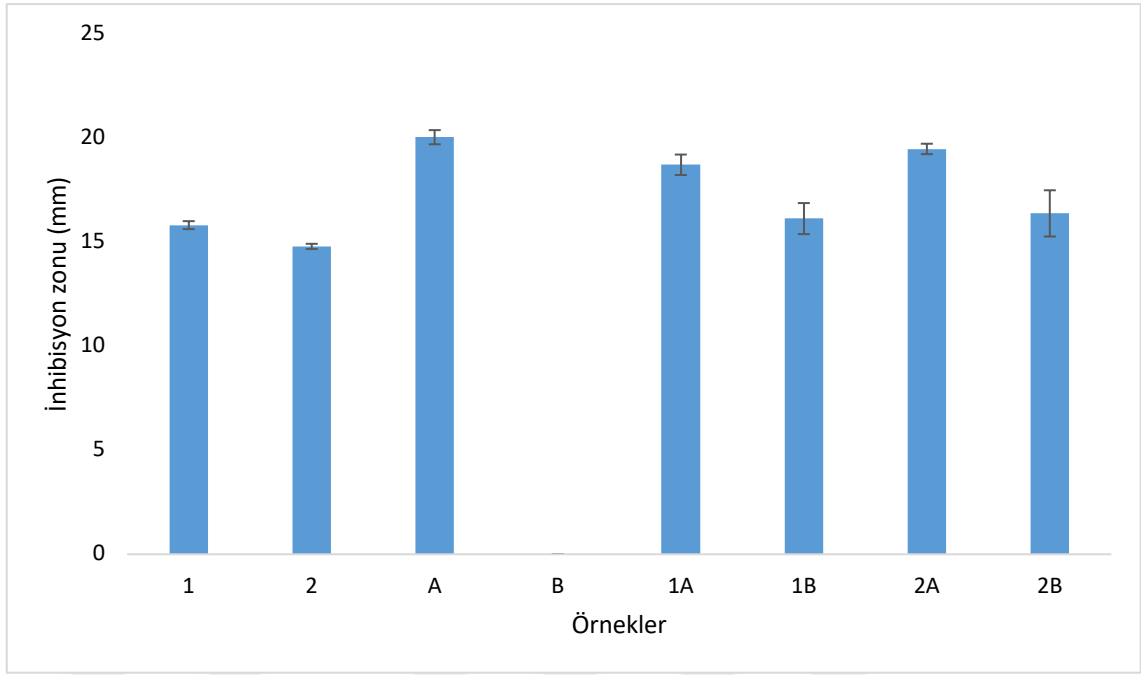
Şekil 4.13. Nanopartiküller ve uçucu yağların *Bacillus cereus* bakterisine karşı inhibisyon zonları (mm).

Şekil 4.14'te Gel-AgNP'lerin karanfil ve nane uçucu yağların *S. typhimurium* bakterisine karşı sırası ile 14.65 ± 0.17 ve 12.87 ± 0.51 inhibisyon zonları ile sinerjistik etkinlik gösterdiği gözlemlendi. Ayrıca Gel-Glu-AgNP'lerin her iki uçucu yağ ile sinerjistik etkinliğini fazla olduğu ortaya çıkarıldı. Nane uçucu yağı ilgili konsantrasyonda *S. typhimurium*'a karşı herhangi bir inhibisyon göstermedi.



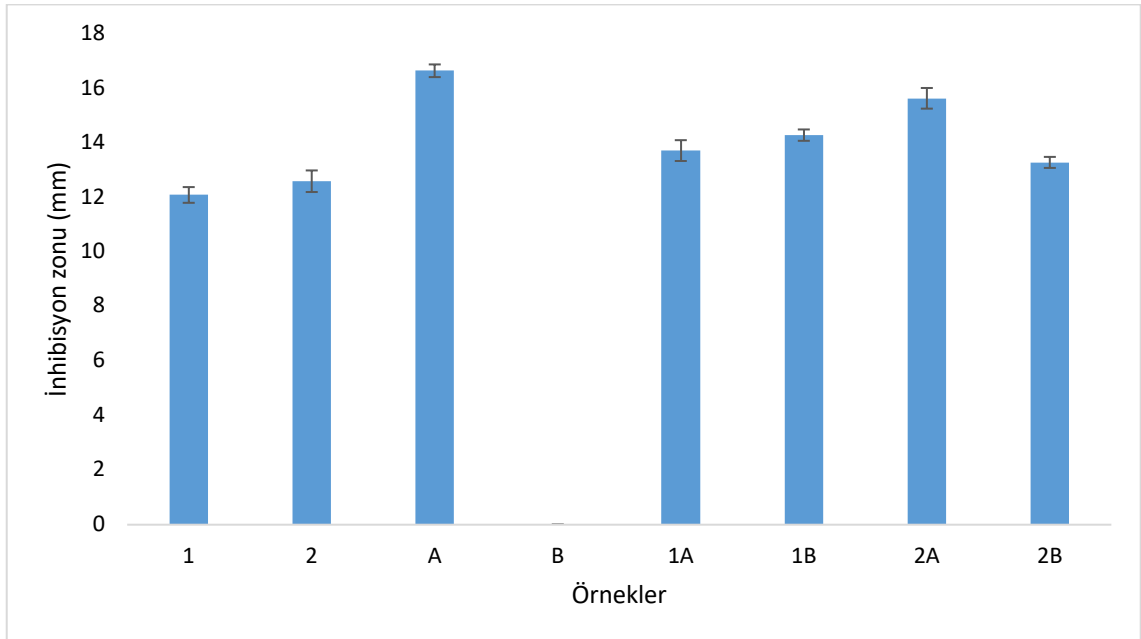
Şekil 4.14. Nanopartiküller ve uçucu yağların *Salmonella typhimurium* bakterisine karşı inhibisyon zonları (mm).

Şekil 4.15'te nanopartiküller ve uçucu yağların *P. aeruginosa* bakterisine karşı inhibisyon zonları gösterildi. Elde edilen sonuçlara göre Gel-AgNP'lerin 15.80 ± 0.19 'luk bir inhibisyon zonu ile Gel-Glu-AgNP'lere oranla daha iyi bir inhibisyon gerçekleştirdiği tespit edildi. Karanfil uçucu yağının 20.02 ± 0.49 'luk bir inhibisyon zonu oluşturduğu belirlenirken nane uçucu yağının herhangi bir aktivite göstermediği bulundu. *P. aeruginosa* bakterisine karşı nanopartiküllerin karanfil yağı ile bir sinerjistik etki göstermediği gözlemlenirken, diğer yandan nane uçucu yağı ile sinerjistik etki gösterdiği tespit edildi.



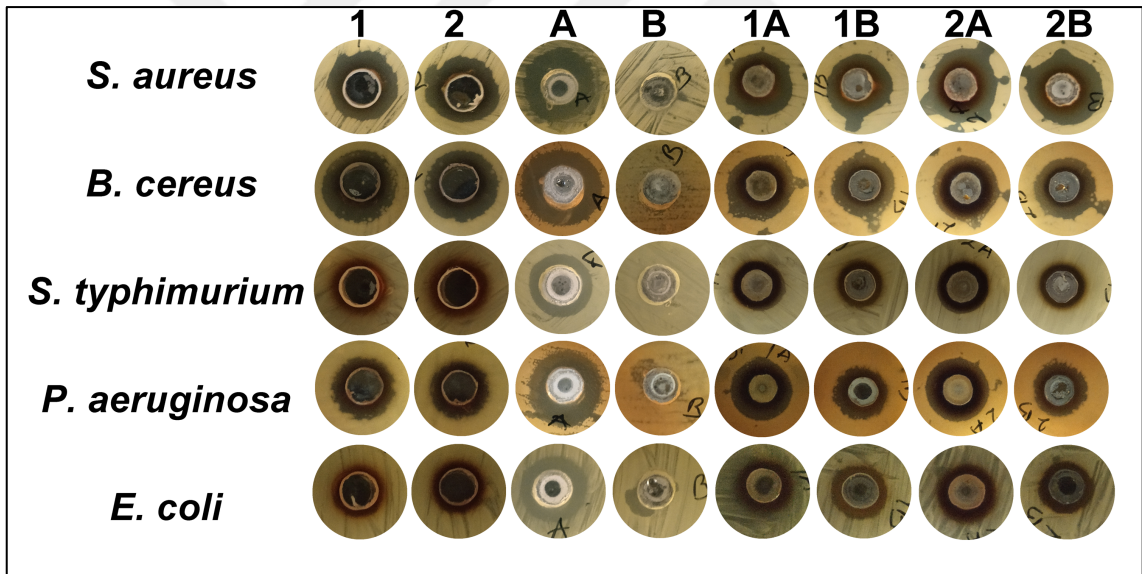
Şekil 4.15. Nanopartiküller ve uçucu yağların *Pseudomonas aeruginosa* bakterisine karşı inhibisyon zonları (mm).

Şekil 4.16'da *E. coli*'ye karşı Gel-AgNP'lerin 12.59 ± 0.39 değerinde bir inhibisyon zonu ile Gel-AgNP'lere oranla daha iyi bir inhibisyon gösterdiği belirlendi. Her iki nanopartikülün de nane uçucu yağı ile sinerjistik etki gösterdiği belirlenirken, karanfil uçucu yağının tek başına göstermiş olduğu 16.64 ± 0.23 'lük inhibisyon zonunun nanopartiküller ile azaldığı tespit edildi.



Şekil 4.16. Nanopartiküller ve uçucu yağların *Echerichia coli* bakterisine karşı inhibisyon zoları (mm).

Bu bulgular, Gel-AgNP'lerin hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilere karşı potansiyel bir antibakteriyel ajan olarak hizmet edebileceğini göstermektedir. Gümüş nanopartiküller, bakteri hücrelerinde yapısal ve morfolojik değişikliklere neden olarak hücre ölümüne yol açmaktadır. Literatürdeki çalışmalara bakıldığında, jelatin ile gümüş nanopartiküllerin sentezi bazı araştırmacılar tarafından gerçekleştirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, jelatin ile AgNP'lerin kolay sentezi gerçekleştirildiği bildirildi. Elde edilen jelatin-AgNP'lerin yüksek stabilite sergilediğini bulmuşlardır (Lee ve Zhang*, 2013). Lavanya ve ark., (2020), yaptıkları bir çalışmada kimyasal olarak sentezlenmiş AgNP'ler ile jelatin ile sentezlenmiş AgNP'lerin karşılaştırmalı analizi gerçekleştirmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarda, jelatin AgNP'lerin düşük konsantrasyonda bile iyi derecede bakteri inhibisyonuna yol açtığını doğrulamışlardır. Yapılan ilgili çalışmanın sonuçları, 80 µg/mL jelatin AgNP'lerin *S. aureus*'un büyümesini durdurduğunu ortaya koymuştur (Lavanya ve ark., 2020).



Şekil 4.17. Nanopartiküller ve uçucu yağların mikroroganizmalara karşı geliştirdikleri inhibisyon zonları.

Elde edilen sonuçlara göre, Gel-AgNP'lerin ve Gel-Glu-AgNP'lerin en yüksek antibakteriyel aktiviteyi *S. aureus*'a, en düşük aktiviteyi ise Gel-AgNP'lerin *E. coli*'ye ve Gel-Glu-AgNP'lerin ise *S. typhimurium*'a karşı gösterdiği tespit edildi. Karanfil uçucu yağının belirtilen konsantrasyonlarda yüksek antibakteriyel etkinlik gösterdiği gözlemlenirken, eşit konsantrasyonda nane uçucu yağının herhangi bir aktivite göstermediği belirlendi. Gel-AgNP ve karanfil uçucu yağının sinerjistik antibakteriyel aktivitesi yalnızca *B. cereus*'a karşı gözlemlendi. Gel-Glu-AgNP'lerin ise karanfil uçucu yağı ile *S. aureus* ve *B. cereus*'a karşı sinerjistik etkisinin olduğu belirlendi. Diğer

yandan, tüm nanopartiküllerin nane uçucu yağı ile tüm mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitede sinerjistik etkinlik gösterdiği bulundu.

4.3. Toprak Analizi

Tablo 4.1’de görüldüğü üzere çalışılan toprağın tekstür sınıfının tınlı olduğu görülmektedir. Ayrıca toprak örneğinin pH değeri 7.65, EC değeri 1756 ve kireç oranının % 16.20 olduğu gözlemlendi.

Tablo 4.1. Toprak örneğinin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri

Tekstür	pH 1:2.5	OM (%)	CaCO₃ (%)	EC (µmhos/cm)	AS (%)	TK (%)	SN (%)	FSK (%)
Tınlı	7.65	0.72	16.20	1756	17.70	24.60	12.80	11.80

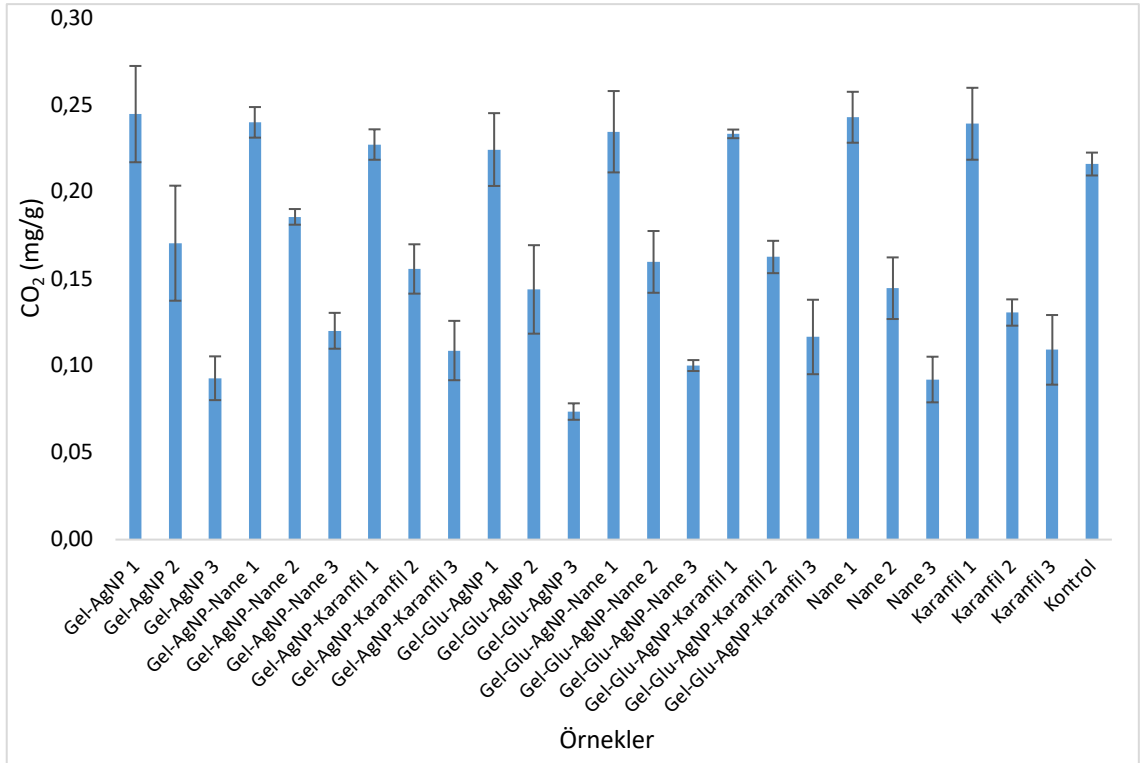
Hazırlanan toprak örnekleri Şekil 4. 18’de gösterildi. Gel-AgNP, Gel-Glu-AgNP, karanfil uçucu yağı, nane uçucu yağı ve bunların kombinasyonları farklı konsantrasyonlarda toprak örneklerine uygulandı. Uygulama gerçekleştirilmeyen kontrol grubu ile karşılaştırılarak topraklar belirli inkübasyon süreleri sonunda dehidrojenaz ve alkalin fosfataz aktivitesi 1., 5. ve 10. günlerde ve toprak solunumu ise 10.gün sonunda analiz edildi.



Şekil 4.18. Örnekler ile muamele edilen toprak örnekleri

Uygulanan örneklerin 3 farklı konsantrasyonda (0.2, 0.4 ve 0.6 mL/ 250 g toprak) toprak solunumu üzerinde 10 gün inkübasyon süresi sonundaki sonuçları CO₂ (mg/g) olarak Şekil 4. 19’da görülmektedir. Uygulama yapılmayan toprak örneğindeki toprak solunumunun değeri 0.22 ± 0.01 olarak ölçüldü. Gel-Glu-AgNP’nin 3. doz uygulamasında en fazla azaldığı bulundu. Tüm örneklerin ilk dozunda (0.2 mL) kontrole göre toprak solunumunda artış olduğu gözlemlendi. Uygulamaların toprak solunumu üzerindeki ilk artan etkisinin, aşırı hassas türlerin ölümünden kaynaklandığı düşünülmektedir.

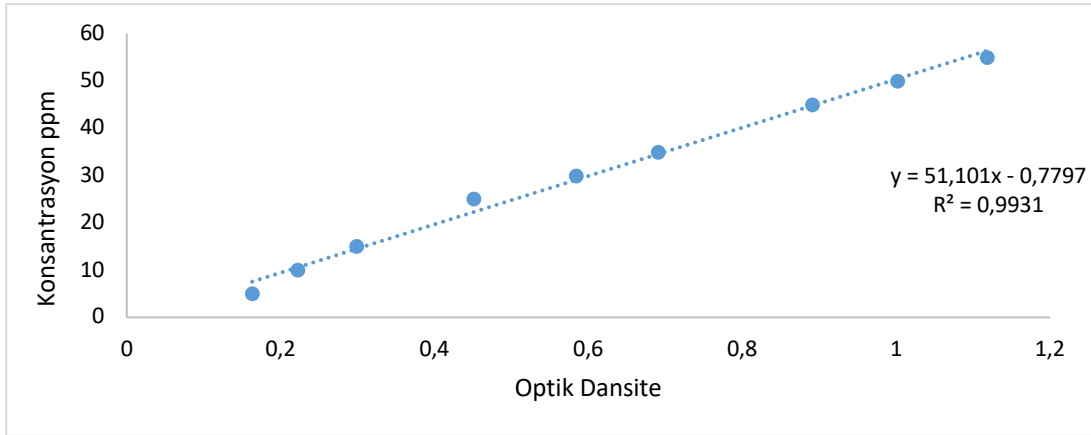
Gel-AgNP/nane uçucu yağı kombinasyonunun 3.dozu hem AgNP hem de nane uçucu yağına göre toprak solunumunda artışa sebebiyet vererek bir sinerjistik etki gösterirken karanfil uçucu yağ için herhangi bir sinerjistik etki oluşmamıştır. Gel-Glu-AgNP ile nane ve karanfil uçucu yağ kombinasyonunun 3. dozunda ise sinerjistik etki gözlemlendi. Sonuçlar tüm örneklerde solunum azalmasının doz bağımlı olduğunu gösterdi.



Şekil 4.19. Toprağa uygulanan örneklerin 3 doz olarak 0.2 mL (1.doz), 0.4 mL (2. Doz) ve 0.6 mL (3. Doz) olarak 10.gün sonudaki toprak solunumu üzerindeki etkinlikleri.

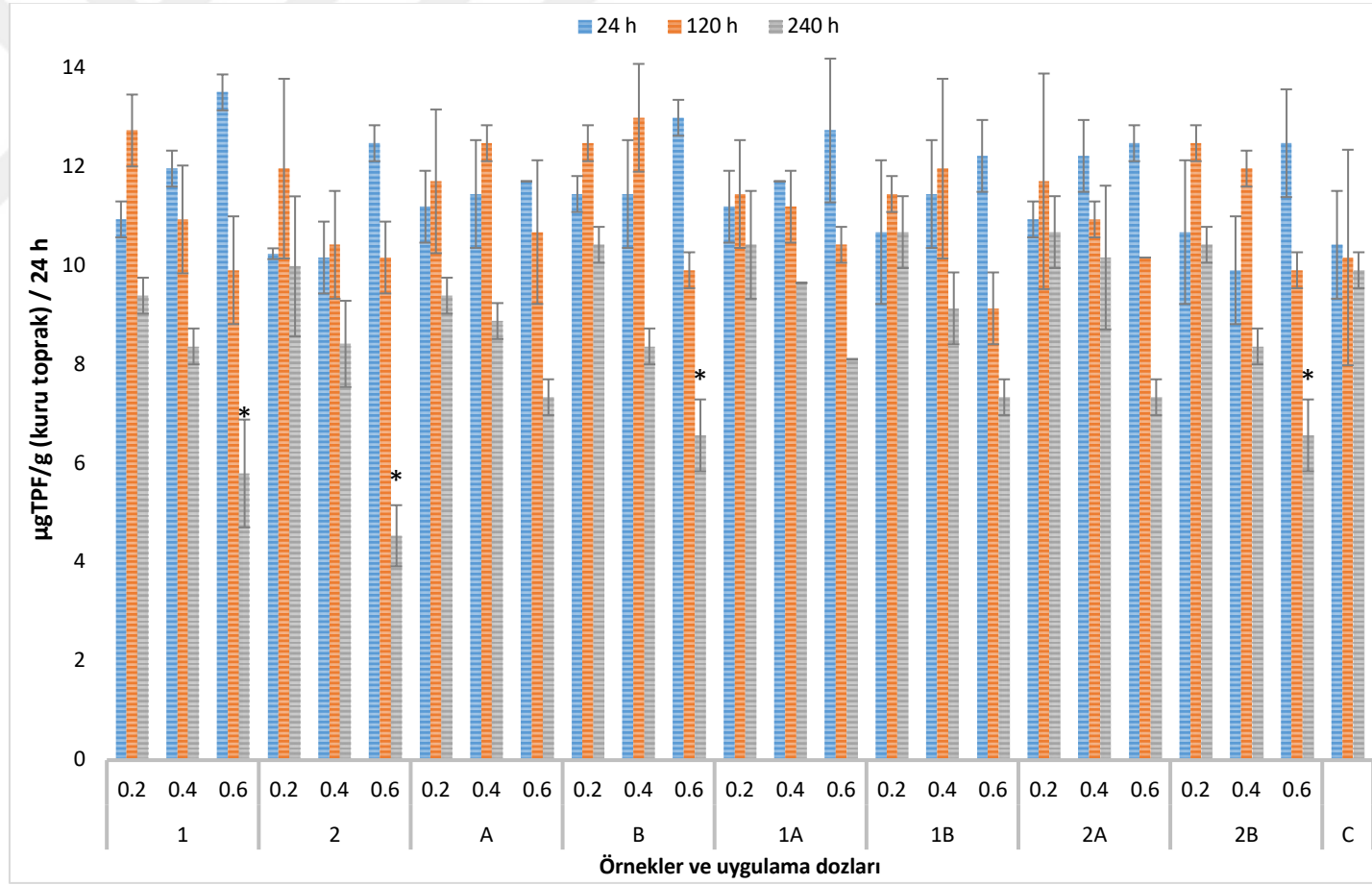
4.3.1. AgNP'lerin Toprak Enzimatik Aktiviteleri Üzerindeki Etkisi

Bu çalışmada, Gel-AgNP'lerin, uçucu yağların ve bunların sinerjistik etkisinin toprak üzerindeki etkilerini değerlendirmek için konsantrasyona ve zamana bağlı dehidrojenaz ve alkalın fosfataz aktiviteleri araştırıldı. Örneklerin 0.2, 0.4 ve 0.6 mL/ 250 g toprak olarak uygulanması ile 1, 5 ve 10 günlük maruz kalma süresi boyunca enzim aktiviteleri ölçüldü ve kontrol gurubu ile karşılaştırıldı. Şekil 4.20, dehidrojenaz aktivitesinin ölçümünde kullanılan standart eğriyi göstermektedir. Hazırlanan standart eğride R^2 değeri 0.9931 olarak elde edildi.



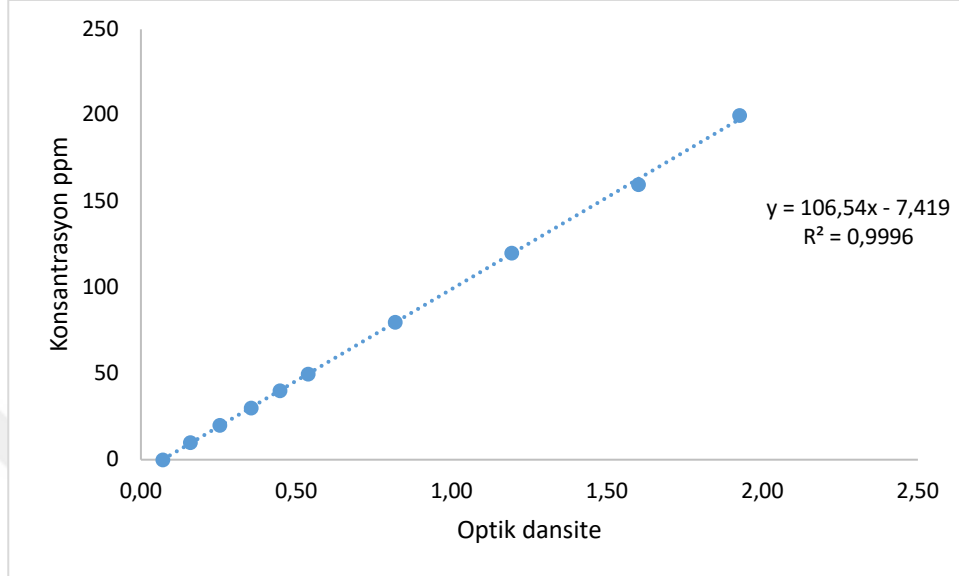
Şekil 4.20. Uygulama yapılan toprak örneklerinde dehidrojenaz ölçümü için hazırlanan standart eğri

Şekil 4.21, artan AgNP'lerin ve uçucu yağların uygulama dozları (0.2, 0.4 ve 0.6 mL/250 g kuru toprak) ile dehidrojenaz aktivitesinin zamana bağımlı değişimini belirtmektedir. Değerler $\mu\text{g p-nitrofenol/g/FKT}$ olarak belirtildi. Kontrole göre karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizi ve Tukey HSD testi ile gerçekleştirilerek istatistiksel farklı olanlar * olarak belirtildi ($p < 0.05$). 1. gün sonunda dehidrojenaz aktivitesini en fazla düşüren örneğin 9.91 ± 1.09 'luk değerle Gel-Glu-AgNP-nane (0.4 mL) kombinasyonun olduğu gözlemlendi. İlk gün sonunda kontrole göre nanopartiküllerin ve uçucu yağların yüksek dozlarda dehidrojenaz aktivitesini arttırdığı gözlemlendi. Gel-AgNP'lerin ilk gün sonunda doz artışıyla dehidrojenaz aktivitesini arttırdığı bulundu. Gel-Glu-AgNP'ler için 1. gün sonunda ilk iki dozda enzim aktivitesi birbirine yakın değerler gösterirken 3. dozda yükselme meydana geldiği bulundu. Gel-AgNP'lerin ilk dozu için 5. gün sonunda artış olurken 10. gün sonunda dehidrojenaz aktivitesinde düşüş meydana geldi. Ayrıca 5. ve 10. gün sonunda uygulama dozu arttıkça bu nanopartiküllerin dehidrojenaz aktivitesini düşürdüğü ortaya çıkarıldı. Bu durumun Gel-Glu-AgNP'ler içinde aynı kaldığı gözlemlendi. Özellikle nanopartiküllerin uygulanan yüksek dozlarda 10. gün sonunda dehidrojenaz aktivitesinin kontrole göre oldukça fazla düşürdüğü bulundu. Bu sonuçlar bize yüksek AgNP konsantrasyonlarının rizosfer mikroorganizmaları üzerinde daha toksik olduğunu göstermektedir (Das ve ark., 2012).



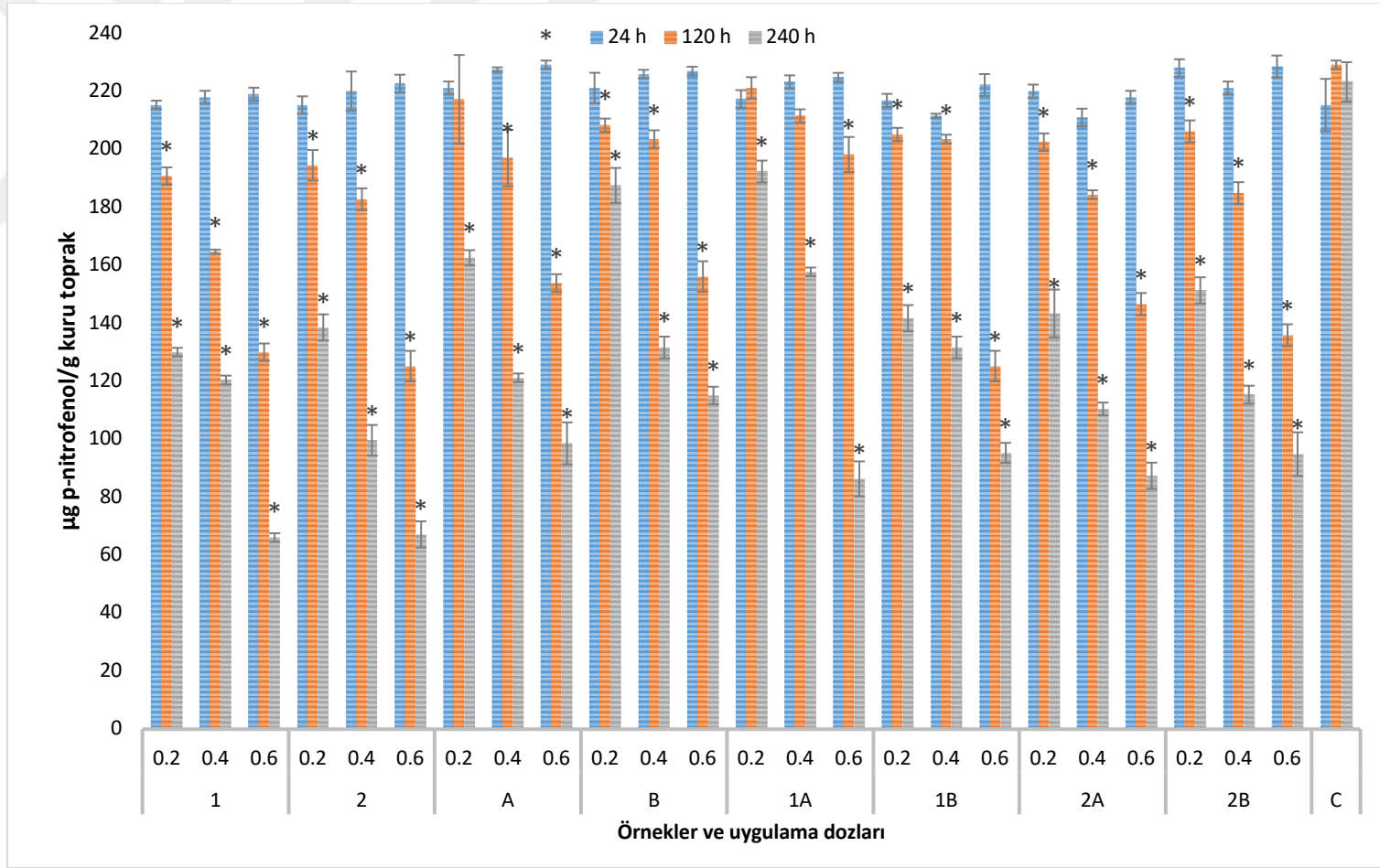
Şekil 4.21. Toprağa uygulanan örneklerin doz ve zaman bağımlı toprak dehidrojenaz aktivitesi üzerindeki etkinlikleri

Toprak örneklerinde uygulanan örneklerin etkisiyle alkalen fosfatazda meydana gelen değişikliklerin ölçümü için oluşturulan standart eğri Şekil 4.22’de gösterilmektedir. Oluşturulan standart eğride R^2 değeri 0.9996 olarak kaydedildi.



Şekil 4.22. Uygulama yapılan toprak örneklerinde alkalen fosfataz ölçümü için hazırlanan standart eğri

Toprağa uygulanan örneklerin doz ve zaman bağımlı toprak alkalen fosfataz aktivitesi üzerindeki etkinlikleri Şekil 4.23’te gösterildi. Kontrole göre karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizi ve Tukey HSD testi ile gerçekleştirilerek istatistiksel farklı olanlar * olarak belirtildi ($p < 0.05$). Elde edilen sonuçlara göre ilk gün sonunda tüm örneklerde doz artışı ile alkalen fosfataz aktivitesinin yükseldiği görüldü. İlk gün sonunda Gel-Glu-AgNP-Nane 3 kombinasyonun ise tam tersi etki göstererek alkalen fosfataz aktivitesinde daha fazla artışa sebep olarak sinerjistik etki gösterdiği belirlendi. Nanopartiküllerin ve uçucu yağların tüm dozlarında zamana bağlı olarak enzim aktivitesinin inhibe edildiği gözlemlendi. Ayrıca tüm örneklerde ilk gün dışında zaman süresi artışına bağlı olarak aktivitenin doz artışına bağlı olarak düştüğü bulundu.



Şekil 4.23. Toprağa uygulanan örneklerin doz ve zaman bağımlı toprak alkalin fosfataz aktivitesi üzerindeki etkinlikleri

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu çalışmada, indirgeyici ve stabilize edici bir ajan olarak görev yapan jelatinin sulu solüsyonunda gümüş nanopartiküllerin sentezi gerçekleştirildi. Ayrıca, jelatinin rolünü ortaya koyabilmek için ikinci bir nanopartikül sentezi ise jelatin solüsyonuna glukoz ilave edilerek gerçekleştirildi. Elde edilen nanopartiküllerin karakterizasyonu çeşitli analitik tekniklerle gerçekleştirildi. UV-Vis spektroskopisi ile Gel-AgNP'lerin 446 nm'de karakteristik pik gösterdiği bulundu. Ayrıca, nanopartiküllerin FTIR ile karakterizasyonun da özellikle jelatin yapısında bulunan grupların gümüşün indirgenmesinde rolü olduğu ortaya çıkarıldı. Yapılan XRD analizi ile AgNP'lerin oluşumu doğrulandı. Ayrıca nanopartiküllerin yapılan STEM ve TEM analizinde küresel formda ve homojen dağılım gösteren nanopartiküllerin varlığı ortaya çıkarıldı. Zeta potansiyeli analizi ile nanopartiküllerin pozitif yüklü olduğu belirlendi. Bunlara ilaveten nanopartiküllerin DLS analizinde PDI değerlerinin 0.3'ün altında olduğu ve bununda sentezlenen AgNP'lerin oldukça stabil olduğu sonucuna ulaşıldı. Nanopartiküllerin stabilitesinin özellikle çalışma sonuçlarını değerlendirilmesinde daha sağlıklı sonuçlara ulaşılmasına katkı sunmaktadır.

Çalışmada sentezlenen AgNP'lerin antibakteriyel aktivitesinin ve bunların uçucu yağlar ile sinerjistik etkisi çeşitli bakteri suşları ile gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar, Gel-AgNP'lerin ve Gel-Glu-AgNP'lerin hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilere karşı antibakteriyel etkinlik gösterdiğini ortaya çıkardı. Çalışmada kullanılan iki farklı uçucu yağdan karanfil uçucu yağında antibakteriyel aktivite yüksek gözlemlenirken nane uçucu yağında ise oldukça düşüktü. *S. aureus*'a karşı Gel-Glu-AgNP'lerin hem karanfil ve hem de nane uçucu yağı ile sinerjistik aktivite gösterdiği belirlendi. Gel-AgNP- karanfil ve Gel-AgNP- nane uçucu yağ kombinasyonlarının *B. cereus*'a karşı sinerjistik aktivite gösterdiği bulundu. Ayrıca, *S. typhimurium* ile yapılan çalışmada Gel-Glu-AgNP'lerin her iki uçucu yağ ile bu bakteriye karşı sinerjistik etkinliğini fazla olduğu ortaya çıkarıldı. *P. aeruginosa* ve *E. coli* bakterilerine karşı nanopartiküllerin yalnızca nane uçucu yağı ile sinerjistik etki gösterdiği gözlemlendi.

Ayrıca, çalışmanın kapsamını gerçekleştirmek için, gümüş nanopartiküllerin toprak mikroorganizmaları üzerindeki etkinliğinin anlaşılabilmesi için toprak solunumu ve toprak enzimleri üzerine çalışma gerçekleştirildi. Gel-AgNP, Gel-Glu-AgNP, karanfil uçucu yağı, nane uçucu yağı ve bunların kombinasyonları farklı konsantrasyonlarda

toprak örneklerine uygulandı. Toprak solunumu için 10. gün sonunda ve toprak enzimleri için ise 1, 5 ve 10. gün sonunda ölçümler gerçekleştirildi. Uygulanan örneklerin ilk dozunun (0.2 mL) kontrole göre toprak solunumunda artışa neden olduğu ortaya çıkarıldı. Tüm örneklerde uygulama dozu arttıkça solunumun azaldığı tespit edildi. Topraktaki enzimler, toprağın en aktif organik bileşiklerinden birini temsil etmektedir. Bundan dolayı dehidrojenaz ve alkalen fosfataz aktiviteleri incelendi. Enzim analizlerinde 1. gün sonunda enzim aktivitelerinde artış gözlemlenirken diğer inkübasyon sürelerinde zamana bağlı bir enzim inhibisyonun görüldüğü bulundu. Ayrıca örneklerin dozları arttıkça buna orantılı olarak enzim aktivitelerinde azalma meydana geldiği gözlemlendi. Ayrıca nanopartikül ve uçucu yağların kombinasyonlarının enzim aktivitelerinde sinerjistik etki ortaya çıkarabildikleri bulundu.

5.2. Öneriler

AgNP'lerin çevresel kullanımı ve özellikle toprakla işlenmesi ile ilgili herhangi bir düzenleme ve standart bulunmadığından, çalışma özellikle biyolojik moleküllerle elde edilen ve polimerlerle stabilize edilmiş bu tür nanomalzemelerin çeşitli uygulamalarda değerlendirilebilmesi için faydalı olabilir. Sonuç olarak, elde edilen nanopartiküllerin nanomalzemelerin diğer kimyasal veya fiziksel sentez yöntemlerinden kaynaklanan toksik ajanları içermemesi, nanopartiküllerin çevresel uygulamalarda kullanımı ve değerlendirilmesinde yeni bir bakış açısı oluşturacağı düşünülmektedir. Ayrıca, bundan sonraki çalışmalarda;

- AgNP'lerin topraklarda davranış durumu ve toprak mikroorganizmaları ile etkileşimleri hakkında daha kapsamlı çalışmaların gerçekleştirilmesi,
- Farklı sentez parametreleri ile gerçekleştirilecek olan AgNP'lerin etkinliğinin mikroorganizmalar ile etkileşiminde moleküler seviyelerde çalışılması,
- Nanopartiküllerin çeşitli biyoaktif ajanlar ile sinerjistik etkisinin mikroorganizmalar ile olan etkileşiminin aydınlatılması,
- Toprağın yapısının nanopartikül etkileşimindeki rolünün aydınlatılabilmesi için farklı özelliklere sahip topraklar ile çalışılması,
- Nanopartiküllerin topraktaki davranışında nanopartikül stabilitesinin öneminin anlaşılması için çalışılmalar yapılması önerilmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abou El-Nour, K. M. M., Eftaiha, A., Al-Warthan, A. and Ammar, R. A. A., 2010, Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry*, 3 (3), 135–140.
- Aderibigbe, B. A., 2017, Metal-based nanoparticles for the treatment of infectious diseases. *Molecules*, 22(8), 1370.
- Aewsiri, T., Benjakul, S. and Visessanguan, W., 2009, Functional properties of gelatin from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin as affected by bleaching using hydrogen peroxide. *Food Chemistry*, 115 (1), 243–249.
- Ahearn, D. G., May, L. L. and Gabriel, M. M., 1995, Adherence of organisms to silver-coated surfaces. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 15 (4), 372–376.
- Ahmad, N., Alam, M. K., Shehbaz, A., Khan, A., Mannan, A., Hakim, S. R., ... Owais, M., 2005, Antimicrobial activity of clove oil and its potential in the treatment of vaginal candidiasis. *Journal of Drug Targeting*, 13 (10), 555–561.
- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B. L. and Ikram, S. 2016, A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal of Advanced Research*, 7 (1), 17–28.
- Albanese, A., Tang, P. S. and Chan, W. C. W., 2012, The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 14 (1), 1–16.
- Aruguete, D. M. and Hochella, M. F., 2010, Bacteria–nanoparticle interactions and their environmental implications. *Environmental Chemistry*, 7 (1), 3–9.
- Balshaw, D. M., Philbert, M. and Suk, W. A., 2005, Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials, Part III: Nanoscale Technologies for Assessing Risk and Improving Public Health. *Toxicological Sciences*, 88 (2), 298–306.
- Behravan, M., Hossein Panahi, A., Naghizadeh, A., Ziaee, M., Mahdavi, R. and Mirzapour, A., 2019, Facile green synthesis of silver nanoparticles using *Berberis vulgaris* leaf and root aqueous extract and its antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124, 148–154.
- Burduşel, A.-C., Gherasim, O., Grumezescu, A. M., Mogoantă, L., Ficai, A. and Andronescu, E., 2018, Biomedical applications of silver nanoparticles: An up-to-date overview. *Nanomaterials*, 8 (9), 681.
- Burt, J. L., Gutiérrez-Wing, C., Miki-Yoshida, M. and José-Yacamán, M., 2004, Noble-metal nanoparticles directly conjugated to globular proteins. *Langmuir*, 20 (26), 11778–11783.

- Caldwell, B. A., 2005, Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review. *Pedobiologia*, 49 (6), 637–644.
- Cao, C., Huang, J., Cai, W.-S., Yan, C.-N., Liu, J.-L. and Jiang, Y.-D., 2017, Effects of Silver Nanoparticles on Soil Enzyme Activity of Different Wetland Plant Soil Systems. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 26 (5), 558–567.
- Cardozo, V. F., Oliveira, A. G., Nishio, E. K., Perugini, M. R. E., Andrade, C. G. T. J., Silveira, W. D., ... Nakazato, G., 2013, Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 12 (1), 1–8.
- Cornelis, G., Hund-Rinke, K., Kuhlbusch, T., van den Brink, N. and Nickel, C., 2014, Fate and Bioavailability of Engineered Nanoparticles in Soils: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 44 (24), 2720–2764.
- Das, P., Williams, C. J., Fulthorpe, R. R., Hoque, M. E., Metcalfe, C. D. and Xenopoulos, M. A., 2012, Changes in bacterial community structure after exposure to silver nanoparticles in natural waters. *Environmental science & technology*, 46 (16), 9120–9128.
- Deepak, P., Amutha, V., Kamaraj, C., Balasubramani, G., Aiswarya, D. and Perumal, P., 2019, Chemical and green synthesis of nanoparticles and their efficacy on cancer cells. *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*, 369–387.
- Ealia, S. A. M. and Saravanakumar, M. P., 2017, A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* içinde (C. 263, s. 032019 , IOP Publishing.
- Elansary, H. O. and Ashmawy, N. A., 2013, Essential oils of mint between benefits and hazards. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16 (4), 429–438.
- Fabrega, J., Fawcett, S. R., Renshaw, J. C. and Lead, J. R., 2009, Silver nanoparticle impact on bacterial growth: effect of pH, concentration, and organic matter. *Environmental science & technology*, 43 (19), 7285–7290.
- Fabrega, J., Luoma, S. N., Tyler, C. R., Galloway, T. S. and Lead, J. R., 2011, Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. *Environment International*, 37(2), 517–531.
- Feynman, R. P., 1959, Plenty of Room at the Bottom. *APS annual meeting* içinde .
- Galvez, A. M., Ramos, K. M., Teja, A. J. and Baculi, R., 2021, Bacterial exopolysaccharide-mediated synthesis of silver nanoparticles and their application on bacterial biofilms. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 970–978.

- Gangwar, J., Gupta, B. K. And Srivastava, A. K., 2016, Prospects of Emerging Engineered Oxide Nanomaterials and their Applications. *Defence Science Journal*, 66 (4), 323–340.
- Gee, G. W. and Bauder, J. W., 1986, Particle-size analysis. *Methods of Soil Analysis: Part 1 Physical and Mineralogical Methods*, 5, 383–411.
- Gomaa, E. Z., 2017, Antimicrobial, antioxidant and antitumor activities of silver nanoparticles synthesized by *Allium cepa* extract: A green approach. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15 (1), 49–57.
- Gugino, B. K., Abawi, G. S., Idowu, O. J., Schindelbeck, R. R., Smith, L. L., Thies, J. E., ... van Es, H. M., 2009, *Cornell soil health assessment training manual*. Cornell University College of Agriculture and Life Sciences.
- Gurunathan, S., Han, J. W., Kwon, D.-N. and 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), 373.
- Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S. V. and Zolfaghari, B., 2014, Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in pharmaceutical sciences*, 9 (6), 385.
- Jacobson, A. R., McBride, M. B., Baveye, P. and Steenhuis, T. S., 2005, Environmental factors determining the trace-level sorption of silver and thallium to soils. *Science of The Total Environment*, 345 (1–3), 191–205.
- Jamkhande, P. G., Ghule, N. W., Bamer, A. H. and Kalaskar, M. G., 2019, Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 53, 101174.
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A. and Danquah, M. K., 2018 , Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein journal of nanotechnology*, 9 (1), 1050–1074.
- Jiang, H., Manolache, S., Wong, A. C. L. and Denes, F. S., 2004, Plasma-enhanced deposition of silver nanoparticles onto polymer and metal surfaces for the generation of antimicrobial characteristics. *Journal of Applied Polymer Science*, 93 (3), 1411–1422.
- Khan, I., Saeed, K. and Khan, I., 2019, Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12 (7), 908–931.
- Kligler, B. and Chaudary, S., 2007, Peppermint oil. *American family physician*, 75 (7), 1027–1030.
- Klute, A., 1986, Water retention: laboratory methods. A. Klute (Ed.), *Methods of soil analysis: part 1—physical and mineralogical methods* içinde (Second Edi., ss. 635–

662 , Madison, Wisconsin USA: American Society of Agronomy, Inc. Soil Science Society of America, Inc.

- Lavanya, K., Kalaimurugan, D., Shivakumar, M. S. and Venkatesan, S. 2020, Gelatin Stabilized Silver Nanoparticle Provides Higher Antimicrobial Efficiency as Against Chemically Synthesized Silver Nanoparticle. *Journal of Cluster Science*, 31 (1), 265–275.
- Lee, C. and Zhang*, P., 2013, Facile synthesis of gelatin-protected silver nanoparticles for SERS applications. *Journal of Raman Spectroscopy*, 44 (6), 823–826.
- Mahmoud, K. H. and Abbo, M., 2013, Synthesis, characterization and optical properties of gelatin doped with silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 116, 610–615.
- Mandal, M. D. and Mandal, S., 2011, Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1 (2), 154–160.
- Mauter, M. S. and Elimelech, M., 2008, Environmental Applications of Carbon-Based Nanomaterials. *Environmental Science & Technology*, 42 (16), 5843–5859.
- McLean, E. O., 1983, Soil pH and lime requirement. *Methods of soil analysis: Part 2 Chemical and microbiological properties*, 9, 199–224.
- Moebius-Clune, B. N., Moebius-Clune, D. J., Gugino, B. K., Idowu, O. J., Schindelbeck, R. R. and Ristow, A. J., 2016, Comprehensive assessment of soil health: The Cornell Framework Manual, Edition 3.1, Cornell Univ., Ithaca, NY. Cornell University.
- Morones-Ramirez, J. R., Winkler, J. A., Spina, C. S. and Collins, J. J., 2013, Silver enhances antibiotic activity against gram-negative bacteria. *Science translational medicine*, 5 (190), 190ra81-190ra81.
- Mukherjee, P., Ahmad, A., Mandal, D., Senapati, S., Sainkar, S. R., Khan, M. I., ... Kumar, R., 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.
- Myint, S., Daud, W. R. W., Mohamad, A. B. and Kadhum, A. A. H., 1995, Separation and identification of eugenol in ethanol extract of cloves by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72 (10), 1231–1233.
- Nagarajan, M., Benjakul, S., Prodpran, T., Songtipya, P. and Kishimura, H., 2012, Characteristics and functional properties of gelatin from splendid squid (*Loligo formosana*) skin as affected by extraction temperatures. *Food Hydrocolloids*, 29 (2), 389–397.
- Nannipieri, P., Kandeler, E., Ruggiero, P., Burns, R. G. and Dick, R. P., 2002, Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications. *Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil*. New York (NY): Marcel Dekker, 1–33.

- Nasiriboroumand, M., Montazer, M. And Barani, H., 2018, Preparation and characterization of biocompatible silver nanoparticles using pomegranate peel extract. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 179, 98–104.
- Nelson, R. E., 1983, Carbonate and gypsum. *Methods of Soil Analysis: Part 2 Chemical and Microbiological Properties*, 9, 181–197.
- Oliveira, M. M., Ugarte, D., Zanchet, D. and Zarbin, A. J. G., 2005, Influence of synthetic parameters on the size, structure, and stability of dodecanethiol-stabilized silver nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 292 (2), 429–435.
- Perugini Biasi-Garbin, R., Saori Otaguiri, E., Morey, A. T., Fernandes da Silva, M., Belotto Morguette, A. E., Armando Contreras Lancheros, C., ... Yamada-Ogatta, S. F., 2015, Effect of Eugenol against *Streptococcus agalactiae* and Synergistic Interaction with Biologically Produced Silver Nanoparticles. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 861497.
- Peyrot, C., Wilkinson, K. J., Desrosiers, M. and Sauvé, S., 2014, Effects of silver nanoparticles on soil enzyme activities with and without added organic matter. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33 (1), 115–125.
- Plant, R. M., Dinh, L., Argo, S. and Shah, M., 2019, The Essentials of Essential Oils. *Advances in pediatrics*, 66, 111–122.
- Pourjavadi, A. and Soleyman, R., 2011, Silver nanoparticles with gelatin nanoshells: photochemical facile green synthesis and their antimicrobial activity. *Journal of Nanoparticle Research*, 13 (10), 4647–4658.
- Prabhu, S. and Poullose, E. K., 2012, Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International nano letters*, 2 (1), 32.
- Purohit, R., Purohit, K., Rana, S., Rana, R. S. and Patel, V., 2014, Carbon Nanotubes and Their Growth Methods. *Procedia Materials Science*, 6, 716–728.
- Rai, M., Yadav, A. and Gade, A., 2009, Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances*, 27 (1), 76–83.
- Rajput, N., 2015, Methods of preparation of nanoparticles-a review. *International Journal of Advances in Engineering & Technology*, 7 (6), 1806.
- Rath, G., Hussain, T., Chauhan, G., Garg, T. and Kumar Goyal, A., 2016, Fabrication and characterization of cefazolin-loaded nanofibrous mats for the recovery of post-surgical wound. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44 (8), 1783–
- Rhoades, J. D., 1982, in *Methods of Soil Analysis. Part2, Chemical and Microbiological Properties. Soluble salts*, 167–179.

- Roy, A., Bulut, O., Some, S., Mandal, A. K. and Yilmaz, M. D., 2019, Green synthesis of silver nanoparticles: biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. *RSC advances*, 9 (5), 2673–2702.
- Salomoni, R., Léo, P., Montemor, A. F., Rinaldi, B. G. and Rodrigues, M. F. A., 2017, Antibacterial effect of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nanotechnology, science and applications*, 10, 115.
- Sangwan, N. S., Farooqi, A. H. A., Shabih, F. and Sangwan, R. S., 2001, Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*, 34 (1), 3–21. doi:10.1023/A:1013386921596
- Scandorieiro, S., de Camargo, L. C., Lancheros, C. A. C., Yamada-Ogatta, S. F., Nakamura, C. v, de Oliveira, A. G., ... Kobayashi, R. K. T., 2016, Synergistic and Additive Effect of *Oregano* Essential Oil and Biological Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacterial Strains. *Frontiers in Microbiology*, 7, 760.
- Schrand, A. M., Rahman, M. F., Hussain, S. M., Schlager, J. J., Smith, D. A. and Syed, A. F., 2010, Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. *Wiley interdisciplinary reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2 (5), 544–568.
- Sharma, V. K., Yngard, R. A. ve Lin, Y., 2009, Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*, 145 (1–2), 83–96.
- Shawn, L. K., 2015, Essential Oils. R. S. Hoffman, M. A. Howland, N. A. Lewin, L. S. Nelson and L. R. Goldfrank (Ed.), *Goldfrank's Toxicologic Emergencies*, 10e içinde. New York, NY: McGraw-Hill Education. accesspharmacy.mhmedical.com/content.aspx?aid=1108428780 adresinden erişildi.
- Shinde, N. C., Keskar, N. J. and Argade, P. D., 2012, Nanoparticles: Advances in drug delivery systems. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 3 (1), 922–929.
- Silva, G. A., 2004, Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surgical Neurology*, 61 (3), 216–220.
- Singh, J., Dutta, T., Kim, K.-H., Rawat, M., Samddar, P. and Kumar, P., 2018, 'Green' synthesis of metals and their oxide nanoparticles: applications for environmental remediation. *Journal of Nanobiotechnology*, 16 (1), 84.
- Siqueira, J. R. and Oliveira, O. N., 2017, Carbon-based nanomaterials. In *Nanostructures* (pp. 233-249). William Andrew Publishing.
- Song, W. and Ge, S., 2019, Application of antimicrobial nanoparticles in dentistry. *Molecules*, 24 (6), 1033.
- Stankic, S., Suman, S., Haque, F. and Vidic, J., 2016, Pure and multi metal oxide nanoparticles: synthesis, antibacterial and cytotoxic properties. *Journal of nanobiotechnology*, 14 (1), 1–20.

- Su, C. H., Velusamy, P., Kumar, G. V., Adhikary, S., Pandian, K. and Anbu, P., 2017, Studies of antibacterial efficacy of different biopolymer protected silver nanoparticles synthesized under reflux condition. *Journal of Molecular Structure*, 1128, 718–723.
- Tabatabai, M A., 2002, Enzymes in soil. In ‘Enzymes in the environment: activity, ecology and applications’.(Eds RG Burns, RP Dick) pp. 567–596. Marcel Dekker: New York, NY, USA.
- Tabatabai, M Ali and Bremner, J. M., 1969, Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil biology and biochemistry*, 1 (4), 301–307.
- Thakkar, K. N., Mhatre, S. S. and Parikh, R. Y., 2010, Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6 (2), 257–262.
- Thalmann, A., 1968, Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität im Boden mittels triphenyltetrazoliumchlorid (TTC), *Landwirtsch Forsch.*, 21, 249–258.
- Tiwari, D. K., Behari, J. and Sen, P., 2008, Application of nanoparticles in waste water treatment 1.
- Tiwari, J. N., Tiwari, R. N. and Kim, K. S., 2012, Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices. *Progress in Materials Science*, 57 (4), 724–803.
- Wigginton, N. S., Titta, A. de, Piccapietra, F., Dobias, J., Nesatyy, V. J., Suter, M. J. F. and Bernier-Latmani, R., 2010, Binding of silver nanoparticles to bacterial proteins depends on surface modifications and inhibits enzymatic activity. *Environmental Science & Technology*, 44 (6), 2163–2168.
- Wijnhoven, S. W. P., Peijnenburg, W. J. G. M., Herberts, C. A., Hagens, W. I., Oomen, A. G., Heugens, E. H. W., ... Geertsma, R. E., 2009, Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology*, 3(2), 109–138.
- Wiley, B., Sun, Y., Mayers, B. AND Xia, Y., 2005, Shape-controlled synthesis of metal nanostructures: the case of silver. *Chemistry—A European Journal*, 11 (2), 454–463.
- Wright, A. F. and Bailey, J. S., 2001, Organic carbon, total carbon, and total nitrogen determinations in soils of variable calcium carbonate contents using a Leco CN-2000 dry combustion analyzer. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 32 (19–20), 3243–3258.
- Yılmaz Öztürk, B., Yenice Gürsu, B. and Dağ, İ., 2020, Antibiofilm and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles using marine red algae *Gelidium corneum*. *Process Biochemistry*, 89, 208–219.

- Yin, P. T., Kim, T.-H., Choi, J.-W. and Lee, K.-B., 2013, Prospects for graphene–nanoparticle-based hybrid sensors. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15 (31), 12785–12799.
- Yiwei, A., Yunxia, Y., Shuanglong, Y., Lihua, D. and Guorong, C., 2007, Preparation of spherical silver particles for solar cell electronic paste with gelatin protection. *Materials Chemistry and Physics*, 104 (1), 158–161.
- Yun'an Qing, L. C., Li, R., Liu, G., Zhang, Y., Tang, X., Wang, J., ... Qin, Y., 2018, Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. *International journal of nanomedicine*, 13, 3311.
- Zafar, M. S., Khurshid, Z., Najeeb, S., Zohaib, S. and Rehman, I. U., 2017, Therapeutic applications of nanotechnology in dentistry. *Nanostructures for oral medicine içinde* (ss. 833–862), Elsevier.
- Zhang, C., Hu, Z. and Deng, B., 2016, Silver nanoparticles in aquatic environments: Physiochemical behavior and antimicrobial mechanisms. *Water Research*, 88, 403–427.
- Zhang, X.-F., Liu, Z.-G., Shen, W. and Gurunathan, S., 2016, Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International journal of molecular sciences*, 17 (9), 1534.
- Zhao, X., Zhou, L., Riaz Rajoka, M. S., Yan, L., Jiang, C., Shao, D., ... Jin, M., 2018, Fungal silver nanoparticles: synthesis, application and challenges. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38 (6), 817–835.