

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YEŞİL SENTEZ İLE ELDE EDİLEN METAL NANOPARTİKÜLLERİN
ANTİMİKROBİYAL VE ANTİBİYOFİLM ETKİNLİKLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

FATİH ERCİ

**DOKTORA TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. RABİA ÇAKIR KOÇ**

İSTANBUL, 2018

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YEŞİL SENTEZ İLE ELDE EDİLEN METAL NANOPARTİKÜLLERİN
ANTİMİKROBİYAL VE ANTİBİYOFİLM ETKİNLİKLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Fatih ERCİ tarafından hazırlanan tez çalışması 30.04.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Rabia ÇAKIR KOÇ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Rabia ÇAKIR KOÇ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. İlhan ONARAN
İstanbul Üniversitesi

Doç. Dr. Muhammet Übeydullah KAHVECİ
İstanbul Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Cem Bülent ÜSTÜNDAĞ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Didem ÖZÇİMEN
Yıldız Teknik Üniversitesi

ÖNSÖZ

Yeşil sentez ile elde edilen metal nanopartiküllerin antimikrobiyal ve antibiyofilm etkinliklerinin değerlendirilmesi konu başlıklı doktora tez yolculuğum süresince engin bilgi ve deneyimi ile bu yolda ilerlememde yardımcı olan çok değerli danışman hocam Doç. Dr. Rabia ÇAKIR KOÇ'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Bu çalışmanın yerine getirilmesine imkân sağlayan Kimya-Metalurji Fakültesi Dekanlığına, Fen Bilimleri Enstitüsüne, Biyomühendislik Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. Sevil YÜCEL, öğretim üyesi Prof. Dr. İbrahim IŞILDAK ve bölümümüzün değerli öğretim üyeleri ile asistanlarına,

Ayrıca gerektiğinde yardımlarını esirgemeyen İstanbul Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. İlhan ONARAN, İstanbul Teknik Üniversitesi öğretim üyesi Doç. Dr. Muhammet U. KAHVECİ, Necmettin Erbakan Üniversitesi öğretim üyelerinden Doç. Dr. Mustafa YÖNTEM, Doç. Dr. Emrah TORLAK ve Selçuk Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Hüseyin KARA'YA,

Deneysel çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen ve desteklerini unutamayacağım Zeynep KAYA, Behiç Selman ERDOĞDU, Esra KARAKAŞ, Burcu ESKİCİ ve Esra KAVCI'ya,

Ayrıca yaşadığım her türlü zorluğa rağmen hiçbir desteği benden esirgemeyen sevgili aileme,

Çalışkanlık, disiplin, özgüven ve vazgeçmemeyi öğrenerek örnek aldığım ve her zaman desteğini yanımda hissettiğim sevgili eşim Vildan ERCİ'ye ve anlayışı ile bana destek olan oğlum İbrahim Ethem ERCİ'ye bütün içtenliğimle teşekkürü bir borç bilirim.

Nisan, 2018

Fatih ERCİ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	viii
KISALTMA LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xiv
ÖZET	xvi
ABSTRACT.....	xviii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	2
1.3 Hipotez	2
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Nanoteknoloji	3
2.2 NP'lerin Sınıflandırılması.....	5
2.2.1 Lipozomlar	5
2.2.2 Süperparamanyetik NP'ler	6
2.2.3 Fullerenler: Buckyballlar ve Karbon Nanotüpler	6
2.2.4 Dendrimerler	7
2.2.5 Kuantum Dotlar	8
2.2.6 Sıvı Kristaller	8
2.3 Metal NP	9
2.3.1 Metal NP Sentez Yöntemleri	9
2.4 NP Biyosentezi	12

2.4.1	Biyosentez.....	12
2.4.2	NP'lerin Bitkiler Aracılığı ile Sentezi.....	13
2.4.2.1	Bitki Ekstraktlarıyla NP Sentezini Etkileyen Faktörler	16
2.4.2.2	NP Sentezinde İndirgeyici Ajan Olarak Doğal Ürünler	19
2.4.2.3	Bitki Materyalinin Seçimi, Toplanması ve Tanımlanması.....	20
2.4.3	NP'lerin Mikroorganizmalar Aracılığı ile Sentezi	20
2.5	Biyolojik Sentez Sonrası NP Ayrıştırılması.....	22
2.5.1	Ultrasantrifügasyon ve Liyofilizasyon	22
2.5.2	Manyetik Ayırma Yöntemleri.....	22
2.5.3	Membran Filtrasyonu	22
2.5.4	Kalsinasyon	23
2.6	Biyolojik Sentez Sonrası NP'lerin Karakterizasyonu	23
2.6.1	Sentezlenmiş NP'lerin X-ışını Kırınımı	23
2.6.2	Geçirimli Elektron Mikroskopisi (TEM)	24
2.6.3	Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)	25
2.6.4	Fourier Dönüştürücü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR).....	26
2.6.5	UV-Vis Spektroskopisi.....	26
2.6.6	Dinamik Işık Saçılması (DLS) ve Zeta Potansiyeli	27
2.6.7	Enerji Dağılım X-RAY Spektroskopisi (EDS)	28
2.6.8	Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM)	28
2.7	Metal NP'lerin Kullanım Alanları.....	29
2.7.1	Biyomedikal Uygulamalar	30
2.7.1.1	İlaç Dağıtımı ve Kanser Tedavisi	31
2.7.1.2	Tıbbi Teşhis ve Sensörler	31
2.7.1.3	Tıbbi Görüntüleme Uygulamaları.....	32
2.7.2	Atık Su Arıtma	33
2.7.3	Kozmetik	34
2.7.4	Gıda Endüstrisi	34
2.8	NP'lerin Antimikrobiyal Etkinlikleri ve Mekanizması	34
2.8.1	Gümüş NP'lerin Antimikrobiyal Özellikleri ve Mekanizması	36
2.8.2	Bakır Oksit NP'lerin Antimikrobiyal Özellikleri ve Mekanizması	40
2.8.3	Demir Oksit NP'lerin Antimikrobiyal Özellikleri ve Mekanizması.....	42
2.9	NP'lerin Antibiyofilm Özellikleri ve Mekanizması	42
2.9.1	Biyofilm Yapısı ve Oluşum Basamakları	42
2.9.2	NP'lerin Antibiyofilm Etkinlikleri	44
2.10	<i>Thymbra spicata</i> (Zahter) Bitkisi	47
2.11	<i>Cynara scolymus</i> (Enginar) Bitkisi	48
2.12	<i>Mentha piperita</i> (Nane) Bitkisi.....	48

BÖLÜM 3

DENEYSEL ÇALIŞMALAR	50
3.1 Materyal.....	50
3.1.1 Ekipman	50
3.1.2 Kimyasallar.....	52

3.1.3	Deneylerde Kullanılan Tampon, Kùltür Ortamları ve Kimyasalların Hazırlanışı.....	54
3.1.3.1	Çözeltiiler	54
3.1.3.2	Besiyerleri.....	54
3.2	Metot	55
3.2.1	Bitki Örneklerinin Toplanması	55
3.2.2	Bitki Ekstraktının Hazırlanması	56
3.2.3	AgNP Sentezi.....	56
3.2.4	CuONP Sentezi	57
3.2.5	FeONP Sentezi	57
3.2.6	Sentezlenen NP'lerin Karakterizasyonu	57
3.2.6.1	UV-Vis Analizi	57
3.2.6.2	XRD Analizi	58
3.2.6.3	AFM Analizi	58
3.2.6.4	NP'lerin Zeta Potansiyelinin Ölçülmesi	58
3.2.6.5	NP'lerin Boyut Ölçümleri.....	58
3.2.6.6	FTIR Analizi	59
3.2.6.7	SEM ve EDS Analizi	59
3.2.6.8	TEM Analizi.....	59
3.2.7	Sentezlenen NP'lerin Antibakteriyel Aktiviteleri	60
3.2.7.1	Mikroorganizmalar ve Kùltür Ortamları.....	60
3.2.7.2	McFarland Standartlarının Hazırlanması	60
3.2.7.3	Disk Difüzyon Yöntemi	61
3.2.7.4	Mikrodilüsyon Yöntemi.....	61
3.2.7.5	Hücre Bileşenlerinin Salınımı Tayini	61
3.2.7.6	NP'lerin <i>S.aureus</i> Büyüme Kinetiği Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi	62
3.2.8	NP'lerin Antibiyofilm Etkinlikleri	62
3.2.8.1	Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi.....	62
3.2.8.2	Antibiyofilm Aktivite Tayini	62
3.2.9	NP'lerin Sitotoksik Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	63
3.2.10	DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesinin Belirlenmesi	64
3.2.11	İstatiksel Analizler	64
BÖLÜM 4		
DENEYSEL SONUÇLAR		65
4.1	Gümüş NP'ler	65
4.1.1	AgNP Sentezi.....	65
4.1.2	AgNP UV-Vis Karakterizasyonu.....	67
4.1.2.1	AgNP UV-Vis Karakterizasyonu	67
4.1.2.2	AgNP XRD Karakterizasyonu	71
4.1.2.3	AgNP AFM Karakterizasyonu	71
4.1.2.4	AgNP FTIR Karakterizasyonu	72
4.1.2.5	AgNP SEM ve EDS Karakterizasyonu	76

4.1.2.6	AgNP TEM Karakterizasyonu.....	80
4.1.2.7	AgNP DLS ve Zeta Potansiyel Karakterizasyonu.....	85
4.1.3	AgNP'lerin Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi	91
4.1.4	AgNP'lerin Antibiyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi	100
4.1.5	AgNP'lerin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	101
4.1.6	AgNP Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi	104
4.2	Bakır Oksit NP'ler	105
4.2.1	CuONP Sentez ve Karakterizasyonu	105
4.2.2	CuONP Antibakteriyel aktivitesinin Belirlenmesi	115
4.2.3	CuONP Antibiyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi	121
4.2.4	CuONP Sitotok Etkisinin ve Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi	122
4.3	Demir Oksit NP'ler	125
4.3.1	FeONP Sentezi ve Karakterizasyonu	125
4.3.2	FeONP Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi	135
4.3.3	FeONP Antibiyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi	139
4.3.1	FeONP Sitotoksik Etkisinin ve Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi	140
BÖLÜM 5		
SONUÇ VE ÖNERİLER		143
KAYNAKLAR.....		154
ÖZGEÇMİŞ		173

SİMGE LİSTESİ

°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre
g	Gram
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
rpm	Dakikada dönme hızı

KISALTMA LİSTESİ

ASTM	Amerikan Test ve Malzemeler Derneği
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
ATR	Zayıflatılmış Toplam Yansıma
BAuA	Federal İş Sağlığı ve Güvenliği Enstitüsü (Almanya)
BSI	İngiliz Standartları Enstitüsü
DLS	Dinamik Işık Saçılması
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu
FBS	Fetal Sığır Serum
FT-IR	Fourier Dönüşümü Kızılötesi
ISO	Uluslararası Standartlar Teşkilâtı
JCPDS	Toz Kırınım Standartları Ortak Komitesi
MBK	Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
NIOSH	Ulusal İş Sağlığı ve Güvenliği Enstitüsü (Amerika Birleşik Devletleri)
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu
SCCP	Tüketici Ürünleri Bilimsel Komitesi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopisi
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskopisi
UV-Vis	UV-Görünür Bölge Spektroskopisi
XRD	X-Işını Kırınımı Difraktometresi

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	Bazı moleküllerin ve nanoboyuttaki yapıların büyüklüklerinin karşılaştırılması	5
Şekil 2.2	Farklı NP sınıfları	9
Şekil 2.3	NP üretiminde kullanılan yaklaşımlar	10
Şekil 2.4	NP sentez mekanizmalarının temel şablonu	11
Şekil 2.5	Biyolojik olarak yönlendirilen NP sentezinin olası mekanizması	13
Şekil 2.6	NP'lerin bitki aracılı biyosentezi için örnek bir deney protokolü.....	16
Şekil 2.7	Bitki özleri ile nanopartiküllerin sentezini etkileyen faktörler.....	17
Şekil 2.8	Oksitlenmiş polifenollerin, AgNP'lerin boyutunun ve şeklinin ayarlanmasında rolünü gösteren mekanizma	18
Şekil 2.9	Biyomedikal ve çevresel alanlarda metal NP'lerin biyolojik sentezi ve uygulamaları	29
Şekil 2.10	Hücre zar yapısı ve bunun antimikrobiyal seçicilik üzerindeki etkisi	36
Şekil 2.11	Gümüş NP'lerin çeşitli antibakteriyel etki mekanizmaları.....	38
Şekil 2.12	Bakır oksit NP'ler tarafından hücrel toksisite oluşturan farklı yolların şematik görünümü.....	41
Şekil 2.13	Biyofilm oluşum aşamaları.....	44
Şekil 2.14	İmplant yüzeylerinde biyofilm oluşumunu önlemede üç farklı yaklaşım.....	47
Şekil 4.1	<i>T. spicata</i> yaprak ekstraktı AgNO ₃ karışımı ile AgNP sentezinin zamana bağlı renk değişimi.....	67
Şekil 4.2	<i>T. spicata</i> sulu ekstraktından elde edilen 1 numaralı örneğin zamana bağlı değişimini gösteren UV-Vis analizi.....	67
Şekil 4.3	<i>T. spicata</i> sulu ekstraktından elde edilen 2 numaralı örneğin zamana bağlı değişimini gösteren UV-Vis analizi.....	68
Şekil 4.4	<i>T. spicata</i> sulu ekstraktından elde edilen AgNP'lerin UV-Vis analizi	69
Şekil 4.5	<i>T. spicata</i> sulu ekstraktından elde edilen AgNP'lerin sıcaklığa bağlı değişimini gösteren UV-Vis analizi	69
Şekil 4.6	CsAgNP UV-Vis analizi	70
Şekil 4.7	MpAgNP UV-Vis analizi	70
Şekil 4.8	Ts2AgNP XRD analizi	71
Şekil 4.9	Ts2AgNP AFM analizi ve üç boyutlu görüntüsü	72
Şekil 4.10	<i>T. spicata</i> ekstrakt FTIR analizi.....	73
Şekil 4.11	<i>T. spicata</i> AgNP FTIR analizi	73

Şekil 4.12	<i>C. scolymus</i> yaprak ekstraktı FTIR analizi.....	74
Şekil 4.13	<i>C. scolymus</i> AgNP FTIR analizi.....	74
Şekil 4.14	<i>M. piperita</i> yaprak ekstraktı FTIR analizi	75
Şekil 4.15	<i>M. piperita</i> AgNP FTIR analizi.....	76
Şekil 4.16	Ts2AgNP SEM görüntüsü	77
Şekil 4.17	Ts2AgNP EDS spektrumları	77
Şekil 4.18	CsAgNP SEM görüntüsü	78
Şekil 4.19	CsAgNP EDS spektrumları	79
Şekil 4.20	MpAgNP SEM görüntüsü	79
Şekil 4.21	MpAgNP EDS spektrumları	80
Şekil 4.22	Ts1AgNP TEM analizi	81
Şekil 4.23	Ts1AgNP TEM ortalama büyüklük dağılımı	81
Şekil 4.24	Ts2AgNP TEM analizi	82
Şekil 4.25	Ts2AgNP TEM ortalama büyüklük dağılımı	82
Şekil 4.26	CsAgNP TEM analizi	83
Şekil 4.27	CsAgNP TEM ortalama büyüklük dağılımı	83
Şekil 4.28	MpAgNP TEM analizi	84
Şekil 4.29	MpAgNP TEM ortalama büyüklük dağılımı	84
Şekil 4.30	Ts1AgNP DLS analizi	85
Şekil 4.31	Ts2AgNP DLS analizi	86
Şekil 4.32	CsAgNP DLS analizi	87
Şekil 4.33	MpAgNP DLS analizi	88
Şekil 4.34	Ts1AgNP zeta potansiyeli	90
Şekil 4.35	Ts2AgNP zeta potansiyeli	90
Şekil 4.36	CsAgNP zeta potansiyeli	91
Şekil 4.37	MpAgNP zeta potansiyeli	91
Şekil 4.38	AgNP'lerin ile bakterilere karşı göstermiş oldukları antibakteriyel aktivitenin mm cinsinden zon çapları	93
Şekil 4.39	Ts1AgNP'lerin değişen konsantrasyonlarında <i>S. aureus</i> 'un büyüme profilinde zamana bağlı değişim	97
Şekil 4.40	Ts2AgNP'lerin değişen konsantrasyonlarında <i>S. aureus</i> 'un büyüme profilinde zamana bağlı değişim	97
Şekil 4.41	CsAgNP'lerin değişen konsantrasyonlarında <i>S. aureus</i> 'un büyüme profilinde zamana bağlı değişim	98
Şekil 4.42	MpAgNP'lerin değişen konsantrasyonlarında <i>S. aureus</i> 'un büyüme profilinde zamana bağlı değişim	98
Şekil 4.43	AgNO ₃ 'ün değişen konsantrasyonlarında <i>S. aureus</i> 'un büyüme profilinde zamana bağlı değişim	99
Şekil 4.44	<i>T. spicata</i> ekstraktının değişen konsantrasyonlarında <i>S. aureus</i> 'un büyüme profilinde zamana bağlı değişim	99
Şekil 4.45	Congo Red Agar'da slime üretiminin fenotipik ekspresyonu	100
Şekil 4.46	Sentezlenen AgNP'lerin <i>S. aureus</i> 'a karşı göstermiş oldukları antibiyofilm aktivitelerinin % inhibisyon değeri	101
Şekil 4.47	Ts1AgNP'lerin L929 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi	102
Şekil 4.48	Ts2AgNP'lerin L929 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi	102

Şekil 4.49	CsAgNP'lerin L929 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi	103
Şekil 4.50	MpAgNP'lerin L929 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi.....	104
Şekil 4.51	AgNO ₃ 'ün L929 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi	104
Şekil 4.52	AgNP'lerin göstermiş oldukları % DPPH serbest radikal giderim aktivite değerleri.....	105
Şekil 4.53	<i>T. spicata</i> yaprak ekstraktı CuSO ₄ .5H ₂ O karışımı sonrası CuONP sentezini gösteren renk değişimi	106
Şekil 4.54	<i>T. spicata</i> ekstraktı aracılığı ile sentezlenen CuONP'lerin UV-vis spektrumu	106
Şekil 4.55	Ts2CuONP AFM analizi.....	107
Şekil 4.56	Ts1CuONP FTIR analizi	108
Şekil 4.57	Ts1CuONP SEM görüntüsü	108
Şekil 4.58	Ts1CuONP EDS spektrumları	109
Şekil 4.59	Ts1CuONP elementel analizi.....	110
Şekil 4.60	Ts2CuONP SEM görüntüsü	110
Şekil 4.61	Ts1CuONP TEM analizi.....	111
Şekil 4.62	Ts1CuONP TEM ortalama büyüklük dağılımı	111
Şekil 4.63	Ts2CuONP TEM analizi.....	112
Şekil 4.64	Ts2CuONP TEM ortalama büyüklük dağılımı	112
Şekil 4.65	Ts1CuONP DLS analiz sonuçları	113
Şekil 4.66	Ts2CuONP DLS analiz sonuçları	114
Şekil 4.67	Ts1CuONP zeta potansiyeli.....	115
Şekil 4.68	Ts2CuONP zeta potansiyeli.....	115
Şekil 4.69	Disk difüzyon yöntemi ile bakteri suşlarına karşı CuONP'lerin göstermiş oldukları antibakteriyal aktivite	117
Şekil 4.70	Ts1CuONP'lerin değişen konsantrasyonlarında <i>S. aureus</i> 'un büyüme profilinde zamana bağlı değişim	120
Şekil 4.71	Ts2CuONP'lerin değişen konsantrasyonlarında <i>S. aureus</i> 'un büyüme profilinde zamana bağlı değişim	120
Şekil 4.72	CuSO ₄ .5H ₂ O değişen konsantrasyonlarında <i>S. aureus</i> 'un büyüme profilinde zamana bağlı değişim.....	121
Şekil 4.73	Sentezlenen CuONP'lerin <i>S. aureus</i> 'a karşı göstermiş oldukları antibiyofilm aktivitelerinin % inhibisyon değeri.....	122
Şekil 4.74	Ts1CuONP'lerin L929 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi	123
Şekil 4.75	Ts2CuONP'lerin L929 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi	123
Şekil 4.76	CuSO ₄ .5H ₂ O'nun L929 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi	124
Şekil 4.77	CuONP'lerin göstermiş oldukları % DPPH serbest radikal giderim aktivite değerleri.....	124
Şekil 4.78	<i>T. spicata</i> ekstraktı aracılığı ile sentezlenen FeONP görüntüsü.....	125
Şekil 4.79	<i>T. spicata</i> ekstraktı aracılığı ile sentezlenen FeONP'lerin UV-Vis spektrumu	125
Şekil 4.80	Ts2FeONP AFM analizi	126
Şekil 4.81	Ts1FeONP FTIR analizi.....	127
Şekil 4.82	Ts1FeONP SEM analiz görüntüsü.....	127
Şekil 4.83	Ts2FeONP SEM analiz görüntüsü.....	128

Şekil 4.84	Ts1FeONP EDS spektrumları	128
Şekil 4.85	Ts1FeONP elemental	129
Şekil 4.86	Ts1FeONP-a TEM analizi	130
Şekil 4.87	Ts1FeONP-a TEM ortalama büyüklük dağılımı	130
Şekil 4.88	Ts1FeONP-b TEM analizi	131
Şekil 4.89	Ts1FeONP-b TEM ortalama büyüklük dağılımı	131
Şekil 4.90	Ts2FeONP TEM analizi	132
Şekil 4.91	Ts2FeONP TEM ortalama büyüklük dağılımı	132
Şekil 4.92	Ts1FeONP DLS analiz sonuçları	133
Şekil 4.93	Ts2FeONP DLS analiz sonuçları	134
Şekil 4.94	Ts1FeONP zeta potansiyeli	135
Şekil 4.95	Ts2FeONP zeta potansiyeli	135
Şekil 4.96	Disk difüzyon yöntemi ile bakteri suşlarına karşı FeONP'lerin göstermiş oldukları antibakteriyal aktivite	136
Şekil 4.97	Ts1FeONP'lerin değişen konsantrasyonlarında <i>S. aureus</i> 'un büyüme profilinde zamana bağlı değişim	138
Şekil 4.98	Ts2FeONP'lerin değişen konsantrasyonlarında <i>S. aureus</i> 'un büyüme profilinde zamana bağlı değişim	138
Şekil 4.99	FeSO ₄ .7H ₂ O muamelesinden sonra <i>S. aureus</i> 'un büyüme profilinde zamana bağlı değişim	139
Şekil 4.100	Sentezlenen FeONP'lerin <i>S. aureus</i> 'a karşı göstermiş oldukları antibiyofilm aktivitelerinin % inhibisyon değeri.....	140
Şekil 4.101	Ts1FeONP'lerin L929 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi	141
Şekil 4.102	Ts2FeONP'lerin L929 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi	141
Şekil 4.103	FeSO ₄ .7H ₂ O'nun L929 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi.....	142
Şekil 4.104	FeONP'lerin göstermiş oldukları % DPPH serbest radikal giderim aktiviteleri	142

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1	Çeşitli organizasyonlar tarafından nanopartikül ve nanomalzemelerin tanımları.....	4
Çizelge 3.1	Çalışmalarda kullanılan ekipman ve sarf malzemeler	50
Çizelge 3.2	Çalışmalarda kullanılan ekipman ve sarf malzemeler (devamı)	51
Çizelge 3.3	Çalışmalarda kullanılan ekipman ve sarf malzemeler (devamı)	52
Çizelge 3.4	Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler	52
Çizelge 3.5	Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler (devamı)	53
Çizelge 3.6	McFarland standartlarının hazırlanması için kullanılacak karışımların oranları.....	60
Çizelge 4.1	NP sentezinde kullanılan bitkiler ve sentez koşulları.....	66
Çizelge 4.2	Ts2AgNP'lerin EDS analizine göre elementlerin ağırlıkça yüzdeleri	78
Çizelge 4.3	CsAgNP'lerin EDS analizine göre elementlerin ağırlıkça yüzdeleri	79
Çizelge 4.4	Sentezlenen MpAgNP'lerin EDS analizine göre elementlerin ağırlıkça yüzdeleri.....	80
Çizelge 4.5	Ts1AgNP DLS analizi sonucunda ortaya çıkan sayısal değerler	86
Çizelge 4.6	Ts2AgNP DLS analizi sonucunda ortaya çıkan sayısal değerler	87
Çizelge 4.7	CsAgNP DLS analizi sonucunda ortaya çıkan sayısal değerler	88
Çizelge 4.8	MpAgNP DLS analizi sonucunda ortaya çıkan sayısal değerler.....	89
Çizelge 4.9	Nanoakışkanların Zeta potansiyeli ile ilişkisi.....	89
Çizelge 4.10	Disk difüzyon yöntemi ile bakteri suşlarına karşı gümüş NP'lerin mm cinsinden zon bölgeleri	92
Çizelge 4.11	Mikrodilüsyon yöntemi ile bakteri suşlarına karşı gümüş NP'lerin minimum inhibisyon ve bakterisidal konsantrasyonları (MİK ve MBK) (µg/mL).....	94
Çizelge 4.12	Ts1AgNP'ler ile muamele edilen bakterilerin hücre bileşenlerinin salınımının ölçülmesi.....	95
Çizelge 4.13	CsAgNP'ler ile muamele edilen bakterilerin hücre bileşenlerinin salınımının ölçülmesi.....	96
Çizelge 4.14	Sentezlenen CuONP'lerin EDS analizine göre elementlerin ağırlıkça yüzdeleri.....	109
Çizelge 4.15	Ts1CuONP DLS analizi sonucunda ortaya çıkan sayısal değerler.....	113
Çizelge 4.16	Ts2CuONP DLS analizi sonucunda ortaya çıkan sayısal değerler.....	114
Çizelge 4.17	Disk difüzyon yöntemi ile bakteri suşlarına karşı CuONP'lerin mm cinsinden zon bölgeleri	116

Çizelge 4.18 Mikrodilüsyon yöntemi ile bakteri suşlarına karşı CuONP'lerin minimum inhibisyon ve bakterisidal konsantrasyonları (MİK ve MBK) ($\mu\text{g/mL}$)	118
Çizelge 4.19 Ts1CuONP'ler ile muamele edilen bakterilerin hücre bileşenlerinin salınımının ölçülmesi.....	119
Çizelge 4.20 Sentezlenen FeONP'lerin EDS analizine göre elementlerin ağırlıkça yüzdeleri.....	129
Çizelge 4.21 Ts1FeONP DLS analizi sonucunda ortaya çıkan sayısal değerler	133
Çizelge 4.22 Ts2FeONP DLS analizi sonucunda ortaya çıkan sayısal değerler	134
Çizelge 4.23 Ts1FeONP'ler ile muamele edilen bakterilerin hücre bileşenlerinin salınımının ölçülmesi.....	137
Çizelge 4.24 Mikrodilüsyon yöntemi ile bakteri suşlarına karşı FeONP'lerin minimum inhibisyon ve bakterisidal konsantrasyonları (MİK ve MBK) ($\mu\text{g/mL}$)	137

**YEŞİL SENTEZ İLE ELDE EDİLEN METAL NANOPARTİKÜLLERİN
ANTİMİKROBİYAL VE ANTİBİYOFİLM ETKİNLİKLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Fatih ERCİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Rabia ÇAKIR KOÇ

Nanoteknoloji alanındaki son gelişmeler, nano boyuttaki yapıların artan yüzey alanı ve sahip oldukları birçok farklı özellik nedeniyle günümüzde dikkat çekmektedir. Nanopartikül (NP) araştırmaları, bilim dünyasını dönüştürmeye katkıda bulunan çalışma alanlarına olağanüstü katkılar sağlamaktadır. NP'ler; tüketim ve endüstriyel ürünlerde uygulama alanı bulurken, benzersiz özellikleri ile çok önemli değişikliklere yol açacak ölçüde teknolojiyi geliştirmeye devam etmektedir. Ancak, NP'lerin artan üretimi, bunların kullanımı veya çevrede istenmeyen bir şekilde serbest bırakılmaları, tüketici ve çevre güvenliğini sağlayan süreçlere ve politikalara duyulan ihtiyaçları ortaya çıkarmaktadır. NP'lerin potansiyel olarak güvenli bir şekilde hazırlanması ve güvenli kullanım yöntemlerini bir araya getirdiğimizde oluşabilecek herhangi zararlı bir etkinin ortadan kaldırılması mümkün olacaktır. Farklı biyolojik yöntemler kullanılarak NP'lerin biyosentezi, farklı disiplinlerdeki sayısız uygulamalar için etkin olmaktadır. NP'lerin sentezi için farklı yaklaşımlar (fiziksel ve kimyasal) kullanılmasına rağmen, yeşil sentez yöntemi yüksek etkinliği, maliyet etkinliği ve çevresel faydası nedeniyle en çok tercih edilen yöntem haline gelmiştir.

Yapılan tez çalışması kapsamında; bitki ekstraktlarını kullanarak gümüş (AgNP), bakır oksit (CuONP) ve demir oksit (FeONP) NP'lerinin sentezinin ve karakterizasyonun gerçekleştirilmesi ve bu yolla sentezlenen NP'lerin biyolojik aktivitelerinin ortaya

ıkarılması temel hedef olarak belirlendi. Ayrıca metalik NP'lerin boyutunun ve şeklinin, sentezde kullanılan bitki ekstrakt kaynağının NP'lerin göstermiş oldukları antimikrobiyal ve antibiyofilm etki başta olmak üzere çeşitli biyolojik aktivitelerindeki rollerinin belirlenmesi de çalışmanın temel hedeflerinden birini oluşturmaktadır. Bu amaç doğrultusunda; AgNP, CuONP ve FeONP farklı konsantrasyonlardaki *Thymbra spicata* L. var. *spicata* (Zahter) sulu yaprak ekstraktları kullanarak oda sıcaklığında yeşil sentezle ile elde edildi. *Cynara scolymus* (Enginar) ve *Mentha piperita* (Nane) yaprak ekstraktları AgNP sentezinde kullanarak, ekonomik öneme sahip olan üç bitkinin yaprak özütleri aracılığı ile sentezlenen NP'lerin biyolojik aktiviteleri karşılaştırmalı olarak incelendi. NP'ler farklı spektroskopik ve mikroskopik analiz yöntemleri kullanarak karakterize edildi. Sonuç olarak; bitki ekstraktları kullanarak sentezlenen AgNP'lerin TEM analizi, AgNP'lerin boyut ve şeklinin bitki ekstraktı konsantrasyonu ile kontrol edilebileceğini ortaya çıkardı. TEM sonuçlarına göre *T. spicata* yaprak ekstrakt konsantrasyonunun arttırılması ile ortalama AgNP partikül çapının 70.2 nm'den 25.1 nm'ye düştüğü gözlemlendi. Ayrıca, TEM ile yapılan boyut analizlerine göre CuONP ve FeONP'lerin ortalama partikül çapının 25 ve 100 nm civarında olduğu tespit edildi. Aynı zamanda farklı tekniklerle NP'lerin boyut analizi incelendiğinde NP boyutunun DLS>AFM>TEM>XRD olarak sıralandığı ortaya çıktı. Üç farklı bitkinin yaprak ekstraktları kullanarak sentezlenmiş AgNP'ler, iki farklı gram-negatif ve gram-pozitif bakteri karşısında antibakteriyel etkinlikte önemli farklılıklar sergiledi. *C. scolymus* yaprak ekstraktından elde edilen CsAgNP'lerin *S. aureus*'a karşı 18.53 mm çapında maksimum inhibisyon zonu ve 12.5 g/mL MİK değeri ile en fazla antibakteriyel aktivite gösterdiği belirlendi. *S. aureus* için yapılan antibiyofilm aktivite çalışmasında sentezlenen NP'lerin antibiyofilm etkinlikleri belirlendi. Ayrıca, *T. spicata* yaprağı ekstraktını kullanarak sentezlenen AgNP'lerin antibakteriyel ve sitotoksik aktivitelerinin ekil bağımlı olduğu gösterildi. Yapılan tez çalışmasında, farklı ekillerdeki NP'leri bünyesinde barındıran örnekler, çoğunlukla küresel formda NP'lere sahip örneklere göre güçlü antibakteriyel ve sitotoksik aktivite sergiledikleri gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar, AgNP'lerin biyolojik aktivitelerinin NP şeklinin ve sentezde kullanılan bitki ekstrakt kaynağından etkilendiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca *T. spicata* yaprak özütü kullanarak sentezlenen CuONP ve FeONP'lerin antimikrobiyal, antibiyofilm, antioksidan ve sitotoksik etkinlikleri değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre, FeONP'lerin en az AgNP'lerin ise en fazla antibakteriyel aktivite gösterdiği gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Yeşil sentez, gümüş, bakır oksit, demir oksit, metalik NP, antibakteriyel, antibiyofilm, sitotoksikite

**EVALUATION OF ANTIMICROBIAL AND ANTIBIOFILM ACTIVITY OF GREEN
SYNTHESIZED METAL NANOPARTICLES**

Fatih ERCİ

Department of Bioengineering

Ph.D. Thesis

Adviser: Assoc. Prof. Dr. Rabia ÇAKIR KOÇ

Recent advances in nanotechnology are drawing attention today due to the increased surface area of nano-sized structures and the many different properties they possess. Nanoparticle related studies provide extraordinary contributions to the study areas that contribute to transforming the scientific world. Nanoparticles continue to develop the technology in a way that leads to very important changes with its unique properties while it finds application in consumer and industrial products. However, increased production of nanoparticles and their use or unwanted release in the environment reveals the need for policies and processes that provide consumer and environmental safety. Once we combine the safe preparation of nanoparticles with potentially safe methods, it is possible to remove any harmful effect that may occur. Biosynthesis of nanoparticles using different biological methods is effective for numerous applications in different disciplines. Despite the use of different approaches (physical and chemical) for the synthesis of nanoparticles, green synthesis has become the most preferred method due to its high efficiency, cost effectiveness and environmental benefits.

Within the scope of thesis study; the synthesis of silver (AgNP), copper oxide (CuONP) and iron oxide (FeONP) nanoparticles using plant extracts and their characterization,

and the evaluation of the biological activities of nanoparticles synthesized in this way have been identified as the main targets. It is also one of the basic objectives of the study to determine the role of the size and shape of metallic nanoparticles and the plant extract source, which is used in nanoparticle synthesis, in various biological activities, especially antimicrobial and antibiotic effect of nanoparticles. In accordance with this purpose; AgNP, CuONP and FeONP were obtained by green synthesis at room temperature using different concentrations of aqueous extracts of *Thymbra spicata* L. var. *spicata* (Zahter). Using the *Cynara scolymus* (Artichoke) and *Mentha piperita* (Mint) leaf extracts in AgNP synthesis, the biological activities of nanoparticles synthesized through leaf extracts of three plants with economic importance were studied comparatively. Nanoparticles were characterized using different spectroscopic and microscopic analysis methods. As a result; TEM analysis of AgNPs synthesized using plant extracts revealed that the size and shape of AgNPs could be controlled by plant extract concentration. The average AgNP diameter decreased from 70.2 nm to 25.1 nm with increasing *T. spicata* leaf extract concentration according to TEM results. Moreover, according to size analysis of TEM study, CuONP and FeONP have been found to have average particle diameters around 25 and 100 nm, respectively. At the same time, when the size analysis of nanoparticles was examined by different techniques, it was revealed that the nanoparticle size was listed as DLS> AFM> TEM> XRD. AgNPs synthesized using leaf extracts of three different plants exhibited significant antibacterial activity against two different gram-negative and gram-positive bacteria. It was determined that the CsAgNP obtained from *C. scolymus* leaf extract showed the maximum antibacterial activity with a maximum inhibition zone of 18.53 mm in diameter and 12.5 µg/mL MIC value against *S. aureus*. Antibiofilm activity for *S. aureus* was evaluated to determine the antibiofilm activity of the synthesized nanoparticles. In addition, it shows that the antibacterial and cytotoxic activity of AgNPs synthesized using the *T. spicata* leaf extract is shape-dependent. In the thesis study, samples containing nanoparticles of different shapes were observed to show strong antibacterial and cytotoxic activity, compared to samples with nanoparticles in spherical form. The results demonstrate that the biological activities of AgNPs are influenced by the nanoparticle's shapes and the plant extract source used in the synthesis. In addition, antimicrobial, antibiofilm, antioxidant and cytotoxic activities of CuONP and FeONP synthesized using *T. spicata* leaf extract were evaluated. According to obtained results, it was observed that FeONPs showed the least antibacterial activity while AgNPs showed the highest antibacterial activity.

Keywords: Green synthesis, silver, copper oxide, iron oxide, metallic nanoparticle, antibacterial, antibiofilm, cytotoxicity

1.1 Literatür Özeti

Nanoteknoloji, bir metrenin 1 milyarda biri kadar (yani, 10^{-9} m = 1 nm) ölçekte madde ile uğraşan bir bilimdir ve aynı zamanda maddenin atomik ve moleküler ölçekte manipüle edilmesiyle ilgili bir çalışma alanıdır. Nanoparçacık, bir nanoyapının yapımında en temel bileşendir ve Newton'un hareket yasaları tarafından tanımlanan günlük nesnelerin dünyasından çok daha küçüktür, ancak kuantum mekaniği tarafından yönetilen bir atomdan veya basit bir molekülden daha büyüktür. Nanoteknoloji, farklı alanlardaki birçok sorunu çözebilecek potansiyele sahip olup biyoloji, kimya ve malzeme bilimlerinden yararlanarak disiplinlerarası bir teknoloji alanı olarak ortaya çıkmaktadır. Nano ölçekli malzemeler dünyada yaşamın başladığı andan itibaren doğada var olmuşlardır. Eski zamanlarda nanoyapıların veya nanoparçacıkların çeşitli amaçlarla kullanılmasında birçok örnek vardır. Ortaçağ katedrallerinin pencere camlarındaki renk çeşitleri metal oksit nanoparçacıklarının varlığına atfedilmiştir. Nanoteknoloji kavramı, ilk defa Richard Feynman tarafından Amerikan Teknoloji Enstitüsünde verilmiş olan “There’s a plenty of room at the bottom” başlıklı ders ile literatüre kazandırılmıştır [1]. Nanoteknoloji, günümüzde en aktif araştırma alanlarından biridir. NP’lerin büyüklüğü, dağılımı ve morfolojisine göre tamamen yeni ve geliştirilmiş özellikleri vardır. Nanoteknoloji her geçen gün gelişmekte ve hayatımızda önemli bir yer tutmaktadır. Nanoparçacıkların, özellikle de nanomalzemelerin uygulamaları günümüzde hızla gelişmektedir.

1.2 Tezin Amacı

Tezin amacı; bitki ekstraktlarını kullanarak Gümüş (AgNP), Bakıroksit (CuONP) ve Demiroksit (FeONP) NP'lerinin sentezinin gerçekleştirilmesi, sentezlenen NP'lerin karakterizasyonu ve antimikrobial, antibiyofilm, antioksidan ve sitotoksik aktivitelerinin ortaya çıkarılması olarak belirlenmiştir. Ayrıca, metalik NP'lerin yeşil sentezinde bitki ekstrakt konsantrasyon oranının NP boyut ve şeklini değiştirmedeki öneminin anlaşılması, NP'lerin boyutu ile birlikte şekillerinin de NP'lerin biyolojik aktivitesini değiştirmedeki öneminin ortaya çıkarılması, metalik NP'ler arasında biyolojik aktivite farklılıklarının belirlenmesi, yeşil sentezde kullanılan bitki türünün NP'lerin aktivitelerine etkilerinin belirlenmesi bu tez çalışmanın temel hedeflerini oluşturmaktadır.

1.3 Hipotez

NP'ler, küçük boyutlarından ve yüksek yüzey/hacim oranlarından kaynaklanan ayrıcalıklı özelliklerinden dolayı daha büyük parçacıklardan oldukça farklı özelliklere sahiptir ve bu da birçok alanda NP'lerin kullanılmasını sağlamaktadır. NP'lerin bitki ekstraktları kullanılarak sentez işleminin gerçekleştirilmesinde kimyasal reaksiyondaki bileşenlerin oranı, reaksiyon sıcaklığı, kullanılan bitkinin içeriği gibi NP'lerin boyut ve şeklini etkileyen çeşitli faktörler biyosentezde önemli bir rol oynamaktadır.

Bu tez çalışmasında;

Biyolojik sentezde NP'lerin boyutunun ve şeklinin sentezdeki ekstrakt konsantrasyon oranı ile kontrol edilebileceği,

NP boyut ve şeklinin antimikrobiyal, sitotoksik, antibiyofilm ve antioksidan aktiviteyi değiştirdiği,

NP sentezinde kullanılan bitki ekstrakt kaynağının biyolojik aktiviteyi kontrol etmede kullanılabileceği,

Yeşil sentez ile elde edilen farklı metal NP'lerin, farklı biyolojik aktivite gösterebilecekleri hipotez olarak önerilmiştir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1 Nanoteknoloji

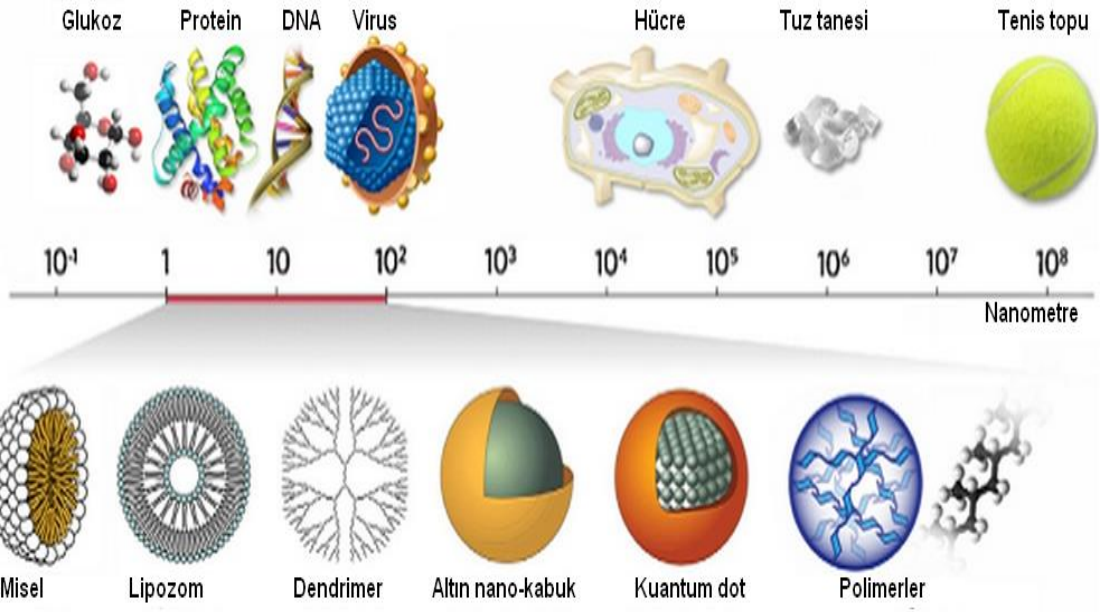
Nanoölçekli materyaller dünyadaki yaşamın başlangıcından bu yana doğada var olmuştur. Nanoteknoloji, nanopartiküllerin (NP) eşsiz fizikokimyasal özelliklere yani yüksek yüzey alanı, yüksek reaktivite, ayarlanabilir gözenek boyutu ve parçacık morfolojisine sahip olduğu için biyoteknoloji ve diğer endüstriler için yeni bir uygulama alanı açmaktadır. Nanoteknoloji fizik, materyal bilimi, kimya, biyoloji ve tıp gibi birçok disiplini bünyesinde barındıran disiplinlerarası bir bilimdir. “Nano” kelimesi Yunanca bir kelime olan ve cüce anlamına gelen “nanos” kelimesinden türetilmiştir. Nanoteknoloji, büyüklüğü 10^{-9} metre ye karşılık gelen bir nanometre büyüklük birimi ile ölçülen, 1 ve 100 nanometre arasındaki herhangi bir malzeme ile ilgilenen bir bilimdir. DNA molekülünün 2.5 nm genişliğinde, bir proteinin 50 nm uzunluğunda ve bir grip virüsünün 100 nm civarında olduğunu düşünürsek nanoboyuttaki yapıların büyüklüklerini daha iyi bir biçimde algılamış oluruz (Şekil 2.1).

Nanoteknoloji günümüzde nanoboyuttaki yapıların yığın hallerinden bağımsız olmak üzere, onları oluşturan elementlere bağlı olarak, farklı özellikler sergilemelerinden dolayı kullanım alanı oldukça genişlemiştir [2]. Her ne kadar nanometre boyut aralığı 1 ile 1.000 nm arasındaki tüm malzemeleri içeriyor olsa da, nanoteknolojiyi tanımlayan 1 ile 100 nm arasındaki bu belirli aralık özellikle önemlidir; bu boyut aralığındaki parçacıklar radikal olarak yığın hallerinden farklı özelliklere sahiptir. Bu farklılık, iki

temel faktörden dolayı meydana gelir: (i) yüzey alanı hacim oranındaki artış (malzeme küçüldükçe artar) ve (ii) parçacık boyutu kuantum etkilerinin hâkim olduğu alana girmesi. Bu aralıkta, parçacık boyutu azaldığında parçacık yüzeyindeki atomların parçacıkların içindikilerine karşı üstünlüğü meydana gelmektedir (boyut azaldığından, yüzeydeki atom sayısı iç kısımdakilere göre artmaktadır). Bu etki, bu boyut aralığındaki parçacıkların özelliklerini ve bu parçacıkların diğer malzemelerin parçacıklarıyla olan etkileşimini değiştirir [3]. Sıklıkla kullanılan nano malzemeler içerisinde NP’ler, karbon nanotüpler, lipid nanotüpler, nanokompozitler ve nanokristaller sayılabilmektedir.

Çizelge 2.1 Çeşitli organizasyonlar tarafından nanopartikül ve nanomalzemelerin tanımları

	NP	Nanomalzeme
ISO	1-100 nm çapında bir parçacık	—
ASTM	2 veya 3 yerde uzunluğu 1-100 nm olan ultra ince bir partikül	—
NIOSH	1 ila 100 nm arasında çapa sahip bir parçacık veya 1-100 nm aralığında bir fiber	—
SCCP	En az bir tarafı nano ölçek aralığında olan	En az bir tarafı veya içyapısı nano ölçekte olan materyal
BSI	Tüm alanları veya çapları nano ölçek aralığında olan	En az bir tarafı veya içyapısı nano ölçekte olan materyal
BAuA	Tüm alanları veya çapları nano ölçek aralığında olan	Bir nanoyapı veya bir nanomaddeden oluşan materyal



Şekil 2.1 Bazı moleküllerin ve nanoboyuttaki yapıların büyüklüklerinin karşılaştırılması [4]

2.2 NP'lerin Sınıflandırılması

Farklı fiziksel ve kimyasal özelliklerden oluşan geniş bir NP kütüphanesi kurulmuştur. Bununla birlikte, nanoteknolojide yapılan yeni keşiflere bağlı olarak, nanoparçacıkların sınıflandırılması sürekli değişmektedir. Şu anda, NP'ler birkaç farklı sınıfa ayrılabilir [5].

1-10 nm'lik boyutlar ve dar bir boyut dağılımı ile yarı kristalin nano yapılar olarak tanımlanan nano kümeler,

10 ile 100 nm arasında boyutlardaki kristalin olmayan nanomalzemelerin agregasyonundan kaynaklanan nano tozlar,

100 ve 1000 nm arasındaki boyutlara sahip tek kristalli nanomalzemeler olan nano-kristaller.

Biyoteknolojide ve özellikle nanotıp alanında kullanılan genel ve çok fonksiyonlu NP sınıfları aşağıda listelenmiştir (Şekli 2.2).

2.2.1 Lipozomlar

Lipozomlar ya da lipid veziküllerle ilgili ilk çalışma, yeni polimer nano-malzeme türlerini anlama ihtiyacının duyulduğu 1960'lı yıllarda ortaya çıkmıştır. Başlangıçta lipozomlar,

biyolojik zarları incelemek için model sistemler olarak kullanıldı ancak 1970 yılına kadar ilaçların taşınımı için bir ortam içerisinde geliştirildiler [6]. Lipozomların genel olarak biyofizikte hücre zarı ve kanallarının özelliklerini anlamada iyi bir model sistem olarak oldukça yararlı olduğu bildirilmiştir. Kimyada, kataliz ve enerji dönüşümü olaylarında mükemmel bir şekilde kullanılmaktadırlar. Biyokimyada proteinlerin salgı, hareketi ve sinyal iletimi, gen aktarımında ve hücre biyolojisinde diğer işlevlerde biyolojik fonksiyonlarının anlaşılmasında önem teşkil etmektedir [6]. Lipozomlar, farmasötik endüstrisinde antikanser, antifungal ajanlar ve aşılar olarak çeşitli geniş uygulama alanlarına sahiptir. Ayrıca kozmetikte, şampuanlarda ve diğer cilt bakım ürünlerinde de kullanılmaktadırlar. İlaç taşınımından sonra hücrelerde bozunabildikleri için tanıda çok önemli araçlar olarak yer almaktadırlar [7]. Lipozomlar, ilaç taşınımı için kullanılan ilk sentezlenmiş nanoparçacıklar olarak bilinmektedirler. Ancak önemli bir sınırlamaları, sulu ortamlarda bir araya gelip hedef bölgeye ulaşmadan içeriklerini serbest bırakma eğilimleridir. Bu durum bunların yerine geçebilecek farklı nanoparçacıklar veya bunları stabil kılacak yeni bir yöntem bulmak için araştırmacıları yönlendirmiştir.

2.2.2 Süperparamanyetik NP'ler

Süperparamanyetik NP'ler [Süperparamanyetik demir oksit nanopartikülleri (SPION)], inorganik malzemeler (silika, altın) veya fosfolipidler, yağ asitleri, polisakkaritler, peptidler, sürfaktanlar, polimerler gibi organik malzemeler ile kaplanmış bir demir oksit çekirdeğine sahip bir inorganik bazlı parçacık sınıfıdır [8]. Diğer NP'lere kıyasla SPION'lerin önemli özelliği, indüklenen manyetizasyona sahip olmalarıdır. Bu özellik sayesinde, ilaç taşınım sistemleri, manyetik hipertermi (tümör tedavisi için lokal ısı kaynağı) ve manyetik olarak hücrelerin transfeksiyonunda kullanılan manyetik ayırıcılar ve kontrast arttırıcı ajanlar olarak yer almaları başta olmak üzere pek çok uygulama için kullanımları mevcut olmaktadır [9], [10].

2.2.3 Fullerenler: Buckyballlar ve Karbon Nanotüpler

Fullerenler, sadece karbondan yapılmış moleküllerdir ve içi boş küreler, elipsoitler veya tüpler gibi farklı biçimlerde bulunurlar. Fullerenlerin küresel biçimleri buckyballlar ve

karbon nanotüpleri (CNT'ler) ya da buckytublar olarak boru  eklinindedir. Fullerenler, grafenden istiflenmi  yapraklardan oluşan ve genellikle altıgen, be gen veya heptagonal ( ok yaygın olmayan) halkalarla bağlanmış olan grafit benzeri bir yapıya sahiptir [11], [12]. Fullerenlerin keşfi, daha önce grafit, elmas ve amorf karbon ile sınırlı olan allotrop karbon sayısı artmasına neden olmuştur. Yeni özelliklerinden dolayı, özellikle malzeme bilimleri, nanoteknoloji ve elektronik alanlarındaki çeşitli teknolojik uygulamalarda buckyballlar ve CNT'ler üzerinde çok sayıda araştırma yapılmıştır. Buckminsterfullerene veya C60, fullerenlerin en küçük formudur ve doğada en bol miktarda bulunanıdır. CNT'ler, daha önce belirtildiği gibi yapısal olara silindirik olan karbon allotroplarıdır. Uzunluk/ ap oranı 132.000.000:1 olan nanotüpler imal edilmekte olup ve bu onları diğer herhangi bir malzemeden daha büyük yapmaktadır. CNT, nanobilim/nanoteknoloji, malzeme bilimi, optik ve hatta mimari gibi farklı bilim dallarındaki konularda onları önemli kılan eşsiz özelliklere sahiptir. Onların vücut zırhı yapımında olası bir kullanımı daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir [13]. Olağanüstü g   ve kendine has elektriksel özellikler sergilerler. Buna ek olarak, CNT'lerin ayrıca m kemm l ısı iletkenleri olduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte, en büyük dezavantajı, bazı toksik özelliklere sahip olma potansiyelleridir. CNT'ler tek duvarlı karbon nanotüpleri (SWCNT),  ift duvarlı karbon nanotüpleri (DWCNT) ve çok duvarlı karbon nanotüpleri (MWCNT) gibi çeşitli formlarda sınıflandırılır [14], [15]. Her bir CNT türündeki özelliklerin spesifikliği, farklı bilim alanlarındaki uygulamalarını belirleyen önemli bir faktördür. Örneğin, tüm CNT'ler içerisinde en fazla çalışılan SWNT, diğer türlerde bulunmayan güçlü elektrik özelliklere sahiptir [12].

2.2.4 Dendrimerler

Dendrimerler, üniform büyüklükte, radyal simetriye sahip, yüksek derecede dallanmış yapıdadır ve çözeltide dairesel bir  ekil alırlar [6]. Dendrimerler, tekrarlayan kovalent bağ oluşturma tepkimeleriyle çekirdekten çevreye tabakalar halinde katlanır. Dendrimerlerin yoğunluğu, her bir dallanma noktasındaki geometrik büyümenin bir sonucu olarak her adımda artmaktadır [16]. Son reaktifini seçerek, farklı aktif yüzey gruplarına sahip dendritik molekülleri tasarlamak mümkün olmaktadır.

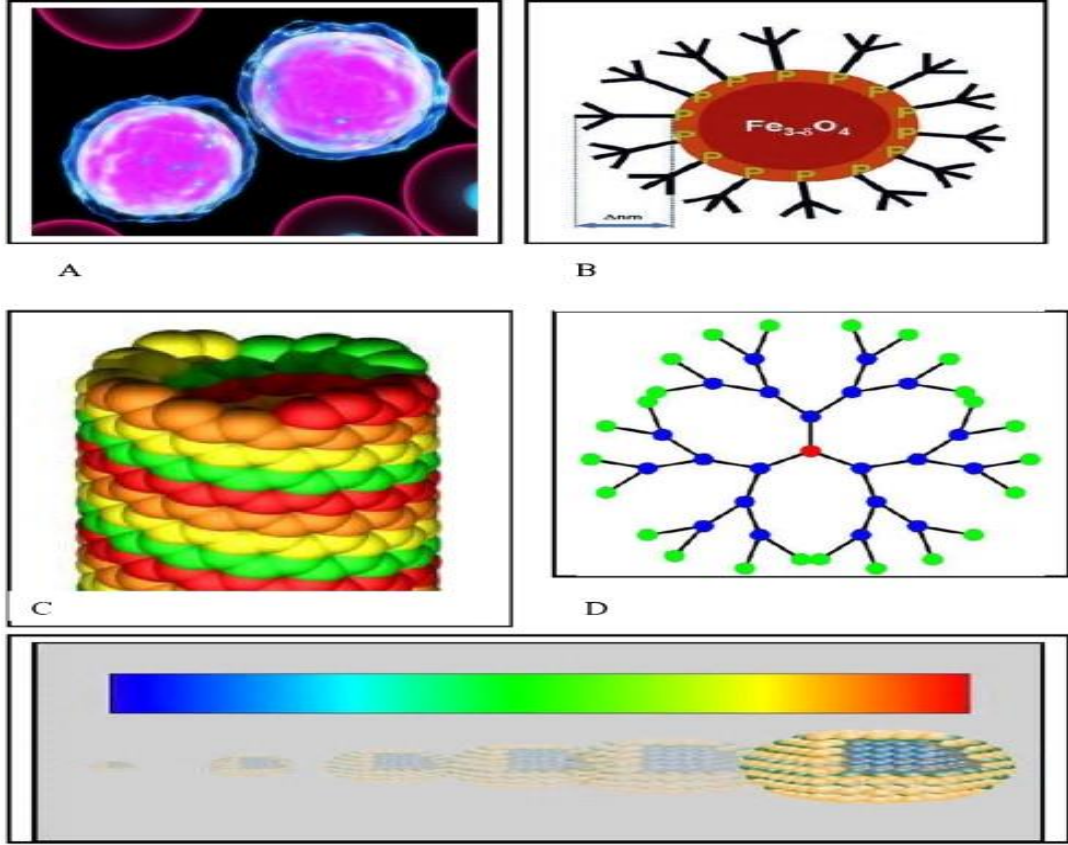
İlk dendritik molekül yaklaşık 1980'de sentezlenmiş, ancak dendrimerlere karşı, özellikle biyoteknolojik alanlarda çeşitli uygulamaların keşfinin artması nedeniyle 2000'li yıllarda ilgi oluşmaya başlamıştır. Nanotıpta, dendrimerlerin yüzeyinde birçok moleküler "kanca" bulunması nedeniyle floresan boyaların tutturulmasında, enzimlerin hücre tanımlama etiketlerinin oluşturulmasında ve diğer molekülleri bağlamada paha biçilmez bir araç olabilme potansiyellerinin mevcudiyeti keşfedilmiştir. Bununla birlikte, bu moleküllerin üretiminin oldukça zor ve pahalı olması büyük ölçekli uygulamalar için bir dezavantajdır. Ayrıca, yüksek kararlılıkları ile birlikte antikorlar ve reseptörler gibi biyomoleküllerle onları işlevsel hale getirme imkânı, onları hedefli ilaç taşınımında çok önemli bir ortam haline getirmektedir [17].

2.2.5 Kuantum Dotlar

Kuantum dot (QD) veya nanokristaller, boyutlarına bağlı olarak spektrumun tüm renklerinde ışık yayabilen yarı iletken NP'lerdir. QD'ların boyutu, spektrumun mavi ucuna yaklaştıkça azalır ve kırmızı uca ilerledikçe artar. Bunlar, görünür ışığın altında, kızılötesi veya ultraviyole spektrumda ayarlanabilen ve birçok diğer benzersiz özelliklere sahiptirler [18]. QD'lar biyoteknolojide, özellikle hücresel görüntüleme ve etiketlemede, geleneksel floresan boyalara mükemmel bir alternatif olduğuna inanılan değerli araçlardır.

2.2.6 Sıvı Kristaller

Bunlar sıvı organik kristalin malzemelerden yapılan farmasötiklerdir ve proteinler veya lipidler gibi doğal olarak oluşan biyomolekülleri taklit etmek üzere tasarlanmıştır. Dokuların iltihaplandığı vücudun belirli bir bölgesini hedef alabildikleri için ilaç taşınımının çok güvenli ve özgül bir aracı olarak görülmektedirler.

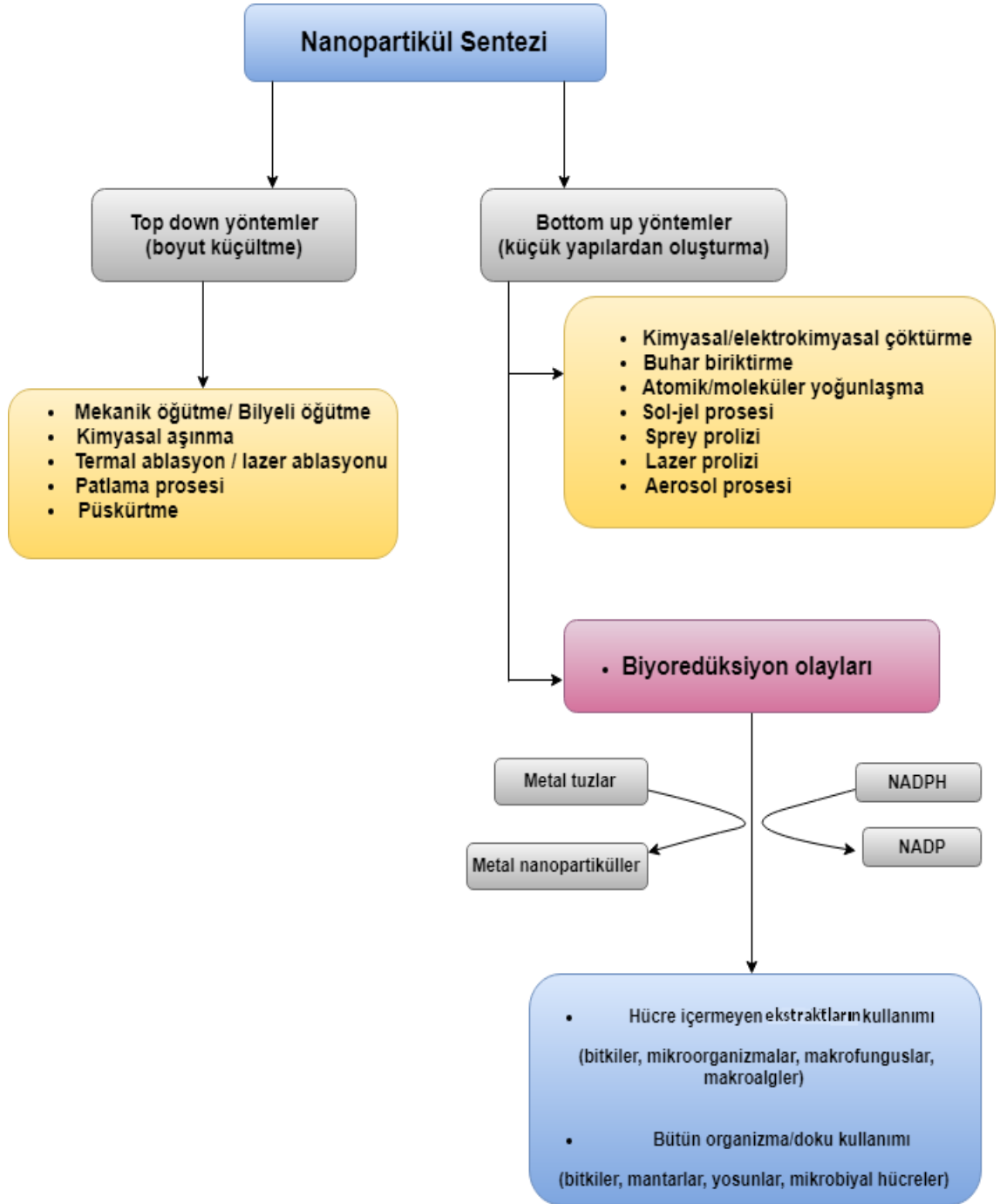


Şekil 2.2 Farklı NP sınıfları (A) lipozomlardaki NP (B) süperparamanyetik NP (C) nanotüp (D) dendrimer (E) değişen optik özelliklere sahip QD [5]

2.3 Metal NP

2.3.1 Metal NP Sentez Yöntemleri

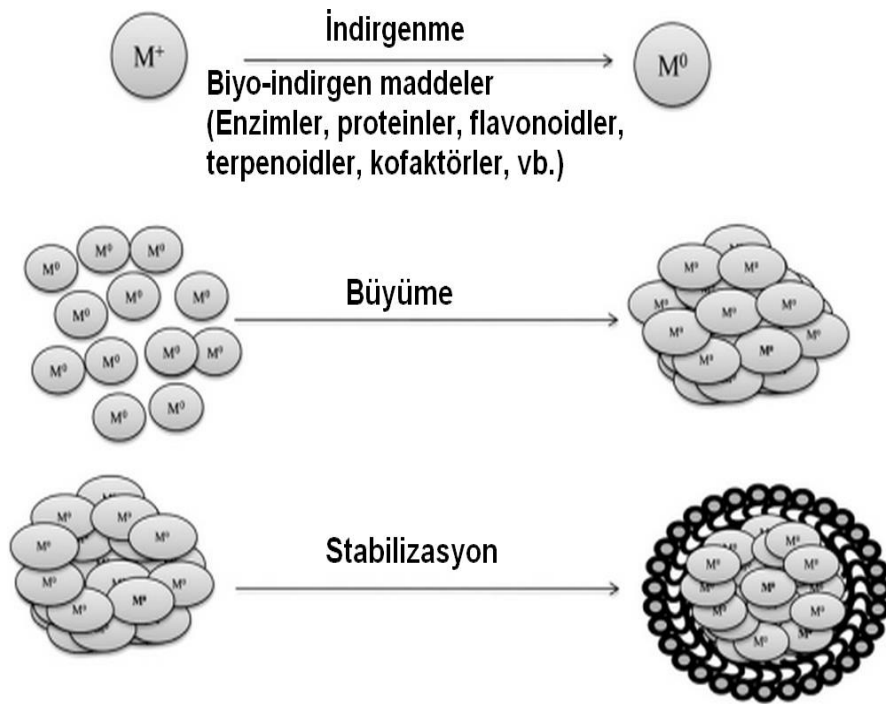
Nanoteknoloji alanındaki ilerleme yenilikçi sentez protokolleri ve karakterizasyon tekniklerinin gelişmesi ile hız kazanmıştır. Geleneksel olarak, NP'ler fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemlerle sentezlenmektedir. NP'lerin üretiminde genellikle iki yaklaşım vardır. Bunlar aşağıdan yukarıya (Bottom Up) ve yukarıdan aşağı (Top Down) olarak adlandırılırlar [19].



Şekil 2.3 NP üretiminde kullanılan yaklaşımlar [20]

Bottom up yaklaşımına dahil yöntemlerde atomik veya moleküler boyuttaki yapıların kimyasal reaksiyonlar ile büyütülerek partikül oluşumunun gerçekleştirilmesi olarak tanımlanmaktadır [21]. Gaz yoğunlaştırma tekniği nanokristalin metal ve alaşımlarının üretiminde kullanılan ilk yöntem olup küçük yapılardan oluşturma yaklaşımıyla çalışmaktadır. Kimyasal/elektrokimyasal çöktürme, kimyasal buhar yoğunlaştırma, sol

jel ve spreylir piroliz yöntemleri de bu yaklaşımın en çok bilinen diğer üyeleridir. Top down yaklaşımına dâhil olan yöntemlerde (Şekil 2.3), hacimsel malzemeye mekaniksel ve/veya kimyasal işlemler ile enerji verilmesi sonucunda malzemenin küçük parçalara ayrılarak nano boyuta kadar inebilmesi esas alınmaktadır [22]. Top down yaklaşım ile çalışan yöntemlere verilebilecek en klasik örnekler; mekanik öğütme ve aşındırma olabilir. Bu teknikler klasik öğütme işlemlerinden daha fazla enerji tüketimi gerçekleştirdiğinden, yüksek enerjili öğütme veya yüksek hız değirmenleri olarak da adlandırılmaktadırlar [23]. NP'nin boyutu, morfolojisi, kararlılığı ve özellikleri deneysel koşullar, metal iyonlarının indirgeyici ajanlarla etkileşiminin kinetiği ve metal NP'ler ile stabilize edici ajanların adsorpsiyon süreçleri tarafından kuvvetle etkilenir. Bu nedenle, sentetik bir rota seçimi ve tasarımı, nanomalzemelerin stabilitesini, özelliklerini ve uygulamalarını belirlemede önemli bir rol oynamaktadır [24]. Burada özellikle NP sentezinde rol alan indirgenme, büyüme ve stabilizasyon aşamalarının kontrolü önem kazanmaktadır (Şekil 2.4).



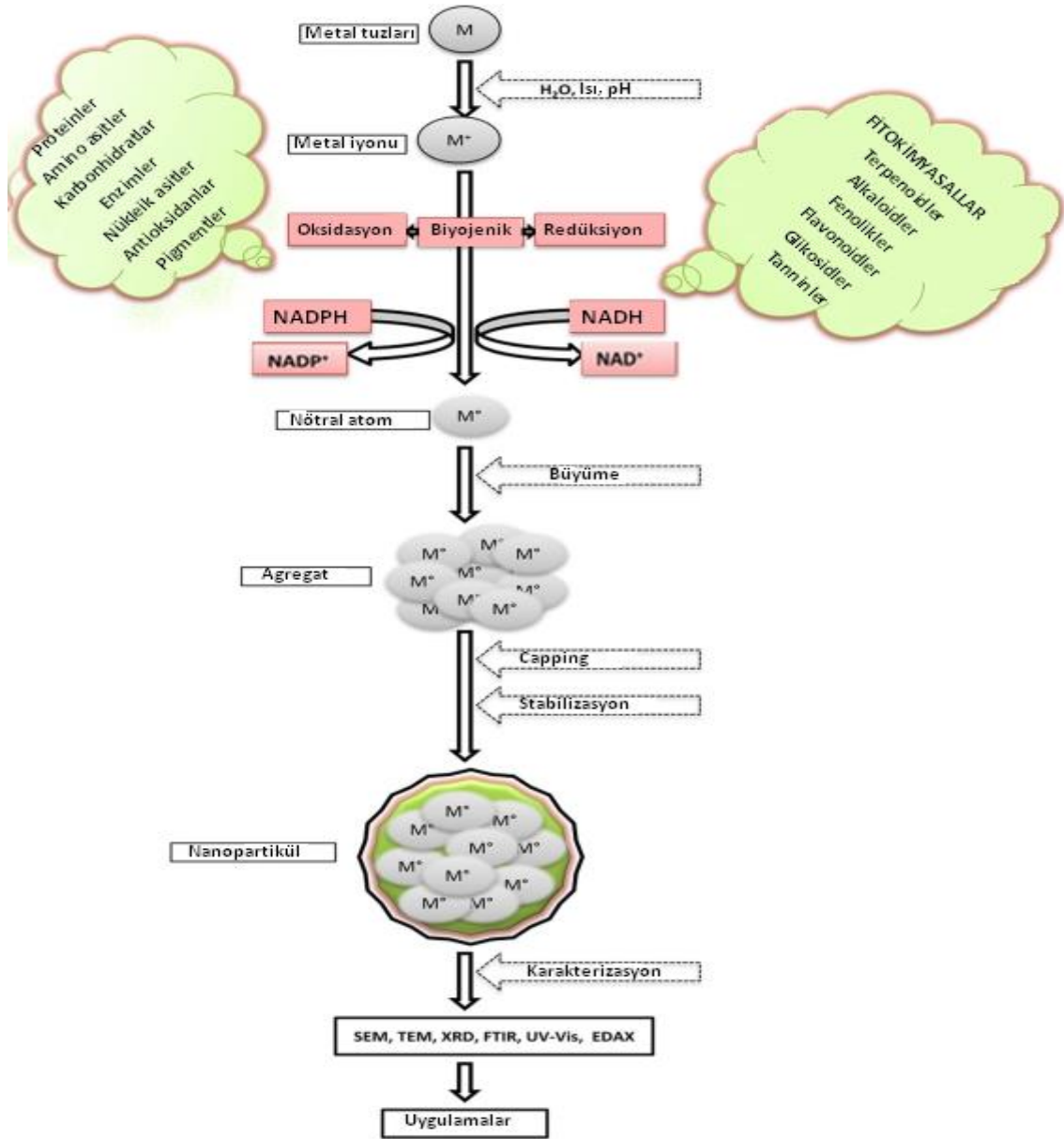
Şekil 2.4 NP sentez mekanizmalarının temel şablonu (M^+ -metal iyon) [20]

2.4 NP Biyosentezi

2.4.1 Biyosentez

Biyoteknoloji ve nanoteknoloji 21. yüzyılın en umut verici teknolojilerinden ikisidir. Genellikle, nanoteknoloji, 1 ila 100 nanometre arasında değişen en az bir boyuta sahip yapıları ele alır. Bu arada biyoteknoloji, biyolojik maddelerin metabolik ve diğer fizyolojik süreçlerini ele alır. Nanobiyoteknoloji bu iki teknolojinin bir birlikteliğidir ve yaşam bilimleri ilgili araştırmalarda birçok yararlı alet ve teknoloji geliştirilmesinde ve uygulanmasında önemli bir rol oynamaktadır [23].

Son yıllarda, fizikokimyasal NP sentez metotlarına nazaran toksik olmayan, maliyeti daha az olan ve çevreye uyumlu olan biyolojik yöntemler kullanılarak NP sentezi ilgi odağı haline gelmiştir [19], [25]. Tamamen 'yeşil' ilkeler altında NP'lerin sentezi, çevre dostu indirgeyici ve stabilize edici ajanlar ile çevreye uyumlu bir çözücü sistemi kullanılarak sağlanabilir. İlgili metallerin tuzlarından NP'lerin biyolojik veya biyojenik sentezi için çeşitli yollar geliştirilmiştir [26], [27]. Mikroorganizmalar, bitkilerin tümü, bitki dokusu ve meyveleri, bitki ekstraktları ve deniz algleri NP'leri sentezlemek amacı ile kullanılmaktadır [28], [29], [30]. NP'lerin biyojenezinde temel ilke, organizmalarda bulunan enzimler/proteinler, aminoasitler, polisakkaritler ve vitaminler gibi çeşitli biyomoleküllerin metal iyonlarının indirgenmesidir. Biyolojik sentezin çevresel etkiyi azaltmasının yanında kontaminasyondan bağımsız, büyüklük ve morfoloji olarak iyi tanımlanmış büyük miktarlarda NP üretimini de mümkün kılmaktadır [20], [31]. Metal iyonlarını indirgemek için bitki ekstraktlarının kullanılması 1900'lü yıllardan itibaren bilinen bir metottur. Fakat prosesteki indirgeyici ajanların doğası halen tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Basitliği açısından, metal iyonlarını nanopartiküllere indirgemek için bitkinin kendisi, ekstraktı veya bitki dokusunun kullanımı son 30 yıl içinde oldukça dikkat çekmiştir [20]. Biyolojik olarak yönlendirilen NP sentezinin olası mekanizması Şekil 2.5'te gösterilmiştir.



Şekil 2.5 Biyolojik olarak yönlendirilen NP sentezinin olası mekanizması. M metal tuzu, M⁺ metal iyonu, M⁰ nötr atomu [32]

2.4.2 NP'lerin Bitkiler Aracılığı ile Sentezi

Bir bitki, tipik olarak kalıcı bir yerde yetişen, su ve inorganik bileşiklerini kökleri ile emen ve yapraklarındaki besinleri klorofil yeşil pigmentini kullanarak fotosentez ile sentezleyen ağaç, ot, eğrelti otları, yosunlar ve çalılarla örneklenen türden herhangi bir organizmadır [33]. Bitki ekstraktı (özütü), bir karışım veya malzemeden sindirim,

damıtma ve bir çözücünün etkisi veya mekanik ayrılma gibi kimyasal veya fiziksel bir işlemle elde edilen bir maddeyi ifade etmektedir [34].

Metal NP'lerin sentezi için çok çeşitli fiziksel ve kimyasal işlemler geliştirilmiştir, ancak bu yöntemler pahalıdır ve indirgeyici ajanlar olarak toksik kimyasalların kullanılmasını gerektirir. Bu nedenle, özellikle NP görüntüleme, doku onarımı, ilaç dağıtımı, dezenfeksiyon ve metal algılama gibi tıbbi uygulamalarda kullanıldığında yeşil kimya nanoteknolojilere entegre edilmeleri son derece önem arz etmektedir.

NP sentezi için bitki dokusuna nazaran bitki ekstraktlarının kullanımının daha basit olduğu ortaya konulmuştur. Metal NP'leri biyosentezi üç ana aşamadan oluşur: (i) indirgeyici ajanların seçimi; (ii) çözücü maddenin seçimi; ve (iii) stabilize edici reaktiflerin seçimi. Genellikle, bitki özütü, hem bir indirgeyici ajan hem de stabilize edici bir ajan olarak sentez işleminde rol üstlenmektedir. Bu nedenlerden dolayı bitki ekstraktlarının sentez sırasında NP oluşumunda rol aldıkları ortaya çıkmaktadır. Birçok bitki türü, flavonoidler, kumarinler, ksantonlar, antrakınonlar ve terpenoidler gibi farklı antioksidatif bileşik türlerini (indirgeyici ajanlar) içerir. Bitki ekstraktlarını kullanarak NP'lerin sentezi için gerekli işlemler daha kolay olmakta ve mikrobiyal süreçlere veya tüm bitkinin kullanılmasına dayalı yöntemlere kıyasla daha az maliyetli olmaları önemli bir avantaj oluşturmaktadır [35], [36], [37], [38]. Bu nedenlerden dolayı bitki ekstraktlarının kullanılması ile NP sentezinin gerçekleştirilmesine olan ilgi son yıllarda artmıştır [26].

Yeni metal NP'lerin fitosentez olarak da bilinen yeşil sentezi, nanosistem ve nanoteknolojide ortaya çıkan yeni alanlardan birini oluşturmaktadır. NP boyutu ve şekilleri, nanomalzemelerin fiziksel, kimyasal, elektriksel ve optik özelliklerini güçlü bir şekilde etkilemektedir. Nano ölçekli materyallerin ve cihazların, elektronik ortamdan tıp alanına kadar uygulanması ve kullanılması onların sahip olduğu ve onlara üstünlük sağlayan benzersiz fizyokimyasal özellikleri sayesinde gerçekleşmektedir [20], [39].

NP'leri sentezlemek için metallerin indirgenmesi sürecinde bitki ekstraktlarının kullanımı nispeten keşfedilmemiş ve az gelişmiş durumdadır. Çözelti sıcaklığı, metal tuzu ve indirgeyici madde konsantrasyonu ve reaksiyon süresi, parçacık şeklini ve

boyutunu etkilemektedir. Bitkileri kullanarak farklı kompozisyonlar ile NP'leri sentezleme imkânı toksik olan kimyasal ve fiziksel ön hazırlık yöntemlerine çevre dostu bir alternatif sunabilir [20].

Bitki ekstraktı, hücre kültürü hazırlama ve mikrobik hücre büyümesinin zorlu süreçleri gibi zaman alıcı ve zorluk derecesi bitki ekstraktına göre daha fazla olan süreçlere gereksinimi ortadan kaldırır. Bitki ekstraktı hazırlama protokolü çalışmanın şekline ve amacına göre değişebilir. Taze yapraklar genellikle ince kesilir ve damıtılmış su ile ekstrakte edilir (Şekil 2.6). Örneğin, Aloe vera yaprakları kullanılarak yapılan ekstrakt hazırlama prosedüründe; Aloe vera yapraklarının 30 g'lık bir kısmı ince kesilmiş ve 100 ml damıtılmış suda kaynatılmıştır. Elde edilen ekstrakt NP sentezi için kullanılmıştır [40].

Bitki ekstraktı hazırlama yöntemi, NP morfolojisi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Bununla birlikte, bitki ekstraktlarının çeşitli bileşimleri, metal iyonlarının indirgenmesinden neyin sorumlu olduğuna açıkça cevap vermemektedir. Bu sorunun cevaplanabilmesi daha fazla araştırmaya gereksinim duyulmaktadır.

Bitki aracılı biyosentezin diğer biyomalzemelere göre avantajları aşağıdaki şekilde sıralanabilir [37], [41].

Kolay kullanılabilirlik,

Güvenli kullanım,

Maliyet yönünden etkinlik,

Tek adımda basit işlem,

İndirgeyici olarak çeşitli metabolitler içermesi,

Hücre kültürlerinin ayrıntılı bir şekilde bakımının elenmesi,

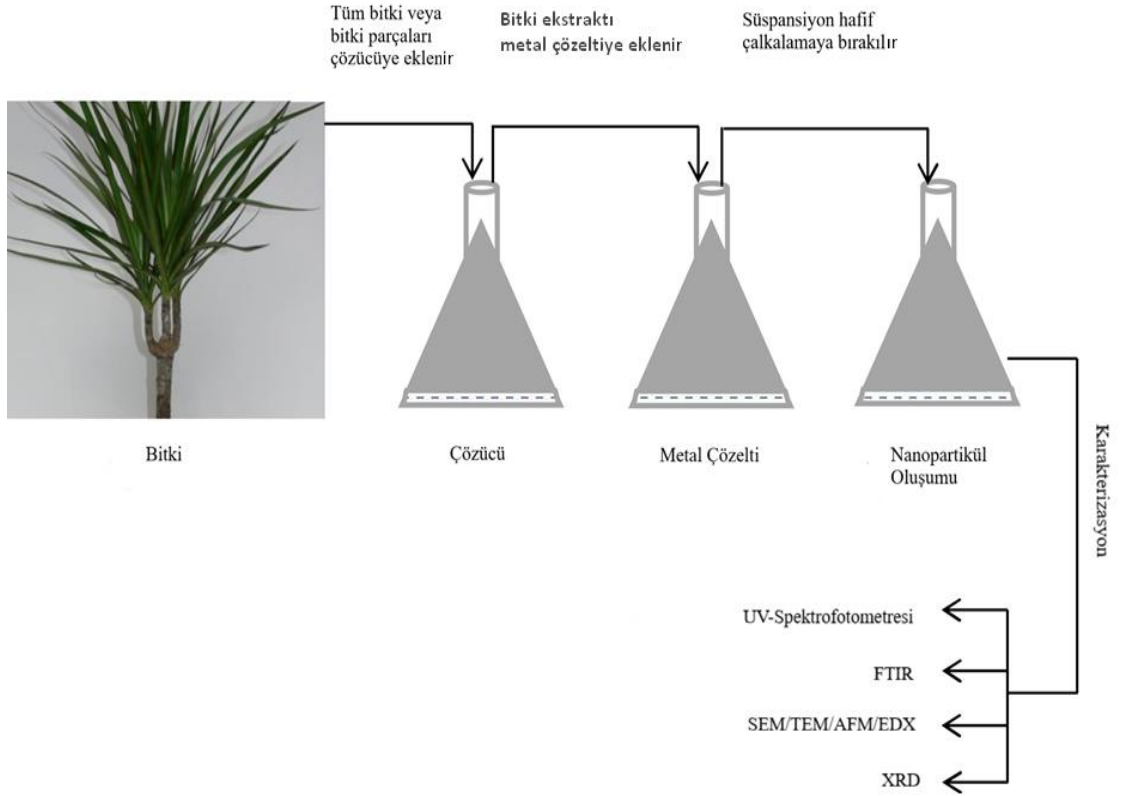
Hızlı sentez,

Çevre dostu olması,

Daha kararlı nanoparçacıklar eldesi,

NP'lerin boyut ve şekilleri üzerinde daha iyi kontrol,

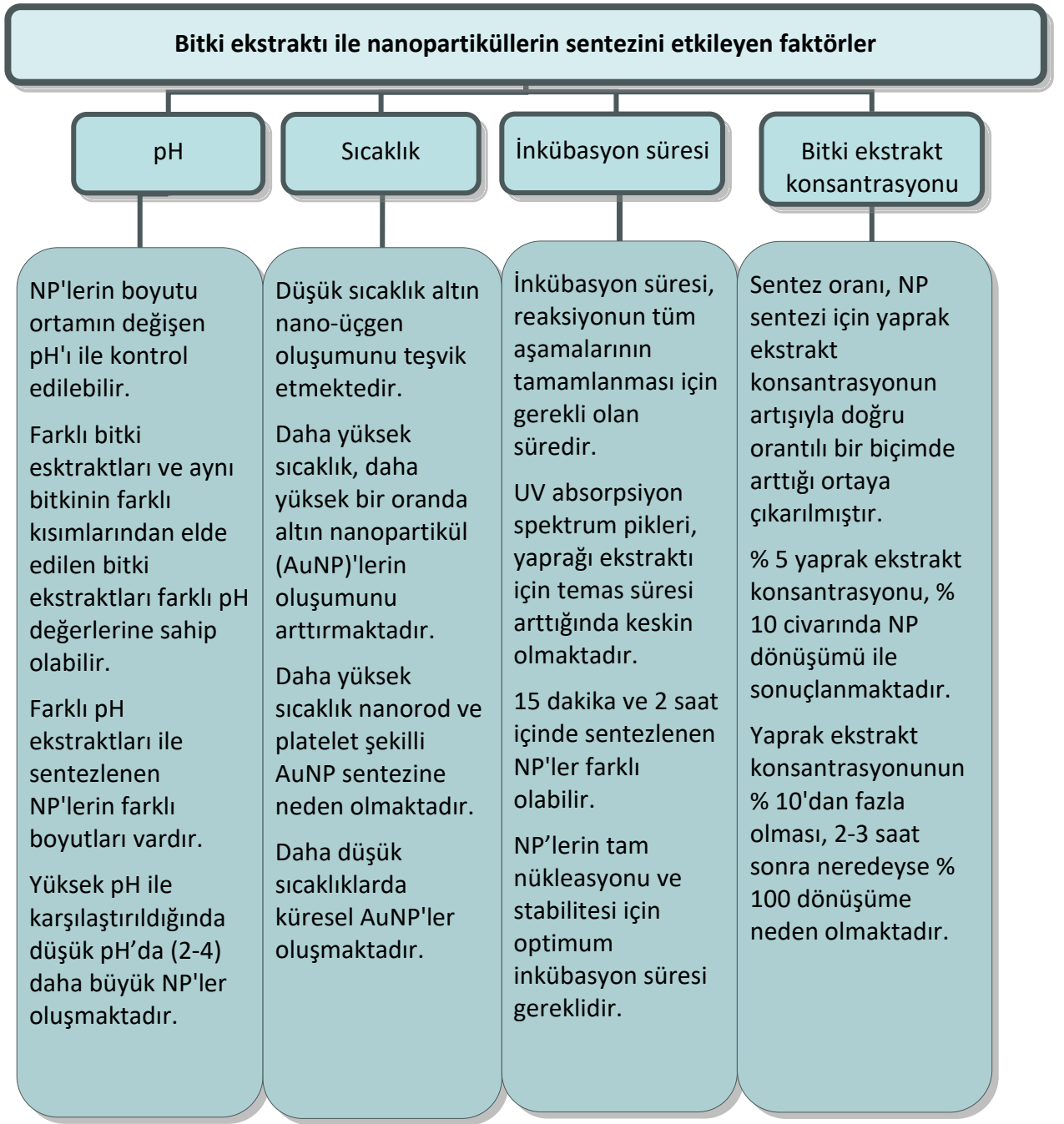
Büyük ölçekli sentez için uygun olması.



Şekil 2.6 NP'lerin bitki aracılı biyosentezi için örnek bir deney protokolü [42]

2.4.2.1 Bitki Ekstraktlarıyla NP Sentezini Etkileyen Faktörler

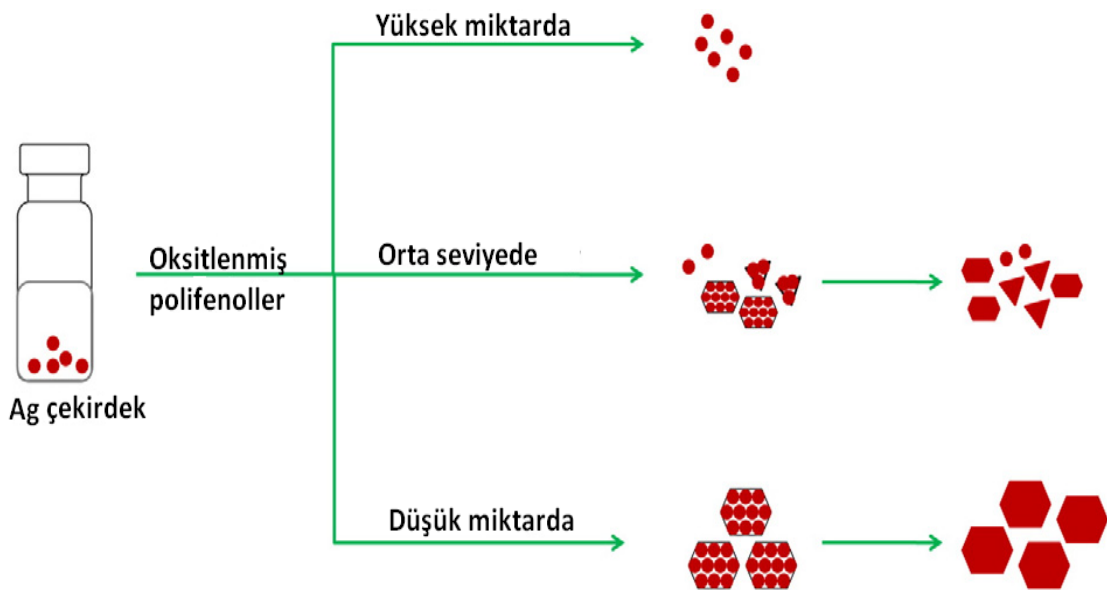
Reaksiyon sıcaklığı, pH, inkübasyon süresinin uzunluğu ve bitki ekstrakt konsantrasyonu sentezlenen nanopartiküllerin şeklinde, boyutunda, stabilitesinde ve nükleasyon sürecinde önemli değişikliklere neden olabilmektedir. Şekil 2.7'de bitki ekstraktları kullanılarak gerçekleştirilen biyosentez olayında NP'leri etkileyen faktörler gösterilmektedir.



Şekil 2.7 Bitki özleri ile nanopartiküllerin sentezini etkileyen faktörler [43], [44]

Farklı boyutlardaki AgNP'lerin oluşum mekanizması ve şekil değişikliğinin kontrol edilmesi Şekil 2.8'de açıklanmıştır. Eklenen ekstrakt miktarı 1 ml olduğunda sentezde altıgen NP'lerin oluşumu gözlenmiştir. Buna karşılık, kullanılan ekstrakt hacmini 3 ve 4 ml'ye yükseltildiği zaman küresel AgNP'lerin oluştuğu gözlemlenmiştir; bu da, Ostwald olgunlaşmasını (Ostwald ripening) kontrol eder ve difüzyon kontrollü bir işleme yol

açarak küçük ve küresel AgNP'lerin oluşumu için bir koruyucu kontrol olarak ekstrakt polifenollerinin önemli rolünü olduğunu göstermektedir. Ekstrakt polifenollerin miktarı daha az olduğunda, AgNP'lerin oksitlenmiş polifenoller ile kapaklanma hızı yavaştır, çekirdeklenme oranı ise nispeten yüksektir ve bu da büyük boyutlu altıgen nanopartiküllerin gelişmesine yol açar. Ekstrakt hacmi arttıkça, daha küçük boyutlu küresel AgNP'lerin gelişmesine neden olan çekirdeklenme oranı ile karşılaştırıldığında kapaklanma oranı daha yüksektir. İndirgeme sürecinden sonra ortamdaki bitki ekstraktındaki oksitlenmiş polifenoller NP'lerin büyüklüğüne kıyasla boyut olarak çok daha küçük olduğu için, Ag çekirdeği etrafındaki moleküller arası etkileşimler yoluyla bağlanıp koruyucu kabuk benzeri bir yapı oluşturduğu düşünülmektedir. Kullanılan ekstrakt miktarı daha yüksek olduğunda, nükleasyondan sonra oluşan Ag çekirdekleri, daha yüksek stabiliteye neden olan oksitlenmiş polifenollerin oluşturduğu kabuk tarafından iyi bir şekilde kaplanmaktadır. Aksine, ekstrakt miktarı az olduğunda, NP'ler oksitlenmiş polifenoller tarafından daha az stabilize edilir ve daha az stabiliteye sahip olurlar [45], [46].



Şekil 2.8 Oksitlenmiş polifenollerin, AgNP'lerin boyutunun ve şeklinin ayarlanmasında rolünü gösteren mekanizma [46]

2.4.2.2 NP Sentezinde İndirgeyici Ajan Olarak Doğal Ürünler

Birçok bitki türü, flavonoidler, kumarinler, ksantonlar, antrakınonlar ve terpenoidler gibi farklı antioksidatif bileşik türlerini (indirgeyici ajanlar) içerir. Flavonoidler, sebzeler ve meyveler olarak kullanılan çeşitli bitkilerde yüksek seviyelerde bulunan; çay ve şarap gibi içeceklerde yüksek miktarda var olan doğal olarak oluşan fenoliklerdir. Antioksidatif bitki fenoliklerinin farklı flavonoid türlerinin (örneğin flavon, flavanon, flavonol, flavanonol) güçlü bir indirgeyici ve antioksidan kapasiteye sahip oldukları bilinmektedir. Bunların arasında quercetin, isorhamnetin, kaempferol ve morin güçlü antioksidan özellik göstermektedir. İzoflavonlar ayrıca doğal olarak oluşan flavonoidlerin önemli üyeleridir ve NP sentezinde de önemli rol oynamaktadırlar. Benzopironlar olarak da adlandırılan bir diğer doğal ürün sınıfı olan, kumarinler, çoğunlukla bitkilerde bulunur. Bitki kökenli kumarinler arasında esculetin, daphnetin ve fraeksetin en aktif maddeler olarak yer alırlar. Benzer şekilde, doğal bir ürün olan ksantonlar sınıfı piron benzeri flavonoidler oluşur ve çeşitli indirgeyici özellikler sergilerler. Kumarinler ve ksantonların, gümüş ya da altın gibi metal NP'lerin hazırlanması için iyi bir potansiyele sahip oldukları bilinmektedir [47]. Fenilpropanoidler yenilebilir olup meyve veren bitkilerde yaygın bir biçimde dağılım gösterirler. Bu sınıfın çeşitli fenolik bileşikleri, özellikle fenilpropanoid glikositleri, antioksidan kapasitesi ile ön plana çıkmaktadır. Mükemmel indirgeme aktivitesi sergilemektedirler ve antioksidatif aktivitelerinin, molekül içindeki fenolik hidroksil gruplarının sayısındaki bir artış ile güçlendiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle, fenilpropanoid bileşiklerin NP'lerin yeşil sentezinde en iyi sonuçları gösterebileceği ortaya çıkarılmıştır. Terpenoidler de çeşitli bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır. Hidrofilik flavonoidlere kıyasla, lipofilik terpenoidlerin güçlü antioksidatif etkilere sahip oldukları ve oksidatif streslere karşı koruyucu etkilerinin olduğu ortaya çıkarılmıştır. Doğal ürünlerin farklı sınıflarınaa ait olan bu bileşiklerin güçlü indirgeyici özelliklere sahip oldukları ve NP sentezi için iyi bir doğal kaynak olarak kullanım potansiyeli gösterdikleri yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur [48].

2.4.2.3 Bitki Materyalinin Seçimi, Toplanması ve Tanımlanması

Bitki türlerinin seçimi, toplanması ve tanımlanmasında çeşitli yöntemler uygulanmaktadır. Fitokimyasal araştırmanın tekrarlanabilirliği, seçilen ve uygulanan yöntemlerden büyük ölçüde etkilenmektedir. Bu bağlantıdaki herhangi bir kusur, hatalı sonuçlara yol açabilir, bu da çalışmanın bilimsel önemini azaltabilir. Bitkinin spesifik bölümleri spesifik sekonder metabolitleri içerir. Bitkiden elde edilen ekstraktların fitokimyasal aralığı temsil etmesini sağlamak için bitkinin hangi bölümünün en yüksek metabolit seviyesini içerdiğini bilmek gereklidir. Birden fazla bitki parçasının veya bütün bitkinin toplanması daha doğru bir strateji olarak ortaya çıkmaktadır. Bitki kimyasalının spesifik sınıfının nicel ve nitel değişimi yakından ilişkili bitki türleri arasında mevcuttur. Bu nedenle, araştırılan bitki türlerinde belirli bir doğal ürün sınıfının mevcut olup olmamasına bakılmaksızın geniş bir çıkarım yapılmasına özen gösterilmesi önerilmektedir. İlaç keşfi için bitki türlerinin seçiminde bazı yaklaşımlar uygulanmaktadır, örneğin:

Geleneksel olarak gıda, ilaç veya zehir için kullanılan bitkilerin bir literatür taramasına veya yerel halkla röportaja dayalı olarak incelenmesi,

Nispeten keşfedilmemiş bir ekolojik bölgeden alınan bitki örneklerinin sistematik veya rasgele toplanması,

Belirli bir bileşiği ürettiği bilinen bir türe ait filogenetik bir ilişki içinde olan bir bitki türünün seçimi,

Literatürde verilen bir türün biyolojik etkinlik çalışmalarına ve raporlarına dayanan seçim [48].

2.4.3 NP'lerin Mikroorganizmalar Aracılığı ile Sentezi

Mikroorganizmalar; bakteriler, algler, funguslar, mayalar, virüsler ve protozoonlar ekosistemde çok önemli rollere sahiptir. Besin maddelerinin geri dönüşümünde ayrıştırıcılar olarak görev üstlenmektedirler. Mikroorganizmalar toksik kimyasallar ve sıkı koşullar olmaksızın ortam koşullarında NP'yi hücre içi veya hücre dışı olarak sentezleme potansiyeline sahiptir. Bu yolla sentezlenen NP'lerin özellikleri kimyasal

olarak sentezlenmiş NP'lere oldukça benzemektedir [49]. Diğer doğal kaynaklar arasında bakterilerin biyolojik NP sentezi için nispeten kolay bir şekilde manipüle edilmeleri nedeniyle yoğun bir şekilde araştırma konusu olarak ön plana çıkmıştır. Birçok bakteri, oda sıcaklığında ve hafif kültür koşullarında 0.1 nm'den 1000 nm'ye kadar çeşitli morfolojilere sahip NP'ler üretebilir [23], [50]. Bilinen birkaç mekanizma, biyosorpsiyon ve bakteriyel hücrelerin içindeki veya dışındaki proteinlerin yardımı ile biyolojik indirgenmesini kapsamaktadır. NP'lerin mikrobiyal biyosentezi oldukça ilgi görmekle beraber partikül büyüklüğü ve morfolojisi, çözeltinin pH değeri ve inkübasyon süresi gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal parametrelere bağlıdır.

Bakteriler toksik metalik ortamlarda hayatta kalabilmek için sayısız detoksifikasyon mekanizması geliştirmiştir. Bu mekanizmalar, oksidasyon veya indirgeme, kompleksleşme, çöktürme ve daha fazlasını içemektedir [51]. NP'leri üretmek için var olan mikrobik yetenek, en toksik ağır metallerle karşı direnç, mineral detoksifikasyonuna ve membran iyonu akışına dayanmaktadır [52]. Bakteriler tarafından NP biyosentez mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bununla birlikte, mineral detoksifikasyonu ile ilgili en temel işlemlerden biri, inorganik yapıların çekirdeklenmesini ve büyümesini kontrol eden bir organik matristen (yani proteinler veya diğer makromoleküller) biyolojik indirgemenin gerçekleşmesidir [53], [54], [55]. NP üreten mikroorganizmaların çoğu biyosekestrasyon ve enzimlerin aracılık ettiği minerallerin indirgenmesi yoluyla bunu gerçekleştirmektedir. Biyolojik indirgenmede proteinler, karbonhidratlar ve biyomembranlarında rol aldıkları bilinmektedir. Mikroorganizmalardaki redüktazlar, örneğin sülfat redüktaz NP'lerin birçok biyolojik indirgeme sürecinde çok önemli işlevler üstlenmektedir [56], [57].

Biyosentezlenmiş NP'lerin oluşum yerleri bakterilerin indirgeyici türlerine bağlıdır. Hücrenin içinde veya hücre duvarında bulunan indirgeyici enzimler veya fonksiyonel gruplar, hücre içi NP'lerin oluşumunda görev almaktadır. Oluşturulan NP'ler bu nedenle belirli alanlarla sınırlıdır ve bazen hücreden kolaylıkla çıkarılamazlar. NP'ler ekstraselüler olarak, genellikle indirgeyici enzimler çözücü ortamda çözündüğünde veya bakteriler enzimleri hücre dışına saldırdığında oluşurlar. NP'lerin bakteriler

tarafından ekstraselüler sentezi, NP'lerin uygulama amacıyla sentezlenmesinde daha iyi bir alternatif sağlamaktadır

2.5 Biyolojik Sentez Sonrası NP Ayrıştırılması

2.5.1 Ultrasantrifügasyon ve Liyofilizasyon

Bu yöntem, NP'lerin ayrılması için en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Islak kimyasal yöntemlerden herhangi biri tarafından hazırlanan NP'ler, uygun bir zaman periyodu için çeşitli rpm'lerde bir ultra santrifüjde santrifüjlenir ve çökeltme ile süpernatant alınır. Çökelti tekrarlanan santrifüjleme ile deiyonize su ile birkaç kez yıkanır, ardından NP'lerde herhangi bir artık çözücü madde veya reaktan kalmaması için süpernatanın uzaklaştırılması gerçekleştirilir. Daha sonra ıslak NP'leri kuru toz şeklinde elde etmek için liyofilizatörde dondurup buharlaştırma yöntemi uygulanır ve sonuçta NP'ler kuru toz halinde elde edilir [58], [59].

2.5.2 Manyetik Ayırma Yöntemleri

Bu yöntemler metalik (manyetik olarak aktif) NP'ler, özellikle de demir oksit NP'ler (FeONP) için spesifiktir. NP dispersiyonu içeren kap bir mıknatıs üzerine yerleştirilir (kullanılan mıknatısın yoğunluğu, materyalin türüne ve NP'lerin boyutuna bağlı olarak değiştirilebilir). Süpernant atılır ve NP'ler tekrar tekrar deiyonize su ile yıkanır. Nihayet, kalan su buharlaştırılır ve NP'ler kuru toz halinde elde edilir ve ileri ki çalışmalar için hazır hale gelmiş olurlar [3].

2.5.3 Membran Filtrasyonu

Uygun bir gözenek boyutuna sahip selüloz zar ile donatılmış zar filtreleme birimi, NP'lerin tutulması ya da istenen boyuttan daha büyük partiküllerin çıkarılması için kullanılır. İkinci durumda, istenen boyuttaki NP'leri içeren süzüntü, parçacıkların kuru bir tozunu elde etmek için ultrasantrifügasyon ile ve takiben liyofilizatörde dondurularak kurutulmaya tabi tutulur [60].

2.5.4 Kalsinasyon

Bu yöntem metalik ve diğer inorganik NP'ler için uygundur. Birlikte-çökeltme gibi yöntemlerle oluşan çökelti, basit filtrasyon yöntemleriyle toplanır. Bu çökelti daha sonra yüksek sıcaklıklarda (genellikle >350 °C) uzun süre (2 ila 3 saatten fazla) kalsinasyona (ısıtma fırınında ısıtma) tabi tutulur. Her zaman filtrasyon yöntemleri NP'lerin ayrılmasında etkin olmamaktadırlar, çünkü olağan filtre ortamlarının gözenek boyutu onları tutmak için çok büyüktür. Bunun yanında, alışılmış santrifüjlerin rpm'i de nanoparçacıkların sedimentasyonuna yetmemektedir. Bu nedenle, rutin ayırma yöntemleri, nanoparçacıkların boyutuna bağlı olarak değiştirilmelidir [3].

2.6 Biyolojik Sentez Sonrası NP'lerin Karakterizasyonu

2.6.1 Sentezlenmiş NP'lerin X-ışını Kırınımı

X-ışını difraksiyonu (XRD) madde fazı ve kristal yapısının analizi için gereklidir. XRD, bir kristalin atomları tarafından X-ışınlarının saçılımı olup, bu da bir girişim efekti üretir; böylece desenin kırınımı, kristalin yapısı ya da kristalin bir maddenin kimliği hakkında bilgi verir [61]. Vakum atmosferi altında kapalı bir tüp içinde üretilen X ışınlarının toz XRD analizi ve tüp içinde 15-60 kV akım uygulaması, bir Cr, Fe, Co, Cu, Mo veya Ag anoduna çarpan elektronları verir [62]. Kuantum teorisine dayanarak, elektromanyetik dalga, aşağıdaki bağıntılarda ifade edilen temel özelliklere (enerji, momentum, vb.) sahip bir foton veya ışık kuantumu adı verilen bir parçacık olarak düşünülebilir [63].

Kırınımın belirli açı değerlerinde bulunması gerekir ve bu açı değerleri Bragg denklemi ile belirlenir [64].

$$n\lambda=2d\sin\theta \quad (2.1)$$

Bu denklemde n , tam sayısı; λ , X-ışınının dalgaboyunu; d , atomik düzlemler arası mesafeyi ve θ , kristal düzlem ile gelen ışın arasındaki açıyı temsil etmektedir. Kristal malzemelerde karakteristik kırınım deseni her pikin denk geldiği bir atomik düzlemi temsil etmektedir. Örgü içerisinde atomların birbirlerine göre yerleşim yerlerini ve her

atomun ne kadar X-ışını saçtığını kırınım desenlerinin şiddetleri göstermektedir. NP'lerin ortalama kristalit boyutu Scherrer formülünden hesaplanabilir [65], [66].

$$D = K\lambda / (\beta \cos(\theta)) \quad (2.2)$$

Scherrer denkleminde bulunan D, kristal büyüklüğünü; K biçim faktörü 0.9 sabitini; λ , X ışını dalgaboyu; β , radyan cinsinden pik yarı genişliğini (FWHM); θ , pikin gözlemlendiği 2θ açısının yarısını temsil etmektedir. Bunların denklemde değerlerinin bilinmesi ile kristal büyüklüğü belirlenir.

2.6.2 Geçirimli Elektron Mikroskopisi (TEM)

Sabit bir elektron demeti kullanan geleneksel TEM'ler, görüntünün lokal kırılma olgusu nedeniyle görüntünün üretildiği oluşum süreçlerine dayanır. Absorpsiyon kontrastı sadece küçük bir rol oynamaktadır. TEM'in temel bileşenleri şunlardır:

- Elektron optik kolon,
- Vakum yapan bölüm,
- Bir aydınlatma sistemi,
- Bir örnek tablası,
- Bir objektif mercek sistemi,
- Bir büyütme sistemi,
- Veri kayıt sistemi (leri),
- Kimyasal analiz sistemi (leri).

Modern bir TEM tipik olarak dikey bir kolon tarafından üst üste konulan ve vakum sistemini içeren bir kumanda konsolunu ve operatör için uygun şekilde yerleştirilmiş kontrol panellerini içermektedir. Mikroskop, çevresel kaynaklardan gelen paraziti azaltmak için tamamen kapatılabilir ve uzaktan çalıştırılabilir. Vakum yapan bölümde elektron ışınları elde edilebilmesi için 10^{-4} ile 10^{-5} torr arasında bir vakum değeri elde edilmesi gerekmektedir. Hava emen döndürücü pompalardan oluşan rotasyon pompası ve serbest difüzyon olayından istifade ederek hazırlanmış olan difüzyon pompaları bu

bölümü oluşturmaktadır. Aydınlatma sistemi, numuneye çarpması için yapılmış bir elektron demetinden (genellikle paralel şekilde) oluşur. Bu elektron demeti, tungsten veya lantan hexaboride (LaB6) gibi bir termiyonik emisyon kaynağı veya bir alan emisyon kaynağı kullanan bir elektron tabancası tarafından üretilir. Aydınlatma sistemi ayrıca, elektron tabancasından çıkan elektron demetinin numuneye odaklanmasından sorumlu bir kondenser lens sistemi içerir. Kondenser lens, elektron tabancasından çıkan elektron demetini numuneye odaklar. Bu lens aynı zamanda elektromanyetik özelliktedir ve önemli bir değer aralığında ayarlanabilen birkaç santimetre odak uzaklığına sahiptir [67]

2.6.3 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

Sentezlenmiş NP'lerin morfolojik özellikleri SEM ile analiz edilebilmektedir. SEM, yüksek enerjili bir elektron demeti aracılığı ile tarama yaparak numune yüzeyini görüntülemeyi sağlar [68]. SEM'de elektron demeti, numunenin yüzeyine çarpar ve numunenin atomlarıyla etkileşime girerek numune yüzey topografyası ve bileşimi hakkında bilgi verir. Karakteristik X-ışınları, ikincil elektron ve geri saçılan elektron şeklinde sinyaller üretirler. SEM'in optik kolonunda; elektron demetinin kaynağı olarak görev alan elektron tabancası, elektronları numuneye doğru hızlandırmada rol üstlenen yüksek gerilimin uygulandığı anot plakası, demeti toplama ve yönlendirme işlemini gerçekleştirmekte kullanılan kondenser ve objektif mercekleri, demet çapını sınırlamaya yarayan apertürler, demeti uygun şekilde saptırarak numune yüzeyinin taranmasını sağlayan tarama bobinleri bulunur. Alttan numune ocağına açılan optik kolon bulunmaktadır ve burada üç boyutlu hareket edebilen numune kazağı, elektron demetinin numune ile etkileşmesiyle ortaya çıkan değişik sinyallere duyarlı algılayıcılar bulunmaktadır. Genel olarak, SEM, polimer nanokompozitlerin, NP'lerin ve nanofiberlerin yüzey yapısının yüksek çözünürlüklü görüntülerini üretmek için kullanılır [69].

2.6.4 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), kızılötesi yoğunluğa karşı dalga boyunu veya ışığın dalga sayısını ölçen kimyasal bir analitik yöntemdir. Spektrumdaki tepe noktalarından farklı fonksiyonel gruplar hakkında bilgi edinmek için FTIR spektroskopisi uygulanır. Sentezlenen metal NP'lerin kapaklanması ve etkin stabilizasyonu için kullanılan biyomolekülleri tanımlamak için FTIR ölçümleri gerçekleştirilmektedir. Kızılötesi spektroskopi, numunenin kimyasal fonksiyonel gruplarının titreşim özelliklerini tespit eder [40]. Kızılötesi ışığın madde ile etkileşmesi durumunda, kimyasal bağlarda gerilme, büzülme ve bükülme şekilleri ortaya çıkar. Kimyasal bağların spesifik türlerinin veya fonksiyonel grupların benzersiz emilim işaretlerine dayalı tanımlanması, kızılötesi spektroskopi ile mümkündür. Kimyasal bağ gerilmesi ve bükülmesi enerjinin emilmesi ile mümkündür. Bu enerji IR aralığında elektromanyetik spektrumda yer almaktadır. FTIR konvansiyonel IR spektroskopiden farklı olarak çeşitli avantajlar sunmaktadır, dolayısıyla günümüzde FTIR yaygın olarak kabul görmektedir. Metal NP yüzeyine bağlı fonksiyonel gruplar, serbest gruplarından farklı FTIR modelini göstermektedir, bu nedenle FTIR, nanomalzemelerin yüzey kimyası hakkında bilgi edinmede yararlı bir araç haline gelmiştir. FTIR, bitkilerin veya onların ekstraktlarının NP ile ilişkili moleküllerinin yapısını belirlemek için kullanılmaktadır [70], [71].

2.6.5 UV-Vis Spektroskopisi

UV-görünür absorpsiyon spektroskopisi, nanoparçacıkların optik özelliklerini araştırmada çok önemli bir rol oynamaktadır. UV-görünür spektroskopi, ultraviyole ve görünür spektrumların spektral bölgesinde bir absorpsiyon spektroskopisi olarak kabul edilir. Absorbans spektroskopisi, bir çözeltinin optik özelliklerini belirlemek için kullanılır. Genellikle solüsyondaki moleküllere uygulanır ve numune tanımlama için sınırlı bir kullanımı vardır, fakat nicel ölçümler için yararlıdır. Çözeltideki analit konsantrasyonu, Lambert-Beer yasası uygulanarak belirli bir dalga boyundaki absorbansın ölçülmesiyle belirlenebilir. Kantitatif oluşum izlenebilir ve NP'lerin boyutu

bu teknik yardımı ile incelenebilir. Temel olarak, örneklem tarafından 190-700 nm dalga boyu aralığında elektromanyetik dalgalara tepki incelenmektedir [72].

Genel olarak, metallerin yüzeyinde bulunan serbest değerlik elektronları atom çekirdeğinin pozitif yükünün çekim etkisinden dolayı titreşir. Bu titreşim metalin dışındaki karakteristik frekans ile elektron yoğunluğu dalgalarına (yüzey plazmonuna) neden olur. Metal yüzey plazmonunun frekansı ile eşdeğer ışık fotonlarının frekansı temelinde fotonların enerjisi emilir [73] ve böylece düzlemsel yüzey için SPR ve nanokütle boyutunda metaller için lokalize yüzey plazmon rezonansı (LSPR) oluşur [74]. NP'lerin absorpsiyon maksimumları esas olarak boyuta, şekle, türe ve çevresel olgulara bağlıdır [75]. Çoğu metal NP'lerde, kısıtlı SPR'ye neden olan azami emilim, elektromanyetik spektrumun ultraviyole bölgesine düşer. Altın ve gümüş NP'lerde rezonans, bantlar arası geçişler nedeniyle görünür bölgede yer alır [76].

2.6.6 Dinamik Işık Saçılması (DLS) ve Zeta Potansiyeli

DLS, aynı zamanda foton korelasyon spektroskopisi (PCS) olarak adlandırılan, lazer difraksiyon metoduna dayanan NP'lerin ortalama parçacık boyutunu incelemek için kullanılan bir ışık saçılım tekniğidir [77]. Bu teknik sıvı ortamda asılı kolloidal parçacıklardan gelen ışığın dağılması prensibini kullanır. Brown hareketine sahip parçacık çözeltisi üzerindeki monokromatik ışık, hareketli parçacıklara çarptığında gelen ışığın dalga boyunu değiştirerek bir Doppler etkisine neden olur. Bu değişiklik, parçacık büyüklüğü ile ilgilidir. Boyut dağılımını çıkarmak ve partikülün ortamdaki hareketi hakkında bir tanımlama yapmak mümkündür, ayrıca otokorelasyon fonksiyonunu kullanarak partikülün difüzyon katsayısı da ölçülebilir [78]. Hidrodinamik çap ölçümleri haricinde DLS cihazı, bir elektrik alanda NP'lerin elektroforetik hareketliliğini ölçmek için kullanılırken ortamın doğasına bağlı olarak numunelerin zeta potansiyelini hesaplamak için de ardışık olarak kullanılabilir. Zeta potansiyeli, NP yüzeyinin durumunun anlaşılmasına ve NP'ler arasındaki elektrostatik itme kuvvetlerine bağlı olan uzun vadeli stabilitenin öngörülmesine yardımcı olan yararlı bir ölçümdür [79]. Bu potansiyel yüzey yükünün dolaylı bir ölçümüdür. NP'lerin yüzey yükünün yoğunluğu ve doğası, biyomoleküllerle olan elektrostatik etkileşiminin yanı

sıra biyolojik çevre ile olan etkileşimlerini belirlediğinden çok önemlidir. Genel olarak, bir ortamdaki eşit yüklü parçacıklar itici elektrostatik kuvvet nedeniyle birbirlerini itme eğilimi gösterirler. Ayrıca, parçacıkların yükleri dışında, çoğunlukla parçacıkların mesafesine bağlı olan van der Waals'ın çekim kuvveti de vardır. Kolloidal kararlılığı sağlayan bu iki karşıt kuvvetin ortak etkisidir [80]

2.6.7 Enerji Dağılım X-RAY Spektroskopisi (EDS)

EDS analizi, yüzeysel elementel kompozisyonu keşfetmek ve orantısını farklı pozisyonda tahmin etmek için kullanılır, böylece numunenin genel bir haritalandırılması sağlanır. Bu teknikte, bir elektron demeti test numunesinin yüzeyine çarpar. Işın enerjisi tipik olarak 10-20 keV aralığındadır ve bu da X ışınlarının numuneden yayıldığına işaret eder. Genel olarak, X ışınlarının yaydığı enerji test örneğine bağlıdır. Elektron ışını örnek boyunca hareket eder ve görüntüler her bir element için elde edilir. NP yüzeyinde Au, Ag ve Pd'nin varlığı kolayca tanımlanabilir; bununla birlikte, düşük atom numarası sahip elemanları EDS kullanılarak tespit etmek zordur [81].

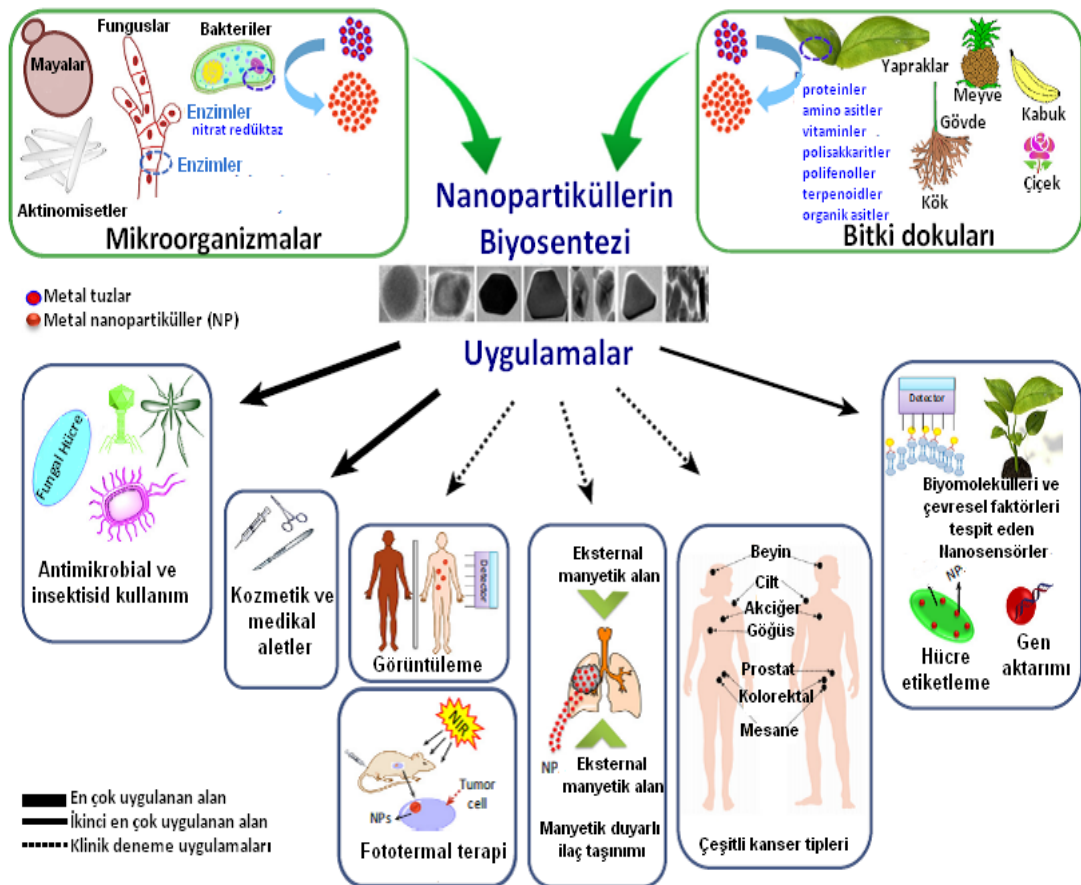
2.6.8 Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM)

Atomik Kuvvet Mikroskopisi (AFM), malzemelerin yüzeyini nanometre seviyesinde görüntüleyen en yaygın ve ideal araçlardan biridir. Kontrol ünitesinden ayrı olarak, AFM makinesinin ana parçaları cantilever, lazer ışını üretici ve fotodiyot dedektörüdür [82]. Görüntüleme işlemi sırasında, konsolun ucu numunenin yüzeyi ile etkileşime girer ve ucun hareketinin sapmasına neden olur. Bu sapma, ucun arka tarafında yönlendirilen lazer ışınının fotodiyot dedektörü üzerinde farklı bir konuma yansıtılmasına neden olur. Ucu bu hareketi numunenin yüzeyini haritalamak ve topoğrafik haritasını oluşturmak için kullanılabilir [83]. Genel olarak, AFM'nin temaslı, temassız ve hafifçe vurma yöntemleri, nanomalzemelerin boyut ve şeklini belirlemek için kullanılır. Bu yöntemler çoğunlukla cantilever ucu ve test örneğinin yüzey atomları arasındaki mesafeden dolayı farklılık göstermektedir [84]. Temaslı modunda uç, numunenin yüzey atomlarıyla temas halindedir ve hareket eden atomun elektron

bulutlarının neden olduğu itici atomlararası kuvvetleri üretir. Temassız AFM modunda cantilever uçları numunenin yüzeyinde titreşir ve atomlararası kuvvetlerden kaynaklanan bu titreşimin değişimi algılanır ve numunenin yüzeyinin topografik görüntülerine dönüştürülür. Hafifçe vurma modunda, uç ve yüzey atomları arasındaki mesafe yukarıda açıklanan diğer iki mod arasında bir yerdedir ve uç numunenin yüzeyi ile temasa geçtiğinde değişir. AFM, nanoyapıların yüzey özelliklerinin tahribatsız bir biçimde karakterizasyonu için güçlü bir araçtır.

2.7 Metal NP'lerin Kullanım Alanları

Son zamanlarda, metalik NP'lerinin çeşitli uygulamaları, biyomedikal, tarımsal, çevresel ve fizyokimyasal alanlarda araştırılmıştır (Şekil 2.9) [85], [86], [87], [88], [89].



Şekil 2.9 Biyomedikal ve çevresel alanlarda metal NP'lerin biyolojik sentezi ve uygulamaları [89]

Günümüzde bazı metal NP'ler geniş şekilde biyomedikal alanlarda [90], [91], ilaç salınımlarında [92], [93], katalizör olarak [94], tarım alanlarında [95], antioksidan olarak [96], antikanser ajan olarak [97], antibakteriyel ajan olarak [98] ve antibiyofilm ajan olarak [99] kullanılmaktadır.

AgNP'ler, biyomedikal uygulamaların da çok farklı amaçlar için kullanılmaktadır [100]. AgNP'ler, antibiyotik tedavisine dirençli patojen mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisi için umut verici alternatifler olarak kabul edilen güçlü antimikrobiyal ajanlardır [101]. Bu nedenle bu parçacıklar, nanomalzemeler ile imal edilmiş ticari cihazlar ve tüketim mallarında antimikrobiyaller olarak yaygın olarak kullanılmaktadır [102]. Bu açıdan AgNP'ler hem insan sağlığı hem de çevresel perspektiflerden en yoğun biçimde incelenen NP türüdür [103].

Demir oksit NP'ler, kanser tedavisi, hipertermi, ilaç dağıtım, doku onarımı, hücre etiketleme, hedefleme ve immünoassaylar, biyolojik sıvıların detoksifikasyonu, manyetik rezonans görüntüleme ve manyetik olarak yanıt veren ilaç tedavisi için uygulanmıştır [104]. Çinko ve titanyum NP'ler, biyolojik olarak uyumlu, toksik olmayan, kendi kendini temizleyen, cilt uyumlu, antimikrobiyal olup dermatolojik davranışlarından dolayı biyomedikal uygulamalarında, kozmetikte, ultraviyole (UV) bloke edici ajanlar olarak ve çeşitli ileri teknoloji işleme uygulamalarında kullanılmaktadır [105], [106]. Bakır ve paladyum NP'leri, piller, polimerler, plastiklerdeki plasmonik dalga kılavuzları ve optik sınırlayıcı cihazlara uygulanmaktadır [107], [108]. Ayrıca metal NP'ler, bu molekülleri daha yüksek duyarlılık ve uzaysal çözünürlük ile görselleştirmek için çeşitli biyomoleküllerin, çeşitli metabolitler, peptidler, nükleik asitler, lipidler, yağ asitleri, glikosfingolipidler ve ilaç moleküllerinin mekânsal analizinde kullanılmaktadır [109]

2.7.1 Biyomedikal Uygulamalar

Biyomedikal alanlardaki metalik NP'lerin uygulamaları sayısızdır ve bu alanda sürekli kullanımları için güçlü bir potansiyel vardır. Metalik NP'ler antimikrobiyal özelliklerinden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır; örneğin, AgNP'ler yara sargılarına, kemik çimentosunda ve implantlarda kullanılmıştır [82]. AuNP'ler, tıbbi açıdan önemli optik

ve antikanser özelliklere sahiptir. Genel olarak biyomedikal uygulamaları aşağıdaki başlıklar altında özetleyebiliriz.

2.7.1.1 İlaç Dağıtımı ve Kanser Tedavisi

Biyosentezlenmiş NP'ler belirli memeli dokularının işleviyle etkileşime girebilir ve bunları değiştirebilir. Örneğin, metalik NP'ler, antioksidan savunma sistemini bozarak reaktif oksijen türlerinin birikmesine, mitokondrinin yok olmasına ve hücre apoptozununa sebep olabilir [110]. Bu etki hedeflenebilir, çünkü metal NP maruziyetinin *in vivo* etkileri güçlü bir şekilde kapaklayıcı maddeye bağlıdır: farklı kapaklayıcı ajanlara sahip olan aynı AgNP'lerin hem sitotoksik hem de sitotoksik olmadığı yapılan çalışmalarda ortaya çıkmıştır [110], [111]. Stabil metal NP'lerin taşıyıcı olarak kullanılması, geleneksel kemoterapötik ajanların yan etkilerini, normal hücreleri etkilemeden, anti-kanser ajanlarının malign hücrelere seçici olarak verilmesiyle en aza indirebilir. Örneğin, altın, tiyollere (-SH) ve aminlere (-NH₂) kuvvetli bir şekilde bağlanma yeteneği sayesinde kolaylıkla modifiye edilebilir. Böylece, NP yüzeyini kemoterapötik ve hedefleyici ajanlar olarak görev yapan biyomoleküller ile kaplamak nispeten kolaydır [112]. Farklı kapaklayıcı ajanların seçimi ile, metalik NP'lerin sitotoksik aktivitesi, hem ilaç salımı hem de kanser hücresi hedeflemesi için kullanılabilir. Hedeflenen NP'lerin kendilerinin tedavi edici olmaları ya da NP'lerin başka bir ajan için taşıyıcı görevi görüp görmedikleri önemli bir konu haline gelmektedir ve böylece biyosentezlenmiş NP'lerin nanotıpta önemi giderek artmaktadır.

2.7.1.2 Tıbbi Teşhis ve Sensörler

Biyosentezlenmiş NP'ler aynı zamanda algılama ve teşhis alanlarında tıptaki gelişmelere önemli katkılar sağlamaktadır. Bu malzemeler, peroksitler ve glikoz dahil olmak üzere tıbbi olarak ilgili bileşikler tespit edebilen kimyasal sensörler ile birlikte başarıyla uygulanmıştır. Örneğin, yumurta kabuğu membranı, AuNP'lerin biyosentezinde bir indirgeyici madde ve iskele olarak kullanılmıştır [113]. Bunun ile hazırlanan sensör, farklı glikoz konsantrasyonlarındaki 17 μ M saptama sınırı ile lineer

bir tepki göstermektedir. Aynı materyal, insan kan serumu örneklerinin glikoz içeriğini ölçmek için kullanılmış ve analizin, standart bir rutin tıbbi spektrofotometrik test ile uyum gösterdiği bildirimiştir [114].

Hidrojen peroksit, astım veya kronik obstrüktif akciğer hastalığında (KOAH) önemli bir rol oynayan, oksidatif stresin bir tanısal göstergesi olarak kabul edilmiştir. Yapılan çalışmalarda *Bacillus subtilis* bakteri suşu kullanılarak hazırlanan biyosentezlenmiş selenyum NP'lere (SeNP) dayanan bir hidrojen peroksit sensörü oluşturulmuştur. Elde edilen SeNP'ler küresel ve tek boyutlu trigonal tellere dönüştürülebilmekte oldukları bildirilmiştir (*B. subtilis* hücrelerinden atılan proteinler template olarak hareket eder). Temiz bir camı karbon elektrot (GCE), bir koloidal SeNP süspansiyonunun damlası ve bir enzim olan horseradish peroksidaz damlasıyla geliştirilmiştir. Döngüsel voltametri çalışmaları, SeNP'lerin, 80 nM saptama sınırıyla sonuçlanan H₂O₂ tespitini artırdığını doğrulamıştır. Bu nedenle bu materyal, örneğin, KOAH'tan etkilenen hastaların ekshale edilmiş nefes kondensinde hidrojen peroksidin saptanması için kullanılabilmiştir [115]

2.7.1.3 Tıbbi Görüntüleme Uygulamaları

Metalik nanokristallerin optik özellikleri yüzyıllardır ilgi çekmektedir. Biyosentez yöntemlerinin dâhil edilmesi, bir dizi boyut, şekil ve dielektrik özelliği olan metal NP'lerin hazırlanmasını mümkün kılmıştır. Metal NP'ler ile ilişkili optik özellikler arasında yüksek veya düşük refraktif indeks, yüksek şeffaflık, yeni fotoluminesans özellikleri, fotonik kristaller ve plazmon rezonans bulunmaktadır [116]. Işığın dalga boyundan daha küçük parçacıklarla etkileştiği alandaki nanofotonik çalışmaları, lokalize yüzey plazmon rezonansı ve boyuta bağlı yarı iletken bant boşluğu gibi yeni fenomenlere yol açmaktadır [117]. Biyosentezlenmiş AgNP'lerden mavi turuncu ışık emisyonu yapılan çalışmalarda mevcuttur. Fungal aracılı AgNP'ler bir *Trichoderma viride* filtratı kullanılarak sentezlenmiş, lazer uyarılmasından sonra fotoluminesans ölçümlerinin, 320-520 nm aralığında bir emisyon gösterdiği ve bunun da AgNP'lerin gelecekte etiketleme ve görüntüleme uygulamaları için ümit verici olduğu iddia edilmiştir [118].

Modern lazer tıbbının önemli bir problemi, operasyon alanı dışındaki hassas alanların geniş ölçüde maruz kalmasıdır. Bu problem, radyasyona maruz kalan dokuların yüzeyi üzerine radyasyonun tersinir şekilde kararmasını sağlayan boyaların yerleştirilmesiyle çözülebilir. Bu olguya optik radyasyon sınırlaması denir [119]. *Coriandrum sativum* yaprak ekstratı kullanılarak biyosentezlenen AgNP'lerin, lazer irradyasyonunun güçlü ters doyurulabilir absorpsiyonunu sergiledikleri ortaya çıkarılmıştır [120]. Yapılan çalışmalarda lazer darbeleriyle Z-tarama tekniği kullanılarak doğrusal olmayan kırılma ve absorpsiyon katsayıları ölçülmüştür. Bu sonuçlardan AgNP'lerin nonlineer optik yeteneğine sahip olduğu ortaya çıkmaktadır

2.7.2 Atık Su Arıtma

Tüm NP'ler nano boyutlarından dolayı kendilerine özgün bir etkiye sahip olabilmektedirler ve hücre membran özelliklerini değiştirerek (örneğin, membran geçirgenliğinde artış) zar hasarına neden olmaktadır[121], [122]. Bu faktörün yanı sıra metalik ve metal oksit NP'lerin etkisi atık/atıksu arıtma ve çamur bertarafında aerobik ve anaerobik koşullara büyük ölçüde bağlıdır. Aerobik şartlar altında AgNP'le ve diğer metal NP'ler ROS oluşumuna sebep olabilir ve hücrede oksidatif strese neden olabilir. Ayrıca, bazı metal NP'ler metal iyonlarını (Ag^+) serbest bırakırlar ve bu nedenle de metal toksisitesine neden olurlar [123], [124]. Karanlık ve oksijensiz koşullar altında, bu tür NP'lerin toksisitesi esas olarak metal iyonlarının salınımı ile ilişkili iken hiçbir ROS üretimine sebep olmazlar [125]. Öte yandan, sıfır değerlikli demir nanopartikül (NZVI) benzersiz ve hızlı bir şekilde hidrojen gazı üretir ve bu da anaerobik sindirime zarar verebilmektedir [126]. Ayrıca, metalik ve metal-oksit NP'ler su arıtımında virüslerin inaktivasyonunda ve biyolojik kirlilik kontrolünde de dezenfeksiyon amacıyla uygulanmaktadırlar [121], [127]. Aynı zamanda, nano ZnO ve NZVI, endüstriyel atıksu arıtımında da uygulanmaktadırlar [123], [128], [129]. Bu tür NP'lerin faydalı kullanımı ile potansiyel toksisiteleri arasında büyük ölçekli kullanımlarını hızlandırmaya yardımcı olacak bir denge kurmak için gelecekteki araştırmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

2.7.3 Kozmetik

Metalik NP'ler ağırlıklı olarak kozmetik ve ilaç kaplama malzemeleri olmak üzere farklı ticari uygulamalar için kullanılmaktadır [130]. Altın, gümüş ve platin gibi nano boyutlu metal NP'ler, şampuan, sabun, deterjan ve ayakkabı gibi çeşitli ticari ürünler için geniş çapta uygulanmaktadır. Kimyasal maddeler çoğunlukla sentetiktir ve insana yan etkilere neden olur. Sonuç olarak, yeşil metalik nanoparçacıklar sağlık ve kozmetik endüstrilerinde koruyucu ajanlar için alternatiftir.

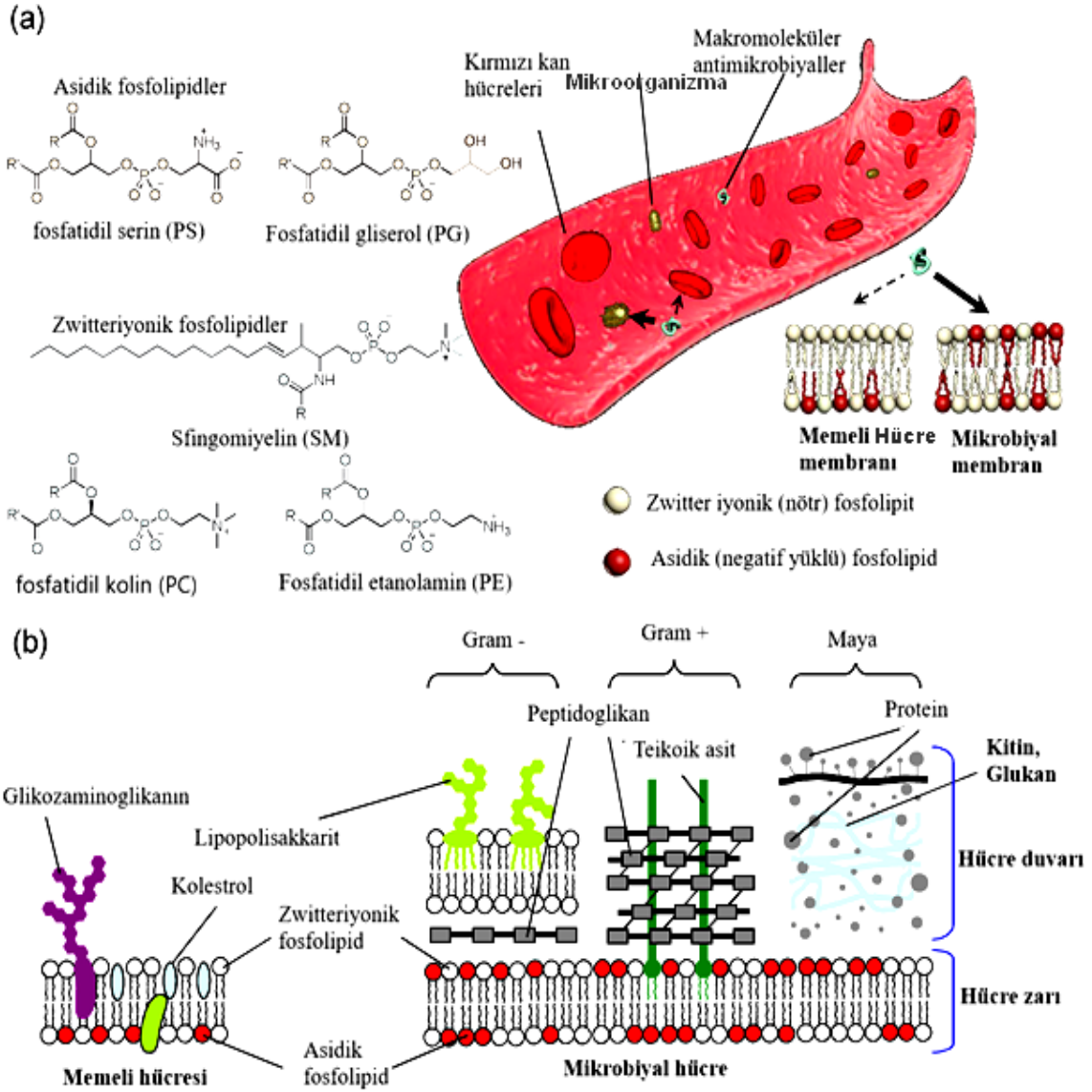
2.7.4 Gıda Endüstrisi

Gümüş metali çok ısı ileten bir malzemedir, bundan dolayı AgNP çeşitli ıda süreçlerindeki mekanik cihazlarda kullanılmaktadır. Genellikle PCR kapağı ve UV-spektrofotometre gibi ısıya dayanıklı cihazlarda kullanılır. Enstrümantasyonun parçalarında malzeme kaplamasında AgNP kullanılmaktadır. Yüksek sıcaklıkta numunelere herhangi bir müdahale gerektirmeden kararlı yapılarını korurlar [131]. Gıda endüstrisinde, gıda ürünleri, hammadde imalatı, işlenmesi ve nakliye gibi çeşitli açık ölçekli proseslere bağlı olarak yüksek mikrobiyal kontaminasyon potansiyeli her zaman olasıdır. Bu nedenle, ürünlerin kalitesini değerlendirmek için uygun maliyetli bir biyosensör geliştirmeye ihtiyaç vardır. Metalik NP'ler biyosensör olarak geliştirilirler ve etkili bir şekilde patojen tespitinde işlev görerek kirleticinin farklı evrelerini düşük maliyetle ve hızlı bir biçimde izlemeye olanak sağlamaktadırlar [132].

2.8 NP'lerin Antimikrobiyal Etkinlikleri ve Mekanizması

Literatürdeki çalışmalar, çoğunlukla bir bakteri hücrelerini canlılığını devam ettirmesi açısından önem arzeden bakteri hücre zarı ile NP etkileşimlerine eşlik eden çeşitli olayları araştırmayı hedeflemiştir. Hücre zarı ile NP etkileşimin en az üç şekilde gerçekleştiği düşünülmektedir: (i) elektrostatik kimyasal absorpsiyon kuvvetleri nedeniyle hücre yüzeyi üzerine koloidal metal parçacıkların yapışması; (ii) bir metal partikülün yapışmasına verilen hücre tepkisi, böylece atomun oksitlenmesiyle parçacık "çözünür" ve atomlar ile iyonların birleşmesiyle daha büyük bir boyuta sahip yeni metal parçacıklarının oluşması; ve (iii) mikrobiyal hücrelerin NP yapışma yerlerinde agregat

oluşturabilirler. Buna ek olarak, metal NP'lerin etkileşimlerinin canlı ve ölü hücreler arasında önemli ölçüde farklılaştığı ve hücre zarı bölgeleri arasında değişebilen hücre yüzeyi yükünün etkileşimlerde önemli bir rol oynadığı değerlendirilmiştir [133]. Çok sayıda parçacık oluşması ve hacimsel olarak yüksek yüzey alanına sahip NP'lerin çok az miktarlarda bile yüksek etkinlik göstermelerini sağladıkları yapılan çalışmalar ile ortaya çıkarılmıştır [134]. Hem bakterilerin hem de memeli hücrelerinin membran yapısı Şekil 2.10'da gösterilmektedir. Temel olarak, bakteriyel hücre duvarlarının temel özellikleri, hücreleri mekanik ve ozmotik hasardan koruyabilecek kadar güçlü bir sertliğe sahip olmalarıdır [135]. İki sınıf bakteri (prokaryotik hücre), yani Gram-pozitif (1) ve Gram-negatif (2) bakteri yapı ve kimyasal bileşim bakımından farklı karakteristik hücre duvarlarına sahiptir. Gram-pozitif bakteriler (monoderm bakteriler veya monoderm prokaryotlar), hücre zarı dışındaki teikoik asitlere bağlanan, lipit peptidoglikanın 20-50 nm tekli kalın tabakasına sahip hücre duvarlarından oluşurken; Gram-negatif bakteriler, teikoik asitler ya da lipoteikoik asitlere bağlı olmayan 2-3 nm ince çok katmanlı lipid peptidoglikan ile sandviç yapısında hücre duvarlarından (8 nm kalınlığında) (yani, hem bir sitoplazmik zar hem de bir dış hücre zarı ile sınırlandırılmış) meydana gelmektedir. Çoğunlukla, Gram-negatif bakterilerin dış zarları, periplazmik boşluk bölgesi içinde peptidoglikan bulunur. Lipoproteinler ise peptidoglikan tabakasının dış membran tabakasına bağlanmasını sağlarlar ve dış zar bu lipoproteinlere bağlı lipopolisakarit omurgalarından oluşur. Bu lipopolisakarit omurgası membran yüzeyine yapısal bütünlük ve hücre yaşayabilirliği kazandırmanın yanı sıra negatif yük sağlar [136]. Hücre duvarlarının bu yapısal bütünlüğü aynı zamanda NP gibi yabancı cisimlere bakterilerin toleransına veya hassasiyetine neden olur. Ayrıca, dış zar, porinler ve lipopolisakarit moleküllerini içerir [137].



Şekil 2.10 Hücre zar yapısı ve bunun antimikrobiyal seçicilik üzerindeki etkisi.

(a) Membran aktif antimikrobiyallerin seçiciliğini sağlayan memeli ve mikrobiyal hücreler arasındaki plazma membran bileşimindeki farklılık ve (b) memeli hücrelerinin hücre zarı ile çeşitli hücre zarları arasındaki büyük farkları gösteren kesitsel diyagram [138]

2.8.1 Gümüş NP'lerin Antimikrobiyal Özellikleri ve Mekanizması

Gümüş metali farklı uygarlıklar boyunca yaygın bir biçimde antimikrobiyal olarak kullanılmaktadır. Birçok toplum gümüşü kuyumcu, süsleme ve güzel çatal bıçak takımı olarak kullanmaktadır. Gümüşün kullanımı, sütlü şişeleri kaplamak için gümüşü doğal bir biyosit olarak kullanan Fenikeliler'e kadar uzanmakta olup mikropların kontaminasyonunu önlemek için antimikrobiyal kullanımının uzun bir geçmişi vardır.

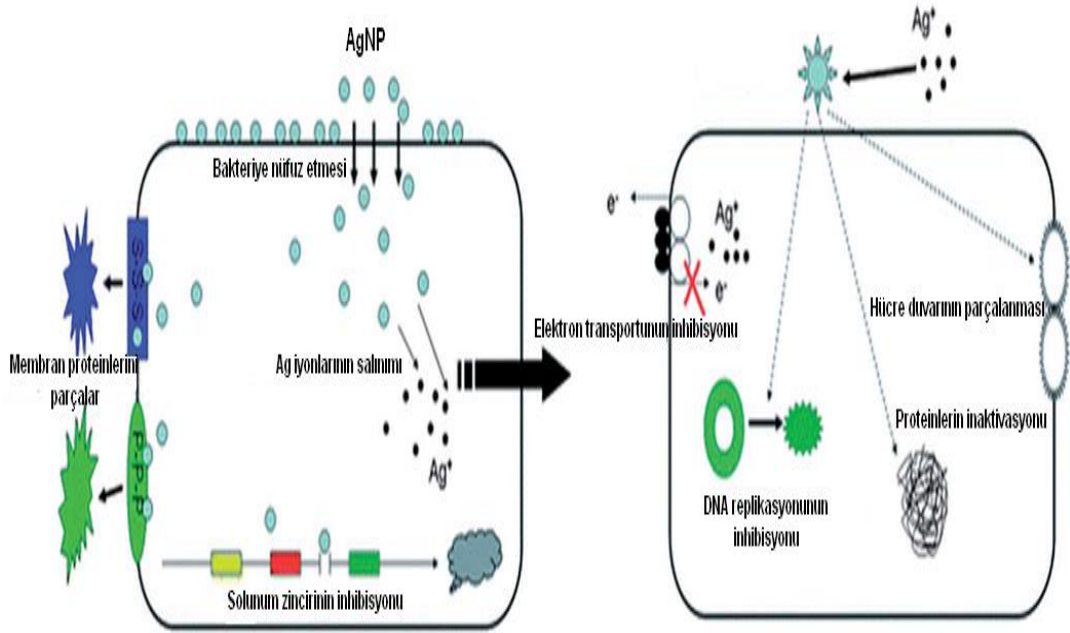
Gümüşün, gram negatif ve gram pozitif bakteriler, funguslar veya virüsler gibi farklı sınıflardan 650'den fazla mikroorganizmaya karşı etkinlik gösteren bir antimikrobiyal ajan olduğu bilinmektedir. Eski Hint tıp sisteminde (Ayurveda olarak adlandırılır), gümüş birçok hastalık için terapötik madde olarak tarif edilmiştir [139]. Antimikrobiyal özelliklere sahip olan tüm metallerin arasından, gümüşün en etkili antibakteriyel etkiye sahip olduğu ve hayvan hücrelerine en az toksik olduğu bulunmuştur. Gümüş, Birinci Dünya Savaşı'ndaki yaralı askerler için tıbbi tedavi amaçlı olarak yaygın olarak kullanılmış ve mikrobik büyümeyi önlediği gözlemlenmiştir [140]. Gümüş genellikle antimikrobiyal etki yaratmak için nitrat formunda kullanılır, ancak AgNP'ler kullanıldığında, mikroorganizmaların maruz kalabileceği yüzey alanında büyük bir artış meydana gelmektedir.

AgNP'lerin antimikrobiyal özellikleri aşağıdakilere bağlıdır:

1. Boyut ve çevresel koşullar (boyut, pH, iyonik kuvvet),
2. Kapaklayıcı ajan.

AgNP'lerin antimikrobiyal veya toksisite aktivitelerinin kesin mekanizmaları hala bilinmemekte ve son zamanlarda en çok araştırılan konulardan bir tanesi olmaktadır. Ag iyonları üzerindeki pozitif yük, antimikrobiyal aktiviteler için hayati öneme sahiptir. Gümüşün herhangi bir antimikrobiyal özelliğinin olması için iyonlaşmış formda olması gerekir. İyonlaşmış formunda, gümüş inerttir ancak nemle temas ettiğinde gümüş iyonlarını bırakır [141]. Ag^+ iyonları, nükleik asitlerle kompleksler oluşturabilir ve tercihen nükleik asitlerin fosfat grupları yerine nükleozidlerle etkileşime geçebilirler. Dolayısıyla, gözlenen antimikrobiyal özelliklere sahip olan gümüş veya gümüş içeren bileşiklerin tüm formları başka bir gümüş iyonu kaynağı (Ag^+) olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu gümüş iyonları maddeye dâhil edilebilir ve gümüş sülfadiazin gibi zamana bağlı olarak yavaşça serbest bırakılabilir veya gümüş iyonları, AgNP'lerde olduğu gibi katı bir gümüş parçasının yüzeyinin iyonize edilmesinden kaynaklı da meydana gelmektedir [122], [142]. Pozitif yüklü NP'ler ile negatif yüklü bakteri hücreleri arasındaki elektrostatik çekimi gösteren bazı literatür çalışmaları mevcuttur [143] ve bunların en uygun bakterisidal madde olduğu öne sürülmektedir [144]. Bu

NP'lerin zar içerisinde biriktiği gösterilmiştir ve daha sonra hücrelere nüfuz ederek hücre duvarına veya hücre zarlarına zarar verebildiği ortaya çıkarılmıştır. Gümüş iyonlarının, tiyol gruplarına (-SH) bağlandığı ve daha sonra hücre zarı içerisinde deaktivasyonuna neden olduğu düşünülmektedir. Ag (I) iyonunun hücreye girip iki iplikçik arasındaki hidrojen bağına keserek DNA molekülünü denatüre edip pürin ve pirimidin baz çiftleri arasında interkalasyon yaptığı öne sürülmektedir.



Şekil 2.11 Gümüş NP'lerin çeşitli antibakteriyel etki mekanizmaları [87]

AgNP'lerinin olası antibakteriyel mekanizmaları şu şekilde sıralanabilir (Şekil 2.11):

- (1) Mikroorganizma nanometre ölçeğinde parçacıkla daha iyi temas eder, AgNP'ler bakterilerle temas için son derece geniş bir yüzey alanı sağlamaktadır. Nanoparçacıklar hücre zarına bağlanır ve ayrıca bakterilere nüfuz eder [145], [146].
- (2) Bakteri membranları sülfür gurupları içeren proteinleri içermektedir ve Ag⁺ gibi AgNP'ler yanı sıra DNA gibi fosfor içeren bileşiklerle etkileşime girerek fonksiyonu inhibe eder [147], [148],
- (3) AgNP'ler veya Ag⁺, bakteriyel mitokondrideki solunum zincirine zarar verebilir ve hücre ölümüne yol açabilir [122],

(4) AgNP'ler, bakteriyel hücreler içinde (düşük pH'lı bir ortamda) Ag⁺'nın sürekli serbest bırakılmasına neden olabilir; bu da serbest radikallerin oluşumuna sebep olabilir ve oksidatif stres oluşturarak bakterisidal aktivitelerini daha da arttırabilir [149], [150].

AgNP'ler, hücre zarı ve DNA'yı bozarak, hayati metabolik enzimleri inhibe ederek ve hücrel unsurları yok eden reaktif oksijen türlerini (ROS) üreterek bakteri gelişimini durdururlar [145], [151]. Mikrobiyal hücreler, reaktif oksijen türlerine duyarlıdır ve bu NP'ler mikrobiyal hücrenin antioksidan savunma mekanizmasını bypass edebilecek kadar yeterli reaktif oksijen türünü üreten herhangi bir muamele için, enfeksiyonu ve ortaya çıkan mikrobik direnci yok etmek için umut verici bir strateji olma potansiyeline sahiptir [152].

Çok yönlü etkisinden dolayı, AgNP'ler ortaya çıkan mikrobik direncin üstesinden gelmek için umut vadeden alternatifler olmaktadır. Bakteriyel direnç dünya çapında ciddi bir sağlık sorunu olması nedeni ile geniş spektrumlu antibakteriyel aktiviteye sahip yeni terapötik ajanların araştırılması gerekmektedir. Etkili stratejilerden biri de, şifalı bitkilerden terapötik moleküller ile gümüş iyonlarını indirgemek ve kaplamaktır. Bitkiler alemi, ortaya çıkan bakteri direnciyle mücadelede AgNP'ler ile birlikte yüksek etkinliğe neden olabilen biyolojik olarak aktif fitokimyasalların çok yönlü bir kaynağıdır. Böyle bir kombinasyon terapisi, gümüş ve biyoaktif kapaklı biyomoleküllerin antimikrobiyal özelliklerinden sinerjik bir yaklaşım ortaya koymaktadır. Ayrıca, biyojenik AgNP'lerin, kitosan gibi biyolojik olarak uyumlu bir biyopolimerle işlevselleştirilmesi, biyolojik aktivitelerini daha da arttırmaktadır. Kitosan, geniş spektrumlu antibakteriyel aktiviteye ve güçlü biyouyumluluk özelliklerine sahip olan doğal bir karbonhidrat polimeridir. Kitosanla işlevsel hale getirilmiş NP'lerin bakteri ile temas eden arayüzlerini değiştirir, bu da metal nanoparçacıklarının biyolojik aktivitesini arttırmaktadır [153]. Kitosan, negatif yüklü bakteri membranına nüfuz ederek (katyonik yapısı nedeniyle) bakteri biyofilmlerine zarar verme kabiliyetine de sahiptir [154], [155]. Böylece, biyojenik AgNP'lerin kitosan molekülleri ile yüzey modifikasyonu antimikrobiyal aktivitelerini ve biyouyumluluklarını muazzam ölçüde artırmaktadır.

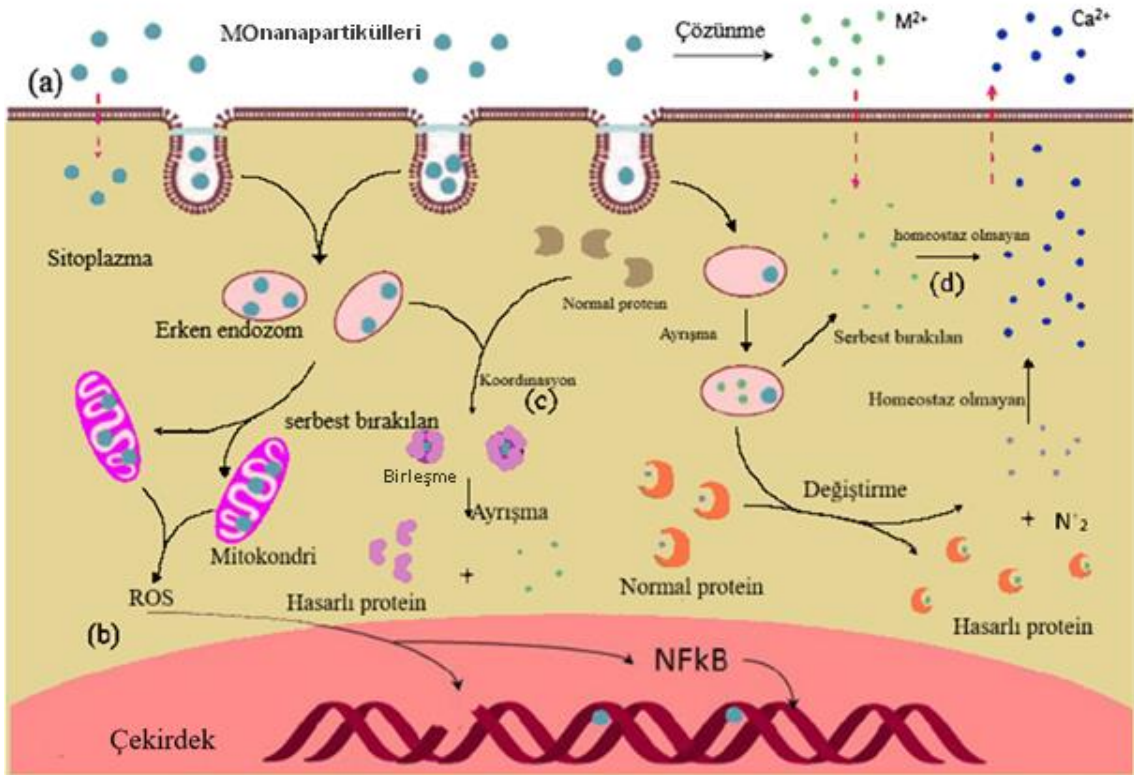
2.8.2 Bakır Oksit NP'lerin Antimikrobiyal Özellikleri ve Mekanizması

Bakır yüzyıllarca bir biyosit ajanı olarak kullanılmıştır. Hipokrat döneminde (milattan önce 400) antik Yunanlıların, akciğer hastalıklarına ve içme suyunun arındırılmasında bakır kullandığı bilinmektedir. Hindu dindarlarına kutsal bir armağan olarak verilen "Kutsal su" suyu temiz tuttuğuna inanıldığı için bakır kaplarda saklanmaktaydı [156].

Bakır ve bakır oksit nanoparçacıklarının bakteri üzerindeki etki şekli için birkaç rapor mevcuttur [157]. Cu(bakır) hayvan hücrelerine nispeten toksik olmayıp birçok mikro organizmaya karşı toksiktir ve bu, antimikrobiyal tedaviler için yeni umutlar sunmaktadır [158], [159]. Araştırmacılar, metalik bakır nanopartiküllerin (CuNP) etki mekanizmasının, AgNP ve CuONP'lerin etkisine benzeyebileceğini öngörmektedirler [160]. Bazı araştırmalarda, linoleik asit kaplı CuNP'lerin bakterilere nüfuz ettikten sonra enzimlerini inaktif hale getirerek bakteri hücre ölümüne neden olan hidrojen peroksit ürettiğini önermektedir [161]. Yapılan bir başka çalışmada, CuNP'lerin, protein denatürasyonuna yol açan -SH grupları ile etkileşimlerinden dolayı geniş bir bakteri türüne karşı etkili bir antibakteriyel madde olarak görev yaptığı varsayılmıştır [162]. CuNP'ler, *B. subtilis* gibi organizmaların hücre yüzeyinde bulunan aminler ve karboksil gruplarına olan yakınlıkları nedeniyle hücre zarı üzerinde etki yaptıkları bilinmektedir [163], [164]. Hücrelere girdikten sonra, NP'ler DNA molekülleri ile bağlanabilir ve nükleik asit iplikçikleri içinde ve arasında çapraz bağlanarak sarmal yapıyı bozabilir. Bakteri hücrelerindeki bakır iyonları ayrıca biyokimyasal süreçleri bozmaktadır [165]. CuONP'lerin *E. coli*'ye karşı etki şekli için önerilen olası mekanizmaya göre; hücre yüzeyine adsorbe edilen CuONP'ler hücre duvarı ile etkileşime girer ve daha sonra hücre membranına zarar verirler, bu da geçirgenliğini artırır ve CuONP çözeltisinde bakterilerin yaşayabilirliğini azaltır [157]. CuONP'lerin antimikrobiyal etkisine ilişkin kesin mekanizma bilinmemektedir ve açıklığa kavuşturulması gereken konular arasında yer almaktadır.

Araştırmacılar CuONP'lerin ökaryotik hücreler üzerinde yaptığı toksik etkilerini potansiyel olarak açıklayan, oksidatif stres, koordinasyon etkileri ve homeostasis etkiler üzerine üç farklı mekanizmayı önermişlerdir [166]. NP'lerin küçük boyutlarından dolayı

hücre zarındaki mevcut gözenekler yoluyla doğrudan hücreye dağılabileceği ya da plazma zarında bulunan iyon kanalları ve taşıyıcı proteinlerden girdikleri öne sürülmektedir. Bazı NP'ler ise, endositoz yoluyla hücrelere girebilirler. Hücreye giren NP'ler, mitokondri gibi oksidatif organellerle doğrudan etkileşime girebilir. Daha sonra, redoks aktif proteinler hücrelerdeki reaktif oksijen türlerini (ROS) üretir ve NP'ler tarafından üretilen iyonlar (Cu^{2+}), çeşitli kimyasal reaksiyonlarla ROS'u indükleyebilir. ROS, DNA iplikçiklerinin koparılmasına neden olabilir ve gen ifadesini etkileyebilir. Ayrıca, Cu^{2+} iyonları, biyomoleküller ile kenetleme maddeleri oluşturma veya fonksiyonel protein inaktivasyonuna neden olabilecek belirli metaloproteinlerde metal iyonlarını yerinden etme becerisine sahiptir. Buna ilaveten, CuONP'ler tarafından salınan Cu^{2+} 'nin lokal konsantrasyonu arttığında bunlar hücre toksisitesi ile sonuçlanacak şekilde hücre metal katyonu homeostazını bozmaktadırlar. Yukarıda açıklanan tüm toksisite mekanizmaları Şekil 2.12'de gösterilmektedir



Şekil 2.12 Bakır oksit NP'ler tarafından hücre toksisite oluşturan farklı yolların şematik görünümü [167]

2.8.3 Demir Oksit NP'lerin Antimikrobiyal Özellikleri ve Mekanizması

FeONP'lerin antibakteriyel etkisi konusunda şu ana kadar yapılmış çeşitli çalışmalar mevcuttur. Önceki çalışmalar, metal oksitlerin süperoksit anyon üretimi ile antimikrobiyal aktivite gösterdiğini işaret etmektedir. Manyetitte bulunan demir iyonları, Fenton reaksiyonu yoluyla hidrojen peroksidi reaktif radikal haline dönüştürürler [168]. Bu iyonlar tarafından üretilen radikaller, polisakkaritleri, DNA iplikçiklerinin koparılmasını, enzim inaktivasyonunu ve lipid peroksidasyonunu başlatabilirler. Aynı zamanda NP'ler elektrostatik etkileşimler yoluyla hücre zarına bağlanarak bakterilerin ölümüne yola açmakta olup negatif yüklü bakterilerin pozitif yüklü metal iyonlarına yapışmasını arttırmaktadırlar [169].

2.9 NP'lerin Antibiyofilm Özellikleri ve Mekanizması

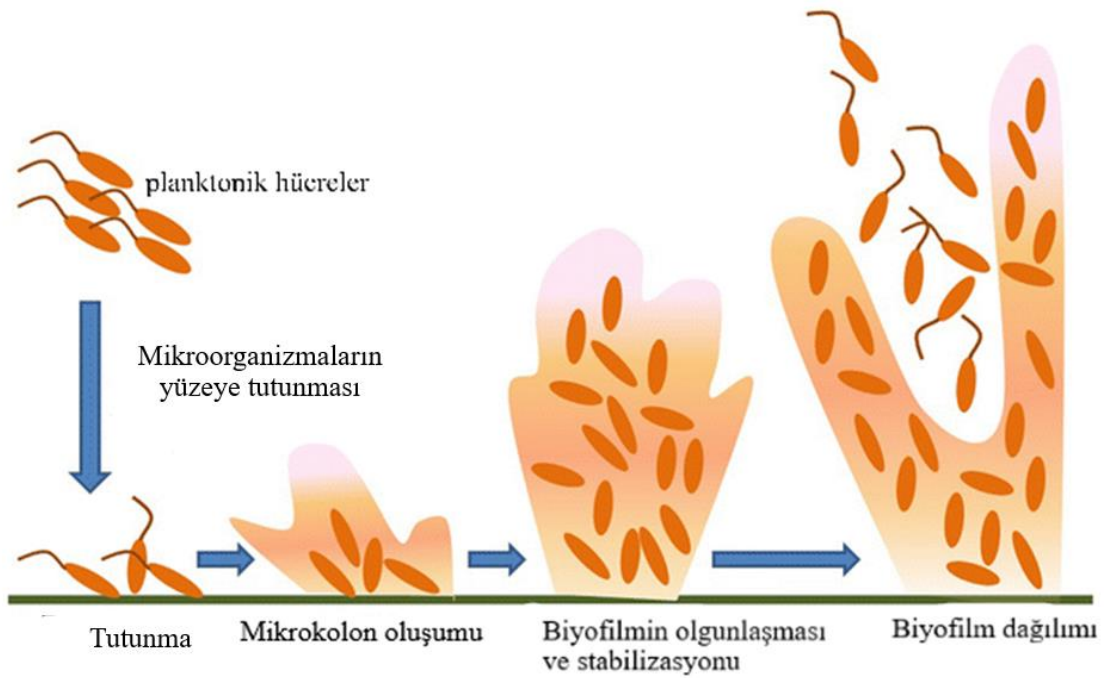
2.9.1 Biyofilm Yapısı ve Oluşum Basamakları

Biyofilmler, çeşitli yüzeylere tutturulmuş kendi kendine üretilen bir polimerik madde matrisi içinde yaşayan organize bir mikroorganizma grubu olarak tanımlanabilir [170]. Bu mikrobiyal kollektiflerin neredeyse her ortamda bulunduğu görülmektedir. Biyofilmler hem biyotik hem de abiyotik yüzeylerde bulunur [171]. Biyofilmler, hücre dışı polimerik maddelerin bir matrisine (EPS) gömülü homojen veya heterojen bakteri toplulukları içermektedirler. Bakteriyel hücreler hücre dışı polimerik maddelerle birbirine bağlanır ve gelişim sürecinin bir parçası olarak her bir hücre yüzeyi ve hücre-hücre etkileşimini içeren bir yüzeye (substrat) bağlanır [172]. EPS çoğunlukla polisakaritlerden oluşur, ancak protein, lipid ve nükleik asitler gibi diğer biyomoleküller de EPS'de bulunur [171]. Glikopeptidler, lipidler ve lipopolisakkaritler gibi polimerler bir iskelet oluşturur ve biyofilmi birlikte tutar [173].

Biyofilm, bir matriste yakın bir biçimde kümelenmiş bakterilerin kompleks birleşimini temsil eder. Biyofilm gelişiminde bir dizi fiziksel, kimyasal ve biyolojik süreç yer alır. Mikrobiyal biyofilm, ilk geri dönüşümlü bağlanma, geri dönüşümsüz bağlanma, olgunlaşma evresi I, olgunlaşma aşaması II ve dağılım gibi beş ardışık aşama boyunca gelişir [174]. Birinci aşamada, planktonik mikrobiyal hücreler yüzeye fiziksel kuvvetler

ve Pilli veya Flagella gibi bakteri yapıları ile yüzeye yapışırlar [175]. Yüzey işlevi, sıcaklık ve basınç gibi farklı faktörler, bakteri yapışmasını büyük ölçüde modüle edebilir. Mikrobiyal hücrenin bir yüzey üzerine tutturulması adezyon olarak bilinirken, mikrobiyal hücreler arasındaki bağlantı ise bağlanma olarak adlandırılır. Bakteriye yüzeylere yapışmaya bağlı fiziksel kuvvetler van der Waals kuvvetleri, sterik etkileşimler ve elektrostatik (çift katmanlı) etkileşimleri içerir [176]. İkinci aşamada, geri dönüşümlü hücrelerin bazıları hareketsiz kalır ve çekim kuvvetleri itici kuvvetlerden daha büyük olduğunda geri döndürülemez olarak yapışırlar. Yüzey ile bakteriler arasındaki hidrofobik etkileşim, aralarındaki itme kuvvetini azalttığı için hücre yüzeyi hidrofobikliği, bakterileri hidrofobik polar olmayan bir yüzeye yapışması durumunda biyofilm oluşumunda da önemli bir rol oynamaktadır [177]. Bu nedenle kısaca, biyofilm gelişmesinin birinci ve ikinci aşamasında, mikrobiyal hücreler, başlangıçta ilgili yüzeyle gevşek olarak ilişkilendirilir ve sonra bu yüzeysel ve yapışkan durum başarılı olur [178]. Biyofilm oluşumunun üçüncü evresi olgunlaşma'dır. Bu evrede, mikrobiyal hücreler biyofilm spesifik genlerin sentezlenmesiyle sonuçlanan otoindüktör sinyallerinin üretimi yoluyla birbirleriyle iletişim kurmaya başlarlar [179]. Bu aşamada, mikroorganizma, biyofilm ağını stabilize etmek için hücre dışı polisakarit maddeleri salgılar. Bir sonraki aşamada, mikrokoloninin boyutu artar ve kalınlığı yaklaşık 100 µm'ye ulaşır. Biyofilm mikrokolonileri genellikle çeşitli mikrobik topluluklardan oluşur. Bu çok özellikli mikro-konsorsiyum nispeten karmaşık ve koordineli bir şekilde çalışır. Onların yakınlığı, substrat değişimini, metabolik ürünlerin dağılımını ve toksik son ürünlerin uzaklaştırılmasını arttırır. Üçüncü ve dördüncü aşamalar, hücrelerin bir araya toplanmasını, yapışmış hücrelerin büyümesi ve olgunlaşması ile mikro-koloniler oluşturmaya içerir. Bu olgunlaşma evresinde, biyofilm, yapısını, fizyolojisini ve metabolizmasını manipüle ederek dış koşula adapte olur. Beşinci aşama, biyofilm ayrılmasını işaret eden ve sabit hücrelerinin hareketli hale dönüşmesini gösteren dağılımdır [178], [180]. Bu son aşamada, biyofilm yayılır ve yeni yüzeylere kolonize olur. Bu evrede, biyofilm içerisindeki mikrobiyal toplum, biyofilmi stabilize eden polisakaritleri parçalayan farklı sakarolitik enzimler üretir ve böylece yeni

bir yüzeye kolonizasyon için biyofilm yapısının üstünde bulunan yüzey bakterileri serbest kalır (Şekil 2.13).



Şekil 2.13 Biyofilm oluşum aşamaları [180]

2.9.2 NP'lerin Antibiyofilm Etkinlikleri

Biyofilmler fizyolojik olarak birçok açıdan planktonik muadillerinden çok farklıdır; bunlardan biri antimikrobiyal ajanlara karşı direncidir [102]. Biyofilmlerin, planktonik hücrelere göre antibiyotiklere 100-1000 kat daha dirençli olduğu bildirilmiştir [103]. Çevrede ciddi sorunlara neden olabilirler ve insanlarda ve hayvanlarda enfeksiyonlara neden olabilirler [104]. Sonuç olarak, hastanelerde ve tıbbi ortamlarda yaygın olarak kullanılan biyositler, biyofilmleri ortadan kaldırmak için etkisiz kalabilmektedir [105]. Biyofilm direnci hakkındaki muamma yıllardır araştırmacılar için ilgi konusu olmuştur [106], [107]. Kompleks matris yapısının varlığına bağlı olarak biyofilm içerisindeki difüzyonun sınırlanması, biyositlere karşı biyofilmlerdeki hücreler için bir koruyucu mekanizma olabilir [181], [182]. Biyofilm matrisindeki negatif yüklü polisakkaritler ayrıca aminoglikozitler gibi pozitif yüklü antibiyotiklere bağlanabilir [183]. Matrix ayrıca defensinler ve diğer antimikrobiyal peptidler gibi küçük moleküllerin hareketini geciktirir ve böylece sinerjik olarak onların bozunmalarını artırmak için β -laktamaz gibi

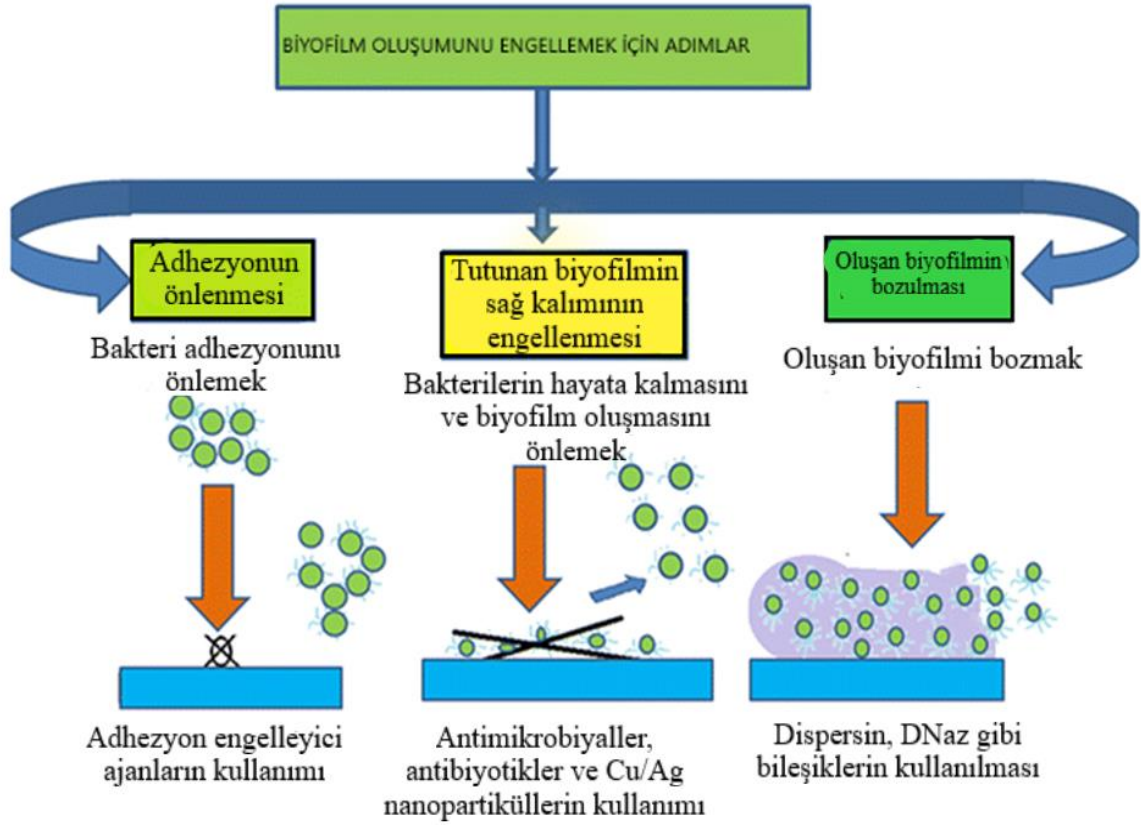
çeşitli antibiyotik degrede edici enzimlerle çalışır [184]. Biyofilmlerdeki hücrelerin yavaş büyüme oranları, antibiyotik direncine atfedilen başka bir mekanizma olabilir, çünkü penisilin gibi bazı antibiyotikler bölünen hücreleri hedef alır ve öncelikle hızlı büyüyen hücreleri öldürürler [185]. Geleneksel antibiyotikler, biyofilm oluşturan bakterilere karşı etkisiz kalmışlardır. Doğal olarak dirençli doğalarından dolayı biyofilmler, tıbbi ve mühendislik ortamlarında büyük zararlı etkilere sahip olabilirler. Örneğin, bağışıklık sistemi zayıf olan hastalardaki kronik enfeksiyonların yarısından fazlası biyofilm oluşumuyla ilgilidir [186]. Buna ek olarak, endüstriyel ortamlarda biyofilm oluşumu, membran sistemlerinde biyolojik kirliliğe ve suda ve / veya petrol boru hatlarında ve depolama tanklarında biyokorozyona neden olmakta ve bu da her yıl milyarlarca dolar ekonomik kayba neden olmaktadır [187].

Biyofilm oluşumunu engelleyen veya gelişen biyofilmlerin bozulmasına neden olan çeşitli mekanizmaların biyofilmleri kontrol ettiği bildirilmiştir. Bunların arasında, nanomalzemelerin bakterisidal etkinlikleri biyofilmlerle mücadele etmek için bir fırsat oluşturmaktadır. Çeşitli nanomalzemelerin antimikrobiyal aktiviteler sergilediği gösterilmiştir [188], [189]. Küçük boyut ve yüksek yüzey alanı/hacim oranı, nanomalzemelerin mikroorganizmalarla yakından etkileşime girmesine izin veren eşsiz özellikleridir [149].

Son zamanlarda, metal ve metal oksit NP'lerinin mikrobiyal büyümeyi ve biyofilm oluşumunu önlemek için kullanılmaları hakkında literatürde bazı çalışmalar mevcuttur [190]. Biosentezlenmiş AgNP'lerin *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus*'un birincil biyofilm oluşumuna karşı yüksek aktivite gösterdiği ortaya çıkarılmıştır [191]. Biyofilm oluşumunu önlemek için geniş bir antimikrobiyal aktivite spektrumuna sahip nanomalzemeler tıbbi cihazların yüzeylerine de kaplanmıştır. Gümüş nanoparçacıklar katetere kaplanarak altı farklı bakterinin biyofilm oluşumunda mükemmel bir inhibisyon göstermişlerdir [192]. Buna ek olarak, bakterisidal nanomalzemelerin biyomalzemelere antibiyofilm özellik kazandırması bir başka yaklaşımdır. Örneğin, AgNP'ler ve çinkooksit NP'leri gibi nanomalzemelerin reçine esaslı diş kompozitlerine dâhil edilmesi, oral biyofilmlerin kontrolünde kullanılmaktadır [193], [194]. Ayrıca, on altı farklı deniz biyofilm bakteri izolatu, antibiyofilm aktivitesi

için araştırılmış ve bunlara farklı konsantrasyonlarda biyosentezlenmiş AgNP'ler uygulanmıştır. Test edilen bakteriler arasında 50 mg/mL konsantrasyonundaki AgNP'lerin biyofilm önlediği kaydedilmiştir [99]. Nanomalzemeler, antibiyofilm ajanları taşıma ve hedefe iletme görevinde de kullanılabilir. Nitrik oksit (NO), biyofilm yayılımını indükleyen hücre-hücre iletişimini kesebilmektedir [195]. NO salınımlı silika nanoparçacıklarının etkinliği antibiyofilm ajanlar olarak test edilmiştir ve *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Candida albicans*'ın biyofilmlerindeki hücrelerin % 99'undan fazlasının etkili bir şekilde inhibe edildiği ortaya çıkarılmıştır [196]. NP'ler, biyofilm hücrelerinin öldürülmesinde önemli bir rol oynayan biyofilm matrisi boyunca NO penetrasyonunu kolaylaştırmaktadır. Ancak, özellikle yeşil sentezle elde edilen nanopartiküllerin antibiyofilm kapasiteleri çok fazla bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında yeşil sentezle elde edilen NP'lerin antibiyofilm etkinlikleri değerlendirilmiştir.

şekil 2.14 implant yüzeylerinde biyofilm oluşumunu önlemede üç farklı yaklaşımı göstermektedir. Bunlar sırası ile şu şekildedir; (i) yüzeye mikrobiyal tutunmayı engellemek için yapışkan olmayan kaplamaların yüzeyler üzerinde kullanılması, (ii) bağlanmış bakterilerin hayatta kalmasını engellemek için NP'lerin ve antibiyotiklerin kullanılması, (iii) nceden oluşturulmuş biyofilmi bozmak için dispersin ve DNaz gibi bileşiklerin kullanılması.



Şekil 2.14 İmplant yüzeylerinde biyofilm oluşumunu önlemede üç farklı yaklaşım.[180]

2.10 *Thymbra spicata* (Zahter) Bitkisi

Güney Avrupa ve Doğu Akdeniz'de, benzer kokulara bağlı olarak çeşitli *Origanum*, *Satureja*, *Thymbra*, *Thymus* ve *Corydorthymus* türleri kekik olarak bilinir "Zahter" ve "Karabas kekik" olarak da bilinen *Thymbra spicata* Lamiaceae familyasına aittir ve bu bitkinin 4 taksonu Türkiye'de bulunmaktadır. Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu ve Akdeniz bölgelerinde yaygın olarak bulunur ve ekonomik olarak önemli bir bitkidir çünkü yapraklar ve çiçekler yaygın olarak yiyecek, içecek üretiminde ve tıbbi amaçlar için kullanılmaktadır. Kekik yağları özellikle parfüm ve kozmetik üretiminde, diş macunları, ağız gargaraları, öksürük ilaçlarında, aroma ve gıda sanayilerinde kullanılır. Türkiye'den yılda yaklaşık 1000 ton civarında *Lamiaceae* familyasına ait bitki ihraç edilmektedir. Önceki çalışmalarda, çok düşük miktarlarda bulunan diğer bileşenlere ek olarak, % 70 oranında karvakrol, karpenpin ve p-cymene bileşenleri içeren *T. spicata* esansiyel yağlarının antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri bildirilmiştir [197], [198]. *T.*

spicata'nın tüm esansiyel yağları arasında baskın monoterpenik fenol olan karvakrol, antimikrobiyal, analjezik, anti-enflamatuar, antioksidan, insektisidal, antiparazitik ve antitümör aktiviteleri içeren bazı özelliklerle gösterilmiştir [199], [200], [201]. İçerik olarak bu kadar zengin olmasına rağmen şimdiye kadar literatürde bu bitki aracılığı ile sentezlenmiş NP'ler ve bunların antimikrobiyal, antibiyofilm, antioksidan ve sitotoksik etkinlikleri hakkında bir çalışma bulunmamaktadır.

2.11 *Cynara scolymus* (Enginar) Bitkisi

Genel olarak dünyada enginar olarak bilinen *Cynara scolymus*, Akdeniz bölgelerinin doğal otsu bir bitkisidir ve Akdeniz nüfusu tarafından yaygın olarak tüketilmektedir. Anti-fotosing ve antioksidan özellikleri de dâhil olmak üzere tıbbi özellikleri nedeniyle Akdeniz bölge ülkelerinde geleneksel tıp alanında kullanılmaktadır [202], [203]. Önceki çalışmalar, enginarın ana bileşenlerini oluşturan luteolin ve di-kafeolkuinik asitler, özellikle de sinarin (1,3-dikafeolkuinik asit asit) ve klorojenik asit (3-O-kafeolkuinik asit) gibi yüksek polifenol içeriğinden dolayı enginarın antioksidan aktivite gösterdiğini göstermiştir [204], [205]. Bu antioksidanlar reaktif oksijen türleriyle (ROS) mücadele edebilir ve sonuç olarak yaşlanma ve oksidatif stresle ilişkili hastalıkların önlenmesini sağlayabilir.

2.12 *Mentha piperita* (Nane) Bitkisi

Labiatae familyasına ait olan *Mentha piperita* (Nane), Amerika, Avrupa ve Asya'da ılıman iklimlerde yetişen, yıllık ya da çok yıllık, otsu, 30-100 cm uzunluğunda olabilen bir bitkidir. Nane, vanilya ve turuncgillerden sonra gelen dünyadaki en önemli ve en yaygın lezzetlerden biridir. *Mentha* türlerinin taze veya kurutulmuş yaprakları bir çeşni olarak kullanmakta ve ayrıca uçucu yağları da üretilmektedir [206]. Nane kullanımında çeşitli faydalı etkilerin olduğu belirlenmiştir. İn vitro, hayvan modellerine ve insan çalışmalarına dayanan sonuçlara göre nanenin; antioksidan, antitümör, antimikrobiyal, antialerjenik ve immünmodüle edici özellikleri ve sindirim sistemine faydaları olduğu belirlenmiştir [207]. Nane uçucu yağları çoğunlukla terpenlerden, özellikle monoterpenlerden oluşmaktadır. Bununla birlikte, değişken miktarda flavonoidler

organik çözücü kullanılarak ekstrakte edilebilmektedir. Daha karmaşık kimyasal bileşim nedeniyle, uçucu yağın antioksidan özelliği için çeşitli bileşikler arasındaki sinerjistik etkiler çok önemli olabilmektedir. Nane'den elde edilen uçucu yağ ve ekstraktlar, antik çağlardan beri, kusma, gaz, iştahsızlık, bronşit tedavisi için geleneksel tıp alanında kullanılmaktadır [208], [209].

BÖLÜM 3

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Materyal

3.1.1 Ekipman

Çizelge 3.1 Çalışmalarda kullanılan ekipman ve sarf malzemeler

Ekipman/Sarf Malzeme	Marka
Soğutmalı santrifüj	Nüve
Otoklav	Nüve
Ultrasonik su banyosu	Isolab
Su banyosu	Memmert
Vortex	Isolab
pH metre	Mettler Toledo
Dondurucular	+4 °C cam kapaklı buzdolabı -20 °C buzdolabı LIEBHERR
Class II steril kabin (laminar flow)	Esco
Manyetik Karıştırıcı	VWR
Isıticılı karıştırıcı	VWR

Çizelge 3.2 Çalışmalarda kullanılan ekipman ve sarf malzemeler (devamı)

CO ₂ İnkübatör	Memmert
İnkübatör	Memmert
Inverted Mikroskop	Nikon
TEM	1400 JEOL
SEM	SU-1510 Hitachi High-Technologies Corp.
AFM	XE-100 Park systems
ATR-FTIR	Nicolet 380 Thermo Scientific
XRD	ADP PRO 2000 GNR Analytical Instruments Group
Liyofilizatör	Teknosem TRS
Mikroplate okuyucu	BioTek Instruments
Multiplate okuyucu	Lab-Line Instruments
Saf Su Cihazı	Merck Milipore direct-Q 3,5,8
Parçacık boyut ölçüm cihazı	Nanoplus-3 particle/zeta analyzer Mikromeritics
Zeta Potansiyel Ölçüm Cihazı	Malvern ZEN 3600 Nano ZS
UV-Vis Spektrofotometre	Cary 60 Agilent Technologies
Steril pipetler (5,10 ve 25 ml'lik)	Lp Italiana Spa
Serolojik pipet tabancası	Thermo
Steril 15 ve 50 ml'lik tüpler	Falcon
10, 100, 1000 µl'lik mikropipetler	Brand
1-10, 10-100, 100-1000 µl 'lik tek kullanımlık pipet uçları	Brand
Santrifüj tüpleri 1, 2, 15, 50 ml	Eppendorf, ISOLAB

Çizelge 3.3 Çalışmalarda kullanılan ekipman ve sarf malzemeler (devamı)

ELISA 24, 48 ve 96 kuyulu plakalar	VWR
50-1000ml'lik otoklavlanabilir cam şişeler	ISOLAB
250-1000ml'lik erlenler	ISOLAB
0,22 µm ve 0, 45 µm'lik sırınga filtreleri	Merck Milipore
Bitki Öğütücü	Bosch
Kâğıt Filtre	Whatman No.1

3.1.2 Kimyasallar

Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler

Kimyasal Malzeme	Marka
Gümüş Nitrat, AgNO ₃	Sigma-Aldrich
Bakır sülfat pentahidrat, CuSO ₄ .5H ₂ O	Sigma-Aldrich
Demir sülfat heptahidrat, FeSO ₄ .7H ₂ O	Sigma-Aldrich
Potassium phosphate monobasic, KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich
Sodium phosphate dibasic dihydrate, Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	Sigma-Aldrich
1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH)	Sigma-Aldrich
Gentamisin	Oxoid
Kristal viyole	Merck
Askorbik asit	Merck
DMSO	Sigma-Aldrich
Etil alkol	Merck
Metanol	Merck

Çizelge 3.5 Çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler (devamı)

Sülfürik asit, H ₂ SO ₄	Merck
Baryum klorid, BaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma-Aldrich
Sodium Chloride, NaCl	Sigma-Aldrich
Potassium chloride, KCl	Sigma-Aldrich
Sodium acetate, C ₂ H ₃ NaO ₂	Sigma-Aldrich
Sükroz	Sigma-Aldrich
Kongo red	Sigma-Aldrich
L-Glutamin	Biological Industries
Tripan Mavisi	Biological Industries
FBS	Biochrom AG
Penisilin-Streptomisin (PEST)	Biochrom-AG (penisilin/streptomisin: 10000 unite /10000 µg/mL)
Agar	Sigma-Aldrich
Brain Heart Infusion Broth	Merck
Nutrient Agar	Merck
Nutrient Broth	Merck
Müller Hinton Agar	Merck
Müller Hinton Broth	Merck
F12 1.1 karışımı olan DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient MixtureF-12)	Sigma-Aldrich

3.1.3 Deneylerde Kullanılan Tampon, Kùltür Ortamları ve Kimyasalların Hazırlanışı

3.1.3.1 Çözeltiiler

- **PBS tamponu**

8 g NaCl, 0,2 g KH_2PO_4 , 1,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 2 g KCl tartılıp deiyonize su eklenerek pH'ı 7,4'e ayarlandı, ardından 1 lt'ye tamamlanarak süzüldü ve otoklavlandı.

- **%0.1'lik kristal viyole solüsyonu (1 mg/mL)**

100 mg kristal viyole 100 ml deiyonize suda iyice çözüldü. +4 °C'de güneş ışınlarından korumak için koyu renkli şişe içerisinde saklandı. Antibiyofilm aktivite testi için kullanıldı.

- **%1'lik sülfürik asit hazırlanması**

90 mL deiyonize su üzerine 1 mL H_2SO_4 eklendi ve karıştırıldı. Son hacim 100 mL'ye deiyonize su ile tamamlandı.

- **%1.175'lik baryum kloridin hazırlanması**

1.175 mg $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartıldı ve 50 mL deiyonize su ile karıştırılarak $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'in erimesi sağlandı ve son hacim deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı.

- **Tripan mavisi solüsyonunun hazırlanması**

100'lik ambalajlarda % 0,5 konsantrasyon şeklinde Tripan mavisi solüsyonu 10 µL alındı ve 90 µL deiyonize ile seyreltilerek sayım solüsyonu hazırlandı. 98 µL sayım solüsyonu ve 2 µL hücre süspansiyonu karıştırılarak 100 µL karışım elde edildi.

3.1.3.2 Besiyerleri

- **Nutrient Agar Besiyeri**

20 g Nutrient agar tartılarak son hacim 1000 mL olacak şekilde deiyonize su ile tamamlandı. Ortamı tamamen çözmek için ısıtma işlemi uygulandı. 15 dakika boyunca 121 °C'de otoklav işlemi ile sterilizasyon gerçekleştirildi. 45-50 °C'ye soğutulduktan sonra iyice karıştırıldı ve petri kaplarına dağıtıldı.

- **Nutrient Broth Besiyeri**

8 g Nutrient broth tartılarak son hacim 1000 mL olacak şekilde deiyonize su ile tamamlandı. Uygun şişelere eşit hacimde dağıtıldı. 15 dakika boyunca 121 °C otoklav işlemi ile sterilizasyon gerçekleştirildi.

- **Müller Hinton Agar Besiyeri**

34 g Müller Hinton agar tartılarak son hacim 1000 mL olacak şekilde deiyonize su ile tamamlandı. Ortamı tamamen çözmek için ısıtma işlemi uygulandı. 15 dakika boyunca 121 °C otoklav işlemi ile sterilizasyon gerçekleştirildi. 45-50 °C'ye soğutulduktan sonra iyice karıştırıldı ve petri kaplarına dağıtıldı.

- **Müller Hinton Broth Besiyeri**

21 g Müller Hinton broth tartılarak son hacim 1000 mL olacak şekilde deiyonize su ile tamamlandı. Uygun şişelere eşit hacimde dağıtıldı. 15 dakika boyunca 121 °C otoklav işlemi ile sterilizasyon gerçekleştirildi.

- **Kongo red Agar**

50 g sükroz, 37 g brain heart infusion broth, 10 g agar ve 0.8 g Kongo red tartıldı ve son hacmi deiyonize su ile 1000 mL' ye tamamlanacak şekilde ayarlanarak hazırlandı.

- **DMEM/F12 ortamı (% 10 Fetal Sığır Serum, Penicillium-Streptomisin ilaveli)**

5 ml % 1 200 mM L-Glutamine, 2.5 ml % 0,5 Penisilin-Streptomisin, 500 ml DMEM F12 karıştırıldı. Elde edilen solüsyondan daha sonra; DMEM F12 45 ml FBS 5 ml olacak şekilde medyum hazırlanır.

3.2 Metot

3.2.1 Bitki Örneklerinin Toplanması

Yapılan çalışmada NP'lerin sentezinde *Thymbra spicata* L. var. *spicata* (Zahter), *Cynara scloymus* (Enginar) ve *Mentha piperita* (Nane) bitkisinin yaprakları kullanıldı. Çalışmada bitki materyali olarak kullanılan zahter bitkisi çiçeklenme döneminde toplandı ve bitkinin teşhisi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Bölümünden destek alınarak tayin

anahtarlarına göre gerçekleştirildi. Enginar ve Nane bitkileri Konya ilinde sebze pazarında taze örneklerden seçildi. Alınan bitkilerin yaprakları önce çeşme suyu daha sonra deiyonize su ile yıkandıktan sonra bir hafta boyunca kurumaya bırakıldı. Kurutulmuş bitki yaprakları öğütücü yardımı ile toz haline getirildi.

3.2.2 Bitki Ekstraktının Hazırlanması

Güneş ışığı altında kurutulmuş ve işlemiden önce deiyonize su ile iyice üç kez yıkanarak tozdan arındırılmış (10 g) bitki yaprağı, 100 mL'lik deiyonize su ile ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Su içindeki askıda bulunan bitki materyali 60 °C'de 30 dakika ısıtıldı ve daha sonra oda sıcaklığında (24 °C) 60 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Nihayet, elde edilen su ekstraktı süzüldü (Whatman filtre kâğıdı No. 1) ve berrak sıvı kısım daha ileri aşamalarda kullanım için 4 °C'de saklandı. Deneyler de tüm cam kapları deiyonize suyla iyice yıkandı ve fırında kurutuldu.

3.2.3 AgNP Sentezi

AgNP'lerin hazırlanmasında Ts1AgNP elde etmek için 1 mL *T. spicata* yaprak ekstraktının son hacminin 1 mM AgNO₃ ile 100 mL'ye tamamlanarak çözeltinin karıştırılmasıyla başlandı. AgNP'lerin büyüklüğünü ve morfolojisini değiştirmek amacı ile ekstrakt miktarı Ts2AgNP'leri elde etmek için 5 ml'ye yükseltildi. Ayrıca, AgNP'ler sırasıyla kolloid CsAgNP'leri ve MpAgNP'leri elde etmek için 5 ml *C. scolyms* ve *M. piperita* yaprak ekstraktı cam şişeye aktararak son hacim 100 mL 1 mM AgNO₃ solüsyonu ile tamamlanarak sentez başlatıldı. Reaksiyon çözeltisi Ts1AgNP, Ts2AgNP ve MpAgNP için 24 ° C'de (oda sıcaklığında) (350 rpm) ve CsAgNP için 60 °C'de (350 rpm) karıştırıldı ve açık kahve ile koyu kahverengi renk değişimi, gümüş iyonlarının AgNP'lere dönüşümünün bir göstergesi olarak kabul edildi. İşlem sonunda, hazırlanan NP'lerin (AgNP) kolloidal süspansiyonu, 15 dakika süreyle santrifüj işlemine (10.000 rpm, 4 ° C) tabi tutuldu ve nihai ürün, bağlanmayan kalıntıların hepsini çıkarmak için üç defa deiyonize su ile yıkandı. Son olarak, saflaştırılmış AgNP'ler vakum altında liyofilizatör vasıtası ile dondurularak kurutuldu ve daha ileri düzeyde kullanım için koyu renk şişelerde 4 °C'de saklandı.

3.2.4 CuONP Sentezi

CuONP'lerin hazırlanması için hazırlanan *T. spicata* (zahter) bitki ekstraktının 40 ve 80 mL'si sırası ile Ts1CuONP ve Ts2CuONP'leri elde etmek için damla damla son hacim 1 mM sulu $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ solüsyonu ile 500 mL'ye tamamlanacak şekilde cam şişe içerisine aktarıldı. Karışım 4 saat boyunca 80 °C'de karıştırılarak bekletildi. Reaksiyon karışımlarının rengi, ısıtma işlemi sırasında kademeli olarak koyu kahverengiye dönüşmüştür ve bu dönüşüm CuONP'lerin oluşumu için bir gösterge olarak kabul edildi. Reaksiyon sonunda elde edilen karışım 10.000 rpm 4 °C'de 15 dakika iki kez deiyonize su ile yıkandı ve 100 °C'de 24 saat kurutulma işlemine tabi tutuldu. Kurutma işlemi sonunda elde edilen nihai kurutulmuş toz daha ileri analizlerde kullanılmak üzere uygun bir biçimde etiketli koyu renkli şişelerde 4 °C'de saklandı.

3.2.5 FeONP Sentezi

T. spicata ekstraktından 20 ve 40 mL alındı ve şişelere eklenerek son hacim 0,1 M $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ solüsyonu ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı. Ts1FeONP ve Ts2FeONP'leri elde etmek için kullanılan 20 ve 40 mL ekstrakt miktarı ile karıştırılan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ solüsyonu karışımı oda sıcaklığında nanopartikül oluşumu ve renk değişimi ile gözlemlendi. Daha sonra hazırlanan NP'lerin kolloidal süspansiyon, 10,000 rpm 4 °C'de 15 dakika santrifüj işlemine tabi tutuldu. İlk santrifüjden sonra %50'lik etil alkol kullanılarak santrifüj yapıp 1 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı ardından koyu renk şişelerde 4 °C'de saklandı.

3.2.6 Sentezlenen NP'lerin Karakterizasyonu

3.2.6.1 UV-Vis Analizi

Sentezlenen NP'ler bir kuvars küveti içine alınmış ve absorbans 1 nm'lik bir çözünürlüğe ayarlanmış bir Cary 60 UV-Vis spektrofotometre kullanılarak 200 ila 800 nm dalga boyu aralığında ölçülmüştür.

3.2.6.2 XRD Analizi

Elde edilen NP tozu, Cu Ka radyasyonu ($k = 1.54 \text{ \AA}$) ile bir ADP PRO 2000 X-ışını kırınım sistemi kullanılarak analiz edildi. XRD paterni 10° ile 80° arasında 2θ aralığında $0,02$ adım büyüklüğü ile çalışılmıştır. Kristalin alan boyutu Debye-Scherrer formülü kullanılarak hesaplandı.

3.2.6.3 AFM Analizi

Hazırlanan NP çözeltileri saf su ile 100 kat seyreltildi ve seyreltilmiş çözeltilerden birer damla $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ boyutlarında temiz bir cam yüzeye yayıldı ve etüvde 40°C 'de kurutuldu. Bu şekilde hazırlanan örneklerin atomik kuvvet mikroskobu ile fotoğrafları çekildi. Nanoparçacıkların morfolojisi XE-100 atomik kuvvet mikroskopisi ile analiz edildi.

3.2.6.4 NP'lerin Zeta Potansiyelinin Ölçülmesi

Zeta potansiyel ölçümleri, 25°C 'de Malvern Zetasizer Nano-ZS üzerinde, 633 nm 'lik bir dalga boyu ve 173° geri yansıma açısı ile gerçekleştirildi. Tek kullanımlık zeta potansiyeli hücreleri (1 cm uzunluğundaki yol), etanol ile durulandı, ardından numune yüklemenden önce deiyonize su ile yıkandı. Zeta Potansiyel analizi, solüsyondaki (kolloidler) NP'lerin yüzey yükünü belirlemek için kullanılan bir tekniktir. NP'lerin stabilitesini öngören yüzey durumunu anlamak için de önemli bir araçtır.

3.2.6.5 NP'lerin Boyut Ölçümleri

Sentezlenen NP'lerin boyut dağılımı, dinamik ışık saçılması (DLS) kullanılarak belirlendi. Ayrıca, NP'lerin polidispersitesi ve boyut dağılımı ölçümleri, deiyonize su ile seyreltilen NP'lerin sonikasyon işlemine tabi tutulmasından sonra Nanoplus-3 parçacık analiz cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. DLS deneylerinden elde edilen polidispersite indeksleri (PDI) partikül agregasyonlarının bir kriteri olarak temel alınmıştır. Polidispersite İndeksi, DLS-ölçülen yoğunluk otokorelasyon fonksiyonunun bir kümüle analizinden hesaplanan bir parametredir. Kümüle analizinde, tek bir parçacık boyutu modu varsayılır ve varsayılan Gauss dağılımının genişliğini tanımlayan otokorelasyon

fonksiyonuna tek bir üstel uyum uygulanmaktadır. Polidispersite İndeksi, boyutsuzdur ve 0.05'ten küçük değerlerin, oldukça monodisperse standartlar dışında nadiren görüleceği ve 0,7'den büyük değerler, numunenin okunamayan ve dolayısıyla DLS tekniği için uygun olmayan çok geniş bir boyut dağılımına sahip olduğunu göstermektedir.

3.2.6.6 FTIR Analizi

Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), sentezlenmiş NP'ler için olası bir stabilizatör olarak işlev gören biyo-organik bileşenlerin varlığını gösterir. NP'lerin sentezinden sonra, onunla ilişkili biyomoleküller FTIR ölçümleriyle tanımlanmıştır. NP'lerin kuru tozları yukarıda belirtilen şekilde elde edildi. Kurutulmuş tozun dikkatli bir şekilde tartılmış bir miktarı FTIR analizine tabi tutulmuştur. Numuneler, iyi sinyal/gürültü oranı elde etmek için 400-4000 cm^{-1} aralığında taranan spektruma sahip bir kızılötesi kaynağına maruz bırakıldı. NP'ler üzerinde bulunan farklı fonksiyonel grupları belirlemek için çeşitli titreşim modları tanımlanmış ve tayin edildi.

3.2.6.7 SEM ve EDS Analizi

Sentezlenen NP'lerin kimyasal bileşim analizi ve morfolojisi bir taramalı elektron mikroskopuyla ilişkili bir EDS analizörü kullanılarak gerçekleştirildi. Sentezlenmiş ve stabilize edilmiş NP'lerin çok az miktarda numunesi bir karbon kaplı bakır ızgarada hazırlandı ve daha sonra püskürtmeli kaplayıcı kullanılarak altın tabakayla kaplanarak SEM görüntüsü alındı.

3.2.6.8 TEM Analizi

NP'lerin morfolojisi ve boyut dağılımı TEM kullanılarak değerlendirildi. TEM analizi için NP solüsyonları bakır ızgaralarına damla kaplama yapıldı. Fazla çözelti bir parça yumuşak filtre kâğıdı kullanılarak çıkarıldı. Bakır ızgara daha sonra oda sıcaklığında kurumaya bırakılarak TEM görüntüsü alındı. Boyut dağılımları ImageJ yazılım paketi kullanılarak görüntü analizi ile belirlendi [210].

3.2.7 Sentezlenen NP'lerin Antibakteriyel Aktiviteleri

3.2.7.1 Mikroorganizmalar ve Kùltür Ortamları

Sentezlenen NP'lerin antibakteriyel aktivitesi, Kirby-Bauer disk difüzyon deneyi ile değeriendirildi. Microbiologics Inc'den (Saint Cloud, ABD) *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) ve *Salmonella typhimurium*'un (ATCC 14028) liyofilize kùltürleri tedarik edildi.

3.2.7.2 McFarland Standartlarının Hazırlanması

McFarland Standartları %1'lik H_2SO_4 ve %1.175'lik $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ kapaklı tüplere Çizelge 3.6'da yer alan hacimlerde karıştırılarak hazırlanmıştır.

Çizelge 3.6 McFarland standartlarının hazırlanması için kullanılacak karışımların oranları

	Hacim (mL)	
Standart no	$BaCl_2 \cdot 2H_2O$ (%1.175)	H_2SO_4 (%1)
0.5	0,5	99,5
1	0,1	9,9
2	0,2	9,8
3	0,3	9,7
4	0,4	9,6
5	0,5	9,5
6	0,6	9,4
7	0,7	9,3
8	0,8	9,2
9	0,9	9,1
10	1	9

3.2.7.3 Disk Difüzyon Yöntemi

Bakteri süspansiyonları, yaklaşık 1.5×10^8 koloni oluşum birimini (CFU / mL) temsil eden 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlandı. İnokulum Mueller Hinton agar plakalarına yayıldı ve oda sıcaklığında havayla kurutuldu. Jel delme aleti yardımı ile Muller-Hinton Agar plakasında yaklaşık 7 mm çapında kuyu oluşturuldu. AgNP'lerin 50 µL'lik alikotları kuyulara ilave edildi ve daha sonra disklerin etrafındaki açık alanla gösterilen inhibisyon bölgelerinin çapları (mm), 35 °C'de 24 saat inkübasyon süresinin sonunda ölçülmüştür. NP'lerin antibakteriyel aktivitesi, gentamisin (10 ug diskler) standart antibiyotik disklerine kıyasla belirlendi ve deneyler üç defa tekrarlandı.

3.2.7.4 Mikrodilüsyon Yöntemi

Sentezlenen NP'lerin antibakteriyel aktiviteleri, bakteri gelişiminin inhibisyonuna yol açan minimum inhibitör konsantrasyonun (MİK) belirlenmesi için mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak değerlendirildi. NP'lerin stok çözeltisi, steril 96 kuyucuklu mikroplakalara 100 µl Mueller Hinton Broth ile 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 and 0.78 µg/mL konsantrasyon aralığına seyreltildi ve test edilen bakteriler (10^5 - 10^6 CFU/mL) ile inoküle edildi. Sırasıyla pozitif ve negatif kontroller olarak Gentamisin ve DMSO kullanıldı. Ardından mikroplakalar kapatıldı ve 35 ° C'de inkübasyona bırakıldı. 24 saat inkübasyondan sonra bakteriyel büyüme, her bir bileşiğin büyüme inhibisyonu için MİK değerini belirlemek için bir mikrolaka okuyucu kullanarak 600 nm'de ölçülmüştür. Bu deneyler iki tekrar halinde gerçekleştirildi. Minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK), çalışılan (MİK) seri dilüsyonlarının 24 saat sonra ilgili agar plakalarına 0.01 mL kullanılarak alt kültürlenmesiyle saptanmış ve 37 ° C'de 24 saat inkübe edilmiş, kolonilerin sayısı belirlenerek besiyerinde bakteri kolonisinin büyümesini engelleyen NP'lerin en düşük konsantrasyonu olarak değerlendirildi [211].

3.2.7.5 Hücre Bileşenlerinin Salınımı Tayini

AgNP, CuONP ve FeONP neden olduğu zar hasarı, ortam içerisine hücre bileşenlerinin salınımının ölçülmesiyle de doğrulanabilmektedir [20]. Farklı konsantrasyonlarda (MİK ve 2 X MİK) NP'ler ile muamele edilmiş mikroorganizmalar 37 °C'de 4 saat inkübe

edildi. İnkübasyon süresinden sonra hücreler santrifüj (8000 rpm, 10 dakika) işlemine tabi tutuldu ve toplanan süpernatantın, 260 nm ve 280 nm'de absorbanısı ölçülerek hücre bileşenlerinin salınımı analiz edildi.

3.2.7.6 NP'lerin *S.aureus* Büyüme Kinetiği Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

NP'lerin bakteriyel büyüme kinetikleri üzerindeki etkisi, *S. aureus* için bir spektrofotometre kullanılarak absorbansta artış olarak 540 nm'de ölçüldü. Nanopartiküller son konsantrasyonları 6.25 ve 3.13 µg/mL olacak şekilde seyreltme işlemine tabi tutuldu. Yoğunluğu 0.1 absorban değerine ayarlanan *S. aureus* Nutrient Broth besiyerine inokule edilerek toplam 200 µl'lik bir son hacimde 96'lık mikrotiplakalarda 37 °C'de 14 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresince 2, 6, 10 ve 14. saatlerde absorban ölçümleri gerçekleştirildi. Deney, pozitif kontrol (inokulum olmaksızın NP ve besiyeri) ve bir negatif kontrol (NP olmaksızın inokulum ve besiyeri) içerdi.

3.2.8 NP'lerin Antibiyofilm Etkinlikleri

3.2.8.1 Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi

S. aureus türünün biyofilm oluşturmalarının doğrulanması Kongo red agarda yapıldı. 37 °C de 24 saat inkübasyon süresinin sonunda siyah renkli koloniler biyofilm pozitif, pembe-kırmızı renkli koloniler biyofilm negatif olarak kabul edildi [212]. Biyofilm pozitif kontrol suşu olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 35556 ve biyofilm negatif kontrol olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşu kullanıldı.

3.2.8.2 Antibiyofilm Aktivite Tayini

Toplam 10 mL'lik Müller Hinton Broth besiyerine öze dolusu bakteri kültürlerinin ekimi gerçekleştirilerek 24 saat 37 °C de inkübasyona bırakıldı. Kültürler daha sonra 1:100 oranında taze besiyeri ile dilüe edildi. 0.2 mL dilüe edilmiş kültür 96 kuyucuklu mikrotiplaklara ilave edildi. Son hacimde 180 µl besiyeri, 10 µl inkübe edilmiş bakteri kültürü ve 10 µl NP çözeltisinden ilave edildi. NP'lerin konsantrasyonu 6.25 ve 100

$\mu\text{g/mL}$ arasında olacak şekilde ayarlandı. Yalnızca steril sıvı besiyeri blank olarak işlem gördü. İnkübasyon işleminden sonra, kuyucuklar 4 kere 0.2 mL fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı (pH 7.2). Kuyucuklarda kalan biyofilmler %2 sodyum astetat ile karıştırılıp ve %0.1 kristal viyole ile boyandı. Fazla kalan boya deiyonize suyla yıkandı ve kuyucuklar kurutulmaya bırakıldı. Kuruma işleminden sonra 200 μL % 95 (v/v) etanol ilave edilip optik yoğunluk 620 nm de çoklu plaka okuyucuda ölçüldü ve ortalama OD değerleri biyofilm inhibisyon etkinliği hesaplanmasında aşağıdaki formül temel alınarak değerlendirildi.

% biyofilm inhibisyonu =

$$[1 - (\text{OD}_{620} \text{ NP'lerle işlem görmüş hücreler} / \text{OD}_{620} \text{ negatif kontrol}) \times 100] \quad (3.1.)$$

3.2.9 NP'lerin Sitotoksik Aktivitelerinin Belirlenmesi

Biyosentezlenmiş farklı AgNP'lerin L929 fare fibroblast hücre canlılığı üzerindeki etkileri, XTT hücre canlılığı testi kullanılarak incelendi. L929 hücreleri DMEM-F12 ortamında (% 10 Fetal Sığır Serum, Penicillium-Streptomisin ile takviye edilmiştir) kültürlenmiştir. Hücreler 37 ° C'de % 5 CO₂ ile inkübe edildi. Tamamen konfluent hücreler, kültür kabından ayrılmak üzere tripsinize edildi. Tripan mavisi boyalı hücreler Thoma slaytları ile sayıldı ve canlı hücre sayısı 1 mL ortamda 10⁶ canlı hücreye ayarlandı. Hücre süspansiyonundan 100 μL , 96 kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna ekildi.

Artan konsantrasyonda (0, 6, 18, 42, 60, 180, 300 $\mu\text{g/mL}$) NP'ler kuyulara ayrı ayrı eklendi (n = 5) ve 24 saat inkübe edildi. Daha sonra NP içeren ortam aspire edildi ve 100 μL 0.5 mg/mL 2,3-Bis- (2-Metoksi-4-Nitro-5-Sülfofenil)-2H-Tetrazolyum-5-Karboksanilid (XTT) çözeltisi (7.5 $\mu\text{g/mL}$ Fenazin metosülfat ile) taze besiyerine ilave edildi. Plakalar, 37 ° C'de 4 saat daha inkübe edildi ve optik yoğunluk, çoklu plaka okuyucu ile 450 nm'de ölçülerek değerlendirildi.

3.2.10 DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesinin Belirlenmesi

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikal giderim aktivitesi değerlendirmesi, antioksidan aktivite çalışmalarında standart bir testtir. Spesifik bileşiklerin radikal giderim aktivitesinin taranması için hızlı bir yöntem olarak görülmektedir. DPPH radikal giderim aktivitesi 96'lık mikrolakalar kullanılarak yapıldı. Kuyularda 12.5-100 µg/mL arasında değişen çeşitli konsantrasyonlarda NP'ler ilave edildi. Metanolde 0.135 mM DPPH radikali çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltinin 100 µl'si bütün kuyucuklara ilave edildi. Reaksiyon karışımı daha sonra iyice karıştırıldı ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karanlıkta bırakıldı. Emilim daha sonra 517 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Absorbsiyonda gerçek azalma, kontrol ile karışılaştırılarak ölçülmüştür. NP'lerin radikal giderim kabiliyeti aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{DPPH giderim etkinliği } \% 100 = ((\text{Abs kontrol} - \text{Abs numune}) / \text{Abs kontrol}) \times 100 \quad (3.2)$$

Abskontrol, DPPH + metanol absorbansını; Absnumune ise DPPH + rnek (NP'ler/ standartları) absorbansını temsil etmektedir.

3.2.11 İstatiksel Analizler

Deney sonuçları,  tekrarın ortalama $\pm$ standart sapması (SD) olarak ifade edildi. Veriler tek yönlü varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. 0.05'ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm analizler için Minitab 17 istatistik paketi kullanıldı.

DENEYSEL SONUÇLAR

4.1 Gümüş NP'ler

4.1.1 AgNP Sentezi

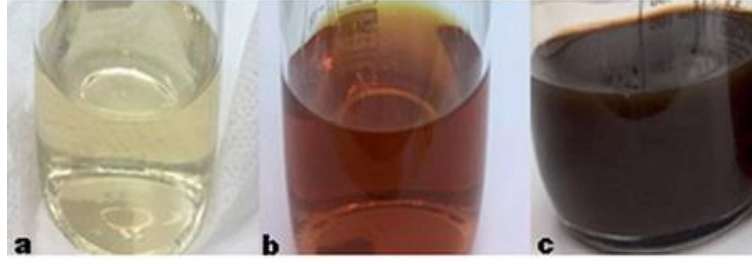
Sentez işleminde yapılan optmizasyon çalışmasında (Çizelge 4.1) *T. spicata* ekstraktı bir kez *T. spicata*^a ve iki kez *T. spicata*^b filtreden geçirilerek farklı iki filtratla da çalışılmıştır. İki defa filtreden geçirilen bitki ekstraktlarında NP'lerin santrifüj işleminde daha kolay bir biçimde elde edildikleri tespit edildi. Bundan dolayı iki defa filtre işleminin daha uygun olacağı düşünüldü. Aynı zamanda optimizasyon çalışmasında AgNP sentezine sıcaklık ve farklı miktarda *T. spicata* konsantrasyon etkisi incelendi.

Şekilde 4.1'de görüldüğü gibi *T. spicata* yaprak ekstraktlarının aracılık ettiği AgNP sentezinin oda sıcaklığında 12 saat içinde kolay bir biçimde gerçekleştiği tespit edildi; bu da toksik kimyasallar veya enerji girdileri gerektirmeyen bir sentez işleminin gerçekleştiğini göstermektedir. Ayrıca, *M. piperita* yaprak ekstraktı kullanılarak AgNP sentezinin de oda sıcaklığında gerçekleştiği ve renk değişiminin 60. dakikada başladığı belirlendi. Bununla birlikte, ekstrakt ve AgNO₃ karışımının 60 °C'de ısıtma işlemine tabi tutulması ile *C. scolymus* yaprak ekstraktında etkili renk değişiminin 2 saat sonra başladığı gözlemlendi. Mikrodalga ile yapılan sentezde ise 2. dakikada renk değişiminin başladığı görüldü (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 NP sentezinde kullanılan bitkiler ve sentez koşulları

Örnek no	Örnek ismi	Son hacim	AgNO ₃ konsantrasyonu	Ekstrakt miktarı	Sentez sıcaklık şartları	NP sentezinde renk değişiminin başlama süresi
1	<i>T. spicata</i> ^a	100 mL	1 mM	1 mL	mikrodalga	2.dakikada renk değişimi başladı
2	<i>T. spicata</i> ^a	100 mL	1 mM	1 mL	oda sıcaklığı	25.dakikada renk değişimi başladı
3	<i>T. spicata</i> ^b	100 mL	1 mM	1 mL	oda sıcaklığı	25.dakikada renk değişimi başladı
4	<i>T. spicata</i> ^b	100 mL	1 mM	5 mL	oda sıcaklığı	25.dakikada renk değişimi başladı
5	<i>T. spicata</i> ^b	100 mL	1 mM	5 mL	60 °C	15.dakikada renk değişimi başladı
6	<i>T. spicata</i> ^b	100 mL	1 mM	5 mL	100 °C	10.dakikada renk değişimi başladı
7	<i>T. spicata</i> ^b	100 mL	1 mM	5 mL	Mikrodalga	2. dakikada renk değişimi başladı
8	<i>C. scolymus</i> ^b	100 mL	1 mM	5 mL	60 °C	2 saat sonra renk değişimi başladı
9	<i>M. piperita</i> ^b	100 mL	1 mM	5 ML	oda sıcaklığı	60. dakikada renk değişimi başladı

^a Ekstraktın bir kez filtreden geçirilmiş hali, ^b Ekstraktın iki kez filtreden geçirilmiş hali

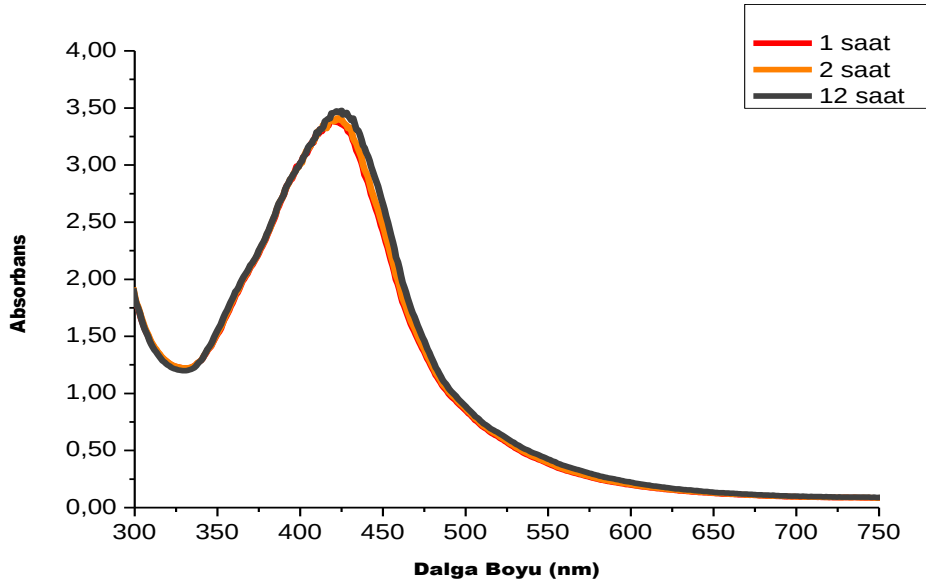


Şekil 4.1 *T. spicata* yaprak ekstraktı AgNO_3 karışımı ile AgNP sentezinin zamana bağlı renk değişimi a) Yaprak ekstraktı- AgNO_3 karışımı (b) 1 saat sonra yaprak ekstraktı- AgNO_3 karışımı (c) 12 saat sonra yaprak ekstraktı- AgNO_3 karışımı

4.1.2 AgNP UV-Vis Karakterizasyonu

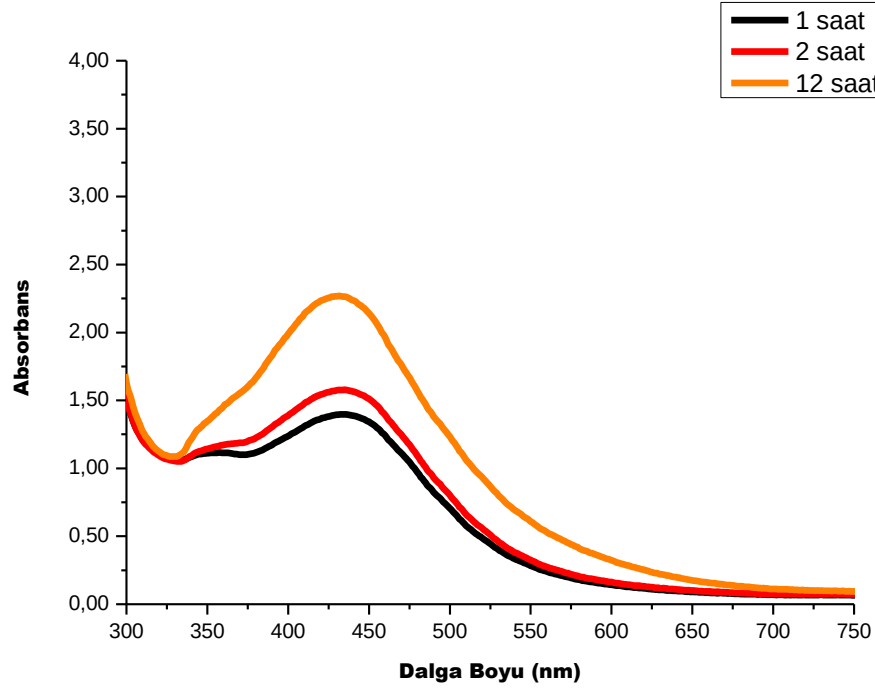
4.1.2.1 AgNP UV-Vis Karakterizasyonu

Siyah-kahverengi renkli numune, deiyonize suda çözüldükten sonra NP'lerin suda iyi bir dağılım göstermeleri için belirli bir süre sonikasyona tabi tutuldu. Bu solüsyon daha sonra küvete yerleştirildi ve NP'lerin ve ekstraktların absorbansı UV-Vis spektrofotometre aracılığı ile ölçülerek kaydedildi. Ev tipi mikrodalgada gerçekleştirilen sentezin çok kısa sürede gerçekleştiği ve zamana bağlı olarak UV-Vis absorbans değerinde herhangi bir değişimin olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.2).



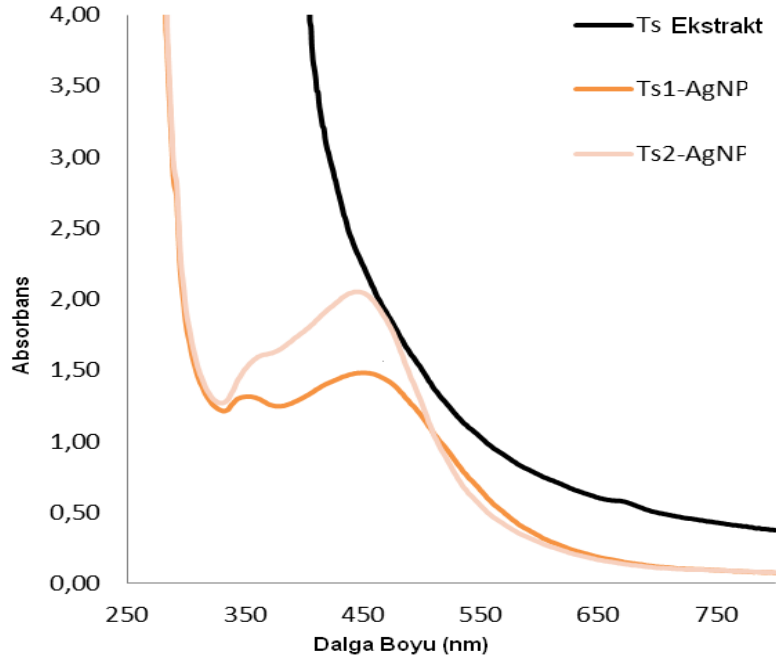
Şekil 4.2 *T. spicata* sulu ekstraktından elde edilen 1 numaralı örneğin zamana bağlı değişimini gösteren UV-Vis analizi

Şekil 4.3 *T. spicata* sulu ekstraktından elde edilen 2 numaralı örneğin zamana bağlı değişimini gösteren UV-Vis analizi görünmektedir. Brada zamana bağlı olarak absorbans değerinde bir artış olduğu gözlemlendi.



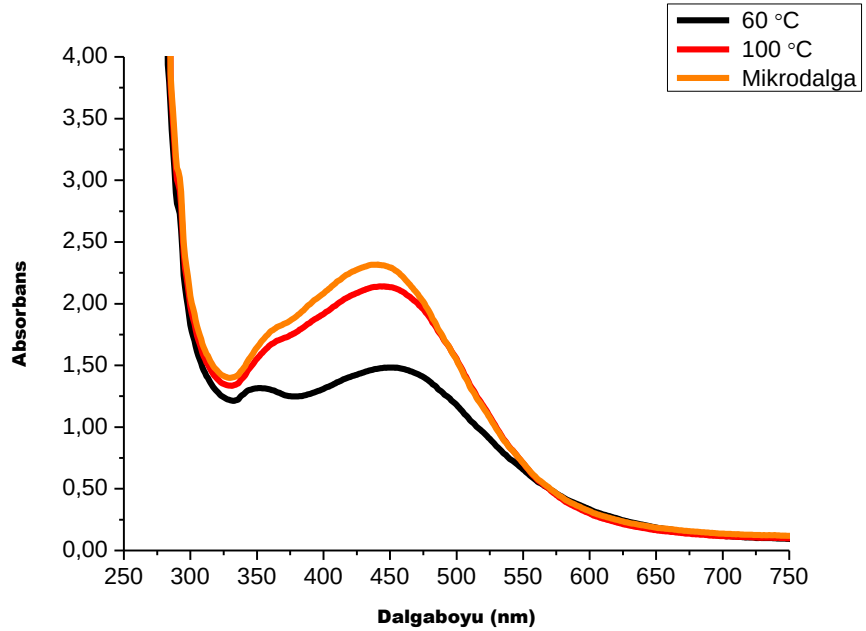
Şekil 4.3 *T. spicata* sulu ekstraktından elde edilen 2 numaralı örneğin zamana bağlı değişimini gösteren UV-Vis analizi

Şekil 4.4'te yaprak ekstraktı-AgNO₃ karışımının UV-Vis spektrumlarının, sırasıyla Ts1AgNP ve Ts2AgNP için 452 ve 444 nm'de net pikler sergilediğini göstermektedir. Elde edilen yüzey plasmon rezonans (SPR) bantları, AgNP'ler için literatür raporlarıyla tutarlıydı [213], [214]. NP'lerin SPR bantlarındaki fark, sentezde kullanılan *T. spicata* yaprak ekstraktlarını farklı miktarlarda kullanılmasına bağlı olabilir. NP'lerin iç partikül mesafesi ve çevresindeki ajanlar gibi faktörler SPR soğurumunun ve emiliminin çözeltideki parçacıkların doğasına, boyutuna ve şekline hassas olması gerçeği ile açıklanabilir.



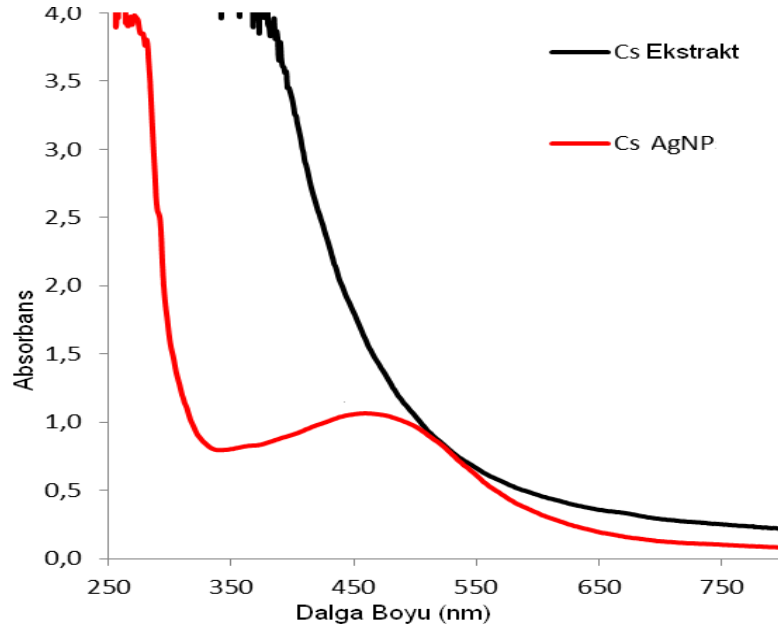
Şekil 4.4 *T. spicata* sulu ekstraktından elde edilen AgNP'lerin UV-Vis analizi

Sıcaklığın AgNP sentezine etkisi UV-Vis ile değerlendirildi. Sentez için uygulanan sıcaklık değerinin arttıkça absorbans değerinin arttığı belirlendi (Şekil 4.5). Burada en yüksek absorbans değerine ev tipi mikrodalgada sentezi gerçekleştirilen AgNP'ler gösterdi.

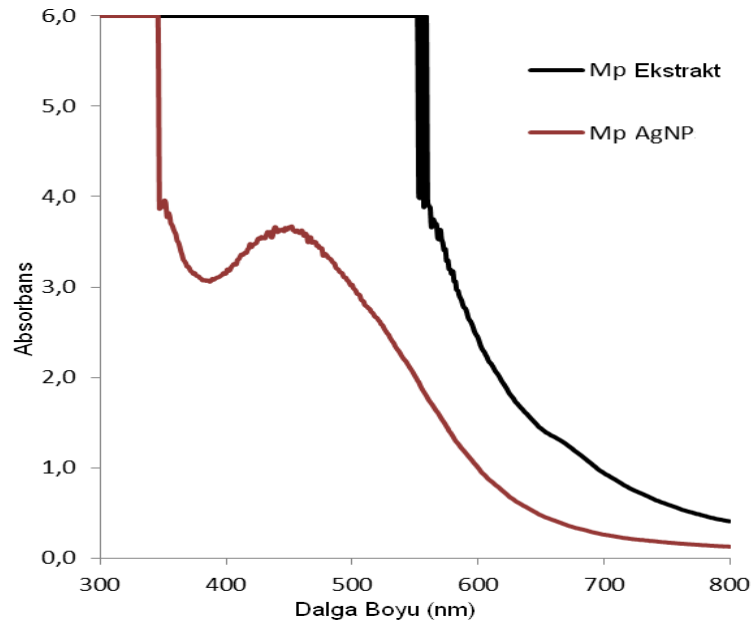


Şekil 4.5 *T. spicata* sulu ekstraktından elde edilen AgNP'lerin sıcaklığa bağlı değişimini gösteren UV-Vis analizi

Ayrıca, CsAgNP ve MpAgNP'in UV-görünür absorpsiyon spektrumlarının sırasıyla 458 ve 452 nm'de en yüksek pik gösterdiği belirlendi (Şekil 4.6 ve 4.7). Burada elde edilen sonuçlar temel alındığında farklı bitki türleri kullanılarak elde edilen AgNP'lerin farklı dalga boylarında en yüksek absorbans spektrumu gösterdikleri belirlendi.



Şekil 4.6 CsAgNP UV-Vis analizi

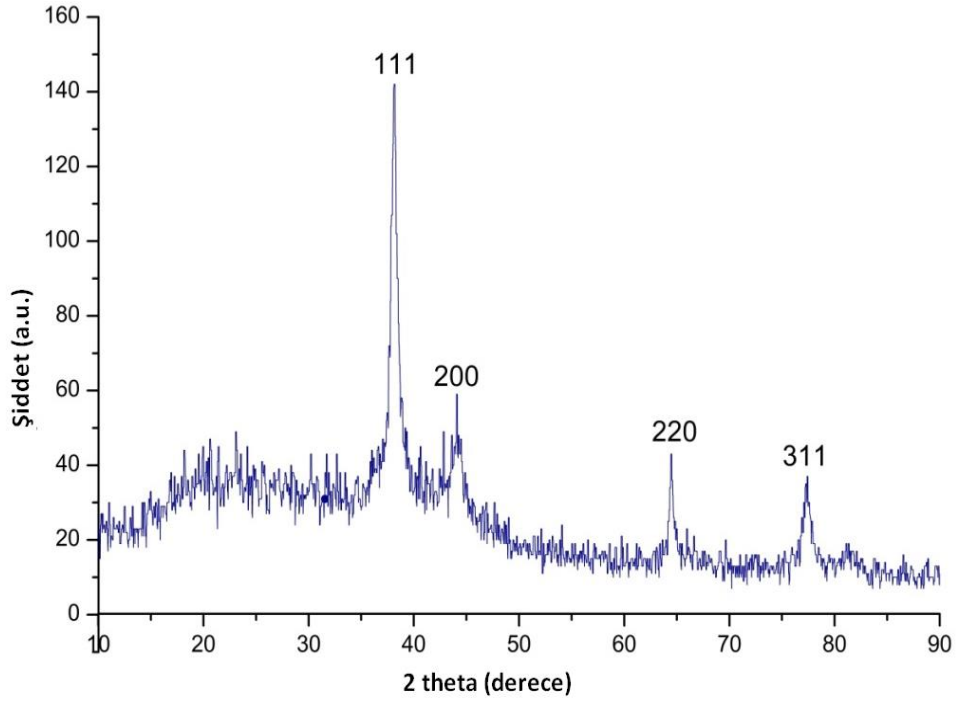


Şekil 4.7 MpAgNP UV-Vis analizi

4.1.2.2 AgNP XRD Karakterizasyonu

X-ışını kırınım tekniği, *T. spicata* (Ts2AgNP) aracılığıyla NP'lerin kristalin yapısını ve elemental bileşimini belirlemek için kullanıldı (Şekil 4.8). Hazırlanan AgNP'lerin XRD spektrumu, yüz merkezli küpün karakteristik Bragg kırınım planları (111), (200), (220) ve (310) olan $2\theta = 38.15, 44.33, 64.50$ ve 77.47° 'de dört kırınım bandı gösterdi. Toz Kırınım Standartları Ortak Komitesi (JCPDS) dosya no: 04-0783 veritabanının eşleşmesinde, sırasıyla, gümüşün kristal yapısını içermektedir [215]. Ts2AgNP'lerin ortalama kristal boyutu, Debye-Scherrer formülüne göre yaklaşık olarak 10 nm olarak hesaplandı:

$$D = 0.94\lambda / \beta \cos\theta \quad (4.1)$$



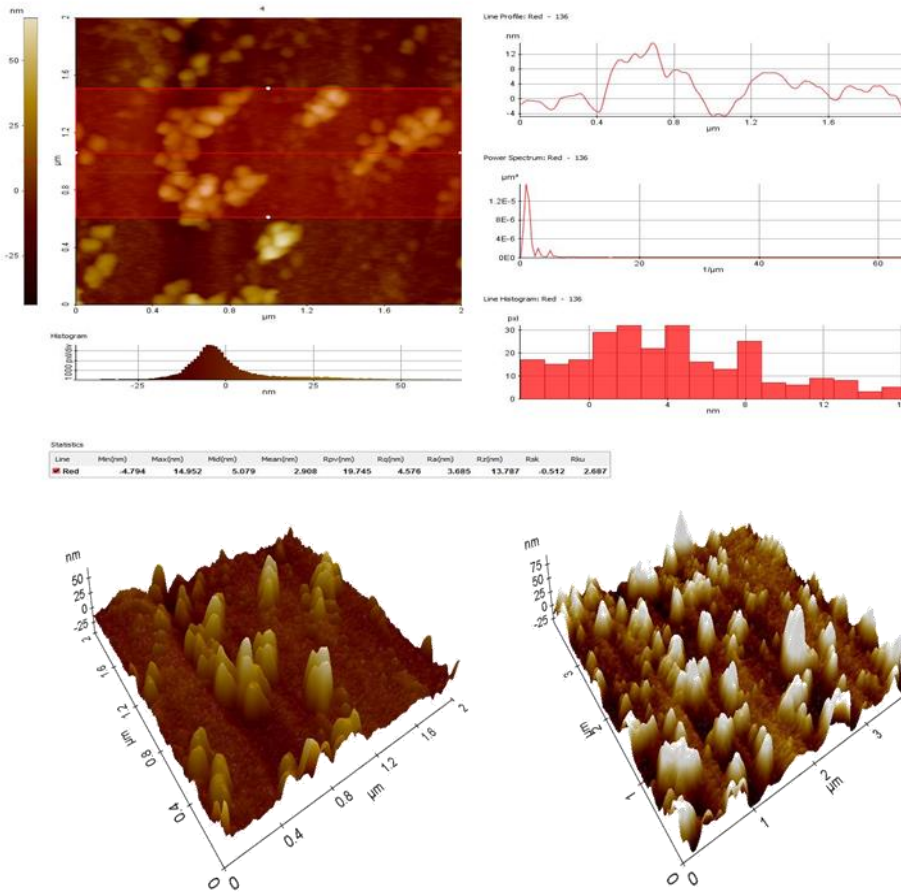
Şekil 4.8 Ts2AgNP XRD analizi

4.1.2.3 AgNP AFM Karakterizasyonu

AFM, NP'lerin yüzey özellikleri hakkında bilgi elde etmek için gelişmiş bir mikroskopik yöntemdir. AgNP'lerin yüzey morfolojisini ve 3D topoğrafyasını incelemek için AFM analizi gerçekleştirildi (Şekil 4.9). AFM görüntülerinin doğrudan gözlenmesi çoğunlukla

20-50 nm arasında bir boyuta sahip NP'lerin (Ts2AgNP) küresel şekillerini göstermektedir.

Sentezlenen NP'lerin AFM görüntüleri (2 μm X 2 μm) bir alandaki NP'ler taranarak elde edildi. Hazırlanan AgNP'lerin şekil ve boyut özellikleri AFM kullanılarak incelendi. Şekil 4.9'dan görüleceği üzere, sentezlenen Ts2AgNP'ler küresel formdadır.

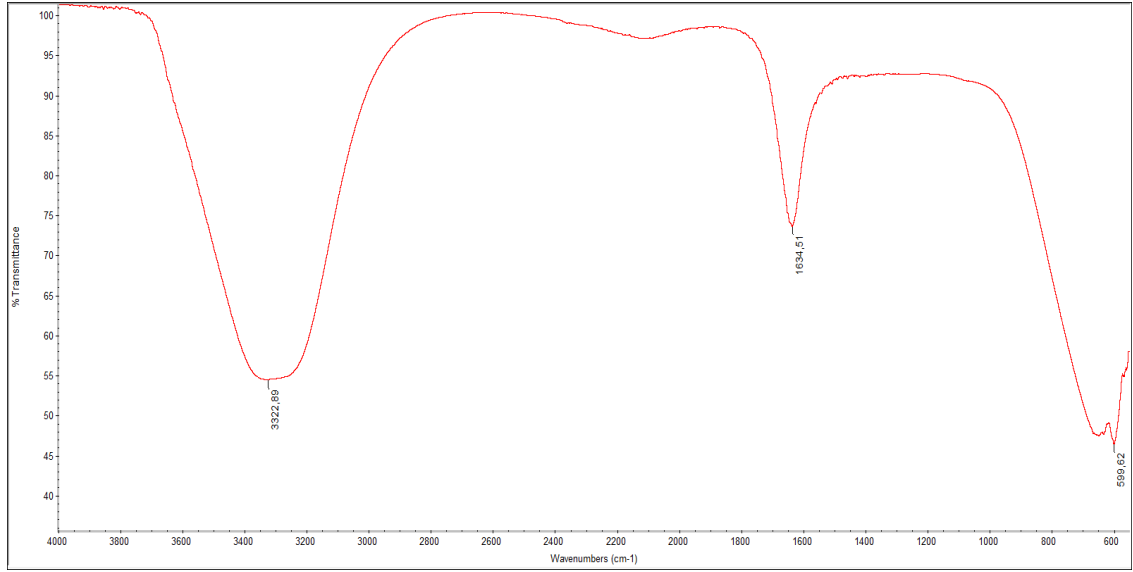


Şekil 4.9 Ts2AgNP AFM analizi ve üç boyutlu görüntüsü

4.1.2.4 AgNP FTIR Karakterizasyonu

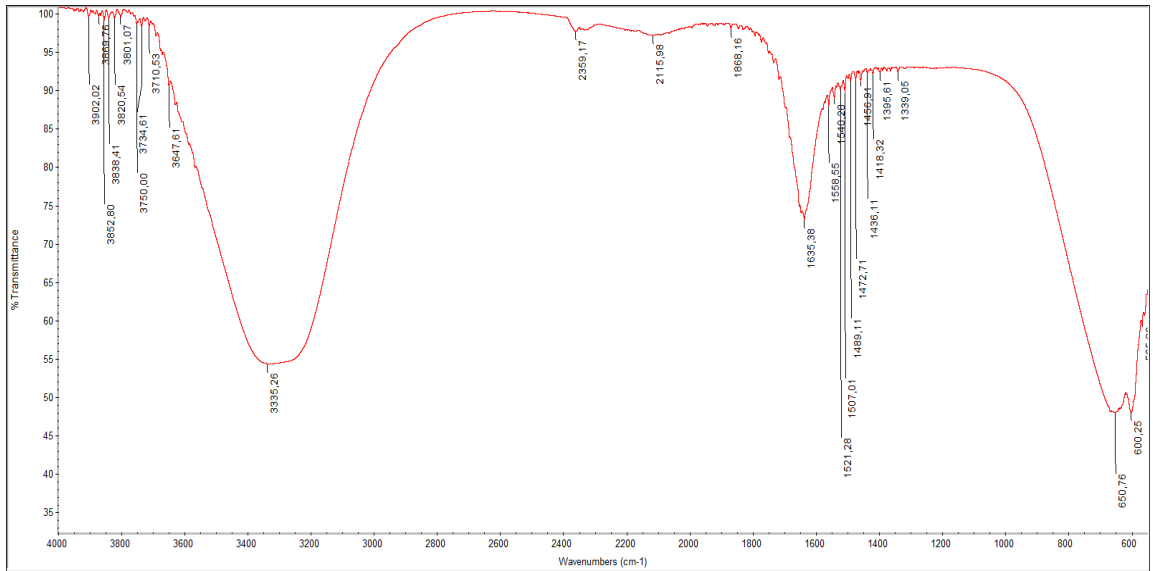
FTIR spektroskopik incelemeler, metal NP'lerin oluşumunda metal redüksiyonunda rol oynayan olası fonksiyonelliği araştırmak için yürütülmüştür. Ekstraktların spektrumları, AgNO_3 çözeltisi eklenmeden önce ve sonra kaydedildi. Fonksiyonel grupları tanımlayan yoğun bantlar, standart değerlerle karşılaştırıldı. *T. spicata* ekstraktı üzerinde 400-4000

cm^{-1} bölgedeki 3322.89, 1634.51 ve 599.62 cm^{-1} 'de bulunan bantlar görüldü (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 *T. spicata* ekstrakt FTIR analizi

Ts2AgNP için 3335.26, 2359.17, 1635.38 ve 600.25 cm^{-1} 'de bantlar görüldü ve *T. spicata* ekstraktının FTIR analizinde görülen bantlara göre bazı kaymalar olduğu belirlendi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 *T. spicata* AgNP FTIR analizi

IR Spectrum (Wavenumbers in cm⁻¹):

- 3330.66
- 2958.70
- 2118.52
- 1635.05
- 1556.55
- 1540.30
- 1506.95
- 1456.83
- 646.44
- 599.76

Wavenumbers (cm⁻¹)

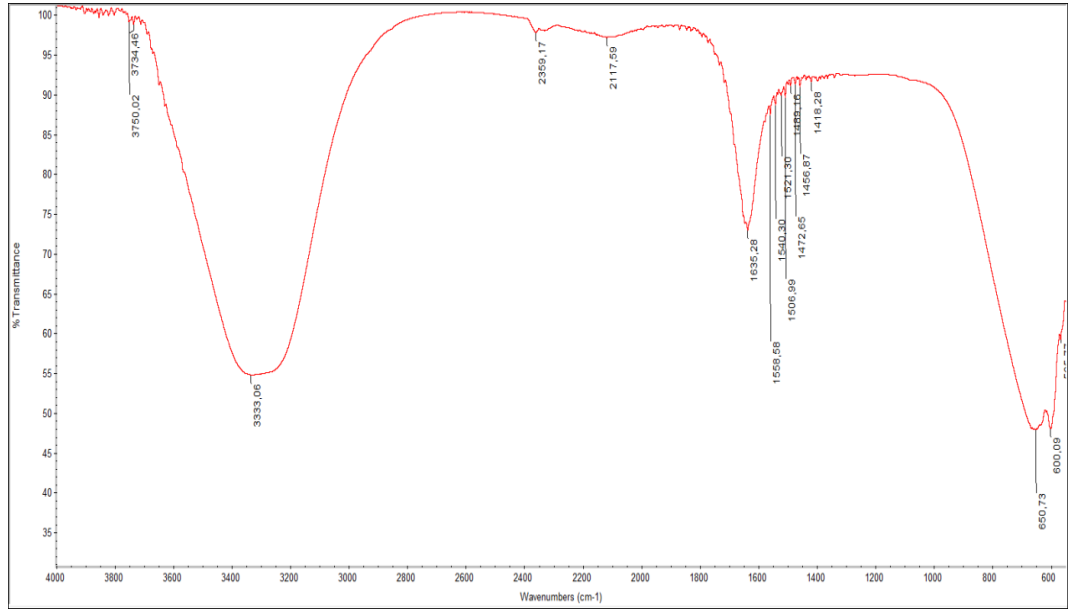
% Transmittance

Key peaks (Wavenumbers in cm⁻¹):

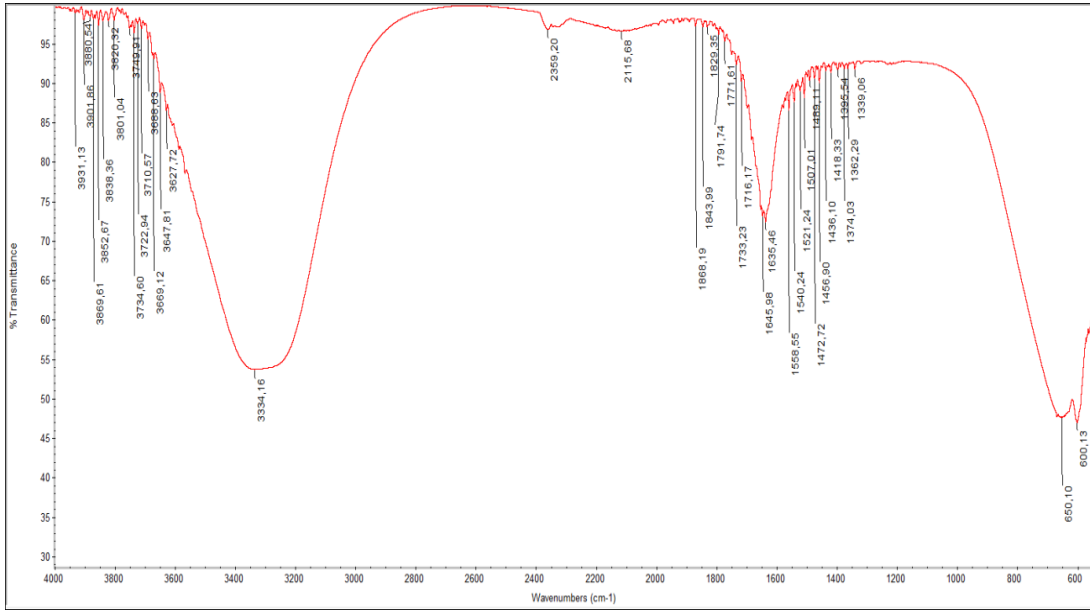
- 3659.69
- 3601.97
- 3580.25
- 3552.74
- 3501.02
- 3429.40
- 3390.00
- 3389.43
- 3270.60
- 3227.69
- 3110.56
- 3085.70
- 3064.76
- 2359.18
- 2115.13
- 1843.94
- 1829.33
- 1791.71
- 1771.57
- 1733.21
- 1716.09
- 1635.48
- 1521.28
- 1507.01
- 1489.13
- 1472.74
- 1456.94
- 1436.11
- 1418.33
- 1385.52
- 1362.28
- 1339.07
- 650.19
- 599.83

74

diğer bazı diğer piklerde mevcuttur. 3335 cm^{-1} civarındaki bantlar, ekstraktaki fenolik bileşiklerden O-H gerilme titreşimi sergilemektedir. 2359 ve 1635 cm^{-1} 'de bulunan pik, sırasıyla, amidlerin N-H uzantısını ve alkenlerin C = C uzantısını veya amidlerin C = O uzanımını temsil eder [216]. Özellikle, sırasıyla *C. scolymus* yaprak ekstraktı için 2358 ve *M. piperita* yaprak ekstraktı için 2359 'da görülen pik *T. spicata* yaprak ekstraktında görülmemiştir. 600 'deki pikin ise alkil halojenürlere C-Cl germe titreşimlerine karşılık geldiği düşünülmektedir. Bu fonksiyonel gruplar AgNP'lerin yeşil sentezinde etkili bir role sahip olabilirler. Ancak, olası mekanizma henüz belirsiz ve daha fazla araştırmaya ihtiyaç duymaktadır.



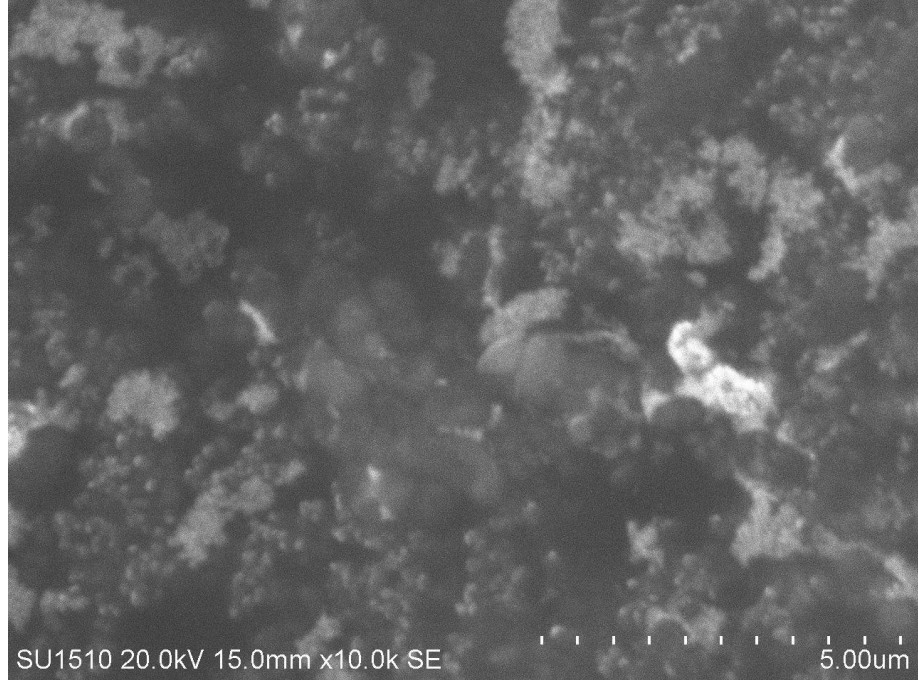
Şekil 4.14 *M. piperita* yaprak ekstraktı FTIR analizi



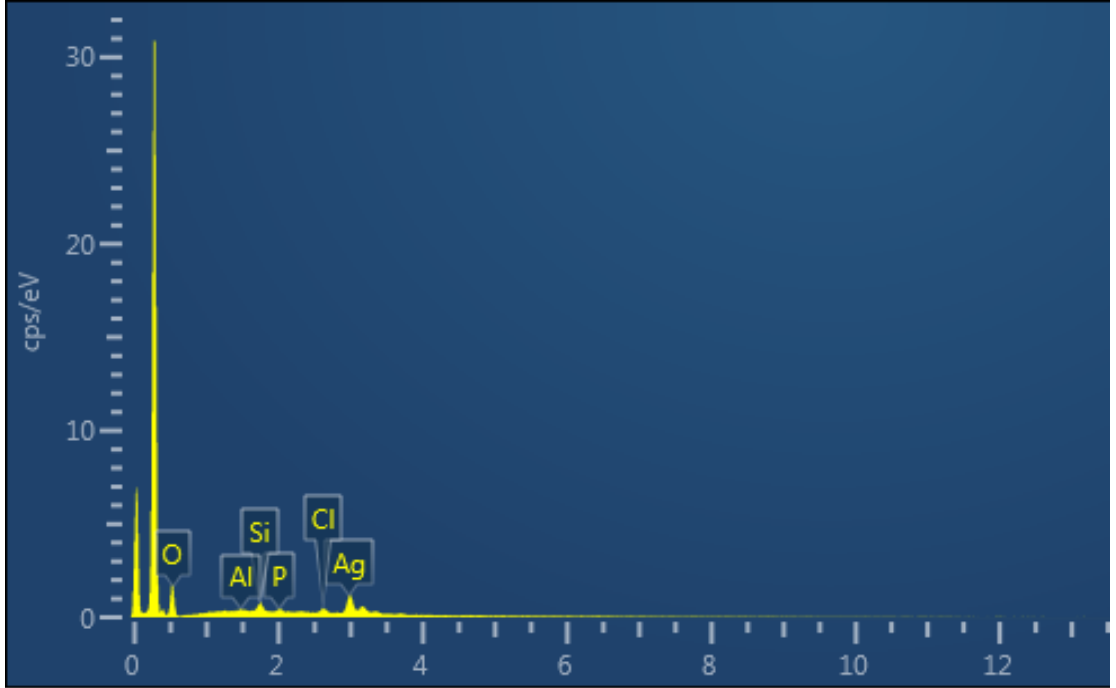
Şekil 4.15 *M. piperita* AgNP FTIR analizi

4.1.2.5 AgNP SEM ve EDS Karakterizasyonu

Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ve Enerji Dağılımı X-RAY Spektroskopisi (EDS) çalışmaları, Ts2AgNP'lerin küresel doğasını ortaya koymuştur (Şekil 4.16 ve 4.17). EDS analizi, NP'lerin oluşumunda rol oynayabilecek elementlerin nitel ve nicel statüsünü vermektedir. EDS spektrumu gümüş bölgede yaklaşık 3 keV'de güçlü bir sinyal ortaya çıkarır ve AgNP'lerin oluşumunu teyit eder. Genel olarak, metalik gümüş nanokristaller, yüzey plazmon rezonansı nedeniyle yaklaşık 3 keV'de tipik bir optik absorpsiyon piki gösterirler [217]. Hazırlanan Ts2AgNP'lerin EDS analizi, her element yüzdesinin Ag (% 85.18), Cl (% 5.95), Si (% 5.60) ve P (% 3.28) olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.2).



Şekil 4.16 Ts2AgNP SEM görüntüsü

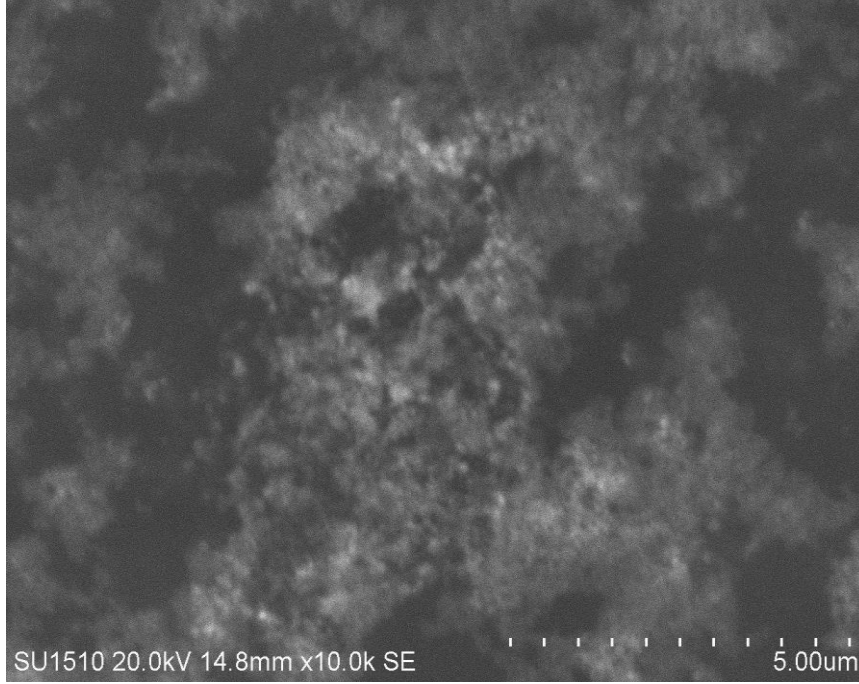


Şekil 4.17 Ts2AgNP EDS spektrumları

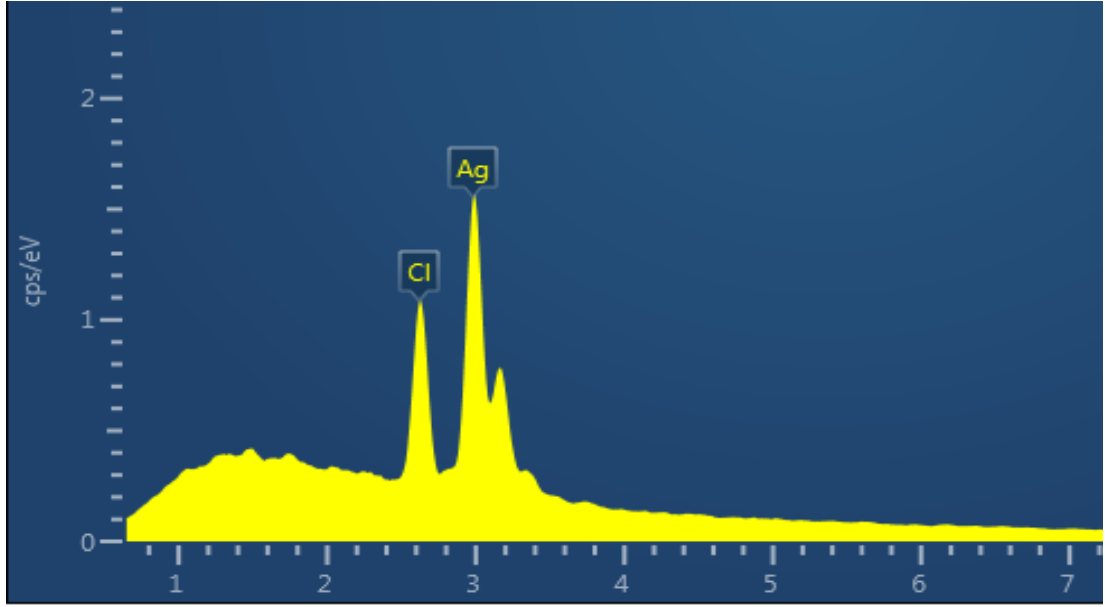
Çizelge 4.2 Ts2AgNP'lerin EDS analizine göre elementlerin ağırlıkça yüzdeleri

Element	Weight %	Weight % Sigma
Ag	85.18	1.18
Cl	5.95	0.70
Si	5.60	0.70
P	3.28	0.79
Total	100.00	

Aynı şekilde CsAgNP ve MpAgNP'lerinde element analizi ve küresel yapısı açıkça görülmektedir (Şekil 4.18, 4.19, 4.20 ve 4.21). Ayrıca, EDS sonuçları Cs2AgNP'lerin Ag (% 84.25), Cl (% 15.75), ve MpAgNP'lerin ise Ag (% 45.17), O (% 50.08), Cl (% 1.65) ve Cd (% 3.10) elementlerin ağırlıkça yüzdesini göstermiştir (Çizelge 4.3 ve 4.4).



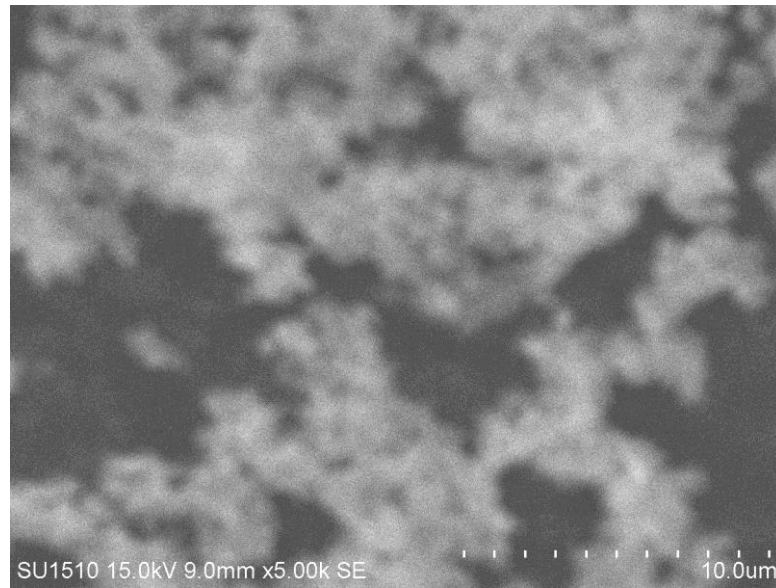
Şekil 4.18 CsAgNP SEM görüntüsü



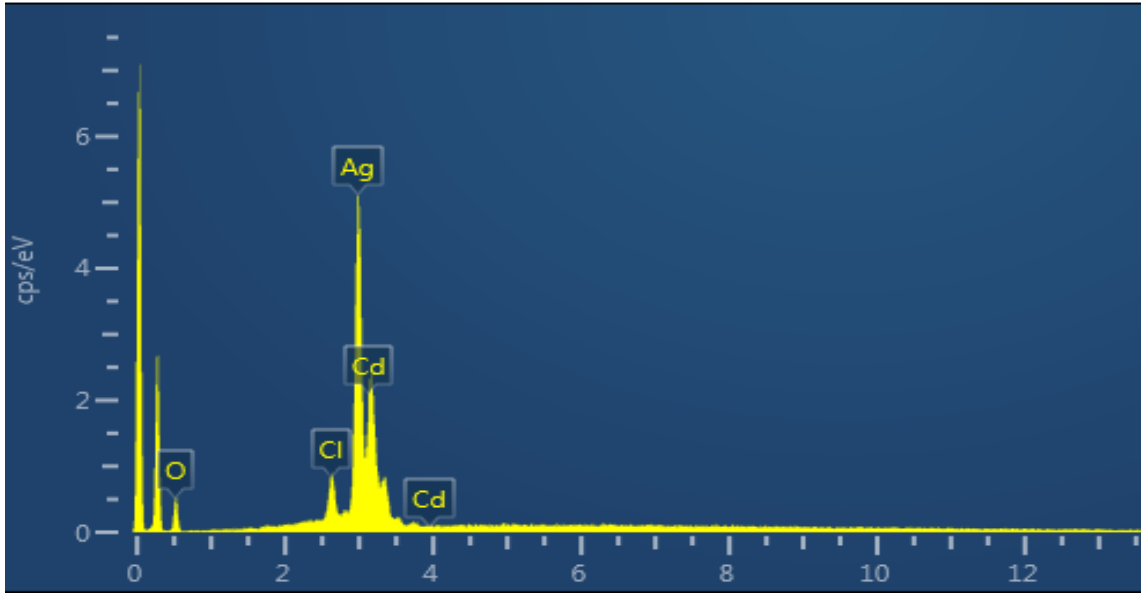
Şekil 4.19 CsAgNP EDS spektrumları

Çizelge 4.3 CsAgNP'lerin EDS analizine göre elementlerin ağırlıkça yüzdeleri

Element	Weight %	Weight % Sigma
Cl	15.75	0.47
Ag	84.25	0.47
Total	100.00	



Şekil 4.20 MpAgNP SEM görüntüsü



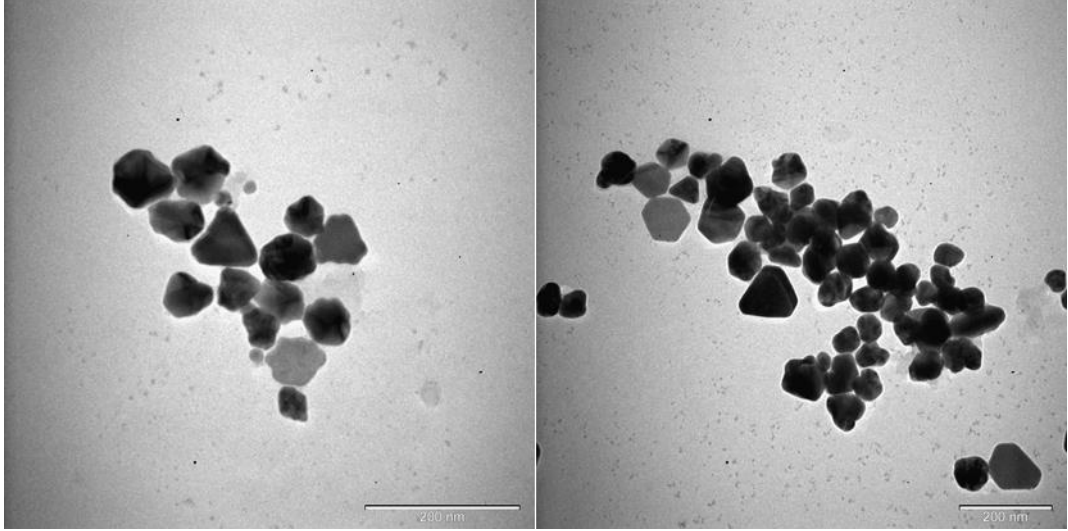
Şekil 4.21 MpAgNP EDS spektrumları

Çizelge 4.4 Sentezlenen MpAgNP'lerin EDS analizine göre elementlerin ağırlıkça yüzdeleri

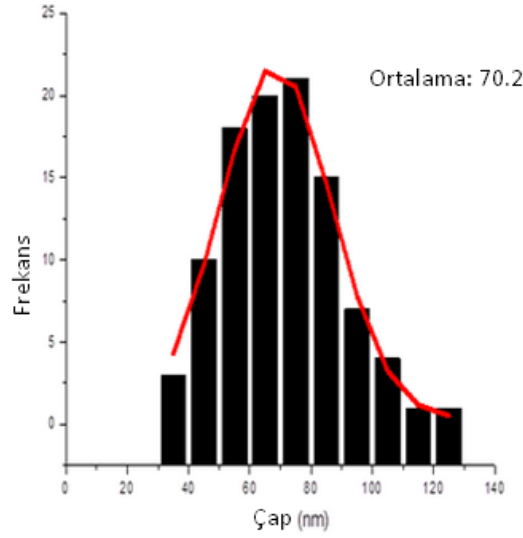
Element	Weight %	Weight % Sigma
Ag	45.17	0.77
O	50.08	0.84
Cl	1.65	0.08
Cd	3.10	0.35
Total	100.00	

4.1.2.6 AgNP TEM Karakterizasyonu

Ekstrakt miktarındaki değişimle birlikte AgNP'lerin morfolojik karakterizasyonu ve boyut değişimi TEM kullanılarak mikroskopik analizle incelendi. Şekil 4.22'de 1 mL *T. spicata* yaprak ekstraktı ile sentezlenen AgNP'lerin üçgen, altıgen ve küresel gibi çok çeşitli şekillerde oluştukları gözlemlendi. TEM ile çap ölçümleri, rastgele seçilmiş 100 partikülün histogramın da normal dağılım ile gösterildi ve Ts1AgNP için ortalama tanecik çapı 70.2 nm ve çap dağılımı 37.6 ila 128 nm arasında gerçekleşti (Şekil 4.23).

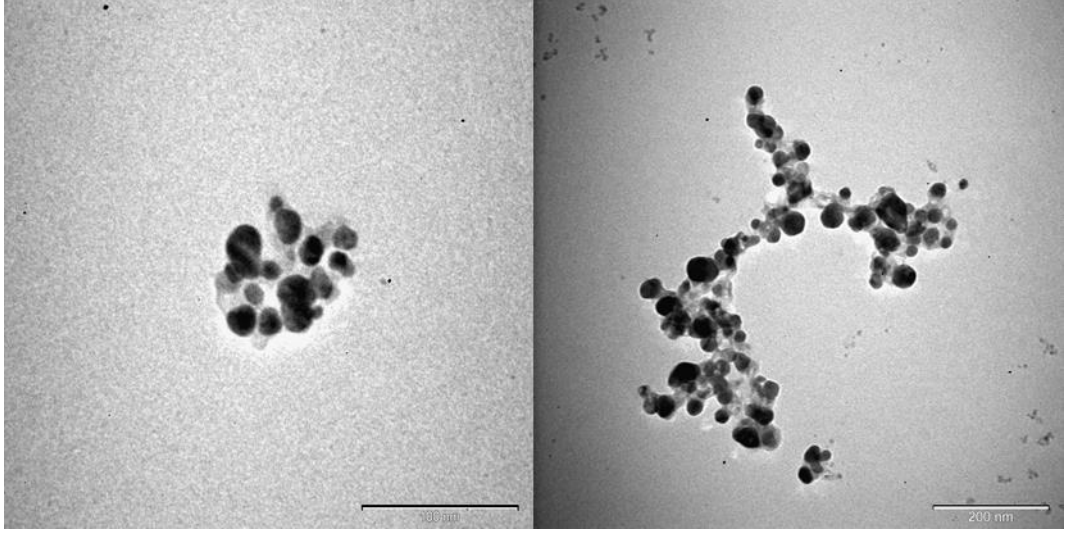


Şekil 4.22 Ts1AgNP TEM analizi

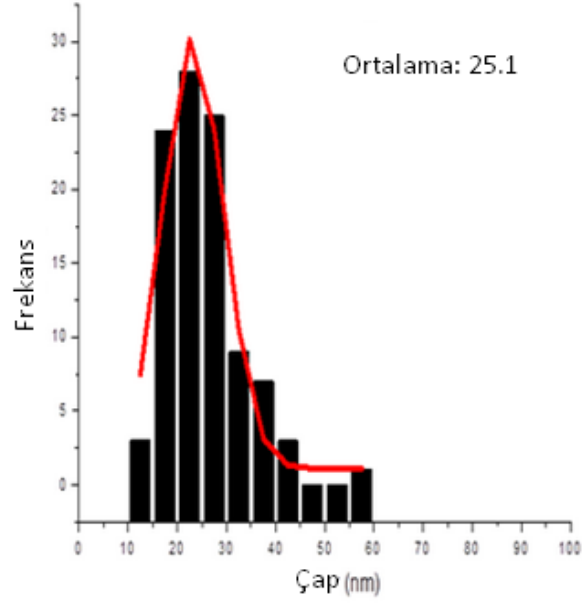


Şekil 4.23 Ts1AgNP TEM ortalama büyüklük dağılımı

Fakat, 5 ml ekstrakt kullanılarak hazırlanan AgNP'lerin küçük küresel formasyon gösterdikleri tespit edildi (Şekil 4.24). Ts2AgNP'lerin çap dağılımı, 11.8 ila 57.2 arasında ve, ortalama partikül çapı 25.1 nm olarak belirlendi (Şekil 4.25). Yapılan TEM analizleri, iki farklı *T. spicata* yaprak ekstrakt konsantrasyonu ile elde nanopartikül şeklinin ve ortalama parçacık çapının değiştiğini gösterdi.

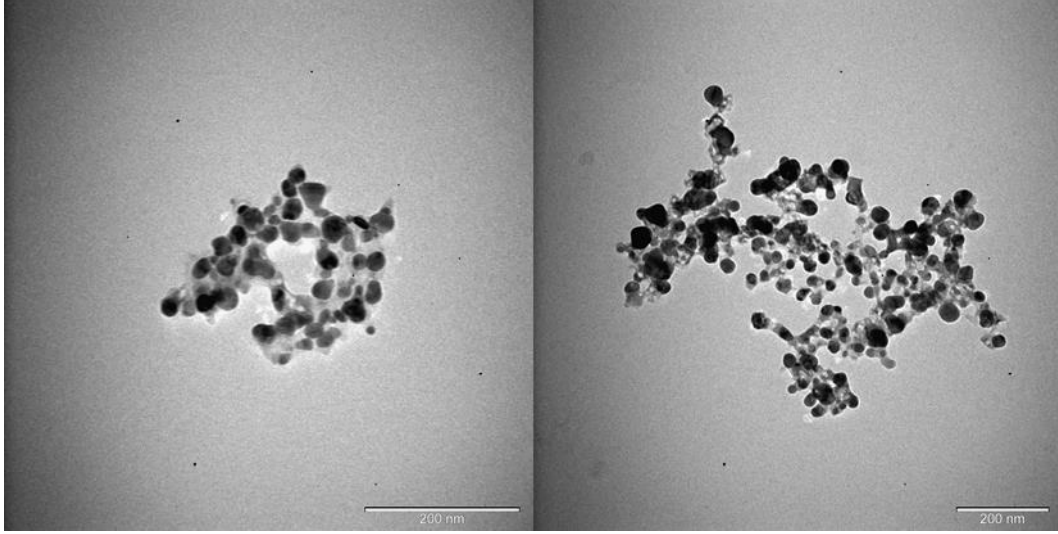


Şekil 4.24 Ts2AgNP TEM analizi

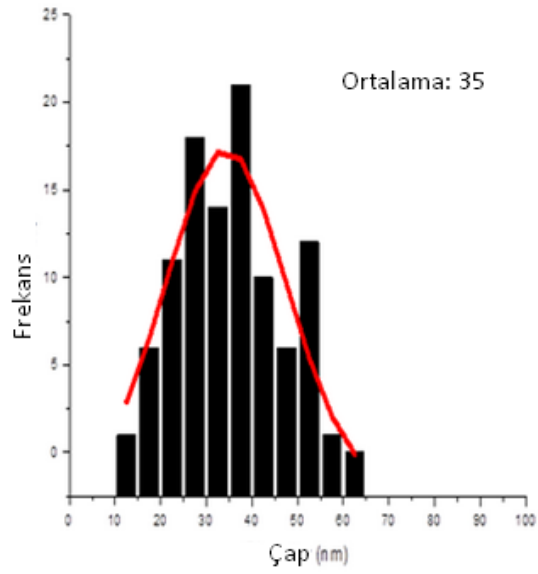


Şekil 4.25 Ts2AgNP TEM ortalama büyüklük dağılımı

Şekil 4.26 ve 4.27, CsAgNP'lerin 35 nm parçacık çapına sahip olduğunu ve küresel formasyonda oldukları tespit edildi.

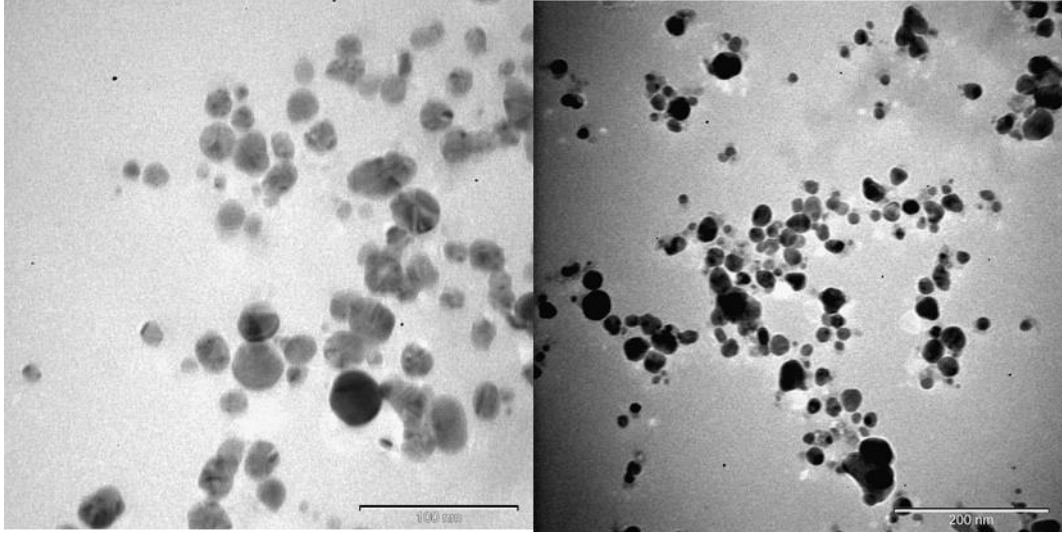


Şekil 4.26 CsAgNP TEM analizi

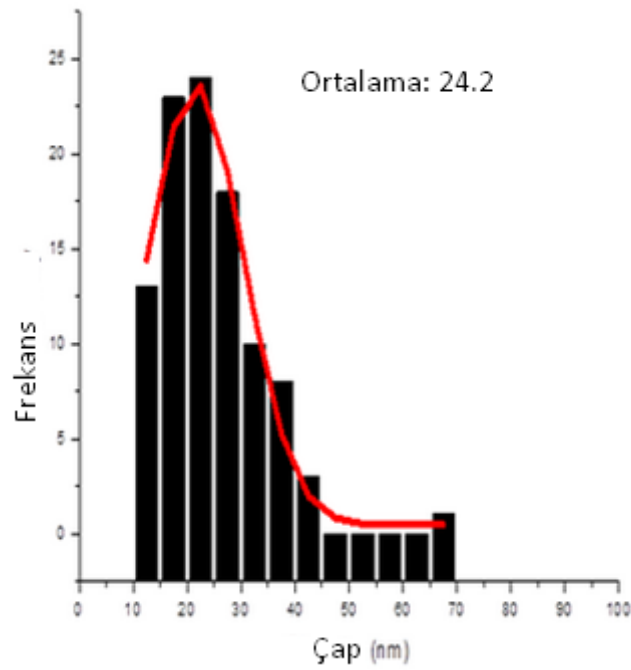


Şekil 4.27 CsAgNP TEM ortalama büyüklük dağılımı

Şekil 4.28 ve 4.29’da MpAgNP’lerin ortalama çap büyüklüğünün 24.2 nm olduğn gösterdi. Elde edilen TEM görüntüsünde nanopartiküllerin küresel formasyonda oldukları gözlendi.



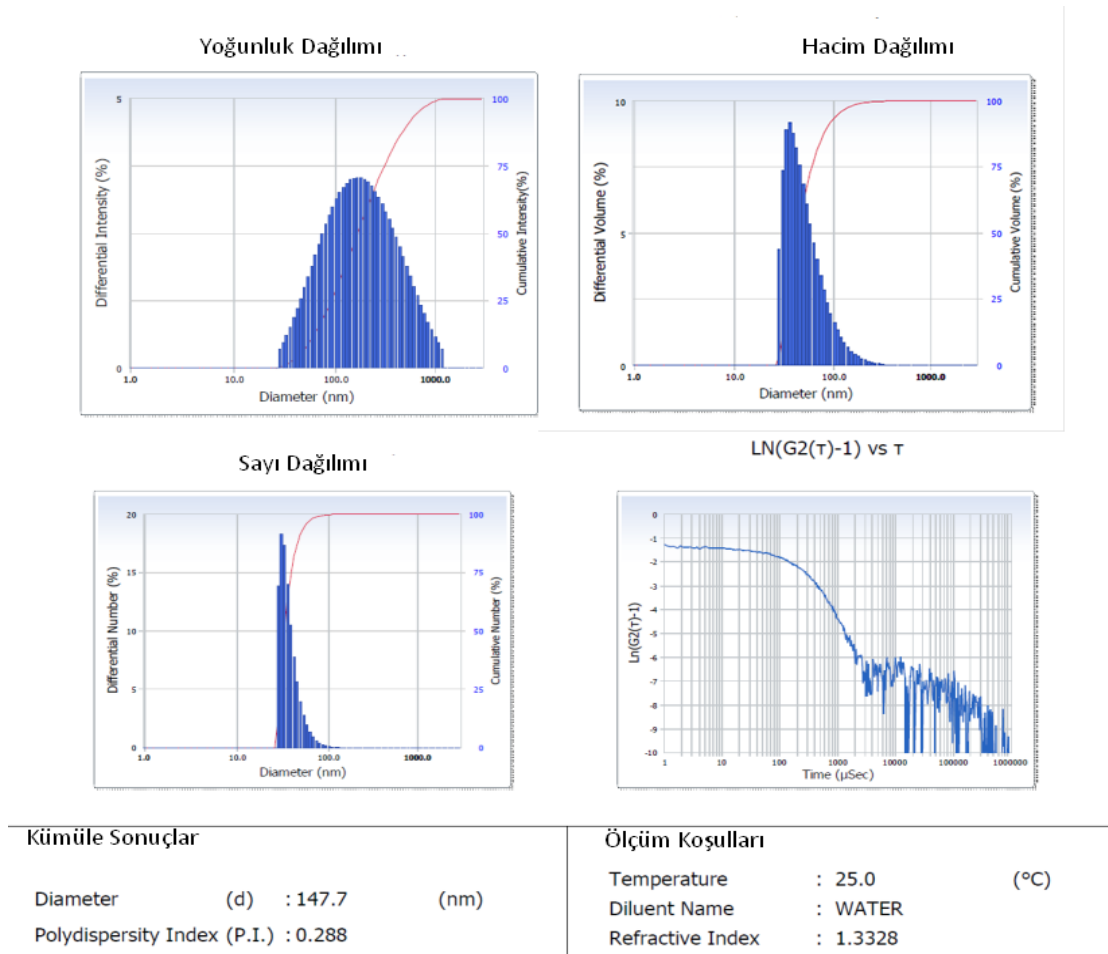
Şekil 4.28 MpAgNP TEM analizi



Şekil 4.29 MpAgNP TEM ortalama büyüklük dağılımı

4.1.2.7 AgNP DLS ve Zeta Potansiyel Karakterizasyonu

Reaksiyon karışımlarındaki AgNP'lerin ortalama parçacık boyutu, boyut dağılımı ve PDI'sı DLS yöntemi ile belirlendi. DLS ile belirlenen çözeltideki Ts1AgNP için ortalama parçacık çap boyutu 147.7 nm olarak bulundu. Ts1AgNP'lerin polidisperste indeksi (PDI) ise 0.288 olarak belirlendi (Şekil 4.30). DLS analizi sonucunda ortaya Ts1AgNP ortalama parçacık çap büyüklüğü için çıkan sayısal değerler yoğunluk dağılımında 252.7 nm, hacim dağılımında 58.2 ve sayı dağılımında 39.3 nm olarak tespit edildi (Çizelge 4.5). Bu sonuçlara göre, ortalama parçacık çap büyüklüğü için TEM sonuçlarına en yakın DLS sonucunun sayı dağılımında ortaya çıktığı belirlendi.

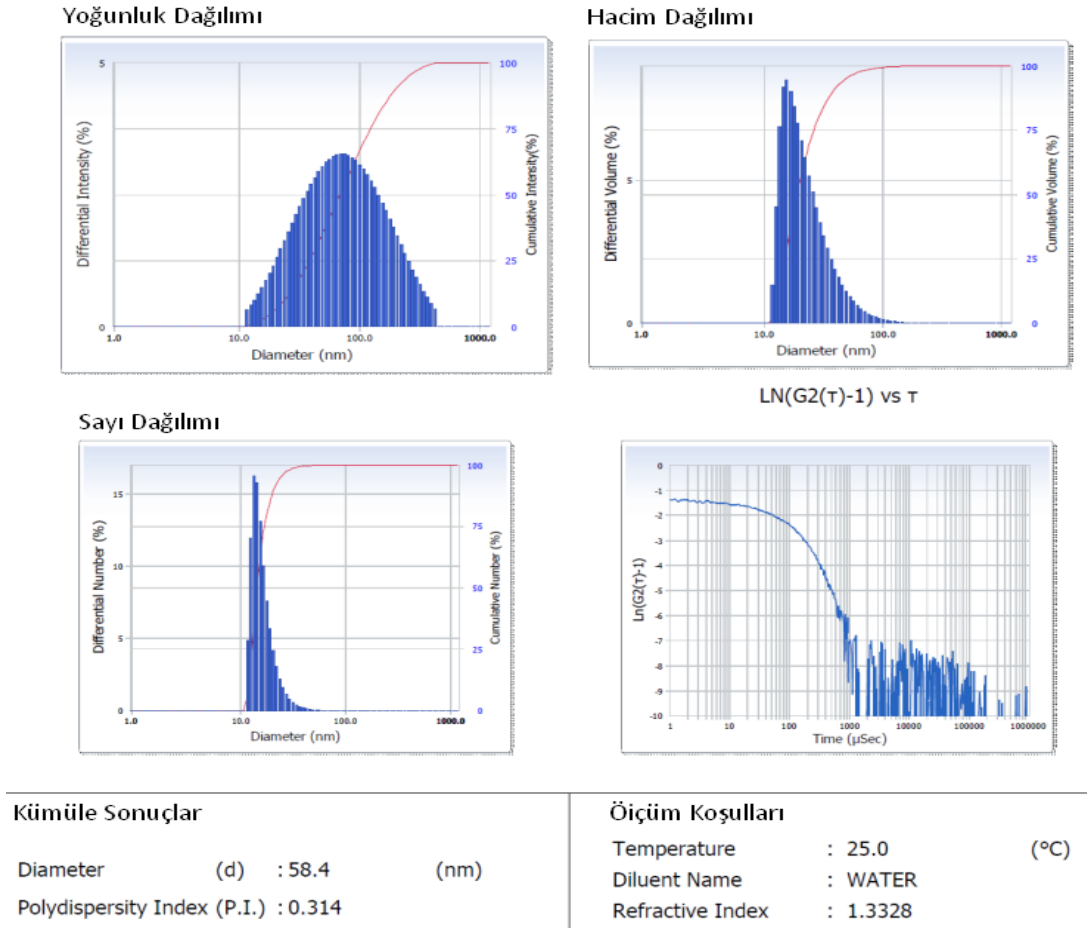


Şekil 4.30 Ts1AgNP DLS analizi

Çizelge 4.5 Ts1AgNP DLS analizi sonucunda ortaya çıkan sayısal değerler

Yoğunluk Dağılımı		Hacim Dağılımı		Sayı Dağılımı	
Çap (nm)	Standart sapma	Çap (nm)	Standart sapma	Çap (nm)	Standart sapma
252.7	216.3	58.2	36.0	39.4	11.3

Ts1AgNP için ortalama parçacık çap boyutu 58.4 nm olarak bulundu. Ts1AgNP'lerin polidisperiste indeksi (PDI) ise 0.314 olarak belirlendi (Şekil 4.31). DLS analizi sonucunda ortaya Ts2AgNP ortalama parçacık çap büyüklüğü için çıkan sayısal değerler yoğunluk dağılımında 100.4 nm, hacim dağılımında 25.3 ve sayı dağılımında 17.2 nm olarak tespit edildi (Çizelge 4.6).

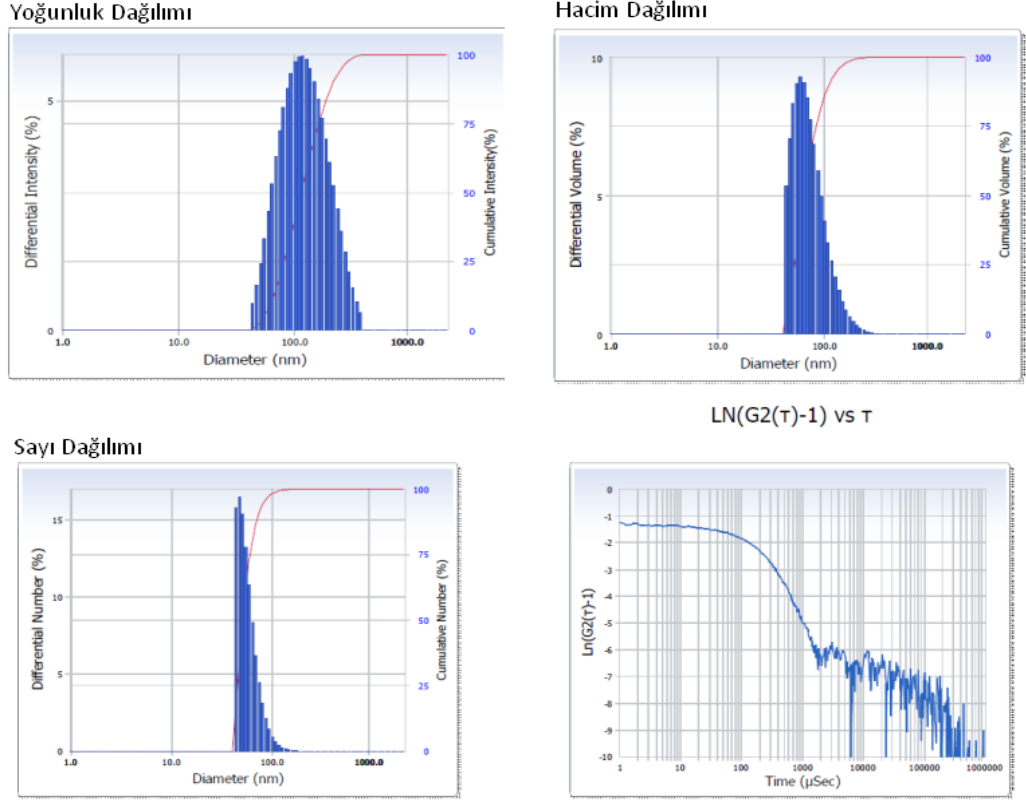


Şekil 4.31 Ts2AgNP DLS analizi

Çizelge 4.6 Ts2AgNP DLS analizi sonucunda ortaya çıkan sayısal değerler

Yoğunluk Dağılımı		Hacim Dağılımı		Sayı Dağılımı	
Çap (nm)	Standart sapma	Çap (nm)	Standart sapma	Çap (nm)	Standart sapma
100.4	81.2	25.3	15.4	17.2	4.9

CsAgNP için ortalama parçacık çap boyutu 119.2 nm olarak bulundu. CsAgNP’lerin polidisperiste indeksi (PDI) ise 0.246 olarak belirlendi (Şekil 4.32). DLS analizi sonucunda ortaya CsAgNP ortalama parçacık çap büyüklüğü için çıkan sayısal değerler yoğunluk dağılımında 140.9 nm, hacim dağılımında 79.4 ve sayı dağılımında 60 nm olarak tespit edildi (Çizelge 4.7).



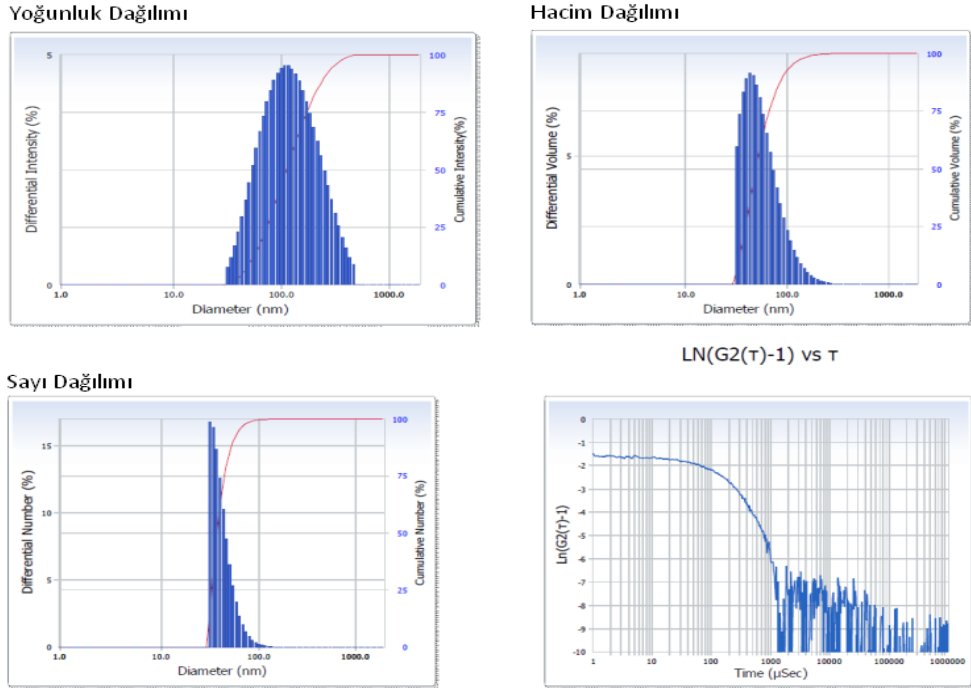
Kümüle Sonuçlar			Ölçüm Koşulları	
Diameter (d)	: 119.2	(nm)	Temperature	: 25.0 (°C)
Polydispersity Index (P.I.)	: 0.246		Diluent Name	: WATER
			Refractive Index	: 1.3328

Şekil 4.32 CsAgNP DLS analizi

Çizelge 4.7 CsAgNP DLS analizi sonucunda ortaya çıkan sayısal değerler

Yoğunluk Dağılımı		Hacim Dağılımı		Sayı Dağılımı	
Çap (nm)	Standart sapma	Çap (nm)	Standart sapma	Çap (nm)	Standart sapma
140.9	68.8	79.4	33.0	60.0	15.9

MpAgNP için yapılan DLS sonuçlarına göre, ortalama parçacık çap boyutu 104.9 nm olarak bulundu. MpAgNP’lerin polidisperiste indeksi (PDI) ise 0.251 olarak belirlendi (Şekil 4.33). DLS analizi sonucunda ortaya MpAgNP ortalama parçacık çap büyüklüğü için çıkan sayısal değerler yoğunluk dağılımında 145.2 nm, hacim dağılımında 62.9 ve sayı dağılımında 44.6 nm olarak tespit edildi (Çizelge 4.8).



Kümüül Sonuçlar			Ölçüm Koşulları		
Diameter	(d)	: 104.9 (nm)	Temperature	: 25.0	(°C)
Polydispersity Index (P.I.)		: 0.251	Diluent Name	: WATER	
			Refractive Index	: 1.3328	

Şekil 4.33 MpAgNP DLS analizi

Çizelge 4.8 MpAgNP DLS analizi sonucunda ortaya çıkan sayısal değerler

Yoğunluk Dağılımı		Hacim Dağılımı		Sayı Dağılımı	
Çap (nm)	Standart sapma	Çap (nm)	Standart sapma	Çap (nm)	Standart sapma
145.2	87.7	62.9	31.1	44.6	12.7

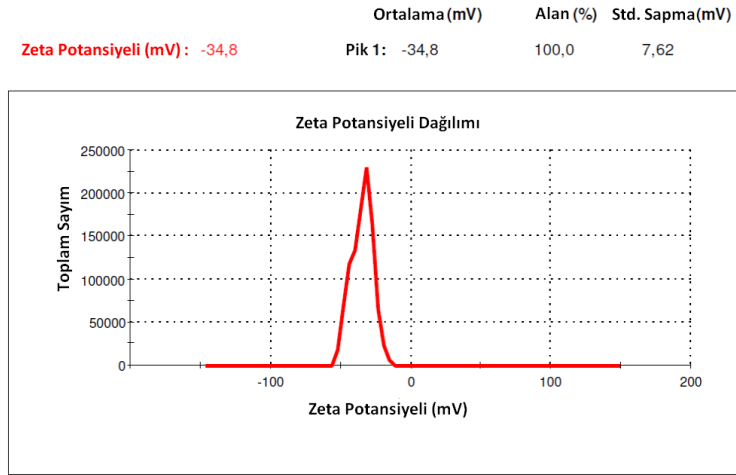
Zeta potansiyeli, solüsyondaki metal NP'lerin kararlılığını ve dağılımını belirlemek için önemli bir parametre olarak kabul edilirken aynı zamanda numunenin solüsyonda sahip olduğu toplam yükü de göstermektedir.

+30 mV'den yüksek veya -30 mV'den küçük Zeta potansiyelleri olan sıvı içerisindeki NP'ler tipik olarak stabil kabul edilmektedir. Bunun nedeni, askıda kalan tüm NP'lerde mevcut olan büyük negatif veya pozitif Zeta potansiyelinin parçacıkların bir araya gelmesi için itilmeye ve zorluğa yol açmasıdır. Bununla birlikte, NP'lerin Zeta potansiyelinin düşük olması durumunda, parçacıkların bir araya gelip aglomerasyon oluşturmasını engelleyebilecek güç bulunmamaktadır.

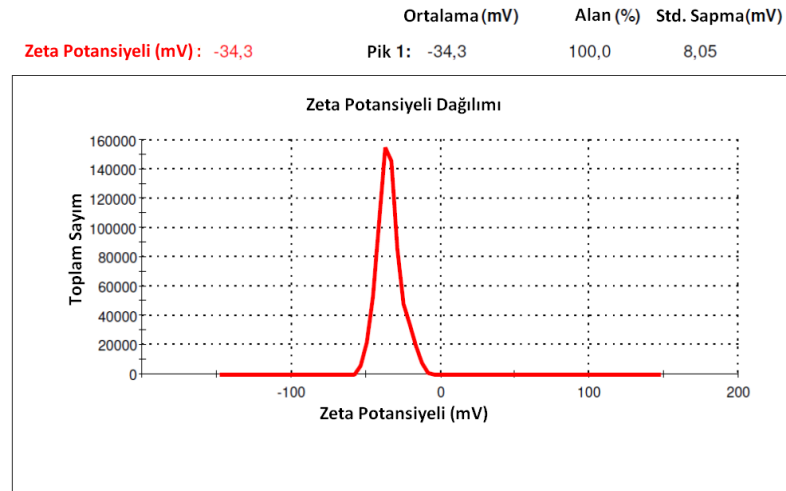
Çizelge 4.9 Nanoakışkanların Zeta potansiyeli ile ilişkisi i[217]

0 - ± 5 mV	Hızlı koagülasyon veya flokülasyon
± 10 mV - ± 30 mV	Hassas dispersiyon eşiği
± 30 mV - ± 40 mV	Orta stabilite
± 40 mV - ± 60 mV	İyi stabilite
± 61 mV'den fazla	Mükemmel stabilite

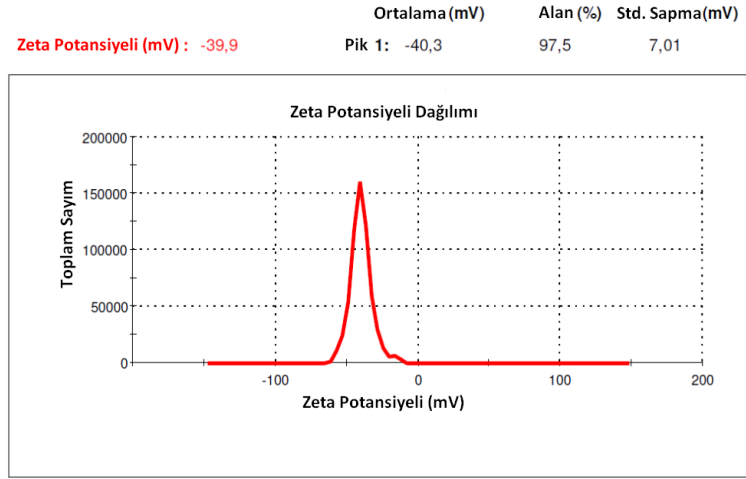
Ayrıca, deiyonize suda sonikatör yardımı ile homojen dağılmış biyosentezlenmiş AgNP, sırasıyla Ts1AgNP, Ts2AgNP, CsAgNP ve MpAgNP için -34.8, -34.3, -39.9 ve -30.5, mV'lik zeta potansiyel değerlerini gösterdi (Şekil 4.34, 4.35, 4.36 ve 4.37). Çizelge 4.9'a göre elde ettiğimiz AgNP'lerin stabilitesinin "orta stabilite" gurubunda yer aldığı belirlendi.



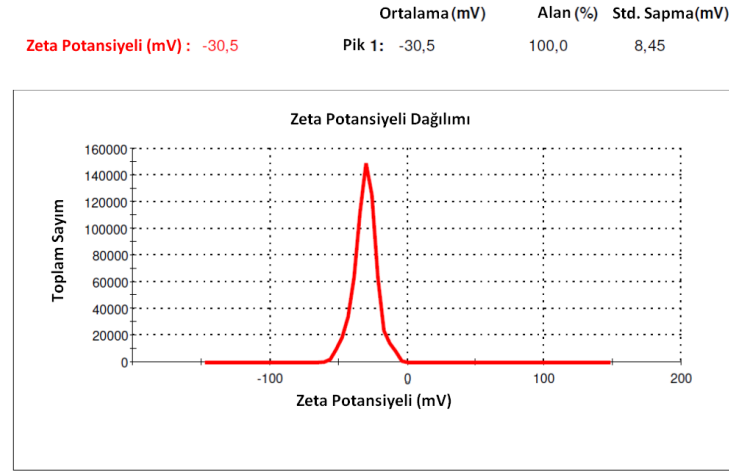
Şekil 4.34 Ts1AgNP zeta potansiyeli



Şekil 4.35 Ts2AgNP zeta potansiyeli



Şekil 4.36 CsAgNP zeta potansiyeli



Şekil 4.37 MpAgNP zeta potansiyeli

4.1.3 AgNP'lerin Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi

Seçilen Gram pozitif bakterilerin (*Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus*) ve Gram-negatif bakterilerin (*Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium*) biyosentezlenmiş AgNP'lere yönelik *in vitro* duyarlılıkları, disk difüzyonu ve mikrodilüsyon yöntemleri ile belirlendi. NP'leri içeren diskler etrafındaki zon bölgesinin çapı (mm), Çizelge 4.10 ve Şekil 4.38'de gösterildi. Elde edilen sonuçlara göre, Ts1AgNP, Ts2AgNP ve CsAgNP'lerin *B. cereus*'a karşı oluşturmuş oldukları inhibisyon zonu 14.67 ± 0.35 , 14.10 ± 0.10 mm iken, MpAgNP'ler ile muamele edilmiş *B. cereus* inhibisyon zon bölgesi ise $14,40 \pm 0,26$ mm olarak belirlenmiştir. CsAgNP'ler ile muamele edilen *S. aureus* için saptanan maksimum inhibisyon zonu 18.53 ± 0.45 mm olarak gözlemlendi. Ts1AgNP, Ts2AgNP ve

MpAgNP'ler ile muamele edilmiş örnekler için elde edilen inhibisyon zonu sırasıyla 16.20 ± 0.10 , 13.37 ± 0.15 ve 12.93 ± 0.38 mm olarak belirlendi. Ts1AgNP ve Ts2AgNP mualesinden sonra kaydedilen inhibisyon zon çapı, *E. coli*'de 11.60 ± 0.20 ve 11.40 ± 0.20 mm; *S. typhimurium*'da sırasıyla 14.20 ± 0.20 ve 11.30 ± 0.10 olarak elde edilmiştir. CsAgNP ve MpAgNP'ler, *E. coli*'de 12.63 ± 0.40 ve $11.10b \pm 0.10$ mm inhibisyon zon çapı gösterdi ve *S. typhimurium* için ise inhibisyon zon çapı 12.57 ± 0.15 ve 10.60 ± 0.20 mm olarak ölçüldü.

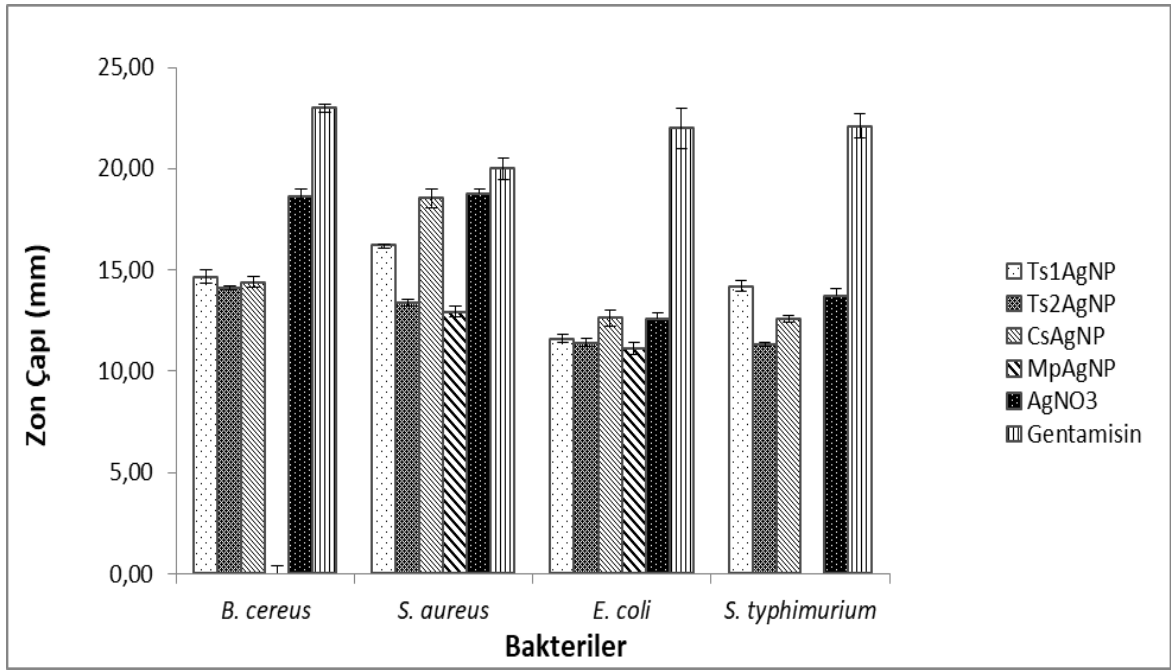
Çizelge 4.10 Disk difüzyon yöntemi ile bakteri suşlarına karşı gümüş NP'lerin mm cinsinden zon bölgeleri (çap)

		Örnekler			
		Ts1AgNP	Ts2AgNP	CsAgNP	MpAgNP
Gram Pozitif	<i>B. cereus</i> (ATCC 11778)	$14.67^a \pm 0.35$	$14.10^a \pm 0.10$	$14.40^a \pm 0.26$	-
	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	$16.20^a \pm 0.10$	$13.37^b \pm 0.15$	$18.53^c \pm 0.45$	$12.93^b \pm 0.38$
Gram Negatif	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	$11.60^{a,b} \pm 0.20$	$11.40^{a,b} \pm 0.20$	$12.63^a \pm 0.40$	$11.10^b \pm 0.10$
	<i>S. typhimurium</i> (ATCC 14028)	$14.20^a \pm 0.20$	$11.30^b \pm 0.10$	$12.57^c \pm 0.15$	$10.60^d \pm 0.20$

B. cereus = *Bacillus cereus*; *S. aureus* = *Staphylococcus aureus*, *E. coli* = *Escherichia coli*,
S. typhimurium = *Salmonella typhimurium*

* Veri noktaları ortalama $\pm$ standart sapma (ortalama $\pm$ SD) şeklinde ifade edildi.

– Bir antibakteriyel aktivite göstermez.



Şekil 4.38 AgNP'lerin ile bakterilere karşı göstermiş oldukları antibakteriyel aktivitenin mm cinsinden zon çapları

NP'lerin 200 ila 1.56 $\mu\text{g/mL}$ arasında değişen konsantrasyonları, Çizelge 4.11'de gösterilen MİK ve MBK değerlerini belirlemek için test edildi. MİK, görünür bir büyümenin olmadığı en düşük konsantrasyon olarak tanımlandı; buna karşılık MBK, koloni görülmeyen en düşük konsantrasyon olarak tanımlandı [218]. AgNP'lerin gram-pozitif bakterilere yönelik MİK ve MBK değerleri 12.5 ila 100 $\mu\text{g/mL}$ arasında iken, AgNP'lerin MİK ve MBK değerleri gram negatif bakterilerde daha yüksekti. Çizelge 4.11'de belirtildiği gibi, biyosentezlenmiş AgNP'ler arasında, MpAgNP'lerin *B. cereus*'a karşı daha az aktivite göstermesine rağmen, CsAgNP'lerin 12.5 $\mu\text{g/mL}$ MİK değeri ile (25 $\mu\text{g/mL}$ MBK) gram-pozitif bakterilere karşı en yüksek antibakteriyel etkinliği gösterdiği belirlendi. Sonuçlar, Ts2AgNP'lerin MİK değerlerine kıyasla Ts1AgNP'lerin *B. cereus*, *E. coli* ve *S. typhimurium* için daha düşük MİK değerlerine neden olduğunu göstermektedir. Ts1AgNP'nin MİK değerleri sırasıyla gram-pozitif bakterilerde ve gram-negatif bakterilerde 25 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ (50 ve 100 MBK) olarak elde edildi. Sırasıyla *B. cereus*, *E. coli* ve *S. typhimurium*'da Ts2AgNP'ler için MİK değerleri sırasıyla 50, 100 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulundu. Ekstrakt konsantrasyonunun farklı oranlarda kullanılmasıyla

kaydedilen sonuçlara göre, daha yüksek ekstrakt konsantrasyonunda elde edilen AgNP'lerin en düşük antibakteriyel etkinliği sergilediğini gösterdi.

Çizelge 4.11 Mikrodilüsyon yöntemi ile bakteri suşlarına karşı gümüş NP'lerin minimum inhibisyon ve bakterisidal konsantrasyonları (MİK ve MBK) (µg/mL

Örnekler	Gram Pozitif				Gram Negatif			
	<i>B. cereus</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. typhimurium</i>	
	MİK	MBK	MİK	MBK	MİK	MBK	MİK	MBK
Ts1	25	50	25	50	50	100	50	100
Ts2	50	50	25	50	100	100	100	200
Cs	12,5	25	12,5	25	50	100	25	50
Mp	100	100	50	100	100	200	200	200

Biyosentezlenmiş AgNP'lerin neden olduğu membran hasarı, ortamdaki hücre bileşen alınımının belirlenmesi Ts1AgNP ve CsAgNP'ler için bir kez daha gösterildi. Membran hasarı hücrel bileşenlerin, en önemlisi proteinlerin ve nükleik asitlerin kaybıyla sonuçlanır ve buda 280 ve 260 nm'de absorbans ölçerek belirlenebilir [20,43]. Hazırlanan AgNP'lerin artan konsantrasyonları ile birlikte 280 ve 260 nm'de absorbansta bir artış gözlemlendi (Çizelge 4.12 ve 4.13). Bu sonuçlar AgNP'lerin bakteriyel membranı doza bağımlı bir şekilde yok ettiğini ve bunu periplazmik proteinlerin ve nükleik asitlerin ortama salınmasının takip ettiğini göstermektedir [43,44]. Ts1AgNP ve CsAgNP'ler için MİK ve 2xMİK miktarında maruz bıraktığımız bakterilerin hücre bileşenlerinin salınım tayinindeki elde ettiğimiz sonuçlarına göre antibakteriyel etkisi fazla olan AgNP'lerin OD260 ve OD280 değerlerinin daha yüksek olduğu bulundu. Ts1AgNP'leri ile 2XMİK konsantrasyonunda muamele edilen *S. aureus* OD260 ve OD280'de sırasıyla 0.34 ve 0.47 değerlerini göstererek test edilen bakteriler arasında en yüksek değer oldu.

Çizelge 4.12 Ts1AgNP'ler ile muamele edilen bakterilerin hücre bileşenlerinin salınımının ölçülmesi

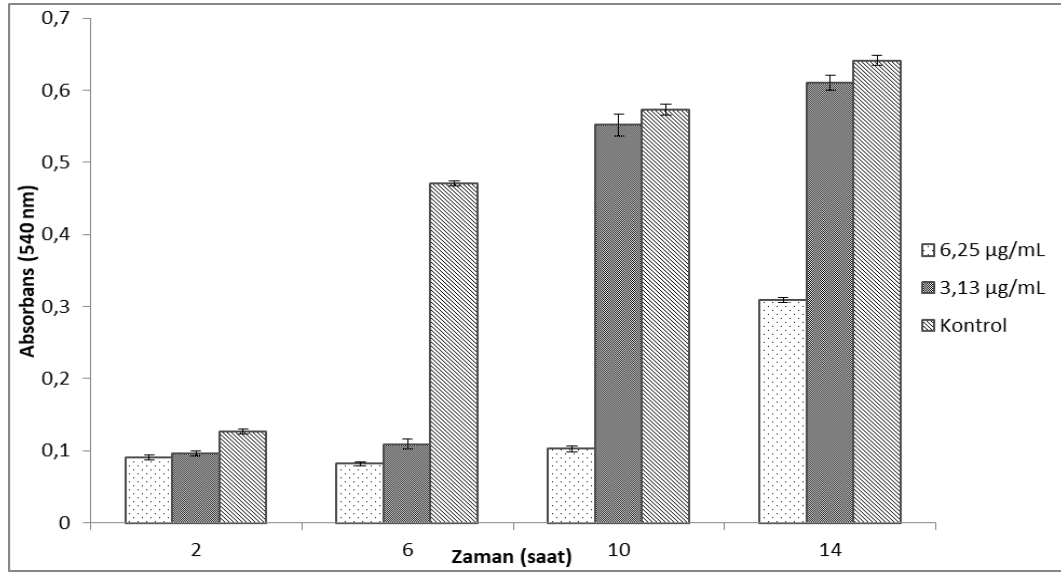
Mikroorganizmalar	Ts1AgNP konsantrasyonu	OD260	OD280
<i>B. cereus</i>	0	0.007	0.09
	MİK	0.20	0.32
	2xMİK	0.29	0.41
<i>S. aureus</i>	0	0.009	0.08
	MİK	0.28	0.36
	2xMİK	0.34	0.47
<i>E. coli</i>	0	0.007	0.06
	MİK	0.15	0.21
	2xMİK	0.22	0.29
<i>S. typhimurium</i>	0	0.006	0.07
	MİK	0.18	0.25
	2xMİK	0.26	0.34

AgNP'ler arasında ise CsAgNP'ler ile muamele edilen *S. aureus*'ta en yüksek OD260 ve OD280 sırasıyla 0.34 ve 0.47 değerleri elde edilerek bulundu. Ayrıca AgNP'lerin doz miktarı arttıkça OD değerlerinde yükseldiği ve membran hasarının arttığı ortaya çıkarıldı

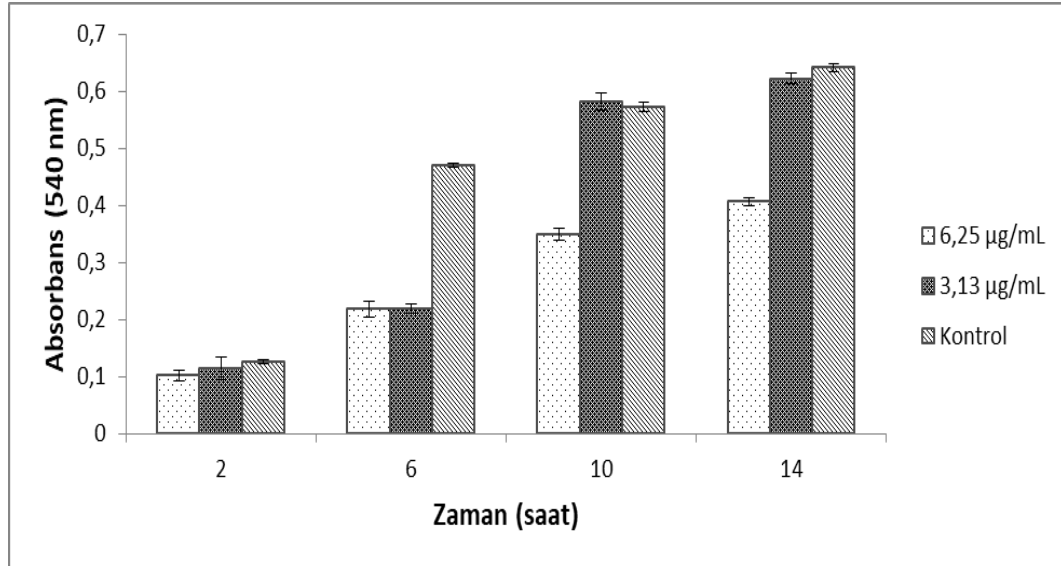
Çizelge 4.13 CsAgNP'ler ile muamele edilen bakterilerin hücre bileşenlerinin salınımının ölçülmesi

Mikroorganizmalar	CsAgNP konsantrasyonu	OD260	OD280
<i>B. cereus</i>	0	0.007	0.09
	MİK	0.23	0.34
	2xMİK	0.30	0.42
<i>S. aureus</i>	0	0.009	0.08
	MİK	0.32	0.38
	2xMİK	0.37	0.46
<i>E. coli</i>	0	0.007	0.06
	MİK	0.17	0.24
	2xMİK	0.23	0.31
<i>S. typhimurium</i>	0	0.006	0.07
	MİK	0.16	0.24
	2xMİK	0.24	0.32

AgNP'lerin *S. aureus* büyüme kinetikleri üzerindeki etkisi bir spektrofotometre kullanılarak absorbansta meydana gelen artış olarak 540 nm'de ölçüldü. NP'lerin son konsantrasyonları 6.25 ve 3.13 µg/mL olacak şekilde çalışıldı. Ts1AgNP ile Ts2AgNP'yi kıyasladığımızda 6.25 µg/mL konsantrasyonda Ts1AgNP'nin *S. aureus*'un büyümesini daha da yavaşlattığı görülmektedir (Şekil 4.39 ve 4.40).

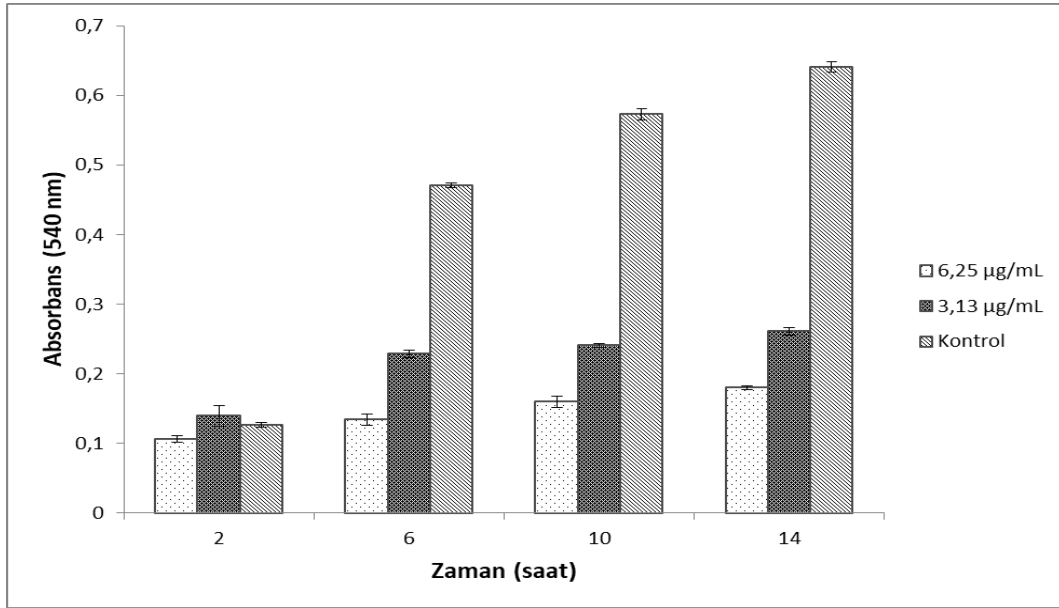


Şekil 4.39 Ts1AgNP'lerin değişen konsantrasyonlarında *S. aureus*'un büyüme profilinde zamana bağlı değişim

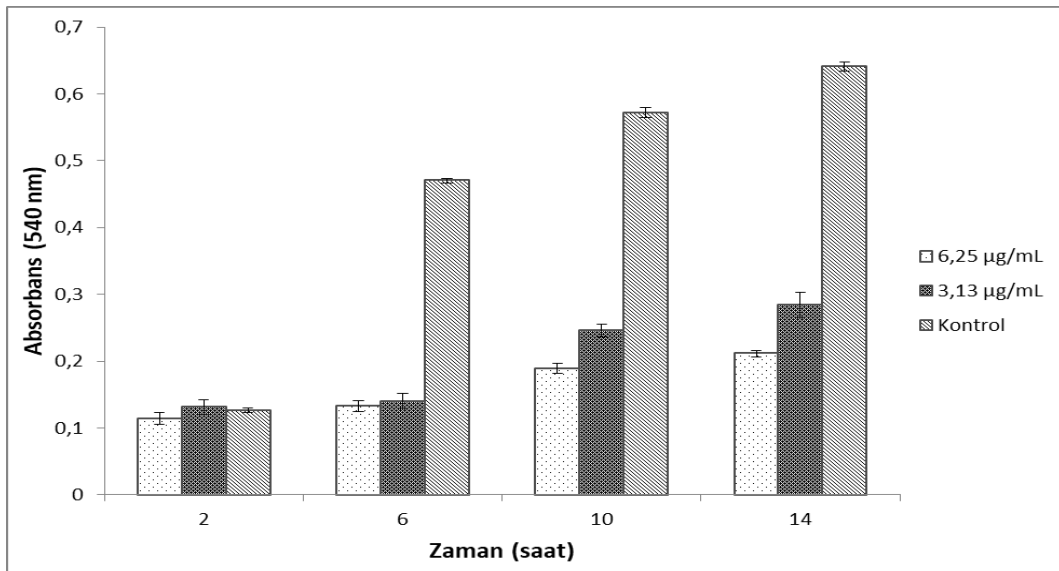


Şekil 4.40 Ts2AgNP'lerin değişen konsantrasyonlarında *S. aureus*'un büyüme profilinde zamana bağlı değişim

Cs2AgNP ve MpAgNP'lerin ise sırası ile 14 saat sonunda 6.25 µg/mL konsantrasyonda 0.07 ve 0.10 ve 3.13 µg/mL konsantrasyonda 0.15 ve 0.16'lık bir absorbans artış değeri kaydedildi. Bu da CsAgNP'lerin *S. aureus*'un büyümesini diğer tüm NP'lere kıyasla daha fazla olumsuz yönde etkilediği görünmektedir (Şekil 4.41 ve 4.42)

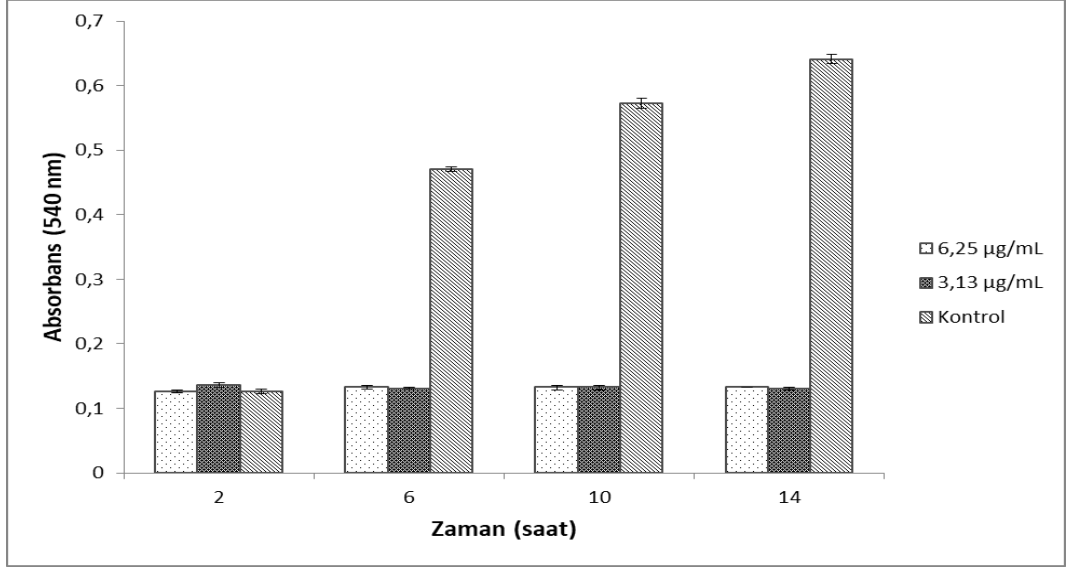


Şekil 4.41 CsAgNP'lerin değişen konsantrasyonlarında *S. aureus*'un büyüme profilinde zamana bağlı değişim

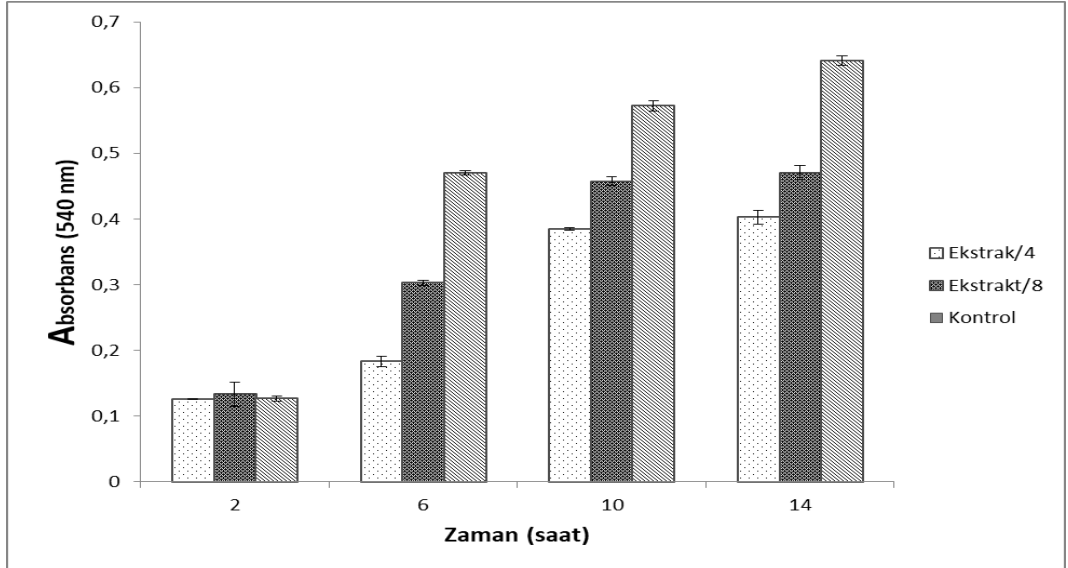


Şekil 4.42 MpAgNP'lerin değişen konsantrasyonlarında *S. aureus*'un büyüme profilinde zamana bağlı değişim

AgNO₃'ün her iki konsantrasyonunda da ise absorbans artış değeri 3.13 µg/mL konsantrasyon için 14 saat sonunda 0.02 olarak kaydedilirken *T. spicata* ekstraktının 1/4 ve 1/8' lik seyreltme oranlarında sırası ile 0.30 ve 0.35 değerinde bir absorbans artışı kaydedildi (Şekil 4.43 ve 4. 44).



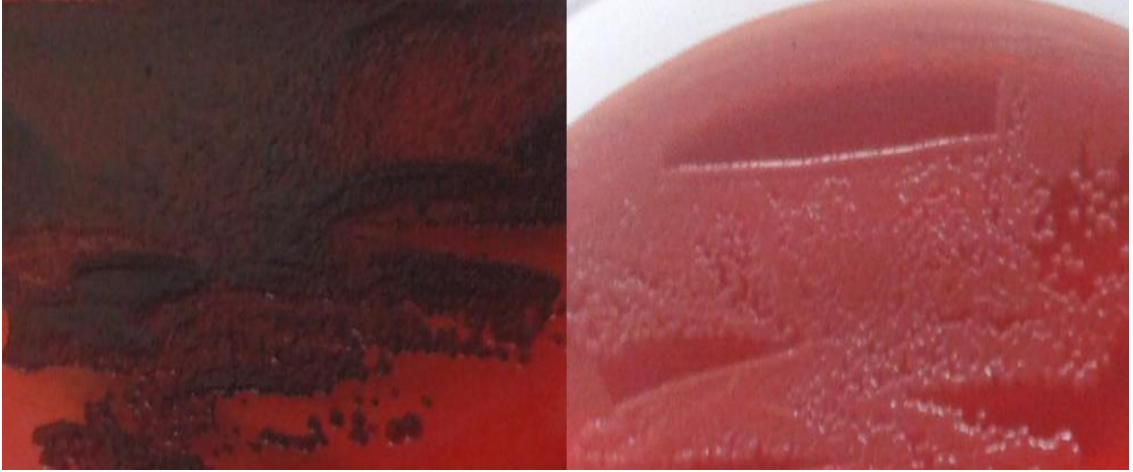
Şekil 4.43 AgNO₃'ün değişen konsantrasyonlarında *S. aureus*'un büyüme profilinde zamana bağlı değişim



Şekil 4.44 *T. spicata* ekstraktının değişen konsantrasyonlarında *S. aureus*'un büyüme profilinde zamana bağlı değişim

Şekil 4.1

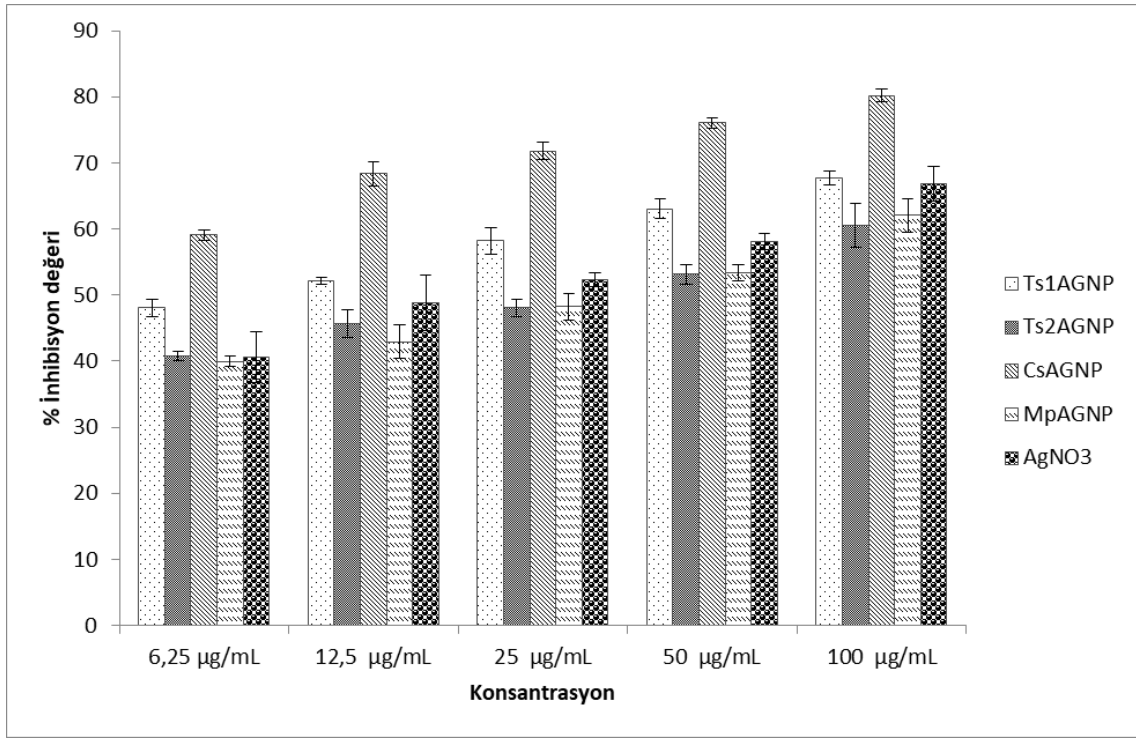
4.1.4 AgNP'lerin Antibiyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi



Şekil 4.45 Congo Red Agar'da slime üretiminin fenotipik ekspresyonu. A: siyah koloniler, biyofilm üreticisi ; B: kırmızı koloniler, biyofilm üreticisi olmayan.

Şekil 4.45'de *S. aureus* suşlarının Congo Red Agar'da slime üretiminin fenotipik ekspresyonu görünmektedir ve NP'lerin antibiyofilm etkinlikler biyofilm üreticisi olduğu doğrulanan siyah koloniler meydana getiren suş ile gerçekleştirildi. Şekil 4.46'daki sonuçlar, AgNP'lerin konsantrasyona bağlı biyofilm oluşum inhibisyonunu göstermektedir. Veriler 6.25 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ 'de konsantrasyon aralığında 24 saat uygulamadan sonra oluşan biyofilm inhibisyon yüzdelerini göstermektedir.

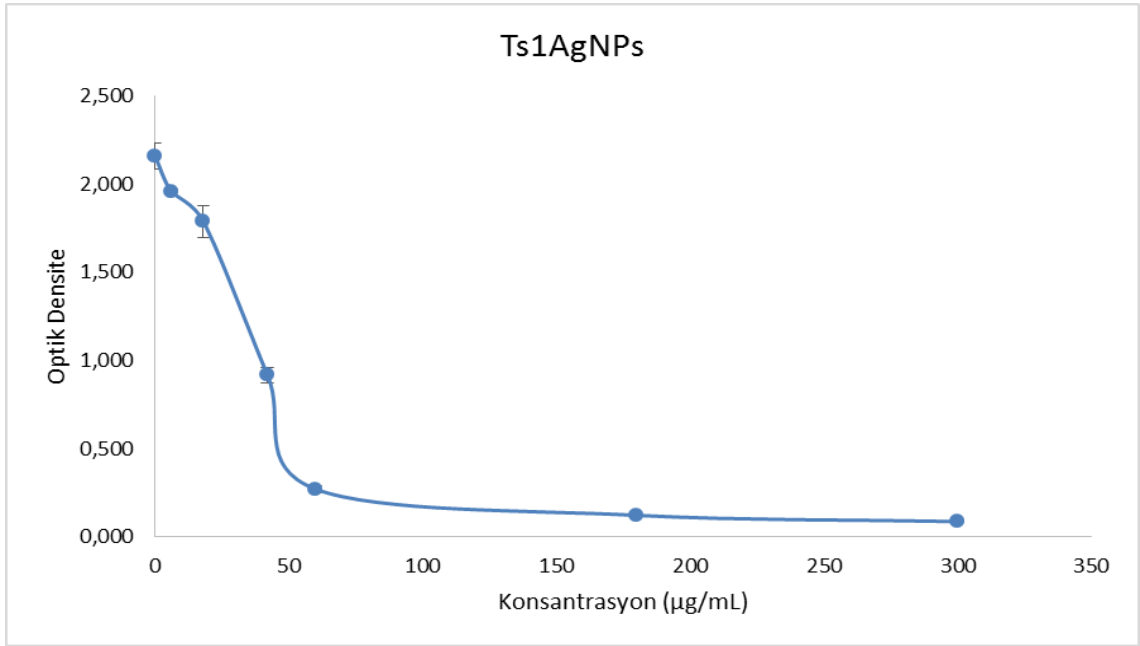
CsAgNP 6.25 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ 'de *S. aureus* tarafından oluşturulan biyofilmlerin oluşumunu $\% 59 \pm 0.7$ 'sini ve $\% 80 \pm 0.9$ 'unu inhibe ederken Ts1AgNP, Ts2AgNP, MpAgNP ve AgNO_3 'e kıyasla en yüksek inhibisyon değerini gösterdi. 100 $\mu\text{g/mL}$ 'de sırası ile Ts1AgNP, Ts2AgNP ve MpAgNP için $\% 68 \pm 1.0$, $\% 61 \pm 3.3$ ve $\% 62 \pm 2.5$ sayısal değerinde *S. aureus* biyofilm oluşum inhibisyon değeri görüldü. 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 'de ise sırası ile Ts1AgNP, Ts2AgNP ve MpAgNP için $\% 48 \pm 1.3$, $\% 41 \pm 0.8$ ve $\% 40 \pm 0.8$ inhibisyon değeri bulundu.



Şekil 4.46 Sentezlenen AgNP'lerin *S. aureus*'a karşı göstermiş oldukları antibiyofilm aktivitelerinin % inhibisyon değeri

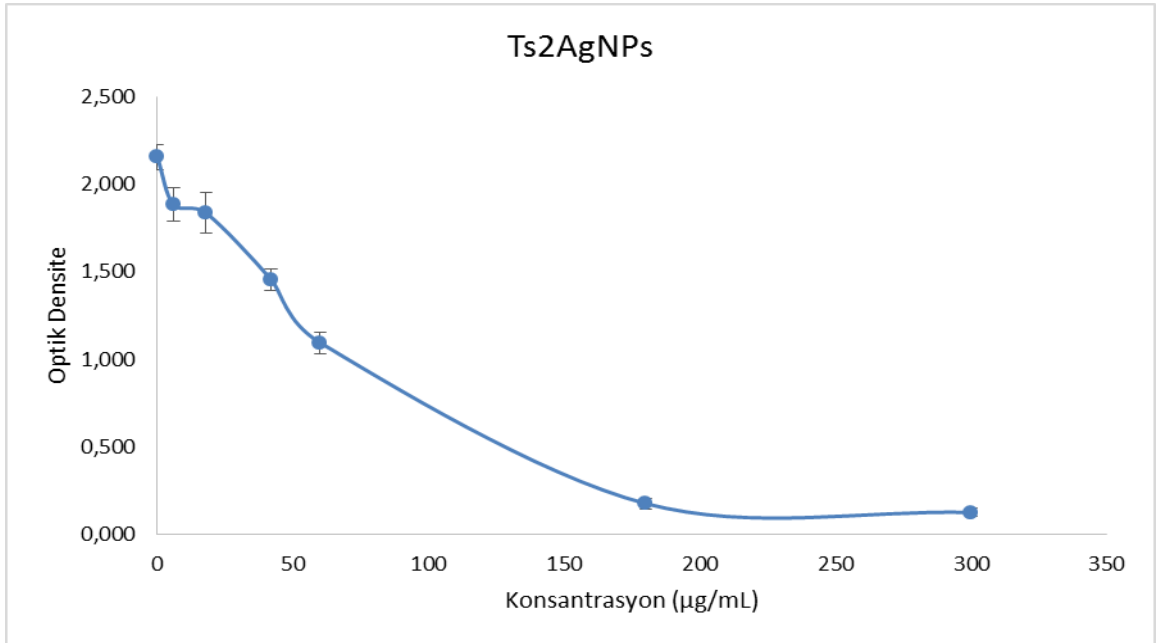
4.1.5 AgNP'lerin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

XTT'nin prensibi, XTT'nin mitokondriyal aktivite sonucu turuncu renkli suda çözünür boyaya dönüştürülmesine dayanmaktadır. Yalnızca canlı hücreler XTT reaktanını dönüştürme özelliğine sahiptir, bu nedenle optik absorpsiyon değeri doğrudan hücre canlılığı ile ilgilidir. L929 hücrelerindeki Ts1AgNP, Ts2AgNP, CsAgNP ve MpAgNP'in XTT sonuçları sırasıyla Şekil 4.47, 4.48, 4.49 ve 4.50'de gösterildi. Şekil 4.1-48, Ts1AgNP'lerin L929 hücreleri üzerindeki etkisini göstermektedir. Hücrenin yaşayabilirliği, NP'lerin artmış konsantrasyonları ile önemli derecede etkilenmiştir. Şekil 4.47'e göre, hücre yaşayabilirliği, 50 ug/mL konsantrasyonda düşmüştür.



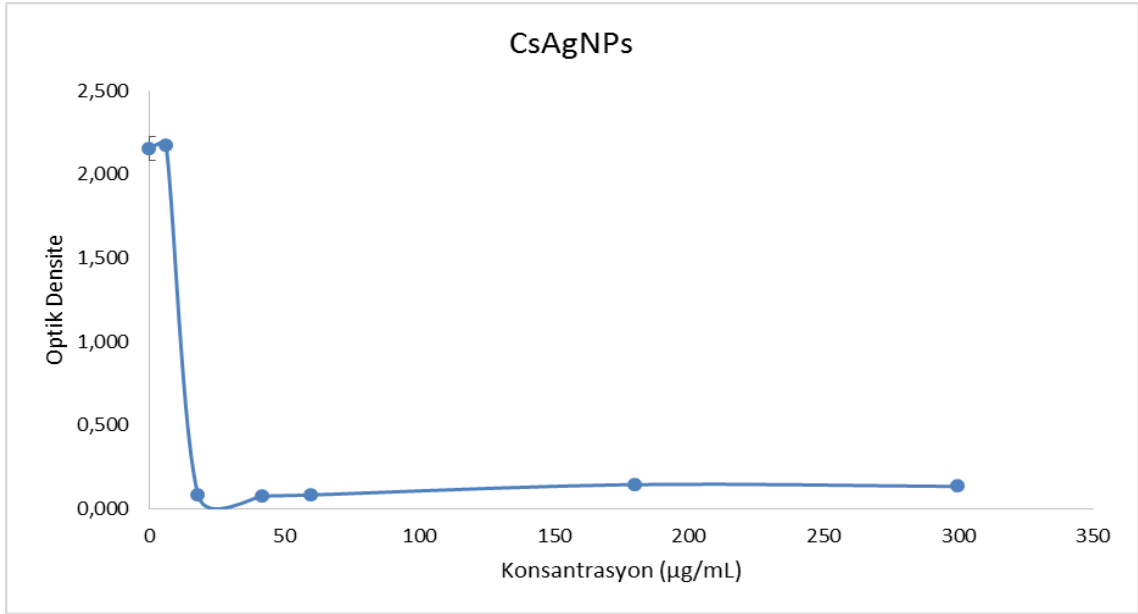
Şekil 4.47 Ts1AgNP'lerin L929 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi

Şekil 4.48, Ts2AgNP'lerin hücreler üzerindeki toksik etkisini gösterir ve şekilde görüldüğü gibi, hücreler canlılığını yaklaşık 150 ug/mL konsantrasyonunda tamamen kaybederler.



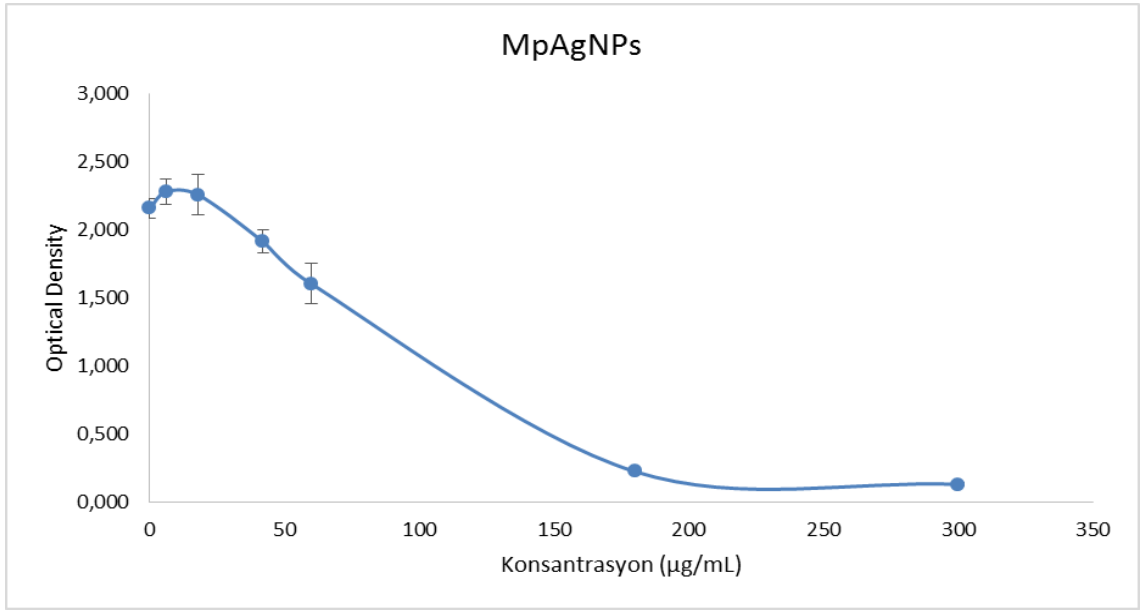
Şekil 4.48 Ts2AgNP'lerin L929 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi

CsAgNP'ler, diğerleri NP'ler arasında, Şekil 4.49'da görüldüğü gibi en toksik AgNP'lerdir. Elde edilen sonuçlar, CsAgNP'lerin hem antibakteriyel hemde sitotoksik aktivitelerinin diğer NP'lere göre oldukça yüksek olduğunu gösterdi ve bunun da bitki içeriğindeki özgün biyomoleküllerden kaynaklandığı düşünülmektedir.



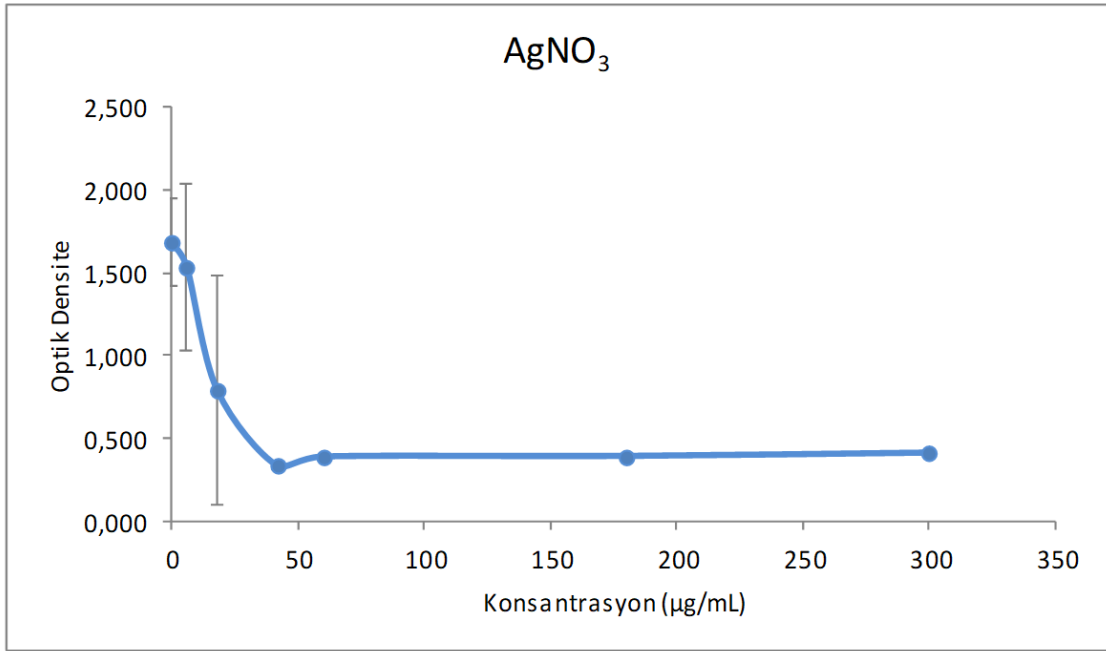
Şekil 4.49 CsAgNP'lerin L929 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi

MpAgNP'lerin toksisite profili, Ts2AgNP'lerle benzerdir ve incelenen NP'ler arasında en az toksik etkiye sahiptir. Hücreler yaklaşık 150 ug/mL konsantrasyonunda canlılıklarını kaybettiler (Şekil 4.50). Şekil 4.51'de ise AgNO₃'ün L929 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi görülmektedir.



Şekil 4.50 MpAgNP'lerin L929 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi

Şekil 4.1

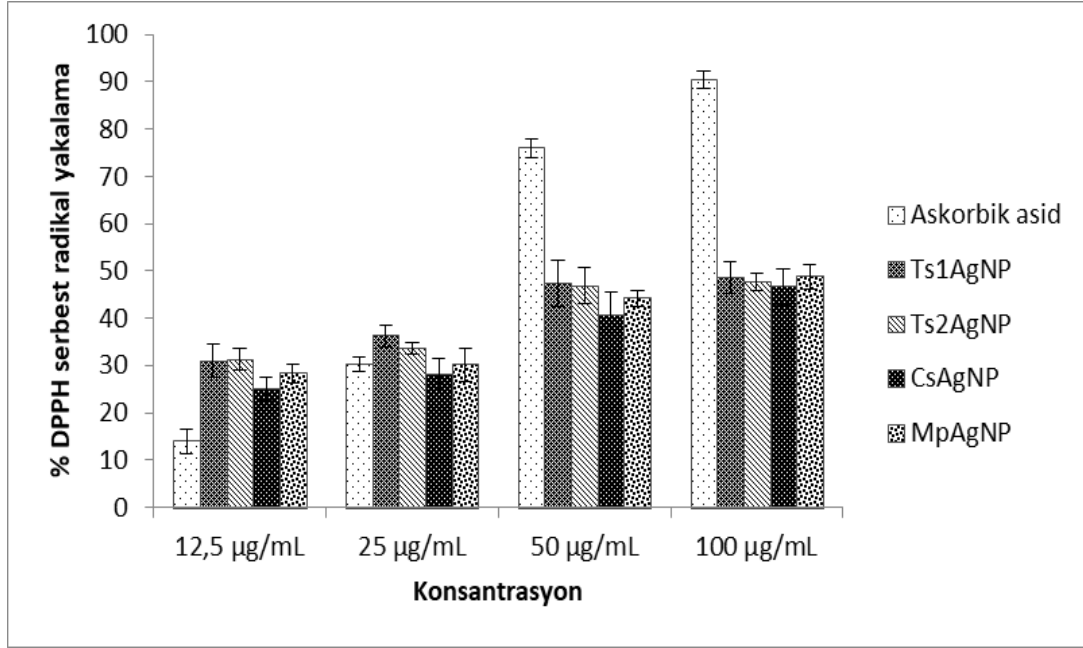


Şekil 4.51 AgNO₃'ün L929 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi

4.1.6 AgNP Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi

Oksidatif stres, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli kronik hastalıkların başlıca nedeni olarak tanımlanmıştır [219]. AgNP'lerin antioksidan potansiyeli DPPH

serbest radikal giderim aktivitesi açısından değerlendirildi ve sonuçlar Şekil 4.52’de sunuldu. AgNP’lerin DPPH radikal giderim aktivitesi doza bağımlıydı ve en yüksek inhibisyon 100 µg/mL konsantrasyonunda % 48.8 sayısal değeri ile MpAgNP’ler gösterdi. Pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asit 100 µg/mL için % 90.3 sayısal değerinde aktivite gösterdi.



Şekil 4.52 AgNP’lerin göstermiş oldukları % DPPH serbest radikal giderim aktivite değerleri

4.2 Bakır Oksit NP’ler

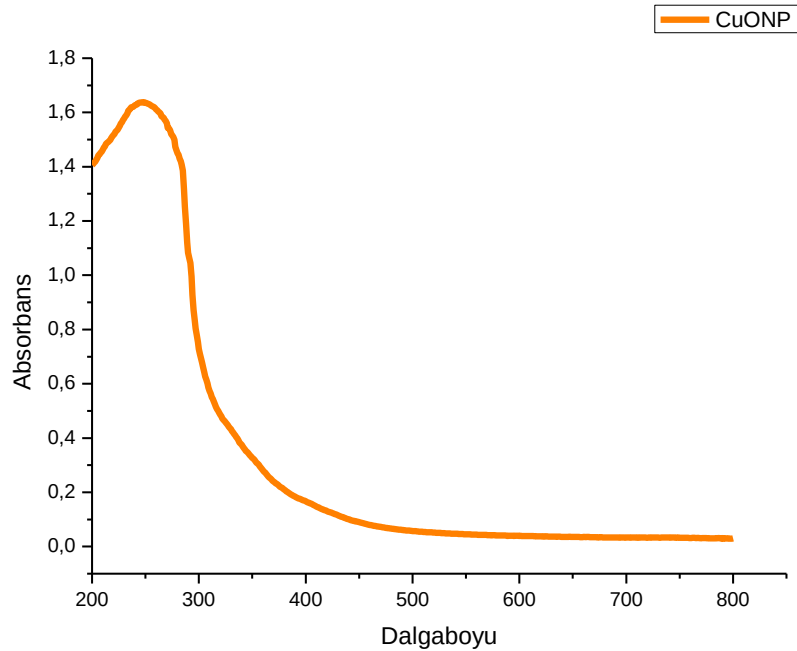
4.2.1 CuONP Sentez ve Karakterizasyonu

Bu çalışmada, CuONP *T. spicata* yaprakları kullanılarak, herhangi bir zararlı indirgeyici veya kaplayıcı madde kullanılmadan, organik çözücüler yerine su çözücü olarak ekstrakte edilmiş solüsyon kullanılarak sentezlenmiştir. NP’lerin sentezinde, bitki özü hem indirgeyici hem de kapayıcı (capping) ajanlar olarak hareket edebilir. Şekil 4.53’de *T. spicata* yaprak ekstraktı CuSO₄.5H₂O karışımı sonrası CuONP sentezini gösteren renk değişimi gösterildi.



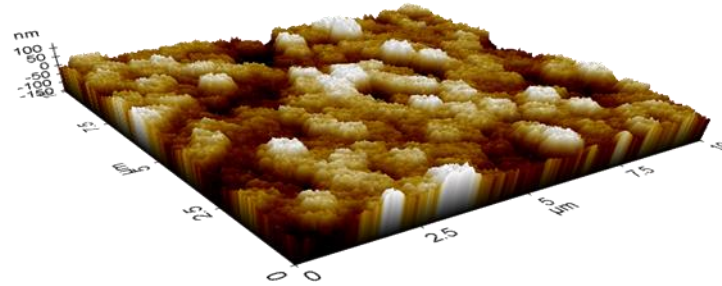
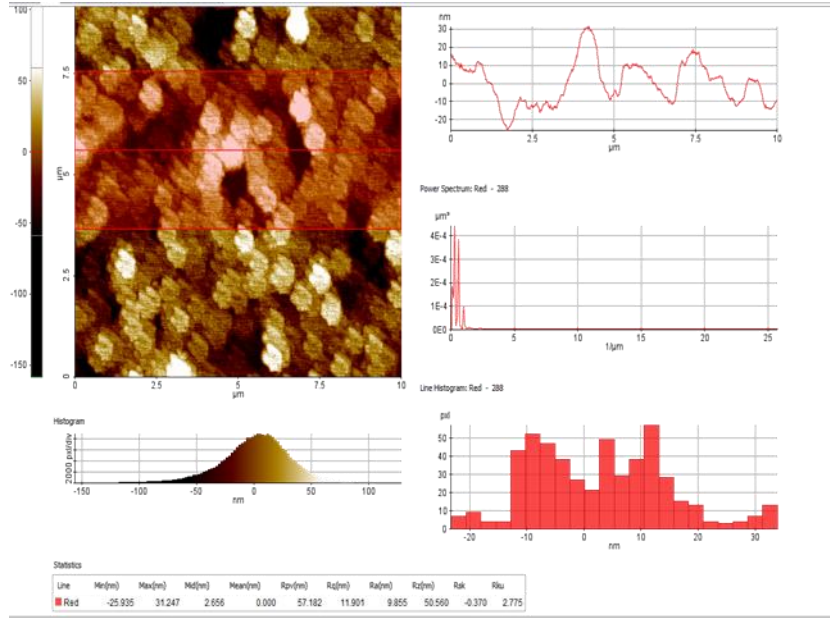
Şekil 4.53 *T. spicata* yaprak ekstraktı $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ karışımı sonrası CuONP sentezini gösteren renk değişimi

CuONP sentezi 4 saat boyunca 80 °C'de karışım karıştırılarak gerçekleştirildi. CuONP'lerin oluşumu UV-Vis spektroskopisi ile kontrol edildi. Şekil 4.54, CuONP oluşumunun UV-Vis spektrumunu göstermektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar, yeşil sentezlenmiş CuONP'lerin maksimum absorbansının, nano boyutlu kuprik oksit partiküllerin yüzey plazmon emilimine bağlı olarak 247 nm'de olduğunu gösterdi. Reaksiyonun rengini değişmesi ve maksimum pik değerinin 247 nm'de gerçekleşmesi redüksiyon işlemini ve NP'lerin oluşumunu gösterdi.



Şekil 4.54 *T. spicata* ekstraktı aracılığı ile sentezlenen CuONP'lerin UV-Vis spektrumu

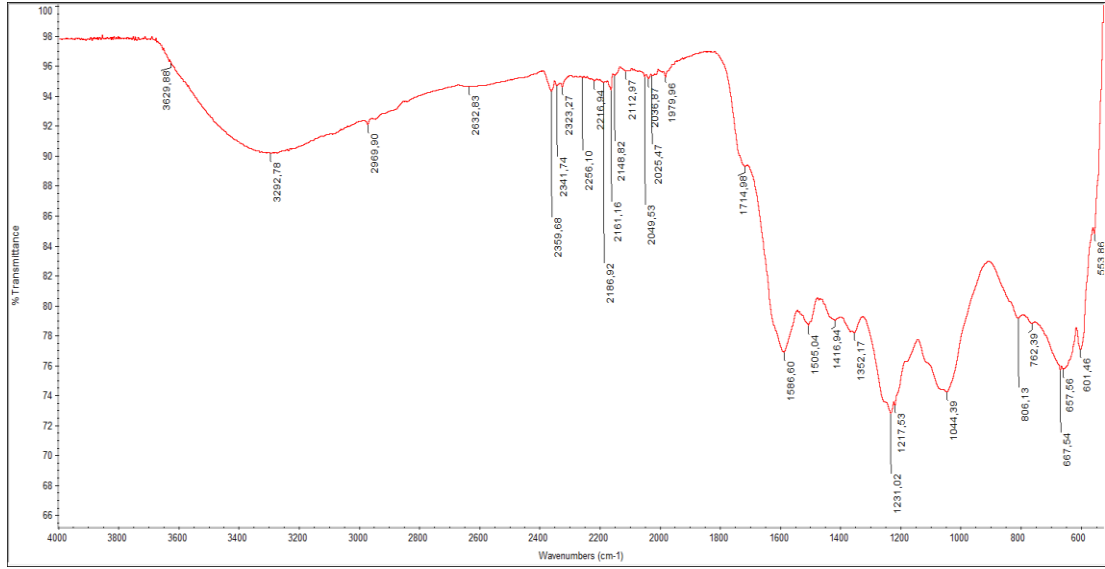
Ts2CuONP'lerin yüzey morfolojisini ve 3D topoğrafyasını incelemek için AFM analizi gerçekleştirildi (Şekil 4.55). AFM analizi sonucunda çoğunlukla Ts2CuONP'lerin 50 nm civarında bir parçacık boyutuna sahip oldukları ve küresel formasyon gösterdikleri belirlendi.



Şekil 4.55 Ts2CuONP AFM analizi

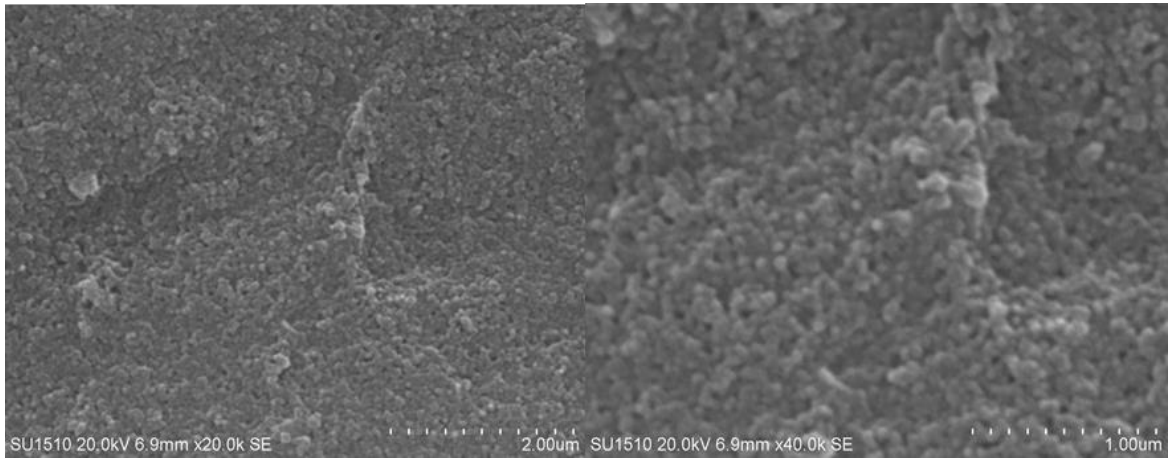
Şekil 4.56'da gösterildiği gibi ortaya çıkan CuONP'lerin yüzey yapısını karakterize etmek için FTIR analizi gerçekleştirildi. Görünen bantlar, NP'ler üzerine adsorbe edilen biyomoleküllerin fonksiyonel gruplarını gösteren kafes titreşim modlarıdır. CuO nanopartiküllerin FTIR spektrumları, CuONP'lerin oluşumunu doğrulayan Cu-O titreşimlerine atfedilebilecek 400-600 cm^{-1} bölgesinde titreşimler sergiledi. Cu-O fonksiyonel grubun titreşimlerine bağlı olarak 601 cm^{-1} 'de bir absorpsiyon bandı

görüldü. Hidroksil fonksiyonel grupların gerilme hareketlerine karşılık gelen bölgede 3200-3500 cm^{-1} yoğun ve geniş bir bant ortaya çıktı [220]. CuONP için yapılan FTIR analizinde gözlemlenen pikler 3292.78, 2359.68, 2161.,16, 1586.60, 1505.04, 1352.17, 1231.02, 1044.39, 806.13, 667.54 ve 601.46 sayısal değerleri gösteren piklerden oluşmaktadır. *T. spicata* ekstraktında ise görülen pikler daha öncede ifade edildiği gibi 3322.89, 1634.51 ve 599.62 cm^{-1} 'de görüldü.



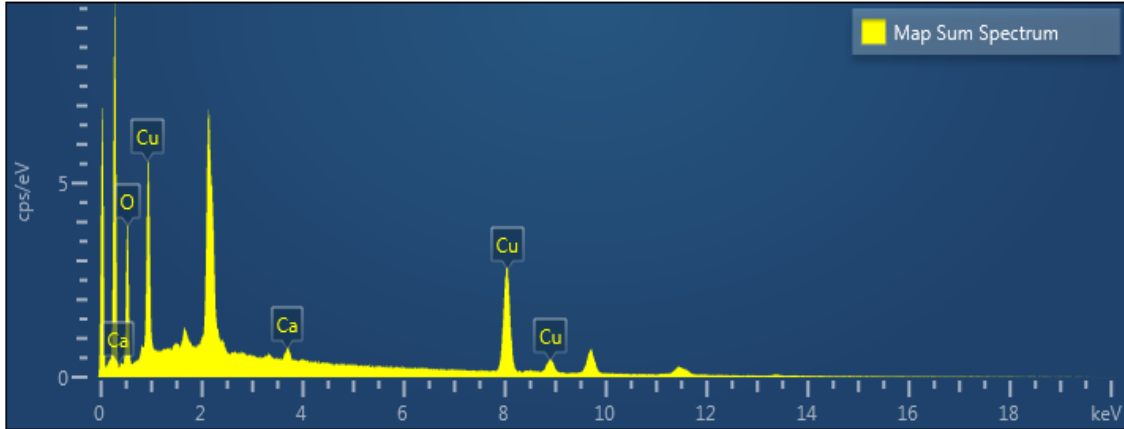
Şekil 4.56 Ts1CuONP FTIR analizi

Şekil 4.57’de elde edilen Ts1CuONP’ SEM görüntüleri görünmektedir. Genellikle nanopartiküllerin küresel formasyon gösterdikleri görüldü.



Şekil 4.57 Ts1CuONP SEM görüntüsü

T. spicata yaprak ekstraktı aracılığı ile elde edilen biyosentezlenmiş CuONP'lerin enerji-dispersif X-ışını spektrumu (EDS), Şekil 4.58'de gösterildi; ve spektrumlarda kalsiyum, oksijen ve bakır ile ilgili sinyaller gözlemlendi. Bakır bölgesindeki güçlü sinyaller CuONP'lerin oluşumunu doğruladı. Metalik Cu nanokristalleri genellikle yüzeysel Plasmon rezonansı nedeniyle yaklaşık 1.0 ve 8.0 keV'de tipik optik absorpsiyon pikleri gösterirler.

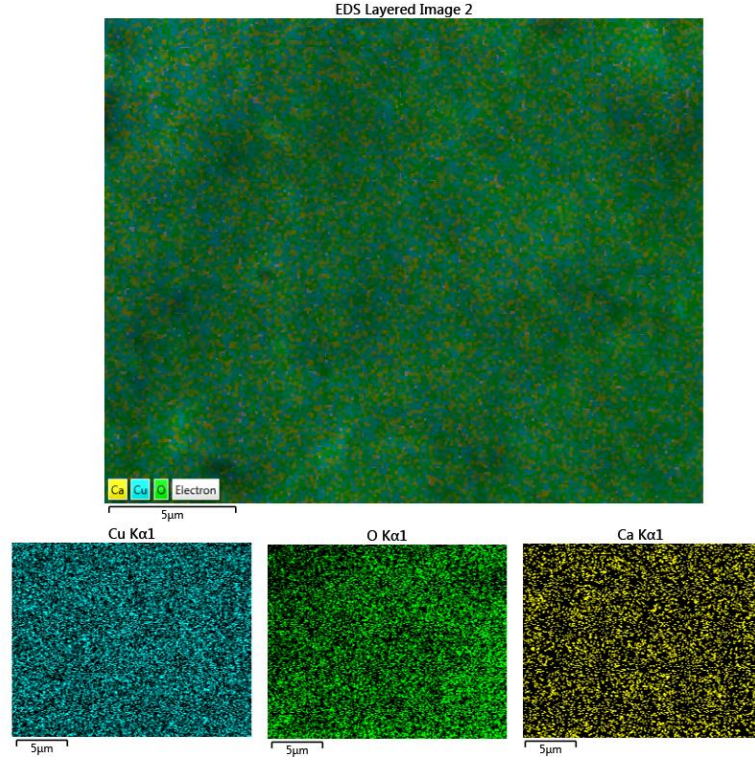


Şekil 4.58 Ts1CuONP EDS spektrumları

Hazırlanan CuONP'lerin EDS analizi, her element yüzdesinin Cu (% 34.40), O (% 64.68) ve Ca (% 0.93) olduğunu gösterdi (Çizelge 4.14). Ayrıca EDS analiz ile görülen elementlerin alan harita analizleride gerçekleştirildi (Şekil 4.59).

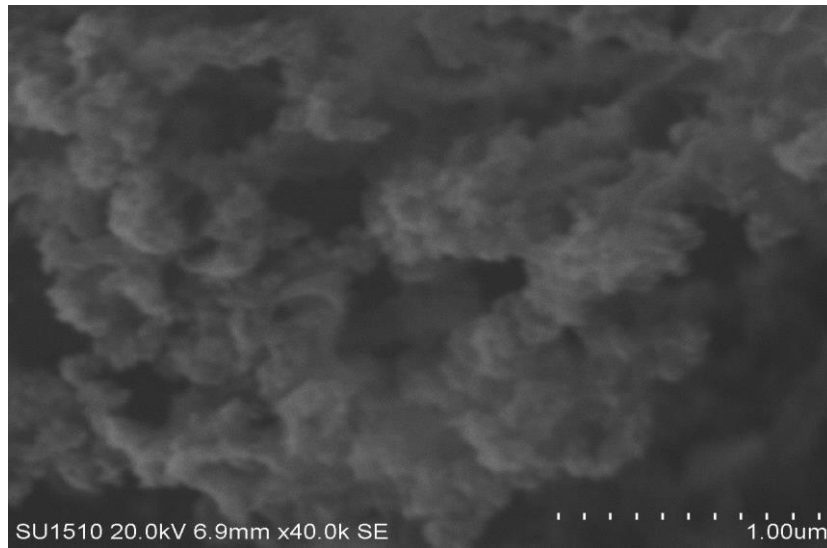
Çizelge 4.14 Sentezlenen CuONP'lerin EDS analizine göre elementlerin ağırlıkça yüzdeleri

Element	Weight %	Weight % Sigma
Cu	34.40	0.34
Ca	0.93	0.06
O	64.68	0.34
Total	100.00	



Şekil 4.59 Ts1CuONP elementel analizi

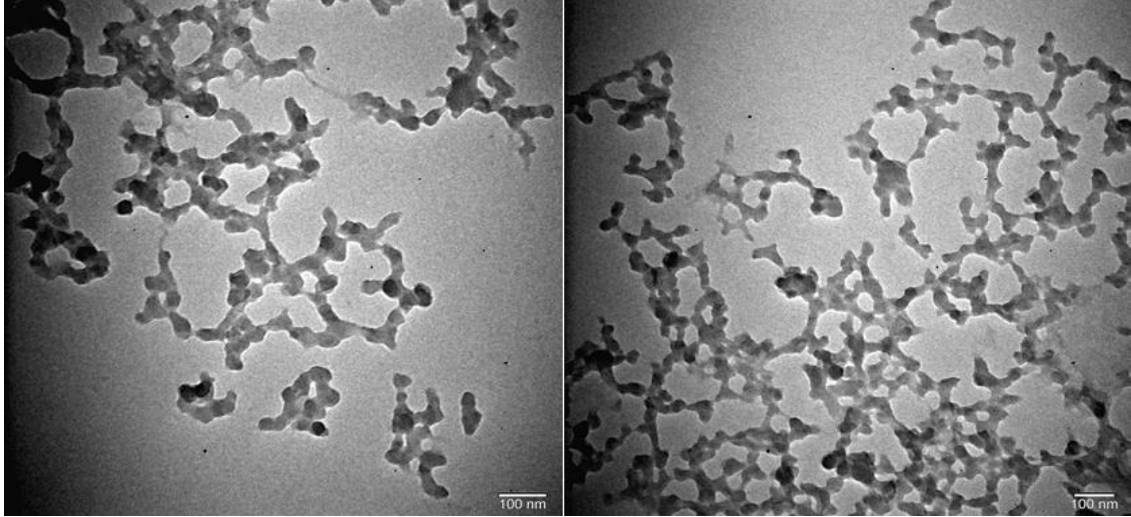
Şekil 4.60'da elde edilen Ts2CuONP' SEM görüntüleri görünmektedir. Genellikle nanopartiküllerin küresel formasyon gösterdikleri görüldü.



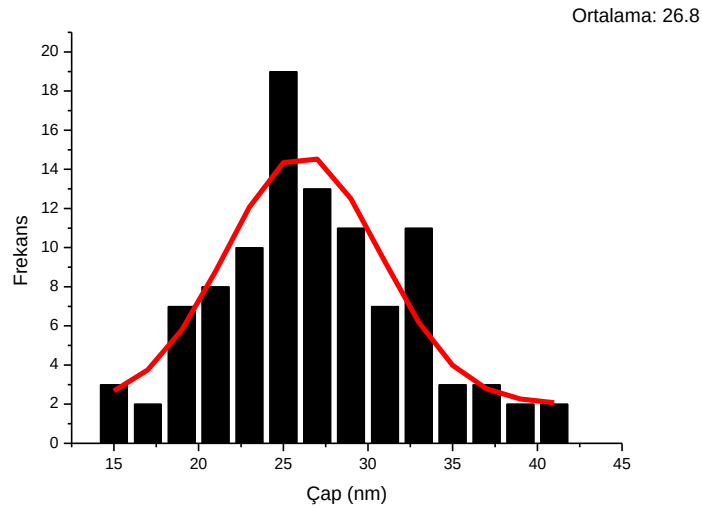
Şekil 4.60 Ts2CuONP SEM görüntüsü

CuONP'lerin morfolojik karakterizasyonu ve boyut değişimi TEM kullanılarak incelendi. Transmisyon elektron mikroskobu, CuONP'lerin morfolojisi, şekli ve büyüklüğü

hakkında daha fazla bilgi vermiştir. Sentezlenen CuONP'lerin TEM görüntüsü, neredeyse küresel morfolojiye sahip CuONP'lerin oluştuğunu ve aglomerasyon olmaksızın nispeten iyi bir monodispersitenin ortaya çıktığını ortaya koymuştur (Şekil 4.61 ve 4.63). TEM ile çap ölçümleri sonucunda Ts1CuONP çap dağılımının analizinden elde edilen rastgele seçilmiş 100 partikülün histogramından elde edilen sonuçlar baz alındığında ortalama tanecik çapı 26.8 nm ve boyut dağılımının 14.35 ila 40.7 nm arasında olduğu belirlendi (Şekil 4.62).



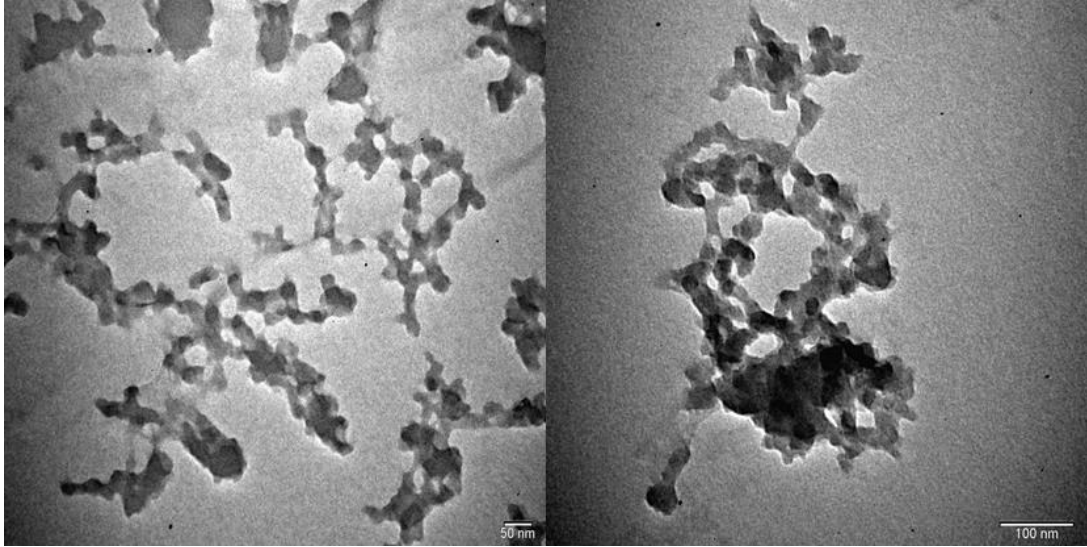
Şekil 4.61 Ts1CuONP TEM analizi



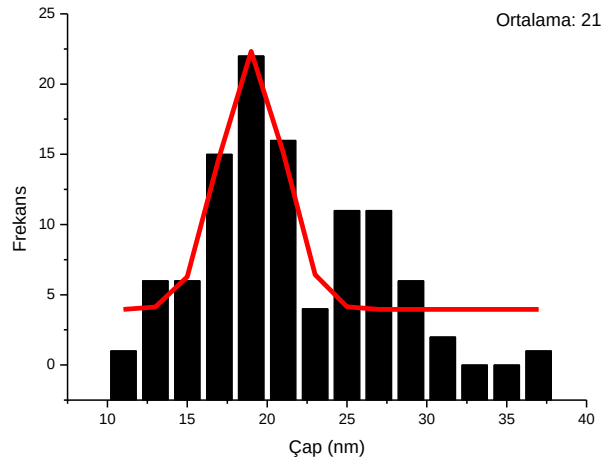
Şekil 4.62 Ts1CuONP TEM ortalama büyüklük dağılımı

Ts2CuONP'lerin çap dağılımı, 11.5 ile 36.6 nm arasındaydı, ortalama partikül çapı 21 nm'dir (Şekil 4.64). 20 mL ve 40 mL özüt kullanılarak sentezlenen CuONP'ler

AgNP'lerdeki gibi ekstrakt konsantrasyonun değişimine göre şekilsel olarak farklılık göstermemektedir. Buna rağmen, AgNP'lerdeki gibi ekstrakt konsantrasyonunun artışıyla NP ortalama çapı küçülmüştür. Bunlara ek olarak sentezlenen bakır nanopartiküllerin tanecik çapları kullanılan ekstrakt konsantrasyonuna bağlı olarak ciddi oranda farklılıklar oluşturmamıştır. Elde edilen bakır nanopartiküllerin tamamı küresel formasyon göstermektedir.



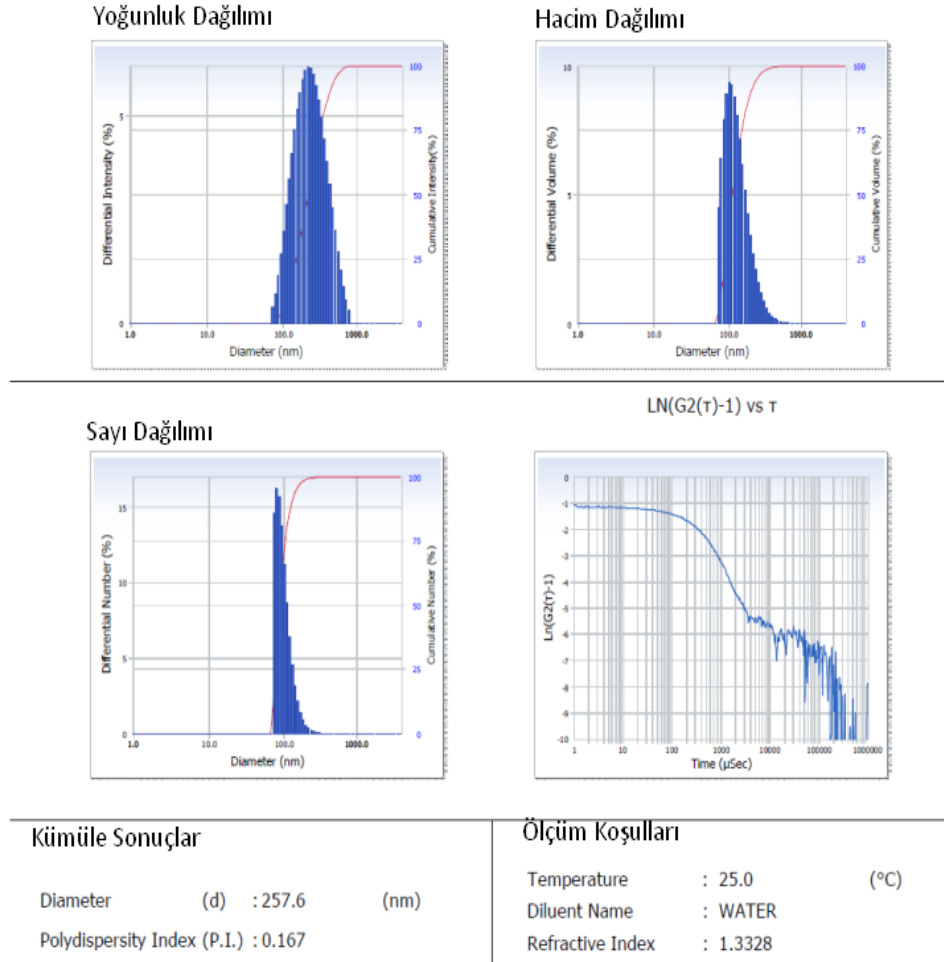
Şekil 4.63 Ts2CuONP TEM analizi



Şekil 4.64 Ts2CuONP TEM ortalama büyüklük dağılımı

Reaksiyon karışımlarındaki AgNP'lerin ortalama parçacık boyutu, boyut dağılımı ve PDI'sı DLS yöntemi ile belirlendi. DLS ile belirlenen çözeltideki NP'lerin ortalama

parçacık boyutu dağılımı 257.6 nm polidispersite indeksi ise (PDI) 0.167 olarak Ts1CuONP için elde edildi(Şekil 4.65). DLS analizi sonucunda ortaya Ts1CuONP ortalama parçacık çap büyüklüğü için çıkan sayısal değerler yoğunluk dağılımında 264.3 nm, hacim dağılımında 141.1 nm ve sayı dağılımında 103.4 nm olarak tespit edildi (Çizelge 4.15).

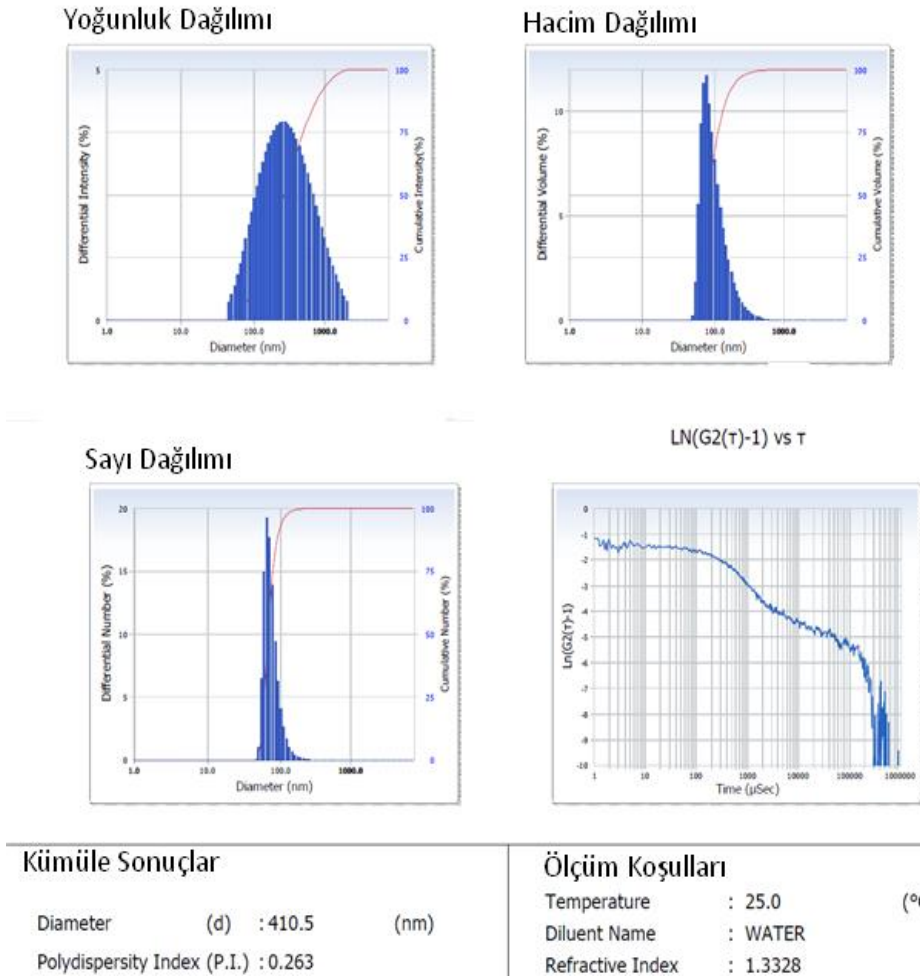


Şekil 4.65 Ts1CuONP DLS analiz sonuçları

Çizelge 4.15 Ts1CuONP DLS analizi sonucunda ortaya çıkan sayısal değerler

Yoğunluk Dağılımı		Hacim Dağılımı		Sayı Dağılımı	
Çap (nm)	Standart sapma	Çap (nm)	Standart sapma	Çap (nm)	Standart sapma
264.3	133.5	141.1	61.9	103.4	28.9

DLS ile belirlenen çözeltideki NP'lerin ortalama parçacık boyutu dağılımı Ts2CuONP için 410.5 nm polidispersite indeksi ise (PDI) 0.263 olarak elde edildi (Şekil 4.66). DLS analizi sonucunda ortaya Ts2CuONP ortalama parçacık çap büyüklüğü için çıkan sayısal değerler yoğunluk dağılımında 423 nm, hacim dağılımında 114.1 nm ve sayı dağılımında 81.3 nm olarak tespit edildi (Çizelge 4.16).

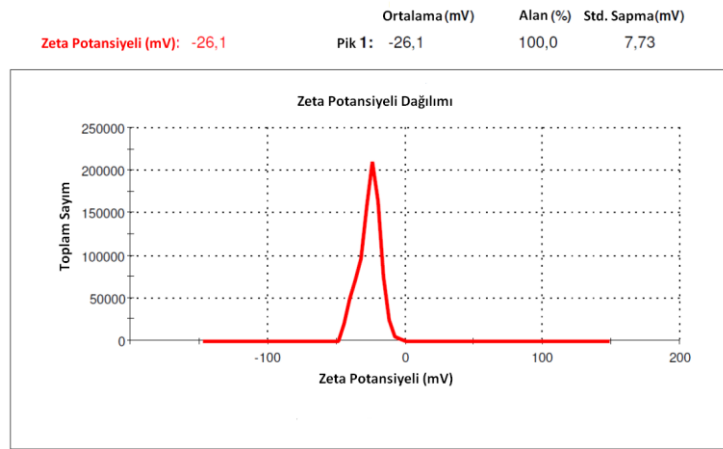


Şekil 4.66 Ts2CuONP DLS analiz sonuçları

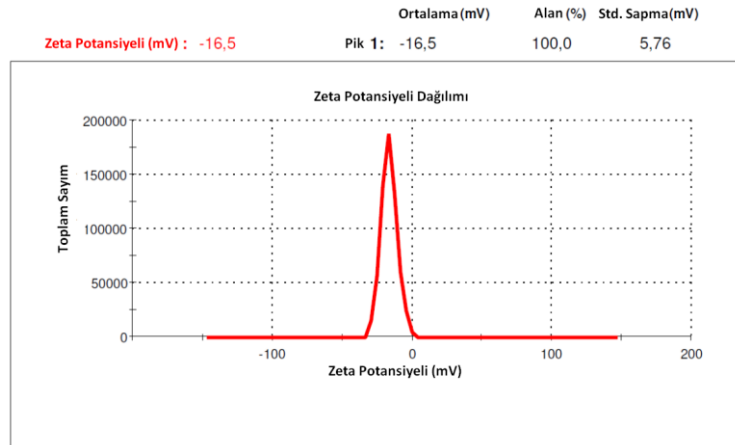
Çizelge 4.16 Ts2CuONP DLS analizi sonucunda ortaya çıkan sayısal değerler

Yoğunluk Dağılımı		Hacim Dağılımı		Sayı Dağılımı	
Çap (nm)	Standart sapma	Çap (nm)	Standart sapma	Çap (nm)	Standart sapma
423.0	377.7	114.1	64.0	81.3	22.1

Yapılan zeta ölçümlerine göre, Ts1CuONP ve Ts2CuONP'lerin zeta değerleri sırası ile -26.1 ve 16.5 olarak belirlendi (Şekil 4.2-15 ve 4.2-16).



Şekil 4.67 Ts1CuONP zeta potansiyeli



Şekil 4.68 Ts2CuONP zeta potansiyeli

4.2.2 CuONP Antibakteriyel aktivitesinin Belirlenmesi

Seçilen Gram-pozitif bakterilerin ve Gram-negatif bakterilerin biyosentezlenmiş CuONP'lere *in vitro* duyarlılıkları, disk difüzyonu ve mikrodilüsyon yöntemleri ile belirlendi. NP'leri içeren diskler etrafındaki zon bölgesinin çapı (mm), Çizelge 4.17 ve Şekil 4.69'da gösterildi. Sonuçlara göre, Ts1CuONP'lerin, Ts2CuONP'lerin *B. cereus*'a karşı inhibisyon zonu 11.43 ± 0.15 , 10.93 ± 0.12 mm iken; Ts1CuONP, Ts2CuONP ile muamele edilmiş örneklerin *S. aureus*'a karşı saptanan maksimum inhibisyon zonu 15.25 ± 0.13 ve 10.22 ± 0.13 mm olarak belirlendi. Ts1CuONP ve Ts2CuONP

mumalesinden sonra kaydedilen inhibisyon zon çapı, *E. coli* ve *S. typhimurium* için gözlemlenmedi.

Çizelge 4.17 Disk difüzyon yöntemi ile bakteri suşlarına karşı CuONP'lerin mm cinsinden zon bölgeleri (çap)

		Ts1CuONP	Ts2CuONP
Gram Pozitif	<i>B. cereus</i> (ATCC 11778)	11.43 ± 0.15	10.93 ± 0.12
	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	15.25 ± 0.13	10.22 ± 0.13
Gram Negatif	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	–	–
	<i>S. typhimurium</i> (ATCC 14028)	–	–

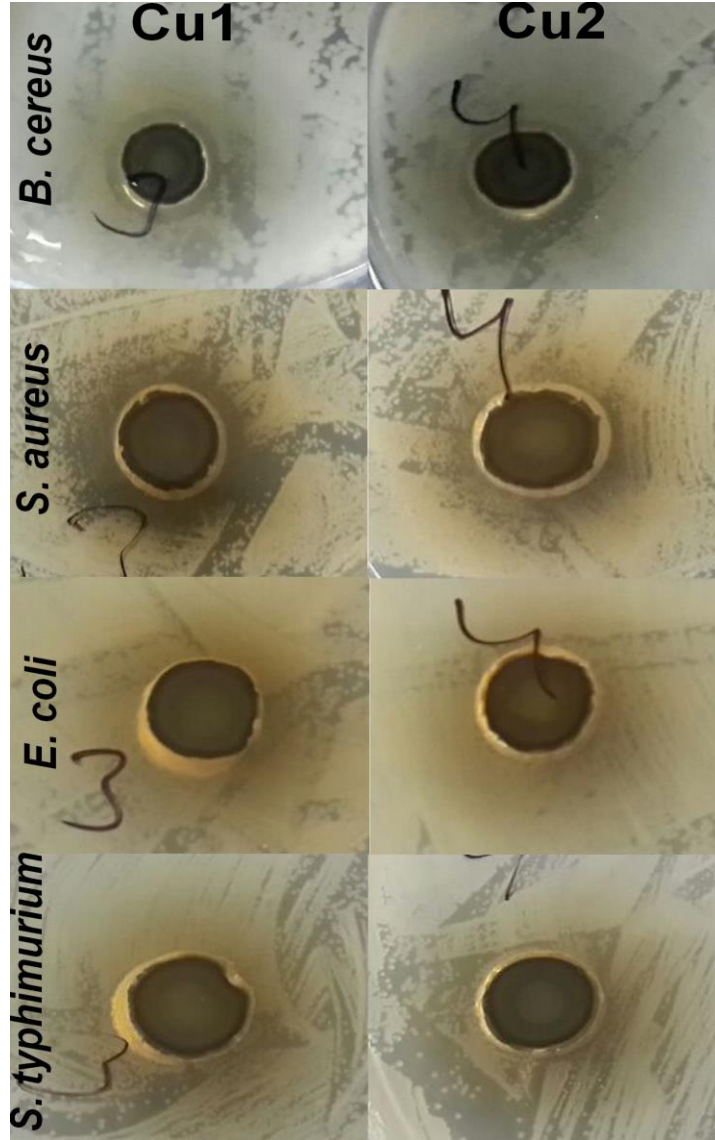
B. cereus = *Bacillus cereus*; *S. aureus* = *Staphylococcus aureus*, *E. coli* = *Escherichia coli*,
S. typhimurium = *Salmonella typhimurium*

* Tek tek veri noktaları ortalama ± standart sapma (ortalama ± SD) şeklinde ifade edildi.

– Bir antibakteriyel aktivite göstermez

NP'lerin 200 ila 1.56 µg/mL arasında değişen konsantrasyonları, Çizelge 4.18'de gösterilen MİK'lerini ve MBK'lerini belirlemek için test edildi. CuONP'lerin gram-pozitif bakterilere yönelik MİK ve MBK değerleri 100 ila 200 µg/mL arasında iken, NP'lerin MİK ve MBK değerleri gram negatif bakterilerde 200'den fazla olması sebebiyle daha yüksekti. Çizelge 4.18'de gösterilen sonuçlar temelinde Ts2CuONP'lerin MİK değerlerine kıyasla Ts1CuONP'lerin *B. cereus* ve *S. aureus* için daha düşük MİK değerlerine neden olduğunu göstermektedir. Ts1CuONP'nin MİK değerleri sırasıyla gram-pozitif bakterilerde 100 ve 100 µg/mL (100 ve 200 MBK) idi. Sırasıyla *B. cereus* ve *S. aureus*'da Ts2CuONP'ler için MİK değerleri sırasıyla 200 ve 200 µg/mL (200 MBK)

olarak bulundu. TS1CuONP ve TS2CuONP'lerin gram-negatif bakteriler için MİK değerleri tespit edilemedi. Cu iyon formunda ise elde edilen MİK ve MBK değerleri sırasıyla gram-pozitif bakterilerde 100 ve 200 µg/mL (200 MBK) iken gram-negatiflerde tespit edilemedi.



Şekil 4.69 Disk difüzyon yöntemi ile bakteri suşlarına karşı CuONP'lerin göstermiş oldukları antibakteriyal aktivite

Çizelge 4.18 Mikrodilüsyon yöntemi ile bakteri suşlarına karşı CuONP'lerin minimum inhibisyon ve bakterisidal konsantrasyonları (MİK ve MBK) (µg/mL)

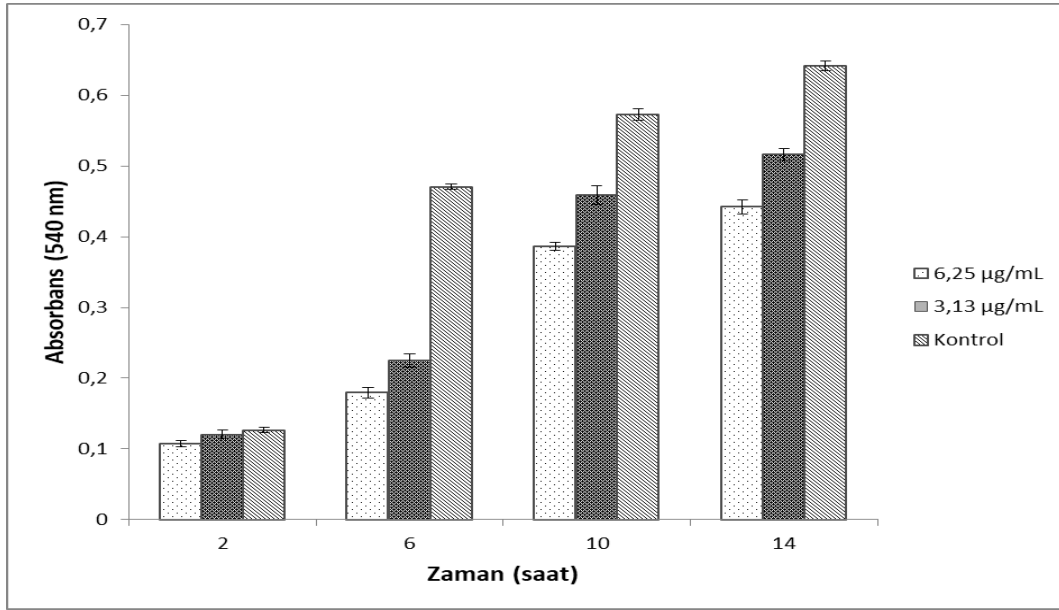
Örnekler	Gram Pozitif				Gram Negatif			
	<i>B. cereus</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. typhimurium</i>	
	MİK	MBK	MİK	MBK	MİK	MBK	MİK	MBK
Ts1CuONP	100	100	100	200	>200	>200	>200	>200
Ts2CuONP	200	200	200	200	>200	>200	>200	>200

Biyosentezlenmiş Ts1CuONP'lerin neden olduğu membran hasarı, ortama *S. aureus* hücre bileşenlerinin salınımının belirlenmesi ile teyit edilmiştir. Hazırlanan Ts1CuONP'lerin artan konsantrasyonları ile birlikte 280 ve 260 nm'de absorbansta bir artış gözlenmiştir (Çizelge 4.19). Bu sonuçlar Ts1CuONP'lerin bakteriyel membranı doza bağımlı bir şekilde yok ettiğini ve bunu periplazmik proteinlerin ve nükleik asitlerin ortama salınmasının takip ettiğini göstermektedir. Ts1CONP'ler için MİK ve 2xMİK miktarında maruz bıraktığımız bakterilerin hücre bileşenlerinin salınım tayinindeki elde ettiğimiz sonuçlarına göre 2XMİK konsantrasyonunda *S. aureus* için OD260 ve OD280 değerleri sırasıyla 0.17 ve 0.24 olarak ölçülürken, *B. cereus* için OD260 ve OD280 değerleri sırasıyla 0.18 ve 0.21 olarak ölçüldü.

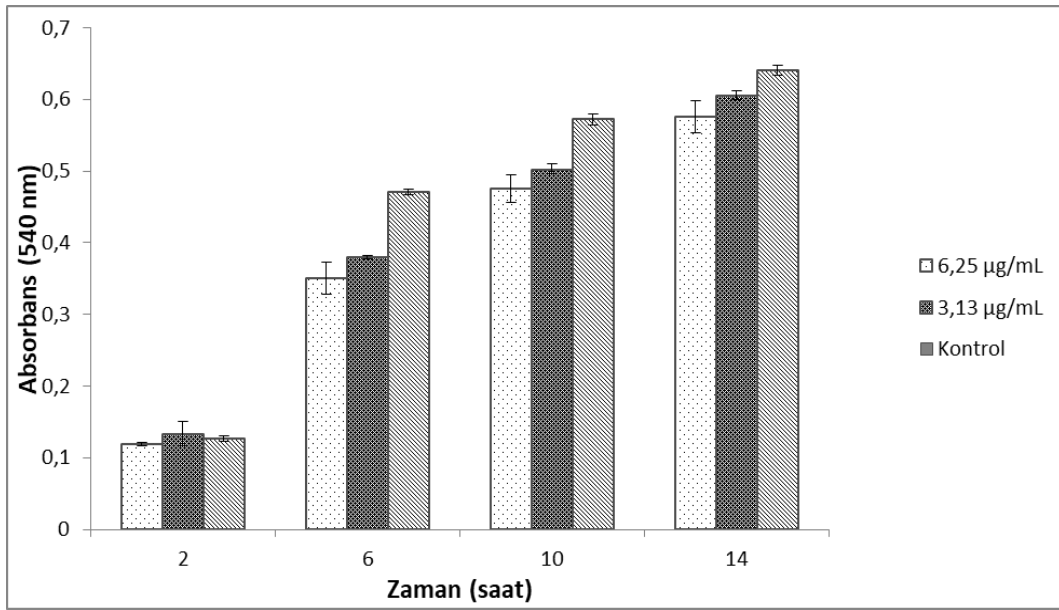
Çizelge 4.19 Ts1CuONP'ler ile muamele edilen bakterilerin hücre bileşenlerinin salınımının ölçülmesi

Mikroorganizmalar	Ts1CuONP konsantrasyonu	OD260	OD280
<i>B. cereus</i>	0	0.007	0.09
	MİK	0.14	0.17
	2xMİK	0.18	0.21
<i>S. aureus</i>	0	0.009	0.08
	MİK	0.15	0.18
	2xMİK	0.17	0.24

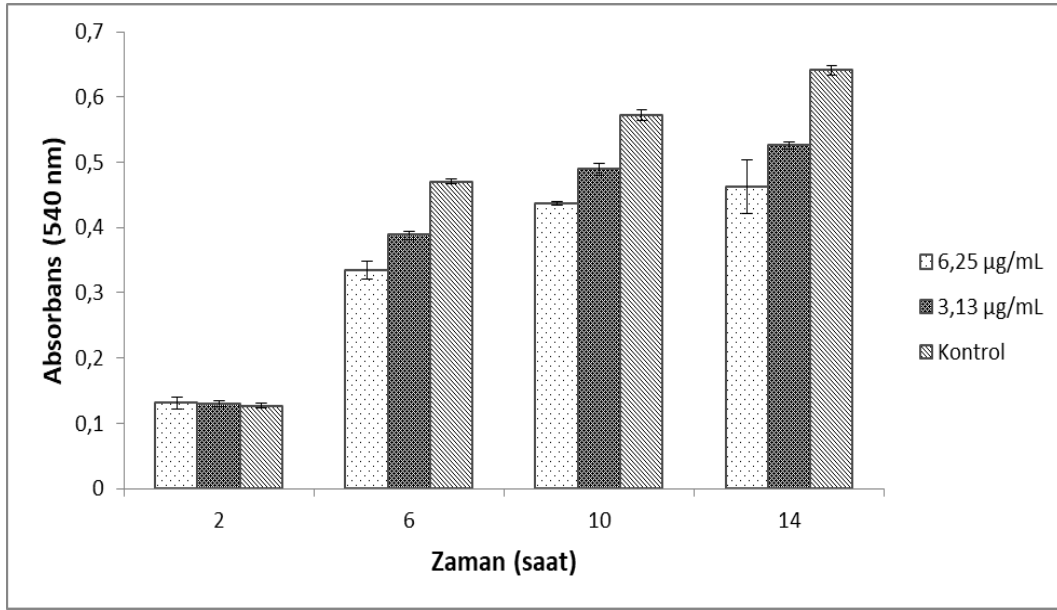
T. spicata sulu ekstraktı ile sentezlenen CuONP'lerin *S. aureus* büyüme kinetikleri üzerindeki etkisi bir spektrofotometre kullanılarak absorbansta meydana gelen artış olarak 540 nm'de ölçüldü. NP'lerin son konsantrasyonları 6.25 ve 3.13 µg/mL olacak şekilde çalışılmıştır. Ts1CuONP ile Ts2CuONP'yi kıyasladığımızda 6.25 µg/mL konsantrasyonda Ts1CuONP'nin *S. aureus*'un büyümesini daha da yavaşlattığı görülmektedir. Ts1CuONP, Ts2CuONP ve CuSO₄.5H₂O'ların sırası ile 14 saat sonunda 6.25 µg/mL konsantrasyonda 0.33, 0.47 ve 0.34'lük bir artış görüldü. 3.13 µg/mL konsantrasyonda ise Ts1CuONP, Ts2CuONP ve CuSO₄.5H₂O'ların sırasıyla 0.41.0.50 ve 0.41'lük bir absorban artış değeri kaydedildi (Şekil 4.70, 4.71 ve 4.72).



Şekil 4.70 Ts1CuONP'lerin değişen konsantrasyonlarında *S. aureus*'un büyüme profilinde zamana bağlı değişim



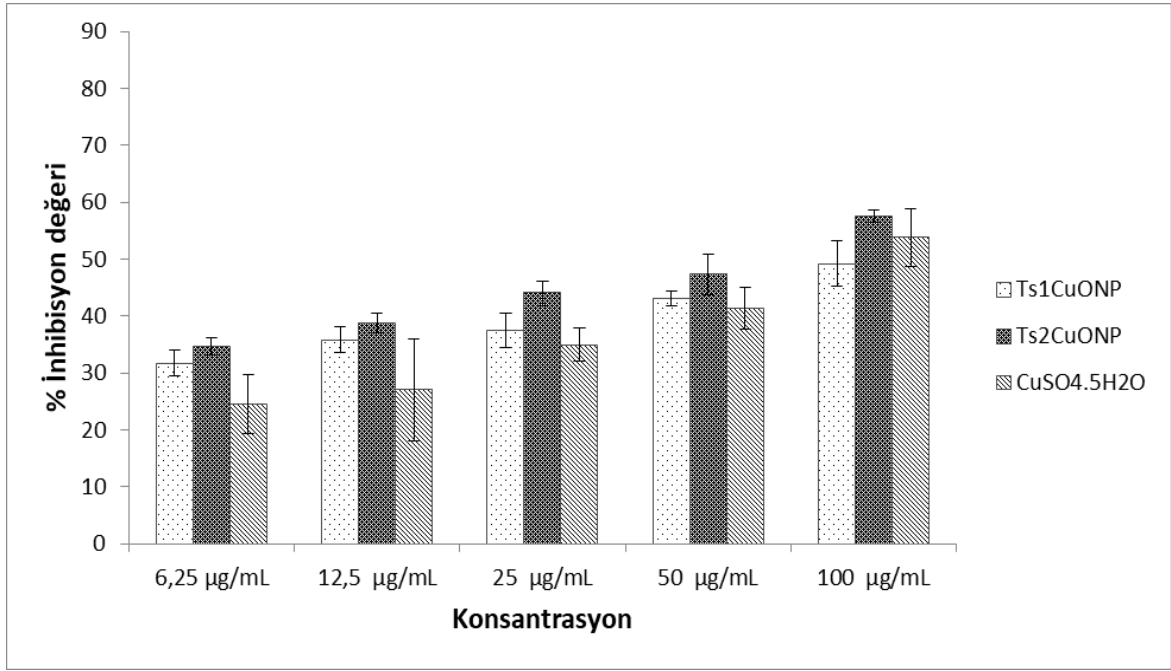
Şekil 4.71 Ts2CuONP'lerin değişen konsantrasyonlarında *S. aureus*'un büyüme profilinde zamana bağlı değişim



Şekil 4.72 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ değişen konsantrasyonlarında sonra *S. aureus*'un büyüme profilinde zamana bağlı değişim

4.2.3 CuONP Antibiyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi

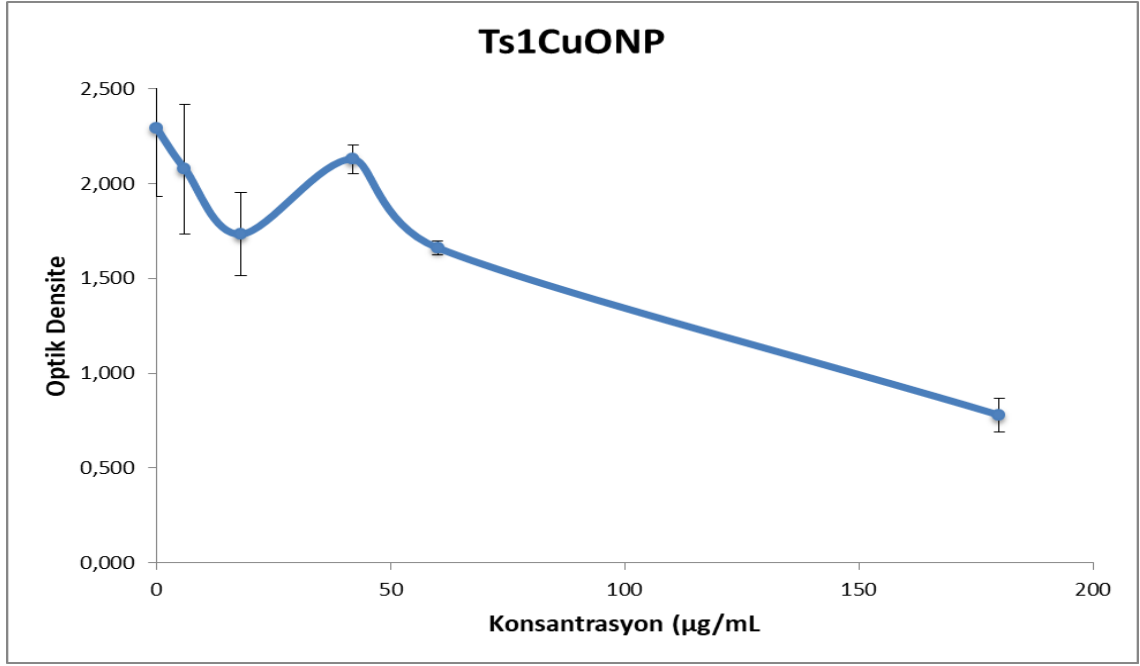
Şekil 4.73'teki sonuçlar, CuONP'lerin konsantrasyona bağlı biyofilm oluşum inhibisyonunu göstermektedir. Elde edilen veriler 6.25 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ 'de CuONP konsantrasyon aralığında 24 saat uygulamadan sonra oluşan biyofilm inhibisyon yüzdelerini göstermektedir. Ts2CuONP 6.25 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ 'de *S. aureus* tarafından oluşturulan biyofilmlerin oluşumunu $\% 34.6 \pm 1.48$ 'ini ve $\% 57.6 \pm 1.03$ 'ünü inhibe ederek Ts1CuONP ve $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 'ya kıyasla en yüksek inhibisyon değerini göstermiştir. 6.25 $\mu\text{g/mL}$ 'de sırası ile Ts1CuONP, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ için $\% 31.7 \pm 2.26$ ve $\% 24.6 \pm 5.19$ inhibisyon değeri görüldü. 100 $\mu\text{g/mL}$ 'de ise sırası ile Ts1CuONP, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ için $\% 49.8 \pm 4.0$ ve $\% 53.8 \pm 4.9$ sayısal değerinde *S. aureus* biyofilm oluşum inhibisyon değeri görüldü.



Şekil 4.73 Sentezlenen CuONP'lerin *S. aureus*'a karşı göstermiş oldukları antibiyofilm aktivitelerinin % inhibisyon değeri

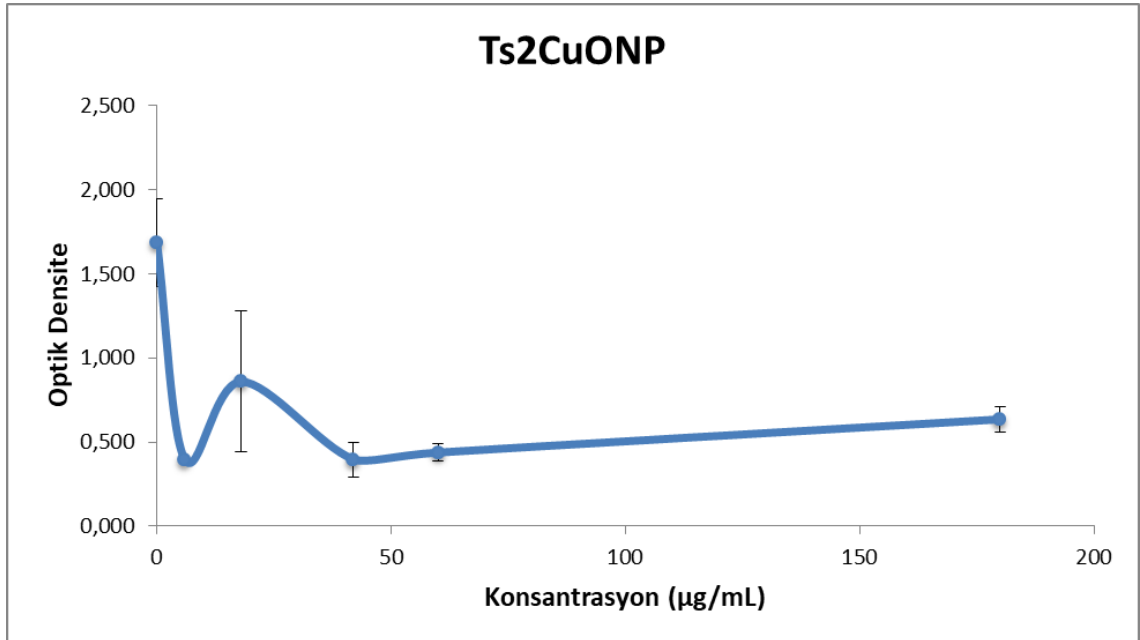
4.2.4 CuONP Sitotok Etkisinin ve Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi

L929 hücrelerindeki Ts1CuONP, Ts2CuONP ve CuSO₄.5H₂O'nun toksisiteleri XTT testinden elde edilen sonuçlar sırasıyla gösterilmektedir. Hücre canlılığı, NP'lerin artmış konsantrasyonları ile önemli derecede etkilenmiştir. Şekil 4.74, Ts1CuONP'lerin hücreler üzerindeki toksik etkisini gösterir ve şekilde görüldüğü gibi, hücreler canlılığını yaklaşık 180 µg/mL konsantrasyonunda tamamen kaybetmişlerdir.

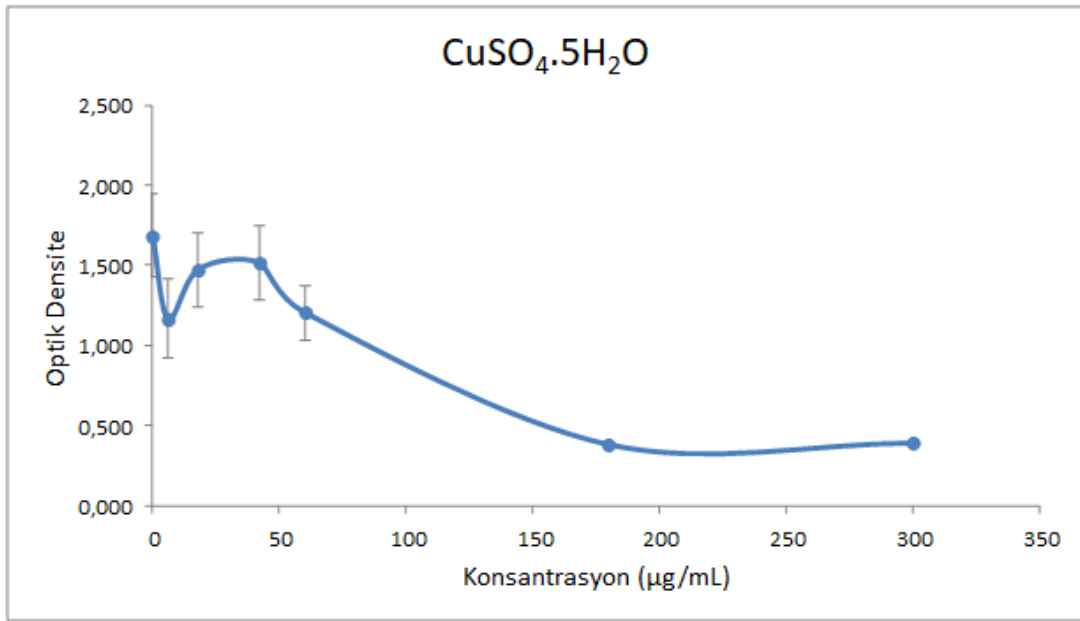


Şekil 4.74 Ts1CuONP'lerin L929 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi

Şekil 4.75'e göre Ts2CuONP'lerin hücre canlılığı, yaklaşık olarak 6 µg/mL konsantrasyonda düşmüştür. Bunlara ilaveten CuSO₄.5H₂O hücreler yaklaşık 180 µg/mL konsantrasyonunda canlılıklarını büyük oranda kaybetmişlerdir (Şekil 4.76).

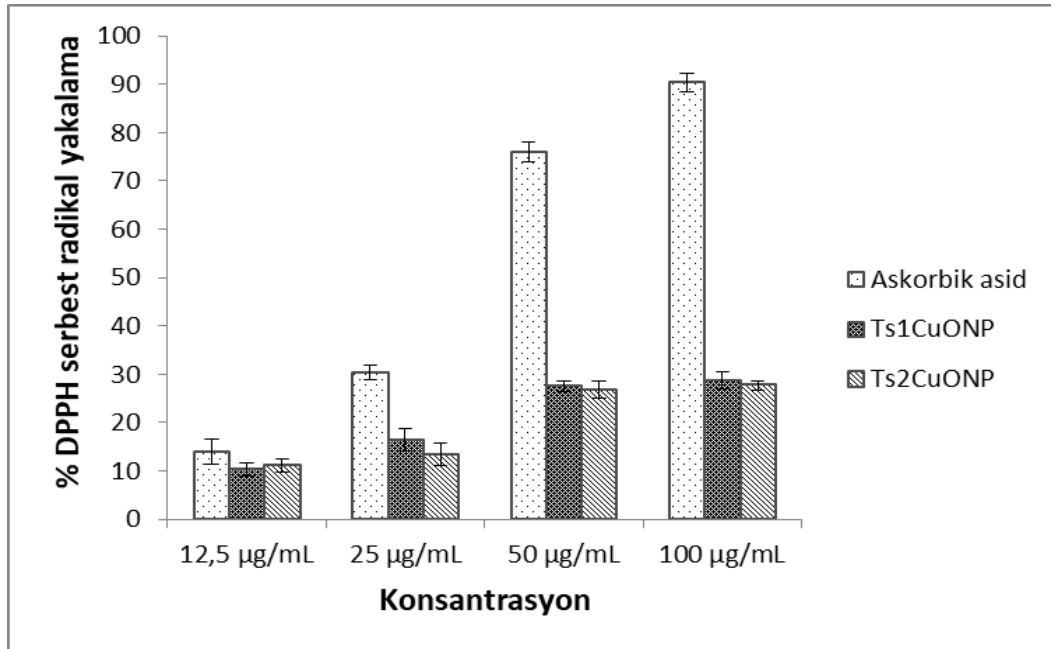


Şekil 4.75 Ts2CuONP'lerin L929 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi



Şekil 4.76 CuSO₄.5H₂O'nun L929 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi

CuONP'lerin antioksidan potansiyeli DPPH serbest radikal giderim aktivitesi açısından değerlendirildi ve sonuçlar Şekil 4.77'de gösterildi. CuONP'lerin DPPH radikal giderim aktivitesi kontrol gurubuna göre çok fazla yüksek değildi ve en yüksek inhibisyonu 100 µg/mL konsantrasyonunda % 28.6 sayısal değeri ile Ts1CuONP gösterdi.

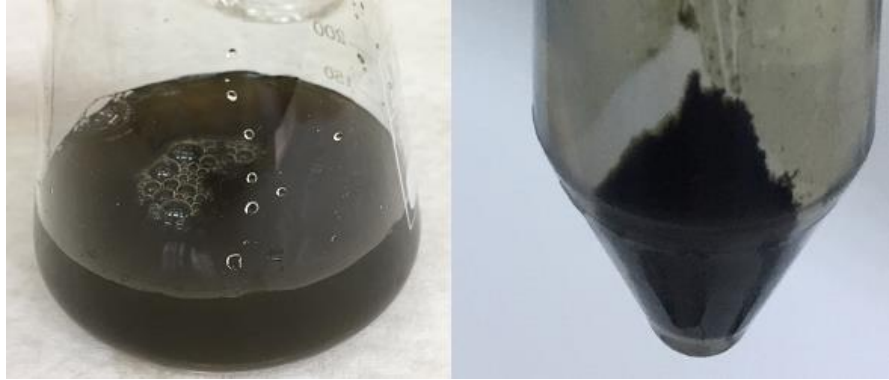


Şekil 4.77 CuONP'lerin göstermiş oldukları % DPPH serbest radikal giderim aktivite değerleri

4.3 Demir Oksit NP'ler

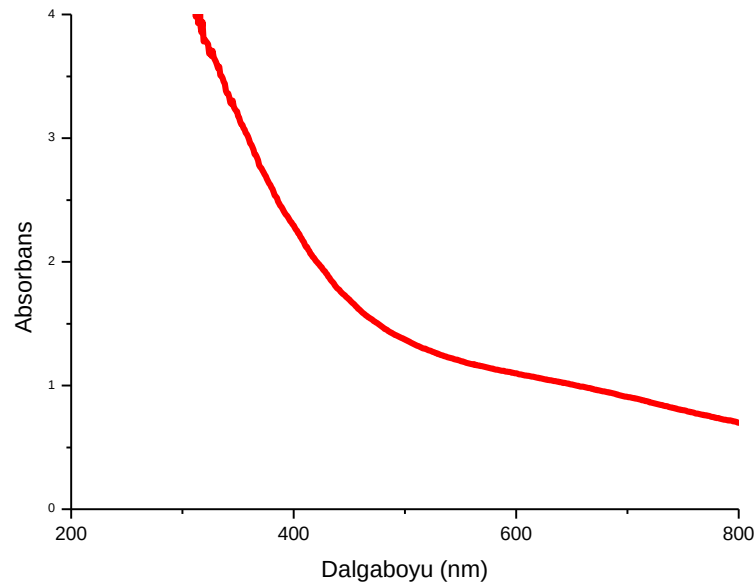
4.3.1 FeONP Sentezi ve Karakterizasyonu

T. spicata sulu yaprak ekstraktının 2 farklı konsantrasyonunda sentez gerçekleştirildi. *T. spicata* sulu ekstraktı $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 M) ile karıştırıldıktan sonra sarı renkteki yaprak ekstraktı anında siyah olarak değişti ve bu da FeONP oluşumunu doğruladı (Şekil 4.78).



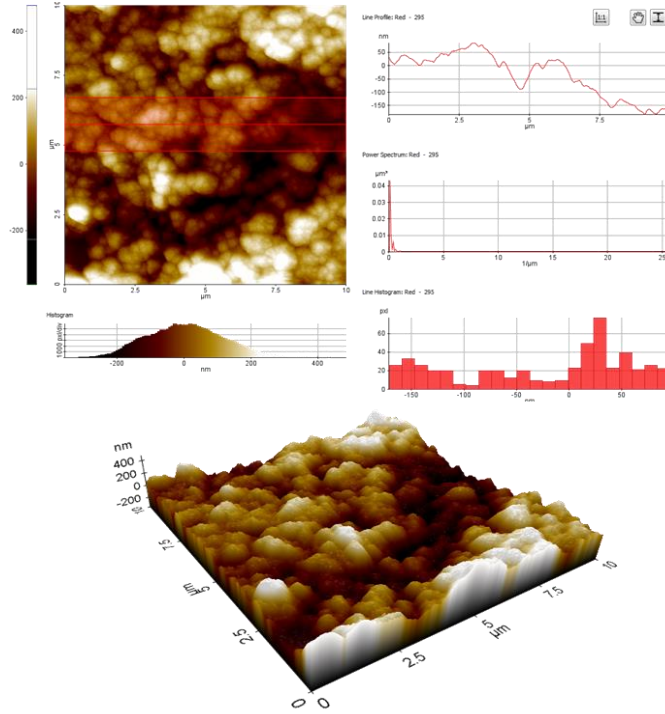
Şekil 4.78 *T. spicata* ekstraktı aracılığı ile sentezlenen FeONP görüntüsü

T. spicata yaprak özütü kullanılarak sentezlenen demiroksit NP'lerin UV-Vis spektrumu, görünür aralıkta sürekli absorpsiyon gösterdi. FeONP'lerin 200-800 nm aralığında spektrum analizi Şekil 4.79'da gösterildi.



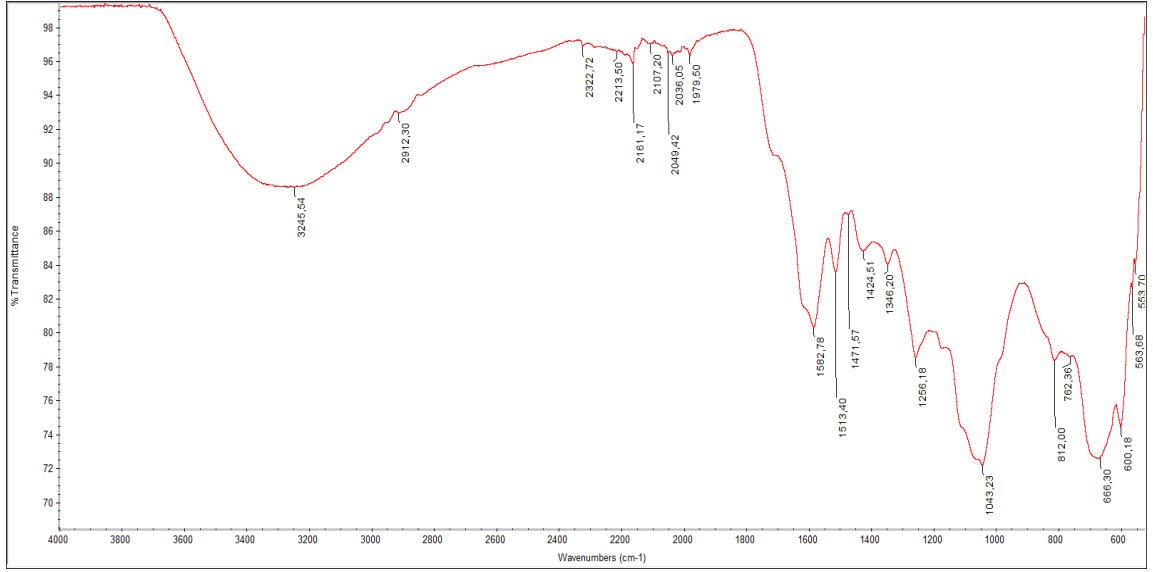
Şekil 4.79 *T. spicata* ekstraktı aracılığı ile sentezlenen FeONP'lerin UV-Vis spektrumu

Yapılan AFM analizinde Ts2FeONP partiküllerinin ortalama büyüklüğünün 200 nm civarında olduğu ve küresel formda oldukları gözlemlendi (Şekil 4.80).



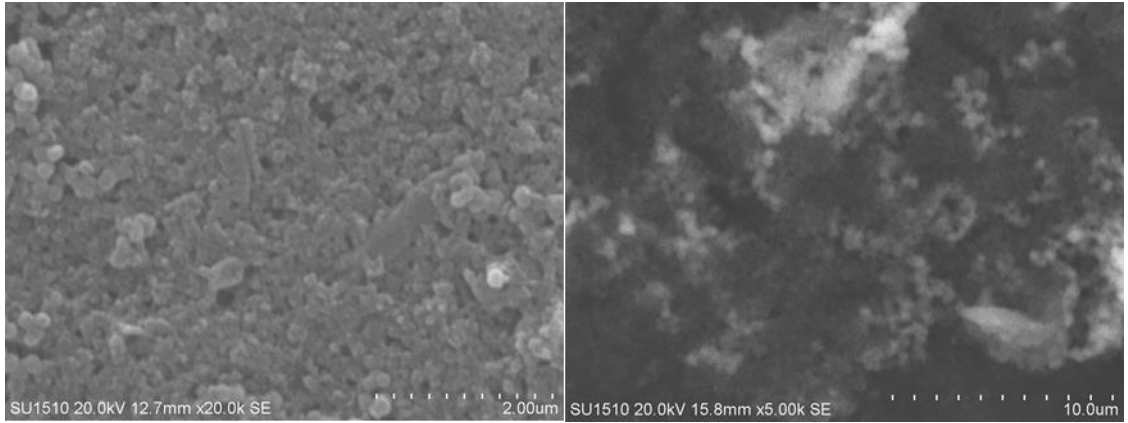
Şekil 4.80 Ts2FeONP AFM analizi

Sentezlenen FeONP'ler için yapılan FTIR analizinde gözlemlenen pikler 3245.51, 1582.78, 1513.40, 1256.18, 1043.23, 812.00, 666.30 ve 600.18 sayısal değerleri gösteren piklerden oluşmaktadır (Şekil 4.81). 3245cm⁻¹'de (geniş) hidroksil için ve 1043 cm⁻¹'de C-O için karakteristik absorpsiyon bantı veya alifatik aminlerin C-N gerdirme titreşimi olarak değerlendirilebilir. Son olarak, 600'de görülen karakteristik pik FeONP'lerdeki Fe-O bağının titreşimini sergilemektedir.

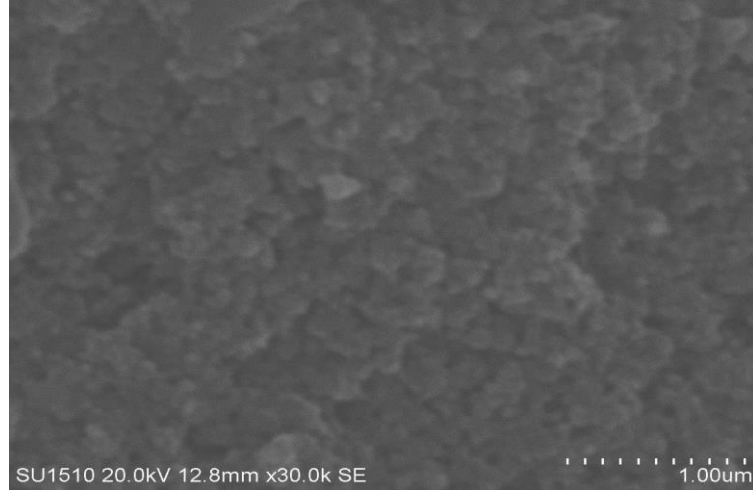


Şekil 4.81 Ts1FeONP FTIR analizi

T. spicata yaprağı ekstraktı ile oluşan FeONP'lerin SEM görüntüleri Şekil 4.82 ve 4.83 'te gösterildi ve boyutlarının AgNP ve CuONP'lere göre daha büyük olduğu belirlendi.

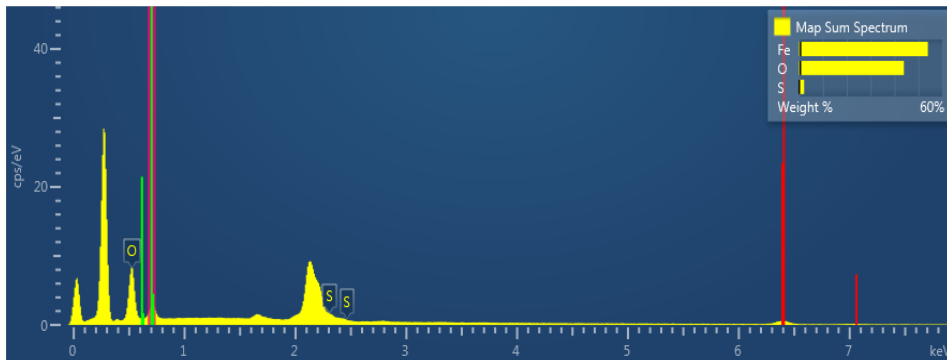


Şekil 4.82 Ts1FeONP SEM analiz görüntüsü



Şekil 4.83 Ts2FeONP SEM analiz görüntüsü

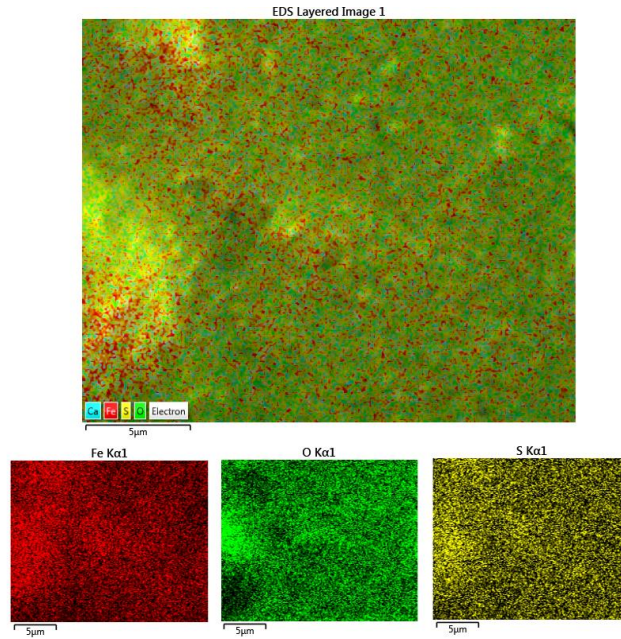
Genellikle, EDS analizi ile demir nanomalzemelerinin yüzey bileşimi, her element veya bileşenin yüzdesiyle birlikte tanımlamaya olanak sağlamaktadır. *T. spicata* yaprak ekstraktı aracılığı ile elde edilen biyosentezlenmiş FeONP'lerin enerji-dispersif X-ışını spektrumu (EDS), Şekil 4.84'te gösterilmiştir. Hazırlanan FeONP'lerin EDS analizi, her element yüzdesinin Fe (% 53.96), O (% 43.90) ve S (% 2.14) olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.20). S sinyali, sentez işleminde kullanılan öncül kaynaklı iken, O sinyallerinin temelde zahter özündeki polifenoller ve diğer moleküllerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca Ca sinyali de görülmüş ama ihmal edilmiştir. Demir bölgesindeki güçlü sinyaller FeONP'lerin oluşumunu doğrulamaktadır. Metalik Fe nanokristalleri genellikle yüzeysel Plasmon rezonansı nedeniyle yaklaşık 0.7, 6.4 ve 7.1 keV'de tipik optik absorpsiyon pikleri göstermektedirler. Ayrıca, Şekil 4.85'te FeONP'lerin EDS alan harita analizleri gösterildi.



Şekil 4.84 Ts1FeONP EDS spektrumları

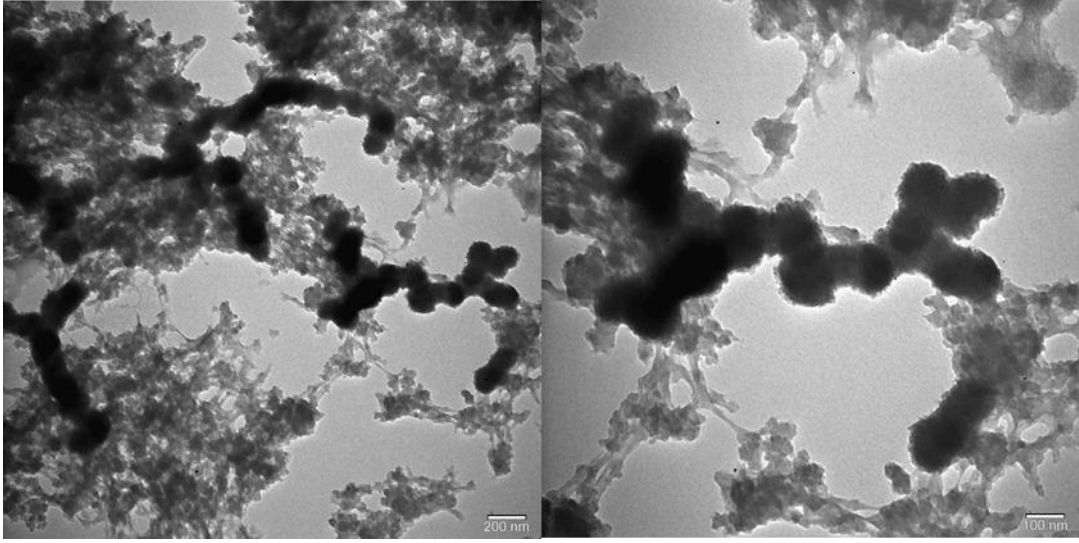
Çizelge 4.20 Sentezlenen FeONP'lerin EDS analizine göre elementlerin ağırlıkça yüzdeleri

Element	Weight %	Weight % Sigma
Fe	53.96	0.58
O	43.90	0.56
S	2.14	0.10
Total	100.00	

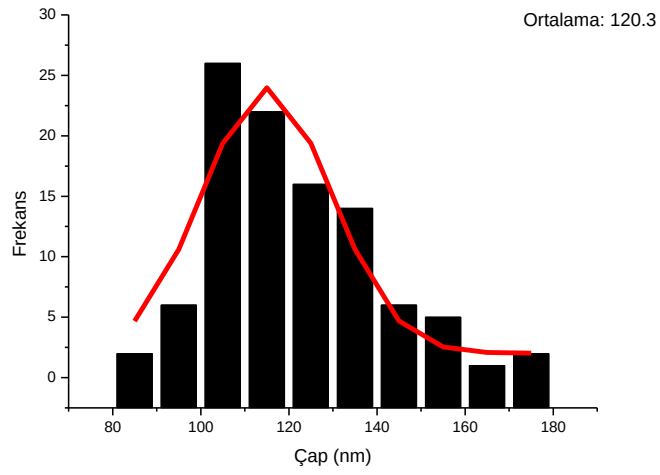


Şekil 4.85 Ts1FeONP elemental

FeONP'lerin morfolojik karakterizasyonu ve boyut değişimi TEM kullanılarak mikroskopik analizle incelendi Transmisyon elektron mikroskobu, FeONP'lerin morfolojisi, şekli ve büyüklüğü hakkında bilgi verdi. TEM sonuçları sentezlenen FeONP'lerin aglomera olduğunu göstermektedir. Aglomerasyon, demir nanopartiküllerinin yüzeyinde bulunan biyomoleküllere bağlı olabileceği düşünüldü. TEM ile çap ölçümleri Image J yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. FeONP çap dağılımının analizinden elde edilen rastgele seçilmiş 100 partikülün histogramını, Ts1FeONP-a için ortalama tanecik çapı 120.3 nm ve büyüklük aralığı 88.9 ila 178 nm arasında olduğu belirlendi (Şekil 4.86 ve 4.87).

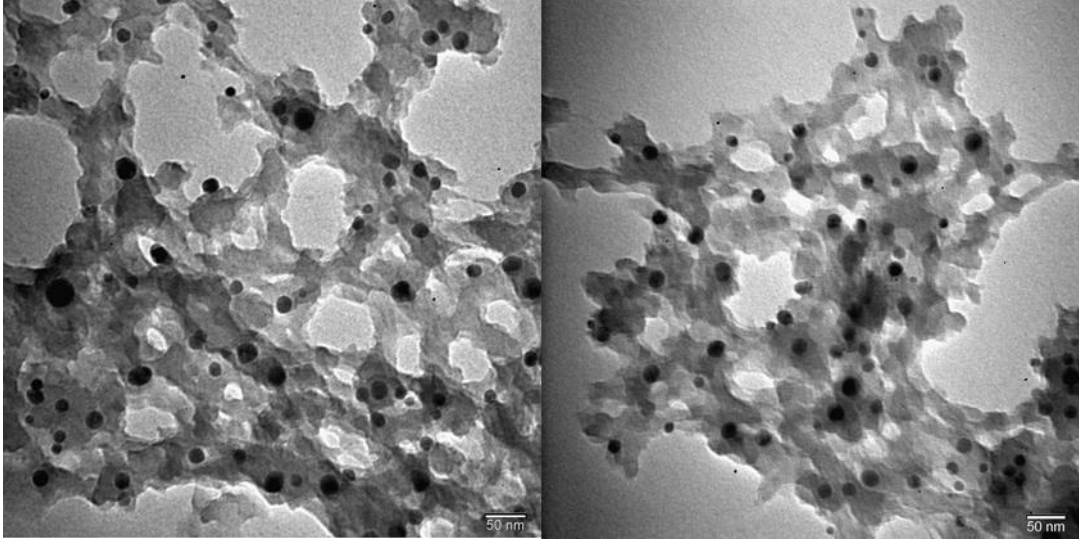


Şekil 4.86 Ts1FeONP-a TEM analizi

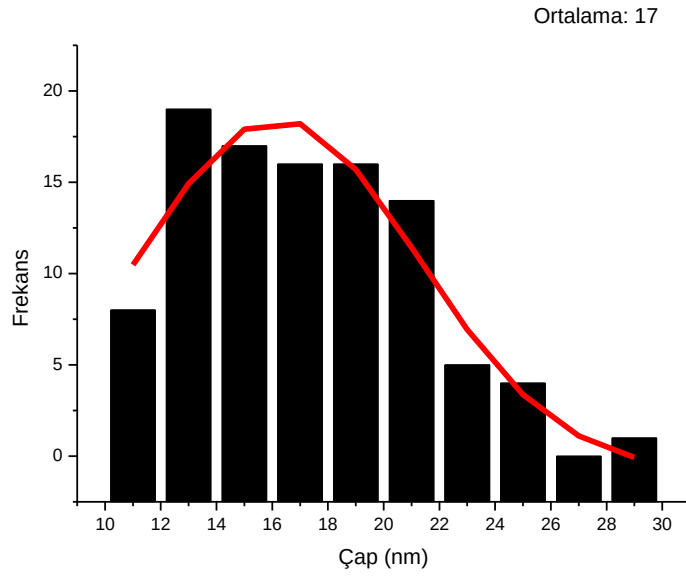


Şekil 4.87 Ts1FeONP-a TEM ortalama büyüklük dağılımı

Ts2FeONP-b'lerin çap dağılımı 10.6 ila 28 nm arasındaydı ve ortalama partikül çapı 17 nm'dir (Şekil 4.88 ve 4.89). Aynı TEM alan taramasında iki farklı büyüklükte nanopartikül oluşumu gözlemlendi.

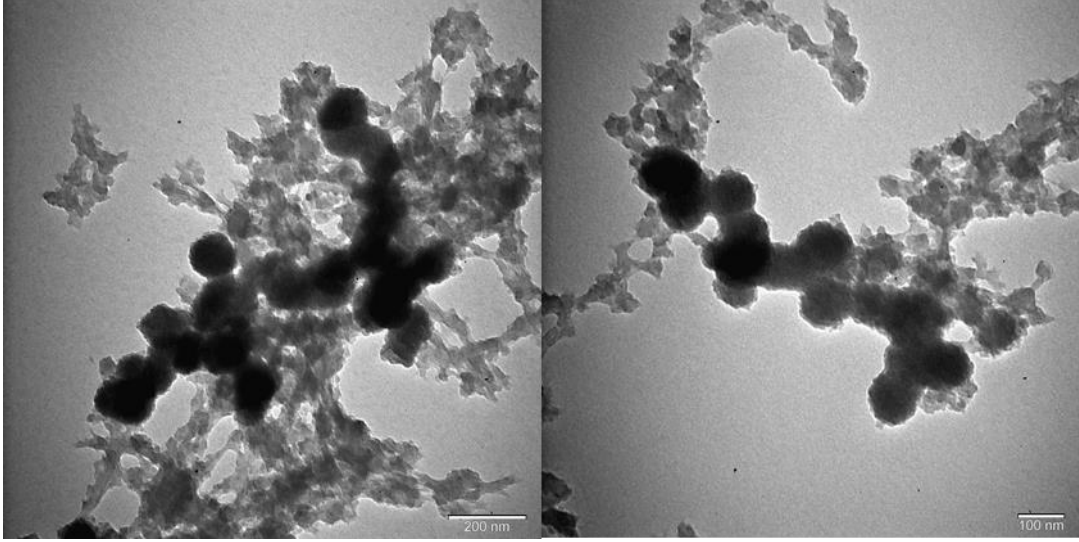


Şekil 4.88 Ts1FeONP-b TEM analizi

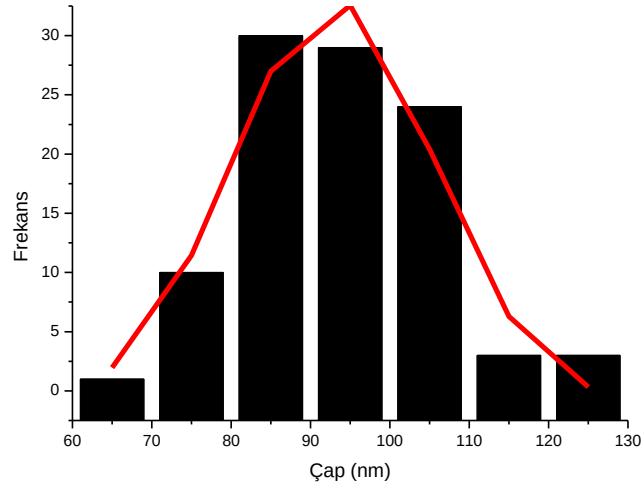


Şekil 4.89 Ts1FeONP-b TEM ortalama büyüklük dağılımı

Ts2FeONP için ise ortalama tanecik çapı 93.9 nm ve büyüklük dağılımının 68.6 ila 128.3 nm arasında olduğu belirlendi (Şekil 4.90 ve 4.91). 40 mL *T. spicata* yaprak özütü ile sentezlenen Ts1FeONP'lerin aynı anda ve ortamda iki farklı TEM ölçümleri elde edilmiştir. TEM gözlemlerinde yüzeyden çeşitli açılarda çıkıntı yapan, ancak genellikle küre merkezinden radyal yönde uzanan saç benzeri yapılara sahip küreler şeklinde parçacıkları ortaya çıktığı gözlemlendi.



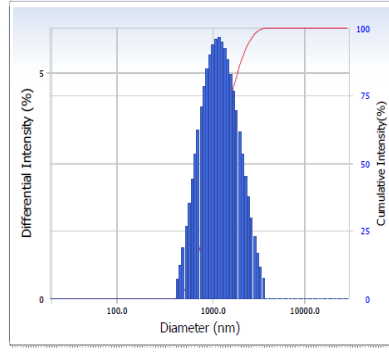
Şekil 4.90 Ts2FeONP TEM analizi



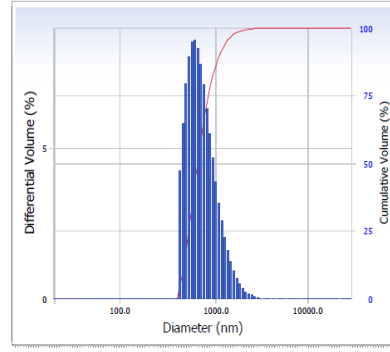
Şekil 4.91 Ts2FeONP TEM ortalama büyüklük dağılımı

Reaksiyon karışımlarındaki FeONP'lerin ortalama parçacık boyutu, boyut dağılımı ve PDI'sı DLS yöntemi ile belirlendi. DLS analiz sonuçlarına göre, Ts1FeONP için ortalama parçacık boyutu dağılımı 1312.0 polidispersite indexi (PDI) 0.352 sayısal değerleri elde edildi (Şekil 4.92). DLS analizi sonucunda ortaya Ts1FeONP ortalama parçacık çap büyüklüğü için çıkan sayısal değerler yoğunluk dağılımında 1357.8 nm, hacim dağılımında 779.7 nm ve sayı dağılımında 585.6 nm olarak tespit edildi (Çizelge 4.21).

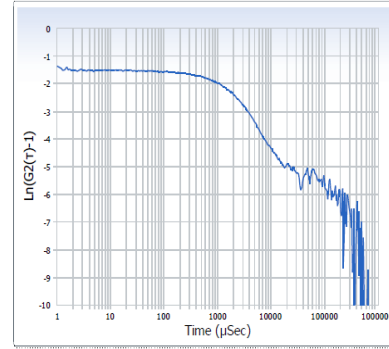
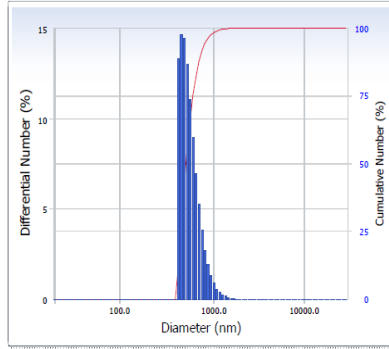
Yoğunluk Dağılımı



Hacim Dağılımı



Sayı Dağılımı



Kümüle Sonuçlar

Diameter (d) : 1312.0 (nm)
Polydispersity Index (P.I.) : 0.352

Ölçüm Koşulları

Temperature : 25.0 (°C)
Diluent Name : WATER
Refractive Index : 1.3328

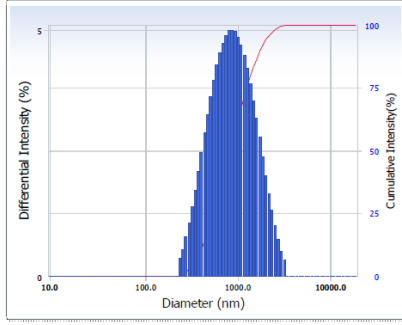
Şekil 4.92 Ts1FeONP DLS analiz sonuçları

Çizelge 4.21 Ts1FeONP DLS analizi sonucunda ortaya çıkan sayısal değerler

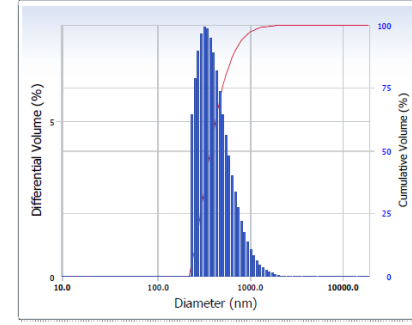
Yoğunluk Dağılımı		Hacim Dağılımı		Sayı Dağılımı	
Çap (nm)	Standart sapma	Çap (nm)	Standart sapma	Çap (nm)	Standart sapma
1357.8	638.2	779.7	322.2	585.6	158.1

DLS analiz sonuçlarına göre, DLS analiz sonuçlarına göre, Ts2FeONP için ortalama parçacık boyutu dağılımı 922.2 nm polidispersite indexi (PDI) 0.352 sayısal değerleri elde edildi (Şekil 4.93). DLS analizi sonucunda ortaya Ts2FeONP ortalama parçacık çap büyüklüğü için çıkan sayısal değerler yoğunluk dağılımında 1061.8 nm, hacim dağılımında 477.9 nm ve sayı dağılımında 335.6 nm olarak tespit edildi (Çizelge 4.22)

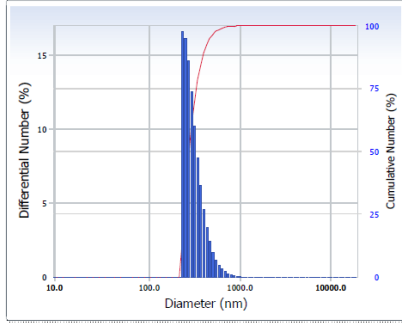
Yoğunluk Dağılımı



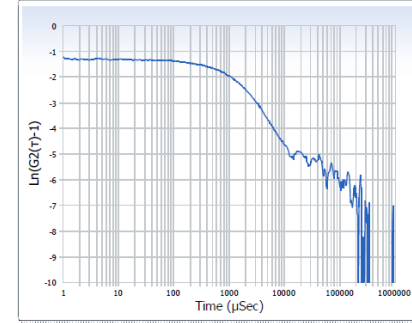
Hacim Dağılımı



Sayı Dağılımı



LN(G2(τ)-1) vs T



Kümüle Sonuçlar

Diameter (d) : 922.2 (nm)
Polydispersity Index (P.I.) : 0.349

Ölçüm Koşulları

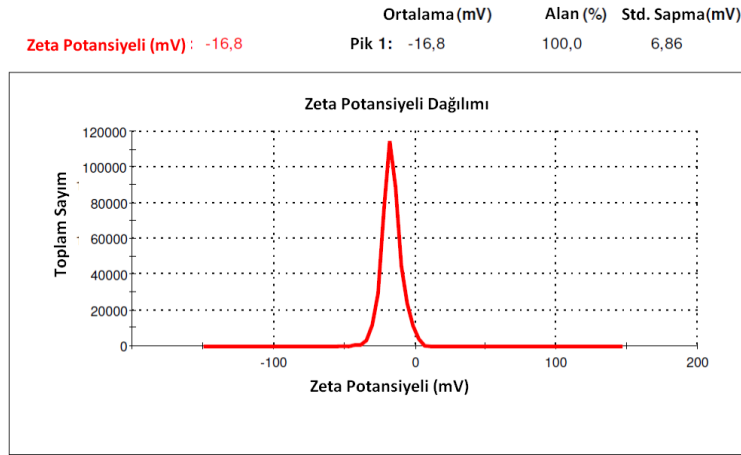
Temperature : 25.0 (°C)
Diluent Name : WATER
Refractive Index : 1.3328

Şekil 4.93 Ts2FeONP DLS analiz sonuçları

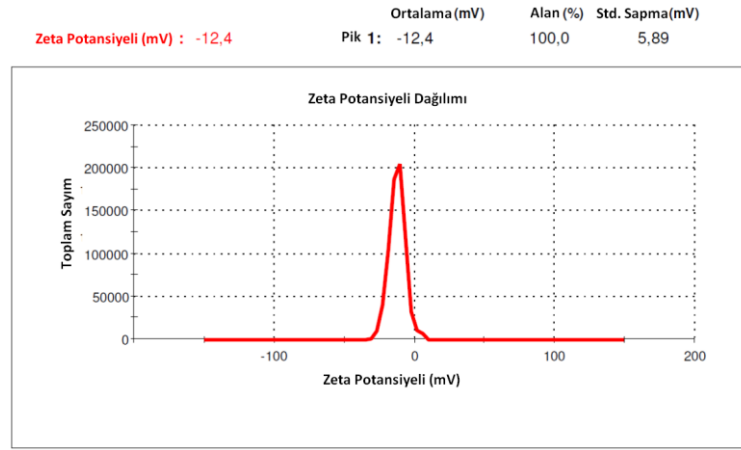
Çizelge 4.22 Ts2FeONP DLS analizi sonucunda ortaya çıkan sayısal değerler

Yoğunluk Dağılımı		Hacim Dağılımı		Sayı Dağılımı	
Çap (nm)	Standart sapma	Çap (nm)	Standart sapma	Çap (nm)	Standart sapma
1061.8	601.3	477.9	236.7	335.6	97.1

Ts1FeONP ve Ts1FeONP için sırası ile zeta potansiyeli değerleri -16.8 ve -12.4 olarak bulundu (Şekil 4.94 ve 4.95). Bu sonuçlar FeONP'lerin stabilitesinin diğer AgNP ve CuONP'lere kıyasla daha düşük olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.94 Ts1FeONP zeta potansiyeli

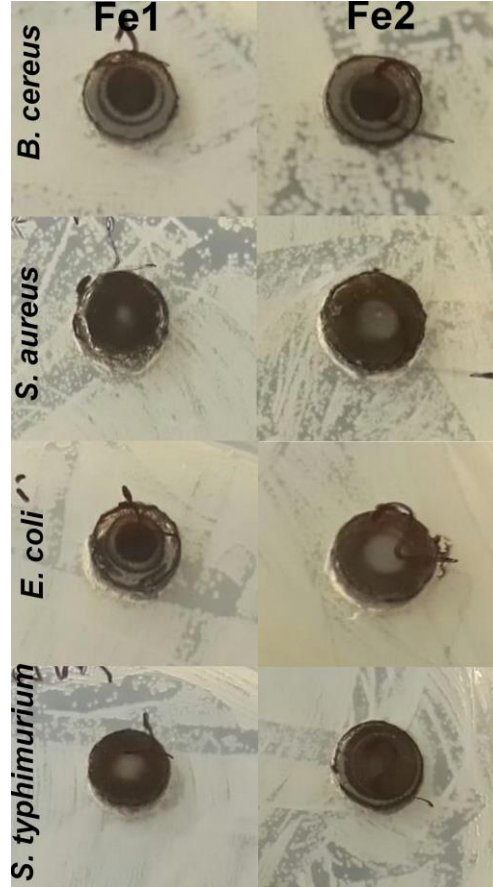


Şekil 4.95 Ts2FeONP zeta potansiyeli

4.3.2 FeONP Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi

FeONP'lerin Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere yönelik *in vitro* duyarlılıkları, disk difüzyonu ve mikrodilüsyon yöntemleri ile belirlendi. FeONP muamelesinden sonra kaydedilen çalışmada yer alan bakteriler için inhibisyon zonu gözlemlenmedi (Şekil 4.96).

NP'lerin 200 ila 1.56 $\mu\text{g/mL}$ arasında değişen konsantrasyonları, Çizelge 4.24'te gösterilen MİK'lerini ve MBK'lerini belirlemek için test edildi. Ts1FeONP'lerin *B. cereus*'a yönelik MİK ve MBK değerleri 200 $\mu\text{g/mL}$ olarak ortaya çıkmaktadır ve en düşük MİK değerini ise *S. typhimurium*' karşı 100 $\mu\text{g/mL}$ ile göstermiştir.



Şekil 4.96 Disk difüzyon yöntemi ile bakteri suşlarına karşı FeONP'lerin göstermiş oldukları antibakteriyal aktivite

Şekil 4.3

T. spicata yaprak ekstraktı kullanılarak sentezlenen Ts1FeONP'lerin neden olduğu membran hasarı ortama salınan *B. cereus* ve *S. typhimurium* hücre bileşenlerinin absorbanlarının 260 ve 280 nm'de ölçülmesi ile belirlendi. Hazırlanan Ts1CuONP'lerin artan konsantrasyonları ile birlikte *B. cereus* 260 ve 280 nm'de absorbansta AgNP ve CuONP'lere göre oldukça düşük bir artış gözlemlendi (Çizelge 4.23). Ts1FONP'ler için 2xMİK NP konsantrasyonuna maruz bıraktığımız bakterilerin hücre bileşenlerinin salınım tayinindeki elde ettiğimiz sonuçlarına göre 2XMİK konsantrasyonunda *S. typhimurium* için OD260 ve OD280 değerleri sırasıyla 0.08 ve 0.15 olarak ölçüldü.

Çizelge 4.23 Ts1FeONP'ler ile muamele edilen bakterilerin hücre bileşenlerinin salınımının ölçülmesi

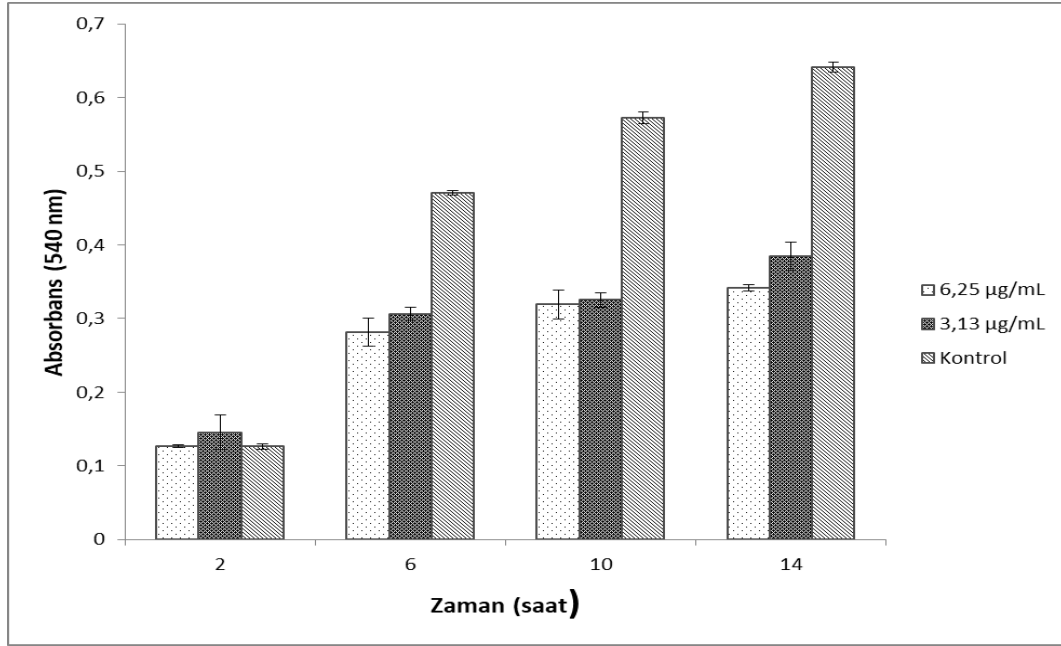
Mikroorganizmalar	Ts1FeONP konsantrasyonu	OD260	OD280
<i>B. cereus</i>	0	0.007	0.09
	MİK	0.08	0.11
	2xMİK	0.09	0.14
<i>S. typhimurium</i>	0	0.006	0.07
	MİK	0.05	0.09
	2xMİK	0.08	0.15

Çizelge 4.24 Mikrodilüsyon yöntemi ile bakteri suşlarına karşı FeONP'lerin minimum inhibisyon ve bakterisidal konsantrasyonları (MİK ve MBK) (µg/mL)

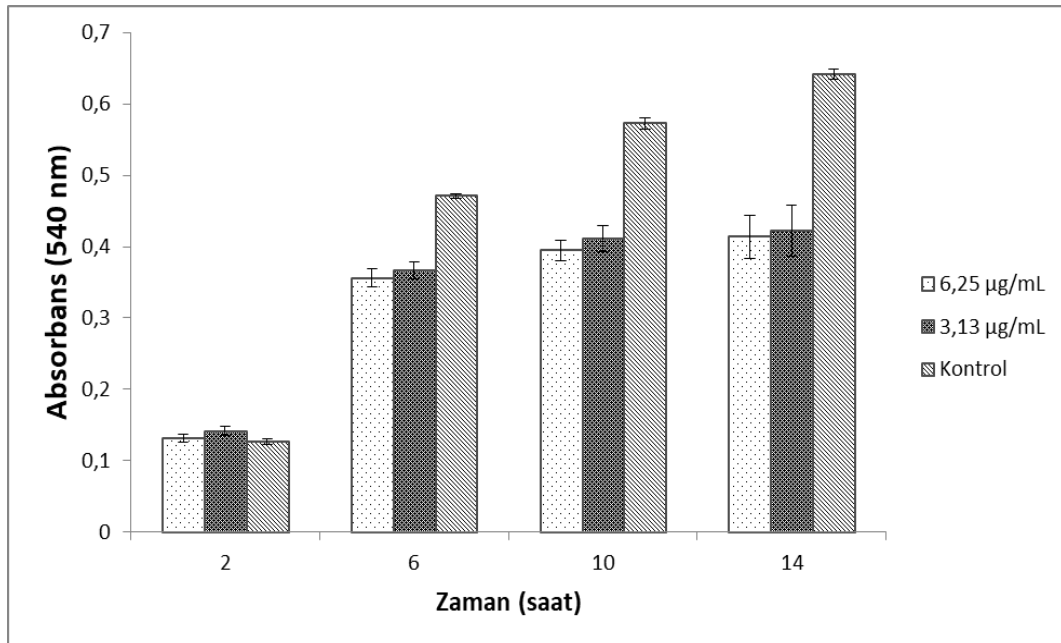
Örnekler	Gram Pozitif				Gram Negatif			
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>				
	MİK	MBK	MİK	MBK	MİK	MBK	MİK	MBK
Ts1FeONP	200	200	>200	>200	>200	>200	100	200
Ts2FeONP	200	>200	>200	>200	>200	>200	200	>200

FeONP'lerin *S. aureus* büyüme kinetikleri üzerindeki etkisi 540 nm'de absorbansta meydana gelen artış olarak spektrofotometre kullanılarak ölçüldü. FeONP'lerin son konsantrasyonları 6.25 ve 3.13 µg/mL olacak şekilde çalışıldı. Ts1FeONP ile Ts2FeONP'yi kıyasladığımızda 6.25 µg/mL konsantrasyonda Ts1FeONP'nin *S. aureus*'un büyümesini daha da yavaşlattığı görünmektedir. Ts1FeONP, Ts2FeONP ve FeSO₄.7H₂O'ların sırası ile 14 saat sonunda 6.25 µg/mL konsantrasyonda 0.23, 0.30 ve 0.53'lük bir artış görülmüştür. 3.13 µg/mL konsantrasyonda ise Ts1FeONP,Ts2FeONP

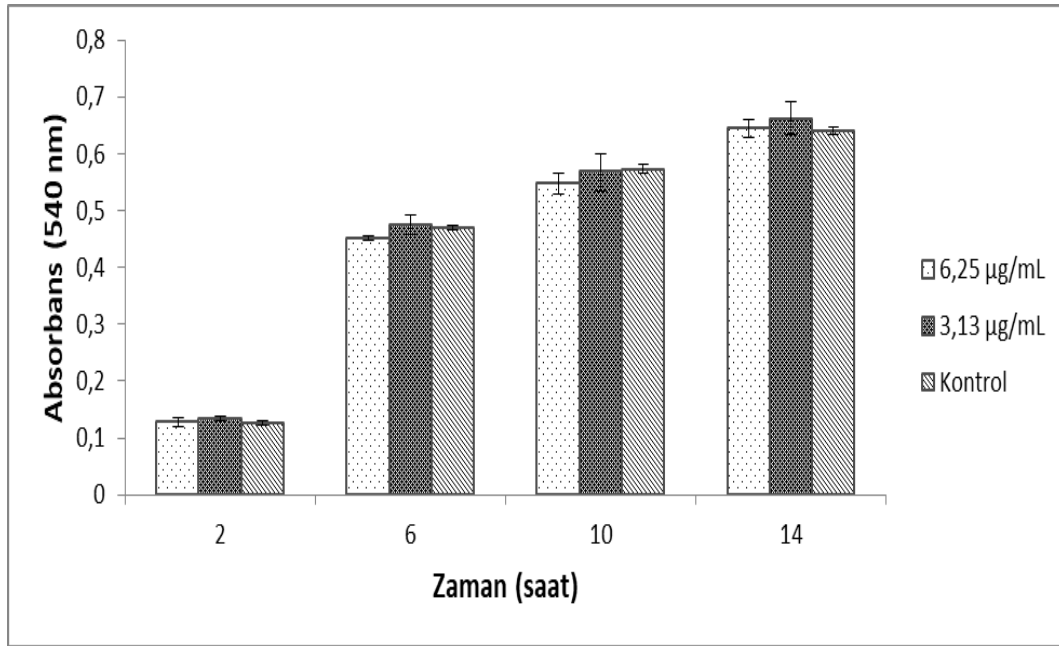
ve $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 'ların sırasıyla 0.28, 0.32 ve 0.55'lik bir absorbans artış değeri kaydedilmiştir (Şekil 4.97, 4.98 ve 4.99).



Şekil 4.97 Ts1FeONP'lerin değişen konsantrasyonlarında *S. aureus*'un büyüme profilinde zamana bağlı değişim



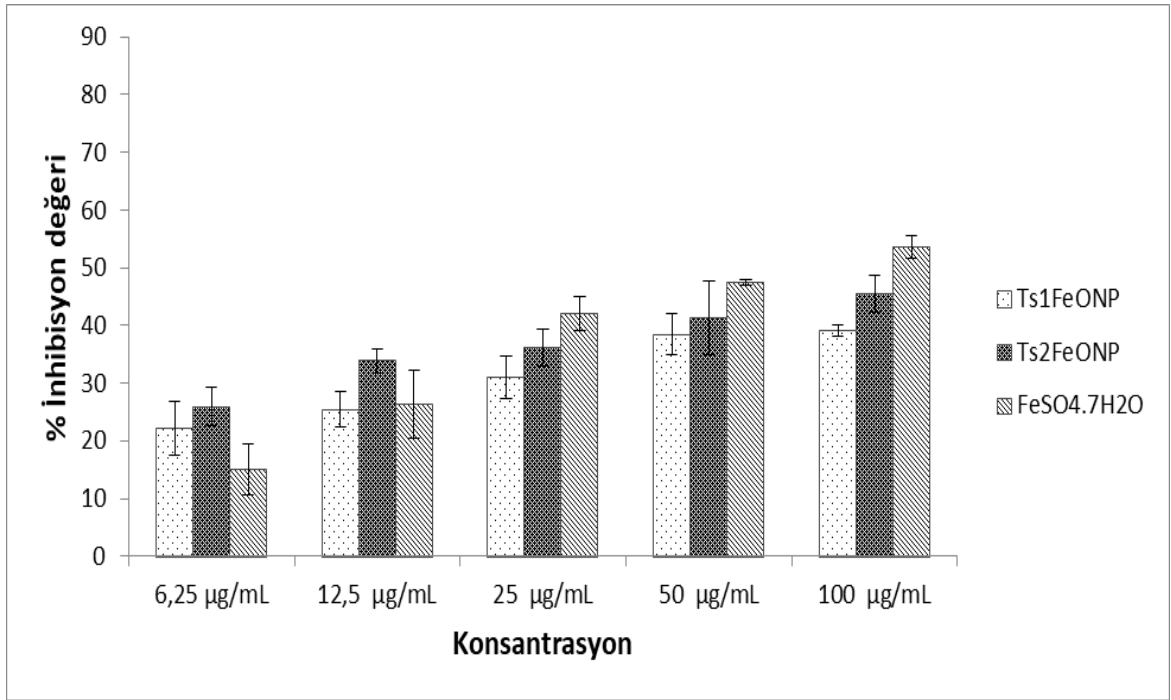
Şekil 4.98 Ts2FeONP'lerin değişen konsantrasyonlarında *S. aureus*'un büyüme profilinde zamana bağlı değişim



Şekil 4.99 FeSO₄.7H₂O muamelesinden sonra *S. aureus*'un büyüme profilinde zamana bağlı değişim

4.3.3 FeONP Antibiyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi

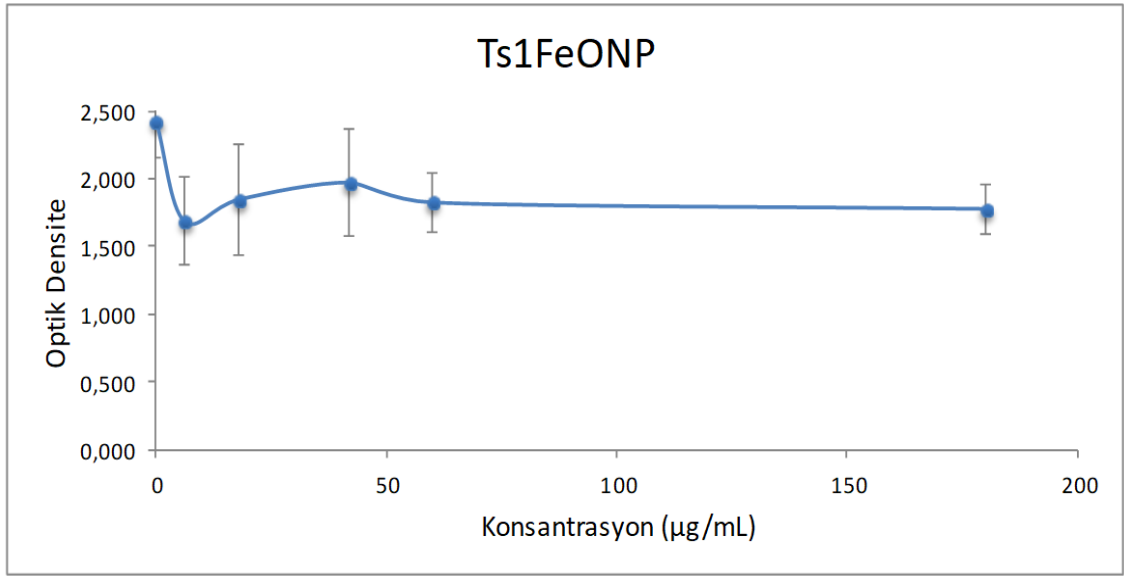
Şekil 4.100'deki sonuçlar, FeONP'lerin konsantrasyona bağlı biyofilm oluşum inhibisyonunu göstermektedir. Veriler 6.25 ve 100 µg/mL konsantrasyon aralığında 24 saat uygulamadan sonra oluşan biyofilm inhibisyon yüzdelerini göstermektedir. Ts2FeONP 6.25 µg/mL'de *S. aureus* tarafından oluşturulan biyofilmlerin oluşumunu % 25.9 ± 3.36 'sını inhibe ederek Ts1FeONP ve FeSO₄.7H₂O'ya kıyasla en yüksek inhibisyon değerini gösterdi. FeSO₄.7H₂O 100 µg/mL'de ise *S. aureus* tarafından oluşturulan biyofilmlerin oluşumunu % 53.6 ± 2.0 'ını inhibe ederek Ts1FeONP ve Ts2FeONP'ye kıyasla en yüksek inhibisyon değeri elde edildi. 6.25 µg/mL'de sırası ile Ts1FeONP, FeSO₄.7H₂O için % 22.1 ± 4.59 ve % 15.0 ± 4.49 inhibisyon değeri görüldü. 100 µg/mL'de ise sırası ile Ts1FeONP, Ts2FeONP için % 39.1 ± 0.99 ve % 45.4 ± 3.18 sayısal değerinde *S. aureus* biyofilm oluşum inhibisyon değeri görüldü.



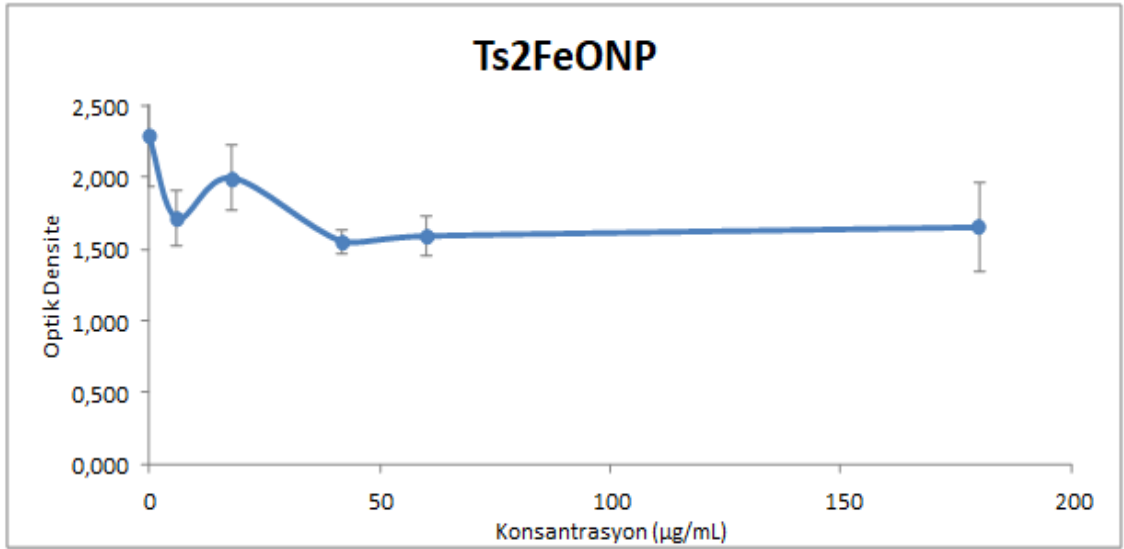
Şekil 4.100 Sentezlenen FeONP'lerin *S. aureus*'a karşı göstermiş oldukları antibiyofilim aktivitelerinin % inhibisyon değeri

4.3.1 FeONP Sitotoksik Etkisinin ve Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi

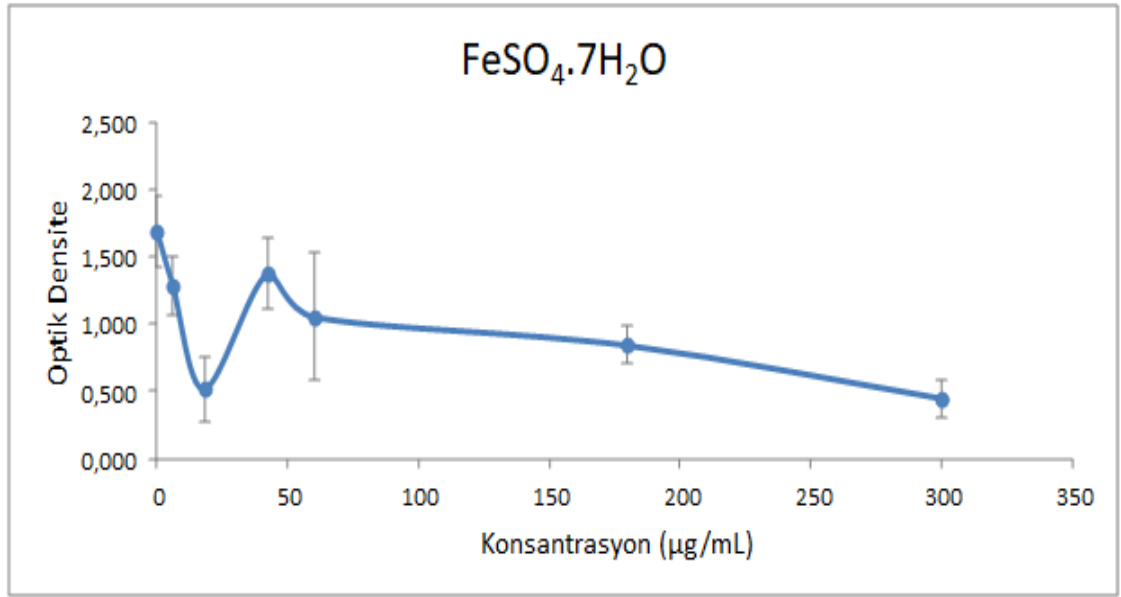
Ts1FeONP, Ts2FeONP ve FeSO₄.7H₂O'nun L929 hücrelerinde meydana getirdikleri toksik etki XTT sonuçları ile sırasıyla Şekil 4.101, 4.102 ve 4.103'te gösterildi. Elde edilen sonuçlarda hem FeONP'lerin hem de FeSO₄.7H₂O'nun L929 hücrelerinin canlılığı üzerinde herhangi bir toksisite göstermedikleri tespit edildi.



Şekil 4.101 Ts1FeONP'lerin L929 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi

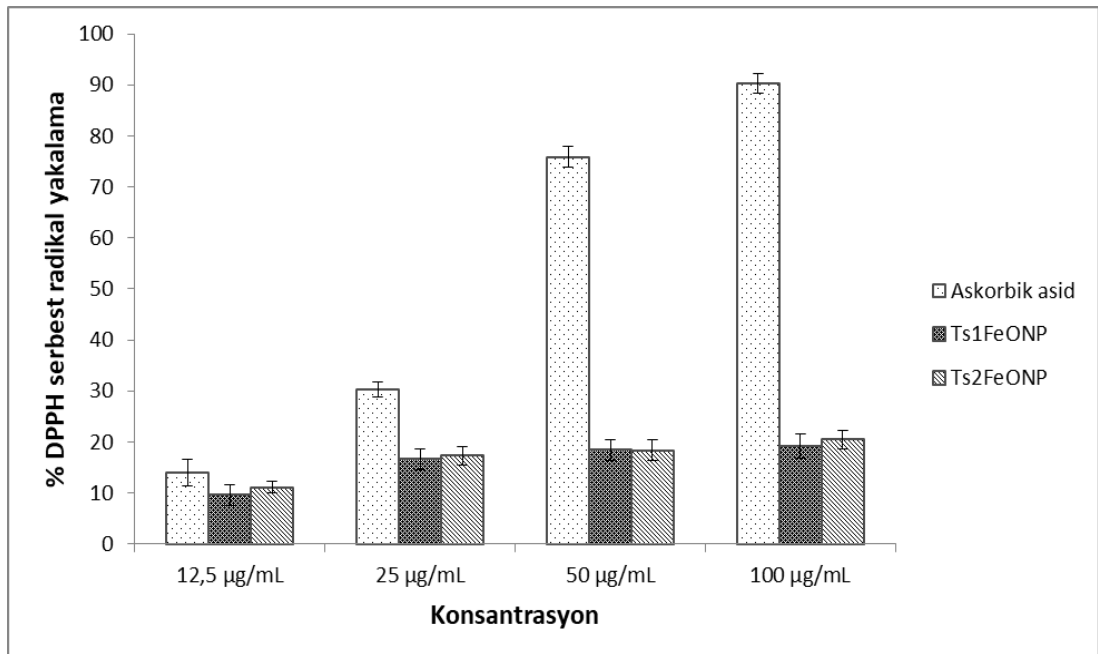


Şekil 4.102 Ts2FeONP'lerin L929 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi



Şekil 4.103 FeSO₄.7H₂O'nun L929 hücreleri üzerine sitotoksik aktivitesi

FeONP'lerin antioksidan potansiyeli DPPH serbest radikal giderim aktivitesi açısından değerlendirildi ve sonuçlar Şekil 4.104'te gösterildi. FeONP'lerin DPPH radikal giderim aktivitesi diğer metel NP'ler ile kıyaslandığında 100 µg/mL konsantrasyonunda en yüksek % 20.4 Ts2FeONP'lerin göstermiş olduğu ve bu değerin oldukça düşük olduğu belirlenmdi.



Şekil 4.104 FeONP'lerin göstermiş oldukları % DPPH serbest radikal giderim aktiviteleri

SONUÇ VE ÖNERİLER

Genellikle NP'lerin sentezi için kimyasal yöntemler, çevresel ve biyolojik açıdan potansiyel risk oluşturan, dış indirgeme maddeleri ve toksik organik çözücüler içerir. Bu nedenle, NP sentezi için hızlı, temiz, toksik olmayan ve çevre dostu bir süreç geliştirilmesinde bitki özütlerinin kullanılması daha tercih edilen bir yaklaşımdır. Bu çalışmada zengin doğal kaynaklı polifenolik bileşikler ve flavonoidik grup içermesi nedeniyle NP sentezi için *Thymbra spicata* tercih edilmiştir [221]. Bu çalışma ile birlikte ilk kez NP'lerin boyut ve şekil kontrollü hazırlanması için indirgeyici ajan olarak *T. spicata*'nın yaprak özütünün kullanılması NP'lerin biyolojik sentezinde çevre dostu bir yolla değerli bir kaynak olabileceği gösterilmiştir. Hem indirgeyici hem de stabilize edici ajanlar olarak *T. spicata* ekstraktı kullanarak AgNP, CuONP ve FeONP'lerin "yeşil" bir sentezini bu tez çalışması ile gösterdik. Bu prosedür, geleneksel protokollere uygun maliyetli ve "yeşil" bir alternatif sunar ve düşük sentez sıcaklıkları ve zaman gerksinimi düşünüldüğünde endüstri için kolayca ölçeklendirilebilir bir sentez sürecini göstermektedir. Sentez esnasında kullanılan bitki ekstraktı miktarının kontrol edilmesinin, NP boyutunun değişimini sağladığını ve bu yolla boyutun kontrol edilebileceğini ortaya koymaktadır.

Bu tezin ilk bölümünde, *T. spicata* bitkisinin farklı ekstrakt konsantrasyonları ve değişik parametreler kullanılarak AgNP'ler sentezinde optimizasyon çalışması gerçekleştirildi. Nanopartiküller çeşitli analitik yöntemler kullanılarak karakterize edildi. Ayrıca, ekonomik açıdan önemli üç bitkinin (*T. spicata*, *C. scolymus* ve *M. piperita*) yaprak

ekstraktları ile sentezlenen AgNP'lerin antibakteriyel, antibiyofilm, antioksidan ve sitotoksik aktiviteleri karşılaştırmalı olarak incelendi. AgNP'ler için elde edilen UV-Vis spektrumlarının en yüksek pik değerlerini sırasıyla Ts1AgNP, Ts2AgNP CsAgNP ve MpAgNP'in 452,444,458 ve 452 nm olarak sergilediği ve bu sonuçların AgNP'ler için literatür ile uyumlu olduğu belirlendi. XRD, Ts2AgNP'lerin kristalin yapısını ve ortalama kristal boyutunu, Debye-Scherrer formülüne göre yaklaşık olarak 10 nm olarak gösterdi. AFM analizi NP'lerin yüzey özellikleri hakkında bilgi elde etmek için kullanıldı ve NP'lerin yüzey morfolojisini ve 3D topoğrafyası hakkında bilgi verdi. AFM görüntüsü ile Ts2AgNP'lerin 20-50 nm arasında bir boyuta sahip oldukları ortaya çıktı. NP'lerin oluşumunda rol oynayan olası fonksiyonelliği belirlemek için FTIR spektroskopik analizler yapıldı ve belirlenen fonksiyonel grupların NP'lerin yeşil sentezinde etkili bir role sahip olabilecekleri düşünülmektedir. Ancak, bu mekanizmalar tam olarak anlaşılabilmiş değildir ve ileri analizler buna ışık tutacaktır. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ve Enerji Dağılımı X-RAY Spektroskopisi (EDS) çalışmaları, NP'lerin morfolojik ve elementel doğasını ortaya koydu. 3 keV'de güçlü bir sinyal ile elde edilen EDS spektrumu AgNP'lerin oluşumunu teyit etti. FTIR ve EDS kimyasal analizler, bitki ekstraktında bulunan bileşikler ile birlikte stabilizasyonun da gerçekleşebileceği düzey ve dengeleyici maddelerin olduğunu düşündürmektedir. AgNP'lerin morfolojik karakterizasyonu ve boyut ölçümleri TEM kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar 1 mL *T. spicata* yaprak ekstraktı ile sentezlenen AgNP'lerin daha yüksek parçacık boyutu gösterdiğini ortaya çıkarırken, 5 ml ekstrakt kullanılarak hazırlanan AgNP'lerin daha küçük parçacık boyutu gösterdikleri tespit edilmiştir. Literatürde, benzer bir biçimde kullanılan ekstrakt miktarındaki azalmanın bir sonucu olarak NP'nin boyutunun artabileceği bulunmuştur [46]. Çünkü NP sentezinde ekstrakt azalması yeni oluşturulmuş gümüş çekirdeğini kaplamak için polifenollerin varlığının azalması anlamına gelmektedir ve buda gümüş çekirdeklerin bir araya toplanmasıyla daha büyük NP boyutuna neden olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, TEM analiz sonuçlarına göre, ekstraktın miktarı azaltıldıktan sonra NP'lerin üçgen, altıgen, küre ve düzensiz şekillerde daha fazla görünmesine karşın, ekstraktların miktarını arttırdığımızda daha küçük olan daha küresel NP'lerin ortaya çıkmasına neden olduğunu göstermektedir.

Sonuçlarımızdan yeşil NP sentezi sırasında bitki ekstraktının miktarının NP boyutunu ve şeklini ayarlamada önemli bir faktör olduğu ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, AgNP'lerin ortalama parçacık boyutu, boyut dağılımı ve PDI'sı DLS yöntemi ile belirlendi. Farklı karakterizasyon analiz ölçümlerinde gözlemlenen boyut farkı, AgNP yüzeyindeki bitkilerin biyoaktif moleküllerinin varlığına bağlı olabilir. Prathna ve ark. AgNP'lerin farklı parçacık boyutlarının farklı karakterizasyon teknikleri kullanılarak bulunduğunu ve parçacık boyutu ölçeğinin DLS> AFM> TEM> XRD olduğunu ve elde ettiğimiz sonuçların bu düzenle uyumlu olduğu belirlendi [222]. Zeta potansiyelinin negatif değeri, gümüş nanoparçacıkların negatif yüklü biyomoleküllerle kaplandığını ve bu NP'ler arasındaki elektrostatik itme etkileşiminin olası agregasyonu önleyerek nanoparçacıkların uzun vadeli stabilitesinden sorumlu olabileceğini ortaya koymaktadır [223].

Ag⁺ iyonlarının AgNP'lerin mikroorganizmalara olan toksisitesindeki rolü ile ilgili devam eden bir tartışma vardır [224]. Birçok çalışma, çözünmüş Ag⁺ iyonlarının AgNP'lerin toksisitesini kaynağını teşkil ettiğini bildirdi [225]. Bunun aksine, birçok çalışma, salınan Ag⁺ iyonlarının etkisinin önemli olmadığını ve AgNP tarafından tetiklenen toksisitenin sadece salınan Ag⁺ iyonlarına değil, daha çok parçacıkların boyutuna, şekline, yüzey kaplamasına ve yüzey yüküne bağlı olarak olarak değişebileceğini öne sürdü. Bu faktörler, Ag⁺ iyonlarının salınımının oranını, kapsamını, yerini ve zamanlamasını etkileyen mekanizma yoluyla dolaylı olarak toksisiteyi etkileyebilir [226], [227], [228], [229].

Ts1AgNP ve Ts2AgNP için elde edilen inhibisyon zonlarının sonuçları, AgNP'lerin antimikrobiyal aktivitelerinin şekil bağımlı olduğunu göstermektedir ve bu olgu, DLS ve TEM analizi ile elde edilen sonuçlarla uyumludur. Ayrıca *C. scolymus* yaprak ekstraktı kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin, *T. spicata* ve *M. piperita*'nın yaprak ekstaktları ile sentezlenen AgNP'lere kıyasla daha fazla antibakteriyel aktiviteye sahip oldukları bulundu.

Antibakteriyel etkinin esas olarak, NP'lerin boyutuna, şekline ve dozuna bağlı olduğu ve gram-negatif bakterilere göre gram-pozitif bakterilere karşı daha belirgin olduğu

bildirildi [230]. Bu, gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerin hücre duvarı kompozisyonundaki yapısal farklılıktan kaynaklanabilir. Gram-negatif hücre duvarı, gram-pozitifden daha negatif yüklü bir dış lipid membran (lipopolisakarit) ile kaplıdır. Zeta değerinden de anlaşılacağı üzere, biyojenik AgNP'ler negatif yüklüdür ve AgNP'ler ile gram negatif bakteriler arasındaki elektrostatik itme, parçacıkların hücre içine nüfuz etmesini ve penetrasyonunu engellediği düşünülmektedir [223]. Metalik NP'lerin boyutunun azaltılmasının, daha küçük nanoparçacıkların önemli ölçüde geniş yüzey alanına bağlı olarak antibakteriyel aktiviteyi arttırması beklenir [231], [232]. Normalde, Gram negatif bakteriler, NP'lere maruz kaldıklarında Gram pozitif bakterilerden daha hassastır [233]. Bununla birlikte, bu çalışmadan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde üçgenler, altıgenler, küreler ve düzensiz şekillerden oluşan Ts1AgNP'lerin farklı şekillerde AgNP içermesinden dolayı Ts2AgNP'lere (ortalama çap 25.1 nm) kıyasla TS1AgNP'lerin (ortalama çap 70.2 nm) daha fazla antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu düşündürmektedir. Ts2AgNP'ler ise daha çok küresel formasyon sergilemektedir. Yani sonuçlar, AgNP'lerin şekil-bağımlı bakteriyel aktivitesinin ölçümü için bir temel oluşturmaktadır. Daha önceki çalışmalarda farklı şekle sahip AgNP'lerin bakterisidal özellikleri üzerine yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada, antibakteriyel aktivite üzerine NP'lerin şeklinin etkilerini ortaya çıkarmışlardır. Sonuç olarak, çalışmalarında farklı şekillerde ama aynı boyuttaki AgNP'lerin aktif yüzeyler için farklı etkili yüzey alanlarına sahip olabileceği ve AgNP'lerin bununla birlikte farklı antibakteriyel etkiler gösterebileceğini tartışmışlardır [234]. Bunun olası bir açıklaması da, Ts2AgNP'lerin sahip olduğu 0.318 sayısal değerindeki daha yüksek PDI değeri ile bu daha küçük çaplı AgNP'lerin (Ts2AgNP) daha fazla agregasyon gösterdiğini ve bu daha küçük çaplı AgNP'lerin daha yüksek çapa sahip AgNP'lere (Ts1AgNP) kıyasla daha düşük antibakteriyel aktivite göstermesinin başlıca nedeni olabileceği düşünülmektedir. AgNP'lerin şekil-bağımlı antibakteriyel aktivitesi ve agregasyon etkisi hakkında çok az şey bilinmektedir ve hangi faktörlerin esas olarak bakteriyel inhibisyona neden olduğunu henüz tam olarak belli değildir. Bu nedenle bu güncel konuyla ilgili gelecekteki çalışmalar önem taşımaktadır. Ayrıca, sentezlenen AgNP'lerin neden olduğu membran hasarı bakteri hücresel bileşenlerin

salınımının 260 ve 280 nm'de absorbansı ölçülerek belirlendi ve NP'lerin antibakteriyel aktiviteleri teyit edilmiş oldu. Bunlara ilaveten, NP'lerin 6.25 ve 3.13 µg/mL konsantrasyonlarındaki *S. aureus* büyüme kinetikleri üzerindeki etkinliği 540 nm'de absorbans ölçümü ile belirli zaman aralıklarında ölçülerek gerçekleştirildi. CsAgNP'lerin *S. aureus*'un büyümesini diğer tüm AgNP'lere kıyasla daha fazla negatif yönde etkilediği sonucuna varılmıştır. Aynı zamanda CsAgNP 100 µg/mL'de *S. aureus* tarafından oluşturulan biyofilmlerin oluşumunu % 80 oranında inhibe ederek diğer NP'lere ve Ag iyonuna kıyasla en yüksek inhibisyon değerini gösterdi.

NP'lerin sitotoksik aktiviteleri XTT'nin prensibine göre XTT'nin mitokondriyal aktivite sonucu turuncu renkli suda çözünür boyaya dönüştürülmesine temeline göre çalışılarak hücre canlılığı ölçüldü. Yine burada antibakteriyel çalışmalara benzer olarak CsAgNP'lerin L929 fibroblast hücreleri üzerinde en fazla toksisite gösteren AgNP'dir. AgNP'lerin toksisite miktarlarına göre sıralaması CsAgNP > AgNO₃ > Ts1AgNP > Ts2AgNP > MpAgNP şeklinde düşünülebilir. AgNP'lerin DPPH serbest radikal giderim aktiviteleri belirlenerek antioksidan kapasiteleri belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre AgNP'lerin DPPH radikal giderim aktivitesi doza bağımlıydı ve en yüksek giderim aktivitesini MpAgNP gösterdi. AgNP'lerin DPPH radikale karşı etkisinin daha yüksek dozlarda iyi bir aktivite değerine ulaşacağı elde edilen sonuçlara göre görülmektedir.

Bu tez çalışmasının çalışmasının ikinci bölümünde, *T. spicata* yaprak ekstraktının farklı iki konsantrasyonu kullanılarak 80 °C'de CuONP'lerin elde edilmesi gerçekleştirildi. Polifenolik bileşikler, bitki ekstraktı aracılı nanomateriyallerin sentezi sırasında indirgeyici ajan olarak görev almaktadırlar [235]. *T. spicata* ekstraktı da polifenolik bileşikler ve flavonoidik grupların zengin bir kaynağıdır. Bu bütün polifenolik bileşikler Cu²⁺ iyonunun indirgenmesi için indirgeyici madde olarak hareket edebilir. Olası mekanizmanın ilk aşamasında, ekstrakt metal tuzu çözeltisi ile karıştırıldığında, polifenolik bileşiklerin hidroksil grupları Cu²⁺ ile kompleks oluşturur ve onu Cu'ya indirger. Bu şekilde oluşturulan metalik bakır atomları, en kararlı oksit yani CuO oluşturmak için mevcut atmosferik oksijen ile reaksiyona girer. Daha sonra, oluşmuş CuO molekülleri bir araya gelerek nükleasyonu izler ve bunu takiben NP'lerin oluşumuyla sonuçlanır. CuONP'ler UV-Vis spektrumunda 247 nm'de en yüksek pik

değerini gösterdi. Ts2CuONP'lerin yüzey morfolojisini ve 3D topoğrafyasını incelemek için yapılan AFM analizi sonucunda sentezlenen NP'lerin 50 nm civarında olduğu belirlendi. CuONP'lerin yüzeyindeki fonksiyonel grupları karakterize etmek için gerçekleştirilen FTIR analizinde CuONP'lerin oluşumunu doğrulayan Cu-O titreşimlerini gösteren 400-600 cm^{-1} bölgesinde titreşimler meydana getiren bantlar görüldü. CuONP'lerin analizleri sonucunda kalsiyum, ve oksijen ile birlikte yaklaşık 1.0 ve 8.0 keV'de tipik bakır optik absorpsiyon pikleri elde edildi. Sentezlenen CuONP'lerin boyut ölçümleri ve şekilsel karakterizasyonu TEM kullanılarak incelendi ve elde edilen sonuçlar küresel morfolojiye sahip CuONP'lerin oluştuğunu gösterdi. Ts1CuONP ve Ts2CuONP ortalama partikül çap büyüklüğünün ise sırası ile 26.8 ve 21 nm olduğu gözlemlendi. Fakat AgNP'lerdeki gibi ekstrakt konsantrasyonunun artışıyla NP ortalama çapında ciddi oranda farklılıklar oluşmadı. DLS ile belirlenen çözeltideki NP'lerin polidispersite indeksleri (PDI) ve ölçülen zeta değerlerine göre Ts1CuONP ve Ts2CuONP'lerin stabilitesinin iyi olduğu ortaya çıkmaktadır. Biyosentezlenmiş CuONP'lerin gram-pozitif bakterilerin ve gram-negatif bakterilere *in vitro* duyarlılıkları, disk difüzyonu ve mikrodilüsyon yöntemleri ile belirlendi. Disk difüzyon testinde maksimum zon çapı Ts1CuONP ile muamele edilmiş *S. aureus*'un gösterdiği belirlendi. CuONP'lerin gram-negatif bakterilere karşı herhangi bir inhibisyon zonu oluşturmadığı gözlemlendi. Elde edilen deneysel sonuçlar biyosentezlenmiş CuONP'lerin gram pozitif bakteriler üzerinde antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu gösterdir. Bu nedenle NP'lerin antibakteriyel aktivitesi daha sonra serbest kalan bakır iyonlarının DNA moleküllerine bağlanması ve nükleik asitler arasında çapraz bağlanma yoluyla sarmal yapının bozulmasına yol açması şeklinde açıklanabilir. Bakteriyel hücrelerin içindeki bakır iyonlarının da biyokimyasal süreci bozarak zarar verdiği bilinmektedir [236], [237]. Ayrıca CuONP'lerin antibakteriyel aktiviteleri NP'ler ile muamele edilen *S. aureus*'un hücre membran zararının ölçülmesi ve büyüme kinetiği üzerindeki etkinin ortaya çıkarılması ile de teyit edildi. CuONP'lerin doz miktarı arttıkça OD değerlerinin de yükseldiği ve membran hasarının arttığı ortaya çıkmaktadır. Büyüme kinetiği sonucuna baktığımızda 6.25 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda Ts1CuONP'lerin *S. aureus*'un büyümesini daha da yavaşlattığı görülmektedir. Ts2CuONP 100 $\mu\text{g/mL}$ 'de *S. aureus*

biyofilm oluşumunu % 57.6 oranında inhibe ederek Ts1CuONP ve CuSO₄.5H₂O'ya kıyasla en yüksek inhibisyon değerini gösterdi.

Ts1CuONP, Ts2CuONP ve CuSO₄.5H₂O'nun L929 hücreleri üzerindeki toksisiteleri XTT yöntemi ile çalışıldı ve hücre canlılığının CuONP'lerin artmış konsantrasyonları ile önemli derecede azaldığı ortaya çıkarıldı. CuONP'lerin toksisite miktarlarına göre sıralaması Ts2CuONP > Ts1CuONP > CuSO₄.5H₂O şeklinde düşünülebilir. CuONP'lerin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi değerlendirildi ve kontrol gurubuna göre çok fazla aktiviteye sahip olamdıkları görüldü. Genel olarak değerlendirir isek AgNP'lerin DPPH radikale karşı aktivitesinin CuONP'lere göre daha yüksek olduğu bulundu.

Tezin son aşamasında ise, *T. spicata* sulu yaprak ekstraktının farklı iki konsantrasyonu kullanılarak FeONP sentezi oda sıcaklığında gerçekleştirildi ve renk değişimi FeONP'lerin oluşumu için temel gösterge olarak alındı. Sentezlenen FeONP'lerin UV-Vis spektrumu, görünür aralıkta sürekli absorpsiyon gösterdi. Fe₂SO₄ ile daha önce yapılan çalışmalarda da sulu çay özütleri kullanılarak sentezlenen amorf FeNP'ler için benzer UV-Vis spektrumları elde edilmiştir [238]. FTIR analizi sonucu görülen absorpsiyon bantları, sentezlenen FeONP'lerin polifenoller ve proteinler tarafından çevrelendiği ihtimalini ortaya çıkarmaktadır [239]. FeONP'lerin EDS analizi, element bileşenlerinin Fe, O ve S 'den oluştuğunu gösterdir. Metalik FeONP'ler 0.7, 6.4 ve 7.1 keV'de tipik optik absorpsiyon pikleri göstermişlerdir. FeONP'lerin morfolojik karakterizasyonu ve boyut analizleri TEM kullanılarak gerçekleştirildi. TEM sonuçları 40 mL *T. spicata* yaprak özütü ile sentezlenen Ts1FeONP'lerin aynı anda ve ortamda iki farklı TEM ölçümleri elde edildi. Ts1FeONP-a için ortalama partikül çapı 120.3 nm ve Ts2FeONP-b'lerin ortalama partikül çapı 17 nm olarak elde edildi. Bu sonuç sentez sırasında dengeli bir karışım olmadığını veya başka koşulların neden olabileceğini göstermektedir. TEM sonuçları yüzeyden çeşitli açılarda çıkıntı yapan ve radyal yönde uzanan küreler şeklinde FeONP'lerin oluştuğunu ortaya çıkardı. Yapılan DLS analizi ve zeta potansiyeli ölçümleri baz alındığında sentezlenen FeONP'lerin sentezlenen AgNP ve CuONP'lere göre stabiletisinin düşük olduğu belirlendi. FeONP'ler aglomerasyona bağlı olarak çeşitli şekil ve boyutta oluşmuşlardır. Elde edilen verilerde FeONP'lerin aglomere olduğu görülmektedir. Sentezlenen FeONP'lerin aglomerasyonunun nedeni, Markova ve ark.

tarafından bildirildiği üzere biyomoleküllerin varlığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir [240].

FeONP'lerin gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı aktiviteleri disk difüzyonu ve mikrodilüsyon yöntemleri ile belirlendi. Disk difüzyonu testinde FeONP uygulananan test bakterileri için inhibisyon zonu gözlemlenmedi. Ts1FeONP'ler en düşük MİK değerini ise *S. typhimurium*' karşı 100 µg/mL ile gösterdi. Ts1FeONP'lerin bakterilerde neden olduğu membran hasarı ortama salınan hücre bileşenlerinin absorbanlarının ölçülmesi ile belirlendi ve *B. cereus* için 260 ve 280 nm'de absorbansta AgNP ve CuONP'lere göre oldukça düşük bir artış değeri elde edildi. Elde edilen sonuçlardan ayrıca Ts1FeONP'lerin *S. aureus*'un büyümesini daha da yavaşlattığı görülmektedir ve bunun nedenin de sentez sırasında TEM görüntülerinde de ortaya çıkan küçük boyutlu Ts1FeONP'lerin olduğu düşünülmektedir. Antibiyofilm etkinliklerine bakıldığında Fe iyon formuna göre sentezlenen FeONP'lerin aktivitelerinin oldukça düşük olduğu görüldü. FeSO₄.7H₂O 'nun L929 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisine bakıldığında, nanopartiküllere kıyas ile daha toksik olduğu ortaya çıkmaktadır. Hücrenin canlılığı, NP'lerin artmış konsantrasyonları ile çok fazla etkilenmedi. Ts1FeONP'lerinin sitotoksikite profili, Ts2FeONP'lerle benzerdir ve incelenen AgNP ve CuONP arasında en az toksik etkiye sahiptir. NP'lerin toksisite miktarlarına göre sıralaması FeSO₄.7H₂O>Ts1FeONP≈Ts2FeONP şeklinde düşünülebilir. FeONP'lerin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi aktivitesinin diğer metal NP'ler ile kıyaslandığında oldukça düşük olduğu belirlendi. FeONP'lerin düşük sitotoksik etkinlikleri ile canlı vücudunda birçok çalışmada biyoyumlu bir biçimde kullanılma potansiyeli olduğu değerlendirilmektedir.

S. aureus, klinik yönetimini zorlaştıran güçlü biyofilm üreticileri olarak bilinmektedir. İnsanlarda, yaşamı tehdit eden birçok enfeksiyonun nedenleri olarak kabul edilmektedir [241]. Artan prevalansı ile başarılı tedavi daha da zorlaşmaktadır. Kronik enfeksiyonlarda bu tür bakteriler olduğunda metisilin direnci ve antibiyotik etkisizliği önemli sorun teşkil etmektedir. Böylelikle, CsAgNP ile biyofilm bazlı bakteriyel enfeksiyonlarla mücadele için konvansiyonel antibiyotik tedavisinin yanı sıra yeni alternatif bir strateji olabilir.

Hem antibakteriyel hem de sitotoksik çalışmaların sonuçları göz önüne alındığında, boyut, şekil ve farklı bitki kaynaklarından gelen yaprak özütünün NP'lerin biyolojik aktivitelerinin kontrolünde önemli parametreler olduğu ortaya çıkmaktadır. NP'ler insan vücudunun maruz kaldığı uygulamalarda kullanıldığında, biyouyumluluk çalışmaları gereklidir. Bununla birlikte, antimikrobiyal özelliklere sahip olan NP'lerin çoğu, belirli konsantrasyonlarda kullanıldığında insan hücreleri üzerinde sitotoksik etkilere sahiptir.

Altın, gümüş, paladyum, platin, titanyum gibi metal NP'lerin optik, elektronik, katalitik özellikleri ve birçok alanda uygulamaları nedeniyle teknolojik önemi bulunmaktadır. Bunların arasında Ag ve CuNP'leri, çoklu ilaca dirençli organizmalar da dâhil olmak üzere çok çeşitli mikroorganizmalara karşı güçlü antimikrobiyal özelliklerinden dolayı yeni antimikrobiyal ajanlar olarak önem kazanmışlardır. Gümüş pahalı bir metaldir ve dolayısıyla AgNP'lerin sentezi için maliyet yüksektir. Tam tersine, bakır gümüşe kıyasla daha ucuzdur ve kolayca bulunur ve dolayısıyla CuNP'lerin sentezi maliyet açısından etkili olmaktadır. CuNP'lerin ilave bir avantajı, polimer veya makromoleküllerle kolayca karışabilen CuONP'lerini oksitlemek ve oluşturmak ve hem kimyasal hem de fiziksel özellikler bakımından nispeten daha kararlı olmasıdır [242], [243].

Demir, demir oksitler, bakır, bakır oksitler, titanyum, titanyum oksitler, çinko, çinko oksitler, gümüş ve altın gibi çeşitli NP'ler ve bunların oksitleri kuvvetli antimikrobiyal ajanlar olarak kullanılmıştır. Nanopartikül veya iyonik formda bulunan gümüş, diğer metallerle karşılaştırıldığında mikroorganizmalar için en toksik olanı olarak ortaya çıkmaktadır [122].

Bakteriyel enfeksiyonlar ile mücadelede inorganik nanomateryallerin kullanılması, kliniklerde ve geleneksel tıpta uygulanan umut verici bir tedavi yöntemidir. Doğal antimikrobiyal etki ile fonksiyonel olmayan NP'ler için çözünmüş iyonlar, DNA ile etkileşime girerek, ribozom fonksiyonlarını değiştirerek ve zarın bozulmasına neden olarak farklı bir şekilde etki ederler. Bu mekanizmalar prokaryot hücreleri için seçici değildir, dolayısıyla ökaryot hücrelerinde toksik etkileri tetiklerler. ROS üretimi, işlevsel olmayan inorganik NP'ler tarafından aracılık edilir ve hızlandırılır ve bu moleküller,

mitokondriyal disfonksiyonların, DNA hasarının ve değiştirilmiş protein üretiminin neden olduğu hücre ölüm mekanizmalarında da rol alır. Ökaryot hücreleri için biyoyumluluğun geliştirilmesinde bazı girişimler, nanoparçacık yüzeyinin polimerlerle veya küçük moleküller ile kaplanmasıyla yapılabilmektedir. Ökaryot hücreleri için daha fazla biyoyumlu sistem elde etmek için yapılan diğer girişimler, doğal anti-enfektif özellikler sergilemeyen ve bunları fitokimyasallar, antibiyotikler veya antimikrobiyal peptitler ile işlevselleştiren NP'lerin kullanımını gerçekleştirmektedir.

Son zamanlarda, yeşil sentez yöntemleri ile elde edilen antimikrobiyal özelliklere sahip NP'lerin elde edilmesi ve etkinliği konusunda ki çalışmalara yoğun bir ilgi görülmektedir. Fitokimyasal olarak işlevselleştirilmiş NP'ler, patojenlerde çoklu ilaç direncinin üstesinden gelmek için daha fazla biyoyumlu ve daha etkili sistemler elde etmek için yeni gelişen bir yaklaşımdır. Sentez işlemi, bitki özleri ile metal tuzlarının redüksüyonuna dayanmaktadır. Bu tür NP'lerin elde edilmesini ve test edilmesini gösteren çalışmalar olsa bile, moleküler mekanizmalar üzerinde çok fazla çalışma yapılmamıştır.

Metalik NP'lerin etki mekanizması önerilmişse de, bu NP'lerin bakteriyel sitoplazmada etkileştiği yerler konusu çok net değildir. Bu nedenle, AgNP'lerin etkileşime girdiği mikroorganizma hedeflerini belirlemek için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Sulu çözelti içinde ve standart sıcaklık ve basınç koşulları altında redoks reaksiyonları yürütmek için tüm biyolojik sistemlerin kullandığı doğal makineler, çoğu zaman maliyetinin çok altında, çok çeşitli nano boyutlu malzemeler üretmek için güçlü bir strateji sağlamaktadır. Biyosentezlenmiş NP'ler sıklıkla bir biyolojik taşıyıcıya bağlanırlar ve pek çoğu, çevresel koşullar altında NP'lerin uyumluluğunu ve stabilitesini artıran biyojenik kapaklayıcı materyallere sahiptir. Kapaklayıcı maddeleri, biyosentez için kullanılan belirli organizmalara özgüdür, bu sayede çok çeşitli ilginç özellikler elde edilebileceği düşünülmektedir.

Biyosentezlenmiş NP'ler, geleneksel NP'lerin kullanıldığı neredeyse her alanda kullanılmaktadır. Biyojenik NP'lerin zorluklarından biri de NP'lerin biyolojik maddeden

ayrılmasıdır. Son yıllarda NP biyosentez araştırmalarında hacim ve büyüme göz önüne alındığında, özellikle NP'lerin uygulamalarına yönelik çok daha yaygın ve yoğun araştırmalar görölmektedir. Fakat NP elde edilmesinde altta yatan biyosentez yöntemlerinin daha fazla araştırılması ve geliştirilmesi ve bununla birlikte yeni biyosentetik NP formlarının oluşturulması beklenmektedir. Ayrıca, Değişik şekillerde nanopartiköl sentezleyip şeklin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesindeki rolünü moleküler seviyede çalışmak ileriye dönük hedefler arasında olmalıdır. Antibiyofilm aktivitesi için nanopartiköllere maruz kalan *S. aureus* için moleküler mekanizmaları açıklayıcı çalışmalar yapmak daha detaylı bir antibiyofilm aktivite öngörüsü oluşturacaktır. Ülkemizin sahip olduğu endemik bitki potansiyelini değerlendirerek farklı bitkiler ile nanopartiköl sentezi gerçekleştirmek ileriye dönük hedefler arasında yer almaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Feynman, R.P., (1960). "There's plenty of room at the bottom", Engineering and science, 23: 22-36.
- [2] Albanese, A. Tang, P.S. ve Chan, W.C., (2012). "The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems", Annual review of biomedical engineering, 14: 1-16.
- [3] Pande, M. ve Bhaskarwar, A.N., (2016). Nanoparticles: Preparation and Characterization: Momentum Press.
- [4] Hulkoti, N.I. ve Taranath, T., (2014). "Biosynthesis of nanoparticles using microbes—a review", Colloids and surfaces B: Biointerfaces, 121: 474-483.
- [5] Nath, D. ve Banerjee, P., (2013). "Green nanotechnology—a new hope for medical biology", Environmental toxicology and pharmacology, 36: 997-1014.
- [6] Graff, A. Benito, S.M. Verbert, C. ve Meier, W., (2004). "Polymer nanocontainers", Nanobiotechnology: concepts, applications and perspectives: 168-184.
- [7] Salata, O.V., (2004). "Applications of nanoparticles in biology and medicine", Journal of nanobiotechnology, 2: 3.
- [8] Lu, A.H. Salabas, E.e.L. ve Schüth, F., (2007). "Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application", Angewandte Chemie International Edition, 46: 1222-1244.
- [9] Neuberger, T. Schöpf, B. Hofmann, H. Hofmann, M. ve Von Rechenberg, B., (2005). "Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: possibilities and limitations of a new drug delivery system", Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 293: 483-496.
- [10] Aptekar, J.W. Cassidy, M.C. Johnson, A.C. Barton, R.A. Lee, M. Ogier, A.C. Vo, C. Anahtar, M.N. Ren, Y. ve Bhatia, S.N., (2009). "Silicon nanoparticles as hyperpolarized magnetic resonance imaging agents", ACS nano, 3: 4003-4008.
- [11] Prasad, D.L. ve Jemmis, E.D., (2008). "Stuffing improves the stability of fullerene-like boron clusters", Physical review letters, 100: 165504.

- [12] Theodore, L. ve Kunz, R., (2005). "Nanotechnology: prime materials and manufacturing methods", Nanotechnology: Environmental Implications and Solutions. John Wiley& Sons, Inc., Hoboken, NJ: 70-79.
- [13] Mintmire, J. Dunlap, B. ve White, C., (1992). "Are fullerene tubules metallic?", Physical review letters, 68: 631.
- [14] Wang, X. Li, Q. Xie, J. Jin, Z. Wang, J. Li, Y. Jiang, K. ve Fan, S., (2009). "Fabrication of ultralong and electrically uniform single-walled carbon nanotubes on clean substrates", Nano Letters, 9: 3137-3141.
- [15] Cloutier, S. Eakin, J. Guico, R. Sousa, M. Crawford, G. ve Xu, J., (2006). "Molecular self-organization in cylindrical nanocavities", Physical Review E, 73: 051703.
- [16] Tomalia, D.A., (2005). "Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic polymer chemistry", Progress in Polymer Science, 30: 294-324.
- [17] Smith, D.K. ve Diederich, F., (2000). Supramolecular dendrimer chemistry: a journey through the branched architecture, ed. Dendrimers li. Springer, 183-227.
- [18] Murray, C.B. Kagan, a.C. ve Bawendi, M., (2000). "Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and close-packed nanocrystal assemblies", Annual Review of Materials Science, 30: 545-610.
- [19] Sepeur, S., (2008). Nanotechnology: technical basics and applications: Vincentz Network GmbH & Co KG.
- [20] Mittal, A.K. Chisti, Y. ve Banerjee, U.C., (2013). "Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts", Biotechnology advances, 31: 346-356.
- [21] Mukherjee, P. Ahmad, A. Mandal, D. Senapati, S. Sainkar, S.R. Khan, M.I. Parishcha, R. Ajaykumar, P. Alam, M. ve 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: 515-519.
- [22] Meyers, M.A. Mishra, A. ve Benson, D.J., (2006). "Mechanical properties of nanocrystalline materials", Progress in materials science, 51: 427-556.
- [23] Thakkar, K.N. Mhatre, S.S. ve Parikh, R.Y., (2010). "Biological synthesis of metallic nanoparticles", Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 6: 257-262.
- [24] 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: 83-96.
- [25] Hernández-Pinero, J.L. Terrón-Rebolledo, M. Foroughbakhch, R. Moreno-Limón, S. Melendrez, M. Solís-Pomar, F. ve Pérez-Tijerina, E., (2016). "Effect of heating rate and plant species on the size and uniformity of silver

- nanoparticles synthesized using aromatic plant extracts", *Applied Nanoscience*, 6: 1183-1190.
- [26] Bar, H. Bhui, D.K. Sahoo, G.P. Sarkar, P. De, S.P. ve Misra, A., (2009). "Green synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas*", *Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects*, 339: 134-139.
 - [27] Parsons, J. Peralta-Videa, J. ve Gardea-Torresdey, J., (2007). "Use of plants in biotechnology: synthesis of metal nanoparticles by inactivated plant tissues, plant extracts, and living plants", *Developments in environmental science*, 5: 463-485.
 - [28] Luangpipat, T. Beattie, I.R. Chisti, Y. ve Haverkamp, R.G., (2011). "Gold nanoparticles produced in a microalga", *Journal of Nanoparticle Research*, 13: 6439-6445.
 - [29] Rajesh, S. Raja, D.P. Rathi, J. ve Sahayaraj, K., (2012). "Biosynthesis of silver nanoparticles using *Ulva fasciata*(Delile) ethyl acetate extract and its activity against *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*", *Journal of Biopesticides*, 5: 2012.
 - [30] Singaravelu, G. Arockiamary, J. Kumar, V.G. ve Govindaraju, K., (2007). "A novel extracellular synthesis of monodisperse gold nanoparticles using marine alga, *Sargassum wightii* Greville", *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 57: 97-101.
 - [31] Dahl, J.A. Maddux, B.L. ve Hutchison, J.E., (2007). "Toward greener nanosynthesis", *Chemical reviews*, 107: 2228-2269.
 - [32] Hussain, I. Singh, N. Singh, A. Singh, H. ve Singh, S., (2016). "Green synthesis of nanoparticles and its potential application", *Biotechnology letters*, 38: 545-560.
 - [33] Oxford English Dictionary Online, Definition of Plant, <https://en.oxforddictionaries.com/definition/plant>, 11 Aralık 2017.
 - [34] Collins English Dictionary Online, Definition of Extract, <https://www.collinsdictionary.com/dictionary/english/extract>, 12 Aralık 2017.
 - [35] Armendariz, V. Herrera, I. Jose-yacaman, M. Troiani, H. Santiago, P. ve Gardea-Torresdey, J.L., (2004). "Size controlled gold nanoparticle formation by *Avena sativa* biomass: use of plants in nanobiotechnology", *Journal of Nanoparticle Research*, 6: 377-382.
 - [36] Beattie, I.R. ve Haverkamp, R.G., (2011). "Silver and gold nanoparticles in plants: sites for the reduction to metal", *Metallomics*, 3: 628-632.
 - [37] Iravani, S., (2011). "Green synthesis of metal nanoparticles using plants", *Green Chemistry*, 13: 2638-2650.
 - [38] Dhillon, G.S. Brar, S.K. Kaur, S. ve Verma, M., (2012). "Green approach for nanoparticle biosynthesis by fungi: current trends and applications", *Critical reviews in biotechnology*, 32: 49-73.

- [39] Kamat, P.V., (2002). Photophysical, photochemical and photocatalytic aspects of metal nanoparticles, eds.: ACS Publications.
- [40] Chandran, S.P. Chaudhary, M. Pasricha, R. Ahmad, A. ve Sastry, M., (2006). "Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract", *Biotechnology progress*, 22: 577-583.
- [41] Shankar, S.S. Rai, A. Ahmad, A. ve Sastry, M., (2004). "Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core–Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth", *Journal of colloid and interface science*, 275: 496-502.
- [42] Vijayaraghavan, K. ve Ashokkumar, T., (2017). "Plant-mediated biosynthesis of metallic nanoparticles: A review of literature, factors affecting synthesis, characterization techniques and applications", *Journal of environmental chemical engineering*.
- [43] Mittal, J. Batra, A. Singh, A. ve Sharma, M.M., (2014). "Phytofabrication of nanoparticles through plant as nanofactories", *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 5: 043002.
- [44] Song, J.Y. Kwon, E.-Y. ve Kim, B.S., (2010). "Biological synthesis of platinum nanoparticles using *Diopyros kaki* leaf extract", *Bioprocess and biosystems engineering*, 33: 159.
- [45] babu Maddinedi, S. Mandal, B.K. Ranjan, S. ve Dasgupta, N., (2015). "Diastase assisted green synthesis of size-controllable gold nanoparticles", *RSC Advances*, 5: 26727-26733.
- [46] babu Maddinedi, S. Mandal, B.K. ve Maddili, S.K., (2017). "Biofabrication of size controllable silver nanoparticles–A green approach", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 167: 236-241.
- [47] Tringali, C., (2003). *Bioactive compounds from natural sources: isolation, Characterization and biological properties*: CRC Press.
- [48] Rai, M. ve Posten, C., (2013). *Green Biosynthesis of Nanoparticles: Mechanisms and Applications*: CABI.
- [49] Bäuerlein, E., (2003). "Biomining of Unicellular Organisms: An Unusual Membrane Biochemistry for the Production of Inorganic Nano- and Microstructures", *Angewandte Chemie International Edition*, 42: 614-641.
- [50] Bai, H.-J. ve Zhang, Z.-M., (2009). "Microbial synthesis of semiconductor lead sulfide nanoparticles using immobilized *Rhodobacter sphaeroides*", *Materials Letters*, 63: 764-766.
- [51] Das, S.K. ve Marsili, E., (2011). *Bioinspired metal nanoparticle: synthesis, properties and application*, ed. Nanomaterials. InTech.
- [52] Lengke, M.F. Ravel, B. Fleet, M.E. Wanger, G. Gordon, R.A. ve Southam, G., (2006). "Mechanisms of gold bioaccumulation by filamentous cyanobacteria from gold (III)– chloride complex", *Environmental science & technology*, 40: 6304-6309.

- [53] Nair, B. ve Pradeep, T., (2002). "Coalescence of nanoclusters and formation of submicron crystallites assisted by *Lactobacillus* strains", *Crystal Growth & Design*, 2: 293-298.
- [54] Parikh, R.Y. Singh, S. Prasad, B. Patole, M.S. Sastry, M. ve Shouche, Y.S., (2008). "Extracellular synthesis of crystalline silver nanoparticles and molecular evidence of silver resistance from *Morganella* sp.: towards understanding biochemical synthesis mechanism", *ChemBioChem*, 9: 1415-1422.
- [55] Sharma, N. Pinnaka, A.K. Raje, M. Ashish, F. Bhattacharyya, M.S. ve Choudhury, A.R., (2012). "Exploitation of marine bacteria for production of gold nanoparticles", *Microbial cell factories*, 11: 86.
- [56] Riddin, T. Gericke, M. ve Whiteley, C., (2006). "Analysis of the inter-and extracellular formation of platinum nanoparticles by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* using response surface methodology", *Nanotechnology*, 17: 3482.
- [57] Han, G. Ghosh, P. ve Rotello, V.M., (2007). Multi-functional gold nanoparticles for drug delivery, ed. *Bio-applications of Nanoparticles*. Springer, 48-56.
- [58] Liu, J.-f. Yu, S.-j. Yin, Y.-g. ve Chao, J.-b., (2012). "Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 33: 95-106.
- [59] Abdelwahed, W. Degobert, G. Stainmesse, S. ve Fessi, H., (2006). "Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations", *Advanced drug delivery reviews*, 58: 1688-1713.
- [60] Kowalczyk, B. Lagzi, I. ve Grzybowski, B.A., (2011). "Nanoseparations: strategies for size and/or shape-selective purification of nanoparticles", *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 16: 135-148.
- [61] Abdullaeva, Z., (2017). *Synthesis of Nanoparticles and Nanomaterials: Biological Approaches*: Springer.
- [62] Das, R. Ali, E. ve Abd Hamid, S.B., (2014). "CURRENT APPLICATIONS OF X-RAY POWDER DIFFRACTION-A REVIEW", *Reviews on Advanced Materials Science*, 38.
- [63] Waseda, Y. Matsubara, E. ve Shinoda, K., (2011). *X-ray diffraction crystallography: introduction, examples and solved problems*: Springer Science & Business Media.
- [64] Pope, C.G., (1997). "X-ray diffraction and the Bragg equation", *Journal of chemical education*, 74: 129.
- [65] Ashraf, J.M. Ansari, M.A. Khan, H.M. Alzohairy, M.A. ve Choi, I., (2016). "Green synthesis of silver nanoparticles and characterization of their inhibitory effects on AGEs formation using biophysical techniques", *Scientific reports*, 6: 20414.
- [66] Krithiga, N. Rajalakshmi, A. ve Jayachitra, A., (2015). "Green synthesis of silver nanoparticles using leaf extracts of *Clitoria ternatea* and *Solanum nigrum* and

- study of its antibacterial effect against common nosocomial pathogens", *Journal of Nanoscience*, 2015.
- [67] Humphreys, J. Beanland, R. ve Goodhew, P.J., (2014). *Electron microscopy and analysis*: CRC Press.
 - [68] McMullan, D., (1995). "Scanning electron microscopy 1928–1965", *Scanning*, 17: 175-185.
 - [69] Joshi, M. ve Viswanathan, V., (2006). "High-performance filaments from compatibilized polypropylene/clay nanocomposites", *Journal of Applied Polymer Science*, 102: 2164-2174.
 - [70] Kulkarni, S.K., (2015). *Nanotechnology: principles and practices*: Springer.
 - [71] Siddiqui, M.H. Al-Wahaibi, M.H. ve Mohammad, F., (2015). "Nanotechnology and Plant Sciences", Springer International Publishing, Cham., 303p. doi, 10: 978-973.
 - [72] Upstone, S.L., (2006). Ultraviolet/Visible Light Absorption Spectrophotometry in Clinical Chemistry, ed. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd.
 - [73] Pockrand, I. Swalen, J. Gordon li, J. ve Philpott, M., (1978). "Surface plasmon spectroscopy of organic monolayer assemblies", *Surface Science*, 74: 237-244.
 - [74] Gordon li, J. ve Ernst, S., (1980). "Surface plasmons as a probe of the electrochemical interface", *Surface Science*, 101: 499-506.
 - [75] Kreibig, U. ve Vollmer, M., (2013). *Optical properties of metal clusters*: Springer Science & Business Media.
 - [76] Kumar, C.G. ve Poornachandra, Y., (2015). "Biodirected synthesis of Miconazole-conjugated bacterial silver nanoparticles and their application as antifungal agents and drug delivery vehicles", *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 125: 110-119.
 - [77] Berne, B.J. ve Pecora, R., (2000). *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*: Courier Corporation.
 - [78] Angus, J.C. Morrow, D.L. Dunning, J.W. ve French, M.J., (1969). "Motion measurement by laser Doppler techniques", *Industrial & Engineering Chemistry*, 61: 8-20.
 - [79] Eilers, H. ve Korff, J., (1940). "The significance of the phenomenon of the electrical charge on the stability of hydrophobic dispersions", *Transactions of the Faraday Society*, 35: 229-241.
 - [80] Grumezescu, A., (2016). *Nanobiomaterials in antimicrobial therapy: Applications of nanobiomaterials*: William Andrew.
 - [81] Durán, N. Marcato, P.D. Alves, O.L. De Souza, G.I. ve Esposito, E., (2005). "Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains", *Journal of nanobiotechnology*, 3: 8.

- [82] Jalili, N. ve Laxminarayana, K., (2004). "A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences", *Mechatronics*, 14: 907-945.
- [83] Hutter, J.L. ve Bechhoefer, J., (1993). "Calibration of atomic-force microscope tips", *Review of Scientific Instruments*, 64: 1868-1873.
- [84] Dufrêne, Y.F., (2002). "Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology", *Journal of bacteriology*, 184: 5205-5213.
- [85] Visweswara Rao, P. ve Hua Gan, S., (2015). "Recent advances in nanotechnology-based diagnosis and treatments of diabetes", *Current drug metabolism*, 16: 371-375.
- [86] Rai, M. Ingle, A.P. Birla, S. Yadav, A. ve Santos, C.A.D., (2016). "Strategic role of selected noble metal nanoparticles in medicine", *Critical reviews in microbiology*, 42: 696-719.
- [87] Abbasi, E. Milani, M. Fekri Aval, S. Kouhi, M. Akbarzadeh, A. Tayefi Nasrabadi, H. Nikasa, P. Joo, S.W. Hanifehpour, Y. ve Nejati-Koshki, K., (2016). "Silver nanoparticles: synthesis methods, bio-applications and properties", *Critical reviews in microbiology*, 42: 173-180.
- [88] Pereira, L. Mehboob, F. Stams, A.J. Mota, M.M. Rijnaarts, H.H. ve Alves, M.M., (2015). "Metallic nanoparticles: microbial synthesis and unique properties for biotechnological applications, bioavailability and biotransformation", *Critical reviews in biotechnology*, 35: 114-128.
- [89] Singh, P. Kim, Y.-J. Zhang, D. ve Yang, D.-C., (2016). "Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms", *Trends in biotechnology*, 34: 588-599.
- [90] Castaneda, M.T. Merkoci, A. Pumera, M. ve Alegret, S., (2007). "Electrochemical genosensors for biomedical applications based on gold nanoparticles", *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 1961-1967.
- [91] Chaloupka, K. Malam, Y. ve Seifalian, A.M., (2010). "Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications", *Trends in biotechnology*, 28: 580-588.
- [92] Ganeshkumar, M. Sathishkumar, M. Ponrasu, T. Dinesh, M.G. ve Suguna, L., (2013). "Spontaneous ultra fast synthesis of gold nanoparticles using *Punica granatum* for cancer targeted drug delivery", *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 106: 208-216.
- [93] Prow, T.W. Grice, J.E. Lin, L.L. Faye, R. Butler, M. Becker, W. Wurm, E.M. Yoong, C. Robertson, T.A. ve Soyer, H.P., (2011). "Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery", *Advanced drug delivery reviews*, 63: 470-491.
- [94] Maity, S. Sen, I.K. ve Islam, S.S., (2012). "Green synthesis of gold nanoparticles using gum polysaccharide of *Cochlospermum religiosum* (katira gum) and study

- of catalytic activity", *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 45: 130-134.
- [95] Nair, R. Varghese, S.H. Nair, B.G. Maekawa, T. Yoshida, Y. ve Kumar, D.S., (2010). "Nanoparticulate material delivery to plants", *Plant science*, 179: 154-163.
 - [96] Niraimathi, K. Sudha, V. Lavanya, R. ve Brindha, P., (2013). "Biosynthesis of silver nanoparticles using *Alternanthera sessilis* (Linn.) extract and their antimicrobial, antioxidant activities", *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 102: 288-291.
 - [97] Bhat, R. Sharanabasava, V. Deshpande, R. Shetti, U. Sanjeev, G. ve Venkataraman, A., (2013). "Photo-bio-synthesis of irregular shaped functionalized gold nanoparticles using edible mushroom *Pleurotus florida* and its anticancer evaluation", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 125: 63-69.
 - [98] Sankar, R. Karthik, A. Prabu, A. Karthik, S. Shivashangari, K.S. ve Ravikumar, V., (2013). "Origanum vulgare mediated biosynthesis of silver nanoparticles for its antibacterial and anticancer activity", *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 108: 80-84.
 - [99] Inbakandan, D. Kumar, C. Abraham, L.S. Kirubakaran, R. Venkatesan, R. ve Khan, S.A., (2013). "Silver nanoparticles with anti microfouling effect: a study against marine biofilm forming bacteria", *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 111: 636-643.
 - [100] Marambio-Jones, C. ve Hoek, E.M., (2010). "A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment", *Journal of Nanoparticle Research*, 12: 1531-1551.
 - [101] Rai, M. Deshmukh, S. Ingle, A. ve Gade, A., (2012). "Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria", *Journal of applied microbiology*, 112: 841-852.
 - [102] Haider, A. ve Kang, I.-K., (2015). "Preparation of silver nanoparticles and their industrial and biomedical applications: a comprehensive review", *Advances in materials science and engineering*, 2015.
 - [103] Panyala, N.R. Peña-Méndez, E.M. ve Havel, J., (2008). "Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health?", *Journal of Applied Biomedicine (De Gruyter Open)*, 6.
 - [104] Iv, M. Telischak, N. Feng, D. Holdsworth, S.J. Yeom, K.W. ve Daldrup-Link, H.E., (2015). "Clinical applications of iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging of brain tumors", *Nanomedicine*, 10: 993-1018.
 - [105] Ambika, S. ve Sundrarajan, M., (2015). "Green biosynthesis of ZnO nanoparticles using *Vitex negundo* L. extract: Spectroscopic investigation of interaction between ZnO nanoparticles and human serum albumin", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 149: 143-148.

- [106] Zahir, A.A. Chauhan, I.S. Bagavan, A. Kamaraj, C. Elango, G. Shankar, J. Arjaria, N. Roopan, S.M. Rahuman, A.A. ve Singh, N., (2015). "Green synthesis of silver and titanium dioxide nanoparticles using *Euphorbia prostrata* extract shows shift from apoptosis to G0/G1 arrest followed by necrotic cell death in *Leishmania donovani*", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59: 4782-4799.
- [107] Momeni, S. ve Nabipour, I., (2015). "A simple green synthesis of palladium nanoparticles with *Sargassum* alga and their electrocatalytic activities towards hydrogen peroxide", *Applied biochemistry and biotechnology*, 176: 1937-1949.
- [108] Nasrollahzadeh, M. ve Sajadi, S.M., (2015). "Green synthesis of copper nanoparticles using *Ginkgo biloba* L. leaf extract and their catalytic activity for the Huisgen [3+ 2] cycloaddition of azides and alkynes at room temperature", *Journal of colloid and interface science*, 457: 141-147.
- [109] Waki, M. Sugiyama, E. Kondo, T. Sano, K. ve Setou, M., (2015). "Nanoparticle-assisted laser desorption/ionization for metabolite imaging", *Mass Spectrometry Imaging of Small Molecules*: 159-173.
- [110] Valodkar, M. Jadeja, R.N. Thounaojam, M.C. Devkar, R.V. ve Thakore, S., (2011). "Biocompatible synthesis of peptide capped copper nanoparticles and their biological effect on tumor cells", *Materials Chemistry and Physics*, 128: 83-89.
- [111] Moulton, M.C. Braydich-Stolle, L.K. Nadagouda, M.N. Kunzelman, S. Hussain, S.M. ve Varma, R.S., (2010). "Synthesis, characterization and biocompatibility of "green" synthesized silver nanoparticles using tea polyphenols", *Nanoscale*, 2: 763-770.
- [112] Patra, C.R. Bhattacharya, R. Mukhopadhyay, D. ve Mukherjee, P., (2010). "Fabrication of gold nanoparticles for targeted therapy in pancreatic cancer", *Advanced drug delivery reviews*, 62: 346-361.
- [113] Zheng, B. Qian, L. Yuan, H. Xiao, D. Yang, X. Paau, M.C. ve Choi, M.M., (2010). "Preparation of gold nanoparticles on eggshell membrane and their biosensing application", *Talanta*, 82: 177-183.
- [114] Zheng, B. Xie, S. Qian, L. Yuan, H. Xiao, D. ve Choi, M.M., (2011). "Gold nanoparticles-coated eggshell membrane with immobilized glucose oxidase for fabrication of glucose biosensor", *Sensors and Actuators B: Chemical*, 152: 49-55.
- [115] Wang, T. Yang, L. Zhang, B. ve Liu, J., (2010). "Extracellular biosynthesis and transformation of selenium nanoparticles and application in H₂O₂ biosensor", *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 80: 94-102.
- [116] Iskandar, F., (2009). "Nanoparticle processing for optical applications—A review", *Advanced Powder Technology*, 20: 283-292.
- [117] Talapin, D.V. Lee, J.-S. Kovalenko, M.V. ve Shevchenko, E.V., (2009). "Prospects of colloidal nanocrystals for electronic and optoelectronic applications", *Chemical reviews*, 110: 389-458.

- [118] Fayaz, M. Tiwary, C. Kalaichelvan, P. ve Venkatesan, R., (2010). "Blue orange light emission from biogenic synthesized silver nanoparticles using *Trichoderma viride*", *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 75: 175-178.
- [119] Podgaetsky, V.M. Tat'yana, N.K. Tereshchenko, S.A. Reznichenko, A.V. ve Selishchev, S.V., (2004). "Laser-limiting materials for medical use": International Society for Optics and Photonics.
- [120] Sathyavathi, R. Krishna, M.B. Rao, S.V. Saritha, R. ve Rao, D.N., (2010). "Biosynthesis of silver nanoparticles using *Coriandrum sativum* leaf extract and their application in nonlinear optics", *Advanced science letters*, 3: 138-143.
- [121] Li, Q. Mahendra, S. Lyon, D.Y. Brunet, L. Liga, M.V. Li, D. ve Alvarez, P.J., (2008). "Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications", *Water research*, 42: 4591-4602.
- [122] Sondi, I. ve Salopek-Sondi, B., (2004). "Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria", *Journal of colloid and interface science*, 275: 177-182.
- [123] Auffan, M. Rose, J. Wiesner, M.R. ve Bottero, J.-Y., (2009). "Chemical stability of metallic nanoparticles: a parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro", *Environmental Pollution*, 157: 1127-1133.
- [124] Liu, J. Sonshine, D.A. Shervani, S. ve Hurt, R.H., (2010). "Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces", *ACS nano*, 4: 6903-6913.
- [125] Xia, T. Kovochich, M. Brant, J. Hotze, M. Sempf, J. Oberley, T. Sioutas, C. Yeh, J.I. Wiesner, M.R. ve Nel, A.E., (2006). "Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm", *Nano Letters*, 6: 1794-1807.
- [126] Yang, Y. Zhang, C. ve Hu, Z., (2013). "Impact of metallic and metal oxide nanoparticles on wastewater treatment and anaerobic digestion", *Environmental Science: Processes & Impacts*, 15: 39-48.
- [127] You, Y. Han, J. Chiu, P.C. ve Jin, Y., (2005). "Removal and inactivation of waterborne viruses using zerovalent iron", *Environmental science & technology*, 39: 9263-9269.
- [128] Wang, C.-B. ve Zhang, W.-X., (1997). "Synthesizing nanoscale iron particles for rapid and complete dechlorination of TCE and PCBs", *Environmental science & technology*, 31: 2154-2156.
- [129] Zhang, X. Lin, Y.-m. Shan, X.-q. ve Chen, Z.-l., (2010). "Degradation of 2, 4, 6-trinitrotoluene (TNT) from explosive wastewater using nanoscale zero-valent iron", *Chemical Engineering Journal*, 158: 566-570.
- [130] Kokura, S. Handa, O. Takagi, T. Ishikawa, T. Naito, Y. ve Yoshikawa, T., (2010). "Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics", *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6: 570-574.

- [131] Weiss, J. Takhistov, P. ve McClements, D.J., (2006). "Functional materials in food nanotechnology", *Journal of food science*, 71.
- [132] Kuppusamy, P. Yusoff, M.M. Maniam, G.P. ve Govindan, N., (2016). "Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications–An updated report", *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24: 473-484.
- [133] Karamushka, V. Gadd, D. Gruzina, T. ve Ul'berg, Z., (1998). "The application of colloid-biochemical parameters of microbial cells for the assessment of heavy metal toxicity", *Colloid journal of the Russian Academy of Sciences*, 60: 717-720.
- [134] Sundaresan, K. Sivakumar, A. Vigneswaran, C. ve Ramachandran, T., (2012). "Influence of nano titanium dioxide finish, prepared by sol-gel technique, on the ultraviolet protection, antimicrobial, and self-cleaning characteristics of cotton fabrics", *Journal of Industrial Textiles*, 41: 259-277.
- [135] Singleton, P., (2004). *Bacteria in biology, biotechnology and medicine*: John Wiley & Sons.
- [136] Roberts, I.S., (1996). "The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria", *Annual Reviews in Microbiology*, 50: 285-315.
- [137] Cabeen, M.T. ve Jacobs-Wagner, C., (2005). "Bacterial cell shape", *Nature reviews microbiology*, 3: 601.
- [138] Engler, A.C. Wiradharma, N. Ong, Z.Y. Coady, D.J. Hedrick, J.L. ve Yang, Y.-Y., (2012). "Emerging trends in macromolecular antimicrobials to fight multi-drug-resistant infections", *Nano Today*, 7: 201-222.
- [139] Ahmed, S. Ahmad, M. Swami, B.L. ve Ikram, S., (2016). "A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise", *Journal of advanced research*, 7: 17-28.
- [140] Ankanna, S. TNVKV, P. Elumalai, E. ve Savithramma, N., (2010). "Production of biogenic silver nanoparticles using *Boswellia ovalifoliolata* stem bark", *Dig J Nanomater Biostruct*, 5: 369-372.
- [141] Klueh, U. Wagner, V. Kelly, S. Johnson, A. ve Bryers, J., (2000). "Efficacy of silver-coated fabric to prevent bacterial colonization and subsequent device-based biofilm formation", *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 53: 621-631.
- [142] Yakabe, Y. Sano, T. Ushio, H. ve Yasunaga, T., (1980). "Kinetic studies of the interaction between silver ion and deoxyribonucleic acid", *Chemistry Letters*, 9: 373-376.
- [143] Cao, Y. Jin, R. ve Mirkin, C.A., (2001). "DNA-Modified Core– Shell Ag/Au Nanoparticles", *Journal of the American Chemical Society*, 123: 7961-7962.

- [144] Eby, D.M. Schaeublin, N.M. Farrington, K.E. Hussain, S.M. ve Johnson, G.R., (2009). "Lysozyme catalyzes the formation of antimicrobial silver nanoparticles", *ACS nano*, 3: 984-994.
- [145] Feng, Q.L. Wu, J. Chen, G. Cui, F. Kim, T. ve Kim, J., (2000). "A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*", *Journal of biomedical materials research*, 52: 662-668.
- [146] Rai, M. Yadav, A. ve Gade, A., (2009). "Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials", *Biotechnology advances*, 27: 76-83.
- [147] Liao, S. Read, D. Pugh, W. Furr, J. ve Russell, A., (1997). "Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions", *Letters in applied microbiology*, 25: 279-283.
- [148] Matsumura, Y. Yoshikata, K. Kunisaki, S.-i. ve Tsuchido, T., (2003). "Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate", *Applied and environmental microbiology*, 69: 4278-4281.
- [149] Morones, J.R. Elechiguerra, J.L. Camacho, A. Holt, K. Kouri, J.B. Ramírez, J.T. ve Yacaman, M.J., (2005). "The bactericidal effect of silver nanoparticles", *Nanotechnology*, 16: 2346.
- [150] Song, H. Ko, K. Oh, I. ve Lee, B., (2006). "Fabrication of silver nanoparticles and their antimicrobial mechanisms", *Eur Cells Mater*, 11: 58.
- [151] Kim, J.S. Kuk, E. Yu, K.N. Kim, J.-H. Park, S.J. Lee, H.J. Kim, S.H. Park, Y.K. Park, Y.H. ve Hwang, C.-Y., (2007). "Antimicrobial effects of silver nanoparticles", *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3: 95-101.
- [152] Reuter, S. Gupta, S.C. Chaturvedi, M.M. ve Aggarwal, B.B., (2010). "Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?", *Free Radical Biology and Medicine*, 49: 1603-1616.
- [153] Arakha, M. Pal, S. Samantarai, D. Panigrahi, T.K. Mallick, B.C. Pramanik, K. Mallick, B. ve Jha, S., (2015). "Antimicrobial activity of iron oxide nanoparticle upon modulation of nanoparticle-bacteria interface", *Scientific reports*, 5: 14813.
- [154] Carlson, R.P. Taffs, R. Davison, W.M. ve Stewart, P.S., (2008). "Anti-biofilm properties of chitosan-coated surfaces", *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 19: 1035-1046.
- [155] Rabea, E.I. Badawy, M.E.-T. Stevens, C.V. Smagghe, G. ve Steurbaut, W., (2003). "Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action", *Biomacromolecules*, 4: 1457-1465.
- [156] Borkow, G. ve Gabbay, J., (2009). "Copper, an ancient remedy returning to fight microbial, fungal and viral infections", *Current Chemical Biology*, 3: 272-278.

- [157] Gopalakrishnan, K. Ramesh, C. Ragunathan, V. ve Thamilselvan, M., (2012). "Antibacterial activity of Cu₂O nanoparticles on E. coli synthesized from Tridax procumbens leaf extract and surface coating with polyaniline", Dig J Nanomater Bios, 7: 833-839.
- [158] Flemming, C. ve Trevors, J., (1989). "Copper toxicity and chemistry in the environment: a review", Water, Air, and Soil Pollution, 44: 143-158.
- [159] Hsiao, M.-T. Chen, S.-F. Shieh, D.-B. ve Yeh, C.-S., (2006). "One-pot synthesis of hollow Au₃Cu₁ spherical-like and biomineral botallackite Cu₂ (OH)₃Cl flowerlike architectures exhibiting antimicrobial activity", The Journal of Physical Chemistry B, 110: 205-210.
- [160] Ruparelia, J.P. Chatterjee, A.K. Duttagupta, S.P. ve Mukherji, S., (2008). "Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles", Acta biomaterialia, 4: 707-716.
- [161] Das, R. Gang, S. Nath, S.S. ve Bhattacharjee, R., (2010). "Linoleic acid capped copper nanoparticles for antibacterial activity", Journal of Bionanoscience, 4: 82-86.
- [162] Schrand, A.M. Rahman, M.F. Hussain, S.M. Schlager, J.J. Smith, D.A. ve Syed, A.F., (2010). "Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment", Wiley interdisciplinary reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2: 544-568.
- [163] Beveridge, T. ve Murray, R., (1980). "Sites of metal deposition in the cell wall of Bacillus subtilis", Journal of bacteriology, 141: 876-887.
- [164] Ren, G. Hu, D. Cheng, E.W. Vargas-Reus, M.A. Reip, P. ve Allaker, R.P., (2009). "Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications", International journal of antimicrobial agents, 33: 587-590.
- [165] Kim, J.-H. Cho, H. Ryu, S.-E. ve Choi, M.-U., (2000). "Effects of metal ions on the activity of protein tyrosine phosphatase VHR: highly potent and reversible oxidative inactivation by Cu²⁺ ion", Archives of Biochemistry and Biophysics, 382: 72-80.
- [166] Chang, Y.-N. Zhang, M. Xia, L. Zhang, J. ve Xing, G., (2012). "The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles", Materials, 5: 2850-2871.
- [167] Ingle, A.P. Duran, N. ve Rai, M., (2014). "Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: a review", Applied microbiology and biotechnology, 98: 1001-1009.
- [168] Stoimenov, P.K. Klinger, R.L. Marchin, G.L. ve Klabunde, K.J., (2002). "Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents", Langmuir, 18: 6679-6686.
- [169] Li, B. ve Logan, B.E., (2004). "Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces", Colloids and surfaces B: Biointerfaces, 36: 81-90.
- [170] Hurlow, J. Couch, K. Laforet, K. Bolton, L. Metcalf, D. ve Bowler, P., (2015). "Clinical biofilms: a challenging frontier in wound care", Advances in wound care, 4: 295-301.

- [171] Cortés, M.E. Bonilla, J.C. ve Sinisterra, R.D., (2011). "Biofilm formation, control and novel strategies for eradication", *Sci Against Microbial Pathog Commun Curr Res Technol Adv*, 2: 896-905.
- [172] Davey, M.E. ve O'toole, G.A., (2000). "Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics", *Microbiology and molecular biology reviews*, 64: 847-867.
- [173] Flemming, H.-C. ve Wingender, J., (2010). "The biofilm matrix", *Nature reviews microbiology*, 8: 623.
- [174] Sauer, K. Camper, A.K. Ehrlich, G.D. Costerton, J.W. ve Davies, D.G., (2002). "Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm", *Journal of bacteriology*, 184: 1140-1154.
- [175] Marić, S. ve Vraneš, J., (2007). "Characteristics and significance of microbial biofilm formation", *Periodicum Bilogorum*, 109: 115-121.
- [176] Garrett, T.R. Bhakoo, M. ve Zhang, Z., (2008). "Bacterial adhesion and biofilms on surfaces", *Progress in Natural Science*, 18: 1049-1056.
- [177] Tribedi, P. ve Sil, A.K., (2014). "Cell surface hydrophobicity: a key component in the degradation of polyethylene succinate by *Pseudomonas* sp. AKS2", *Journal of applied microbiology*, 116: 295-303.
- [178] Hall-Stoodley, L. Costerton, J.W. ve Stoodley, P., (2004). "Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases", *Nature reviews microbiology*, 2: 95.
- [179] Vasudevan, R., (2014). "Biofilms: microbial cities of scientific significance", *J Microbiol Exp*, 1: 00014.
- [180] Gupta, P. Sarkar, S. Das, B. Bhattacharjee, S. ve Tribedi, P., (2016). "Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review", *Archives of microbiology*, 198: 1-15.
- [181] Stewart, P.S., (1996). "Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40: 2517-2522.
- [182] Billings, N. Millan, M.R. Caldara, M. Rusconi, R. Tarasova, Y. Stocker, R. ve Ribbeck, K., (2013). "The extracellular matrix component Psl provides fast-acting antibiotic defense in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms", *PLoS pathogens*, 9: e1003526.
- [183] Shigeta, M. Tanaka, G. Komatsuzawa, H. Sugai, M. Suginaka, H. ve Usui, T., (1997). "Permeation of antimicrobial agents through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a simple method", *Chemotherapy*, 43: 340-345.
- [184] Giwerzman, B. Jensen, E. Høiby, N. Kharazmi, A. ve Costerton, J., (1991). "Induction of beta-lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 35: 1008-1010.
- [185] Mah, T.-F.C. ve O'Toole, G.A., (2001). "Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents", *Trends in microbiology*, 9: 34-39.

- [186] Donlan, R.M., (2001). "Biofilms and device-associated infections", *Emerging infectious diseases*, 7: 277.
- [187] Costerton, J.W. Cheng, K. Geesey, G.G. Ladd, T.I. Nickel, J.C. Dasgupta, M. ve Marrie, T.J., (1987). "Bacterial biofilms in nature and disease", *Annual Reviews in Microbiology*, 41: 435-464.
- [188] Huh, A.J. ve Kwon, Y.J., (2011). "'Nanoantibiotics': a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era", *Journal of Controlled Release*, 156: 128-145.
- [189] Ng, C.K. Mohanty, A. ve Cao, B., (2015). "Biofilms in Bio-Nanotechnology", *Bio-Nanoparticles: Biosynthesis and Sustainable Biotechnological Implications*: 83-100.
- [190] Park, H.-J. Park, S. Roh, J. Kim, S. Choi, K. Yi, J. Kim, Y. ve Yoon, J., (2013). "Biofilm-inactivating activity of silver nanoparticles: A comparison with silver ions", *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 19: 614-619.
- [191] Ramalingam, V. Rajaram, R. PremKumar, C. Santhanam, P. Dhinesh, P. Vinothkumar, S. ve Kaleshkumar, K., (2014). "Biosynthesis of silver nanoparticles from deep sea bacterium *Pseudomonas aeruginosa* JQ989348 for antimicrobial, antibiofilm, and cytotoxic activity", *Journal of basic microbiology*, 54: 928-936.
- [192] Roe, D. Karandikar, B. Bonn-Savage, N. Gibbins, B. ve Rouillet, J.-B., (2008). "Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles", *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 61: 869-876.
- [193] Ahn, S.-J. Lee, S.-J. Kook, J.-K. ve Lim, B.-S., (2009). "Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles", *Dental Materials*, 25: 206-213.
- [194] Aydin Sevinç, B. ve Hanley, L., (2010). "Antibacterial activity of dental composites containing zinc oxide nanoparticles", *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 94: 22-31.
- [195] McDougald, D. Rice, S.A. Barraud, N. Steinberg, P.D. ve Kjelleberg, S., (2012). "Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal", *Nature reviews microbiology*, 10: 39-50.
- [196] Hetrick, E.M. Shin, J.H. Paul, H.S. ve Schoenfisch, M.H., (2009). "Anti-biofilm efficacy of nitric oxide-releasing silica nanoparticles", *Biomaterials*, 30: 2782-2789.
- [197] Ünlü, M. Vardar-Ünlü, G. Vural, N. Dönmez, E. ve Özbaş, Z.Y., (2009). "Chemical composition, antibacterial and antifungal activity of the essential oil of *Thymbra spicata* L. from Turkey", *Natural product research*, 23: 572-579.
- [198] Kizil, S., (2010). "Determination of essential oil variations of *Thymbra spicata* var. *spicata* L. naturally growing in the wild flora of East Mediterranean and

- Southeastern Anatolia regions of Turkey", *Industrial Crops and Products*, 32: 593-600.
- [199] Aligiannis, N. Kalpoutzakis, E. Mitaku, S. ve Chinou, I.B., (2001). "Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species", *Journal of agricultural and food chemistry*, 49: 4168-4170.
 - [200] Sökmen, M. Serkedjieva, J. Daferera, D. Gulluce, M. Polissiou, M. Tepe, B. Akpulat, H.A. Sahin, F. ve Sokmen, A., (2004). "In vitro antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutidens*", *Journal of agricultural and food chemistry*, 52: 3309-3312.
 - [201] Can Baser, K., (2008). "Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils", *Current pharmaceutical design*, 14: 3106-3119.
 - [202] Jiménez-Escrig, A. Dragsted, L.O. Daneshvar, B. Pulido, R. ve Saura-Calixto, F., (2003). "In vitro antioxidant activities of edible artichoke (*Cynara scolymus* L.) and effect on biomarkers of antioxidants in rats", *Journal of agricultural and food chemistry*, 51: 5540-5545.
 - [203] Tanaka, Y.T. Tanaka, K. Kojima, H. Hamada, T. Masutani, T. Tsuboi, M. ve Akao, Y., (2013). "Cynaropicrin from *Cynara scolymus* L. suppresses photoaging of skin by inhibiting the transcription activity of nuclear factor-kappa B", *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 23: 518-523.
 - [204] Falé, P.L. Ferreira, C. Rodrigues, A.M. Cleto, P. Madeira, P.J.A. Florecirc, M.H. Frazatilde, F.N. ve Serralheiro, M.L., (2013). "Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activity of commercially available medicinal infusions after in vitro gastrointestinal digestion", *Journal of Medicinal Plants Research*, 7: 1370-1378.
 - [205] Falleh, H. Ksouri, R. Chaieb, K. Karray-Bouraoui, N. Trabelsi, N. Boulaaba, M. ve Abdely, C., (2008). "Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities", *Comptes Rendus Biologies*, 331: 372-379.
 - [206] Riachi, L.G. ve De Maria, C.A., (2015). "Peppermint antioxidants revisited", *Food chemistry*, 176: 72-81.
 - [207] Lv, J. Huang, H. Yu, L. Whent, M. Niu, Y. Shi, H. Wang, T.T. Luthria, D. Charles, D. ve Yu, L.L., (2012). "Phenolic composition and nutraceutical properties of organic and conventional cinnamon and peppermint", *Food chemistry*, 132: 1442-1450.
 - [208] İşcan, G. Kirimer, N. Kürkcüoğlu, M.n. Başer, H.C. ve DEMİrci, F., (2002). "Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils", *Journal of agricultural and food chemistry*, 50: 3943-3946.
 - [209] Moreno, L. Bello, R. Primo-Yúfera, E. ve Esplugues, J., (2002). "Pharmacological properties of the methanol extract from *Mentha suaveolens* Ehrh", *Phytotherapy research*, 16: 10-13.

- [210] Abràmoff, M.D. Magelhaes, P. ve Ram, S., (2004). "Image processing with".
- [211] Hammond, S. ve Lambert, P., (1978). "Antimicrobial Actions, pp: 8-9", Edward Arnold Ltd, London.
- [212] Gündoğan, N. Citak, S. ve Turan, E., (2006). "Slime production, DNase activity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk, pasteurised milk and ice cream samples", *Food Control*, 17: 389-392.
- [213] da Silva Ferreira, V. ConzFerreira, M.E. Lima, L.M.T. Frases, S. de Souza, W. ve Sant'Anna, C., (2017). "Green production of microalgae-based silver chloride nanoparticles with antimicrobial activity against pathogenic bacteria", *Enzyme and microbial technology*, 97: 114-121.
- [214] Jeong, S.H. Choi, H. Kim, J.Y. ve Lee, T.W., (2015). "Silver-Based Nanoparticles for Surface Plasmon Resonance in Organic Optoelectronics", *Particle & Particle Systems Characterization*, 32: 164-175.
- [215] Hamed, S. Shojaosadati, S.A. ve Mohammadi, A., (2017). "Evaluation of the catalytic, antibacterial and anti-biofilm activities of the *Convolvulus arvensis* extract functionalized silver nanoparticles", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 167: 36-44.
- [216] Lateef, A. Ojo, S. Azeez, M. Asafa, T. Yekeen, T. Akinboro, A. Oladipo, I. Gueguim-Kana, E. ve Beukes, L., (2016). "Cobweb as novel biomaterial for the green and eco-friendly synthesis of silver nanoparticles", *Applied Nanoscience*, 6: 863-874.
- [217] Albright, L., (2008). *Albright's chemical engineering handbook*: CRC Press.
- [218] Wei, D. Sun, W. Qian, W. Ye, Y. ve Ma, X., (2009). "The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity", *Carbohydrate research*, 344: 2375-2382.
- [219] Ajitha, B. Reddy, Y.A.K. ve Reddy, P.S., (2014). "Biogenic nano-scale silver particles by *Tephrosia purpurea* leaf extract and their inborn antimicrobial activity", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 121: 164-172.
- [220] Veisi, H. Rashtiani, A. ve Barjasteh, V., (2016). "Biosynthesis of palladium nanoparticles using *Rosa canina* fruit extract and their use as a heterogeneous and recyclable catalyst for Suzuki–Miyaura coupling reactions in water", *Applied Organometallic Chemistry*, 30: 231-235.
- [221] Tümen, G. Ermin, N. Özek, T. Kürkçüoğlu, M. ve Baser, K.H.C., (1994). "Composition of Essential Oils from Two Varieties of *Thymbra spicata* L", *Journal of Essential Oil Research*, 6: 463-468.
- [222] Prathna, T. Chandrasekaran, N. Raichur, A.M. ve Mukherjee, A., (2011). "Biomimetic synthesis of silver nanoparticles by *Citrus limon* (lemon) aqueous extract and theoretical prediction of particle size", *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 82: 152-159.

- [223] Ahmad, A. Wei, Y. Syed, F. Tahir, K. Rehman, A.U. Khan, A. Ullah, S. ve Yuan, Q., (2017). "The effects of bacteria-nanoparticles interface on the antibacterial activity of green synthesized silver nanoparticles", *Microbial pathogenesis*, 102: 133-142.
- [224] Tolaymat, T.M. El Badawy, A.M. Genaidy, A. Scheckel, K.G. Luxton, T.P. ve Suidan, M., (2010). "An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: a systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers", *Science of the Total Environment*, 408: 999-1006.
- [225] Navarro, E. Piccapietra, F. Wagner, B. Marconi, F. Kaegi, R. Odzak, N. Sigg, L. ve Behra, R., (2008). "Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*", *Environmental science & technology*, 42: 8959-8964.
- [226] Fabrega, J. Fawcett, S.R. Renshaw, J.C. ve Lead, J.R., (2009). "Silver nanoparticle impact on bacterial growth: effect of pH, concentration, and organic matter", *Environmental science & technology*, 43: 7285-7290.
- [227] Kawata, K. Osawa, M. ve Okabe, S., (2009). "In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells", *Environmental science & technology*, 43: 6046-6051.
- [228] Laban, G. Nies, L.F. Turco, R.F. Bickham, J.W. ve Sepúlveda, M.S., (2010). "The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos", *Ecotoxicology*, 19: 185-195.
- [229] Xiu, Z.-m. Zhang, Q.-b. Puppala, H.L. Colvin, V.L. ve Alvarez, P.J., (2012). "Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles", *Nano Letters*, 12: 4271-4275.
- [230] Madigan, M. ve Martinko, J., (2005). *Brock biology of microorganisms*. (11th edn), eds.: SciELO Espana.
- [231] Ahmed, Q. Gupta, N. Kumar, A. ve Nimesh, S., (2017). "Antibacterial efficacy of silver nanoparticles synthesized employing *Terminalia arjuna* bark extract", *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 45: 1192-1200.
- [232] Guzman, M. Dille, J. ve Godet, S., (2012). "Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria", *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8: 37-45.
- [233] Taglietti, A. Diaz Fernandez, Y.A. Amato, E. Cucca, L. Dacarro, G. Grisoli, P. Necchi, V. Pallavicini, P. Pasotti, L. ve Patrini, M., (2012). "Antibacterial activity of glutathione-coated silver nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria", *Langmuir*, 28: 8140-8148.
- [234] Pal, S. Tak, Y.K. ve Song, J.M., (2007). "Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*", *Applied and environmental microbiology*, 73: 1712-1720.

- [235] Kumar, V. Mohan, S. Singh, D.K. Verma, D.K. Singh, V.K. ve Hasan, S.H., (2017). "Photo-mediated optimized synthesis of silver nanoparticles for the selective detection of Iron(III), antibacterial and antioxidant activity", *Materials Science and Engineering: C*, 71: 1004-1019.
- [236] Naika, H.R. Lingaraju, K. Manjunath, K. Kumar, D. Nagaraju, G. Suresh, D. ve Nagabhushana, H., (2015). "Green synthesis of CuO nanoparticles using *Gloriosa superba* L. extract and their antibacterial activity", *Journal of Taibah University for Science*, 9: 7-12.
- [237] Altikatoglu, M. Attar, A. Erci, F. Cristache, C.M. ve Isildak, I., (2017). "Green synthesis of copper oxide nanoparticles using *ocimum basilicum* extract and their antibacterial activity", *FRESENIUS ENVIRONMENTAL BULLETIN*, 26: 217-222.
- [238] Nadagouda, M.N. Castle, A.B. Murdock, R.C. Hussain, S.M. ve Varma, R.S., (2010). "In vitro biocompatibility of nanoscale zerovalent iron particles (NZVI) synthesized using tea polyphenols", *Green Chemistry*, 12: 114-122.
- [239] Luo, F. Chen, Z. Megharaj, M. ve Naidu, R., (2014). "Biomolecules in grape leaf extract involved in one-step synthesis of iron-based nanoparticles", *RSC Advances*, 4: 53467-53474.
- [240] Markova, Z. Novak, P. Kaslik, J. Plachtova, P. Brazdova, M. Jancula, D. Siskova, K.M. Machala, L. Marsalek, B. ve Zboril, R., (2014). "Iron (II, III)–polyphenol complex nanoparticles derived from green tea with remarkable ecotoxicological impact", *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2: 1674-1680.
- [241] Cucarella, C. Tormo, M.Á. Ubeda, C. Trotonda, M.P. Monzón, M. Peris, C. Amorena, B. Lasa, Í. ve Penadés, J.R., (2004). "Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*", *Infection and immunity*, 72: 2177-2185.
- [242] Cioffi, N. Torsi, L. Ditaranto, N. Tantillo, G. Ghibelli, L. Sabbatini, L. Blevè-Zacheo, T. D'Alessio, M. Zambonin, P.G. ve Traversa, E., (2005). "Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties", *Chemistry of Materials*, 17: 5255-5262.
- [243] Usman, M.S. Ibrahim, N.A. Shameli, K. Zainuddin, N. ve Yunus, W.M.Z.W., (2012). "Copper nanoparticles mediated by chitosan: synthesis and characterization via chemical methods", *Molecules*, 17: 14928-14936.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Fatih ERCİ
Doğum Tarihi ve Yeri : 23.07.1985 ÇORUM
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : fxerci@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Doktora	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2018
Y. Lisans	Applied Science	University of Arkansas at Little Rock	2013
Lisans	Biyoloji	Ondokuz Mayıs Üniversitesi	2008

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2014	Necmettin Erbakan Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

YAYINLARI

Makale

1. **Erci, F.** Cakir-Koc, R. ve Isildak, I., (2017). "Green synthesis of silver nanoparticles using *Thymbra spicata* L. var. *spicata* (zahter) aqueous leaf extract and evaluation of their morphology-dependent antibacterial and cytotoxic activity", *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*: 1-9.
2. Altıkatoglu, M. Attar, A. **Erci, F.** Cristache, C. M. ve Isildak, I., (2017). "Green synthesis of copper oxide nanoparticles using *Ocimum basilicum* extract and its antibacterial activity", *Fresenius Environmental Bulletin*, 26 (12A): 7832-7837
3. Torlak, E. Akata, I. **Erci, F.** ve Uncu, A.T., (2016). "Use of gaseous ozone to reduce aflatoxin B 1 and MİKroorganisms in poultry feed", *Journal of Stored Products Research*, 68: 44-49.
4. Torlak, E. Yalcin, S. ve **Erci, F.**, (2016). "Effect of Tween 80 on Conjugated Linoleic Acid Production by *Lactobacillus* Strains in Reconstituted Skim Milk Powder", *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 22.
5. Akata, I. Torlak, E. ve **Erci, F.**, (2015). "Efficacy of gaseous ozone for reducing MİKroflora and foodborne pathogens on button mushroom", *Postharvest Biology and Technology*, 109: 40-44.
6. Yontem, M. Akkaya, A. Kaleli, S. **Erci, F.** ve Kocak, F.E., (2015). "Effects of Sevoflurane and Desflurane on Some BiocheMİKal Parameters", *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 5: 01

Bildiri

1. **Erci, F.** Çakir Koç, R. Torlak, E. ve Işıldak, İ., (2017). "Biosynthesis of *Cynara scolymus* (Artichoke) mediated silver nanoparticles and evaluation of their antibacterial activity", *Sözlü*, 6th International Congress on Molecular Biology and Biotechnology
2. **Erci, F.** Torlak, E. Uncu, A. T. ve Işıldak, İ., (2017). "Comparison of three different methods for the isolation of *Arabidopsis* nuclear membranes", Poster, 6th International Congress on Molecular Biology and Biotechnology
3. Erdoğan, B. S. Yöntem, M. **Erci, F.** ve Almila Doyuk, S., (2017). "MİKrobiological evaluation of coins and its effect to public health", Poster, 6th International Congress on Molecular Biology and Biotechnology
4. **Erci, F.** ve Çakir Koç, R., (2017). "Green synthesis of silver nanoparticles using *Thymbra spicata* var. *spicata* L. leaf extract and evaluation of their biological activities", *Sözlü*, International Congress on Advances in Bioscience and Biotechnology (ICABB)
5. **Erci, F.** Yöntem, M. ve Erdoğan, B. S., (2017). "Effect of Hyperosmotic Stress on MINPP1 Expression", Poster, International Congress on Advances in Bioscience and Biotechnology (ICABB).

6. Çetin, S. **Erci, F.** ve Kurtoğlu, M., (2017). "New Bidentate Azo–Azomethines And Their Copper(II)Complexes: Synthesis, Solvent Effect on Tautomerism AndBiological Studies",Poster, 3. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi, IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies.
7. Kocabaş, E. Sarigüney, A. B. **Erci, F.** Torlak, E. ve Coşkun, A., (2017). "Pirolidin Temelli Tiyazol ve Benzotiyazol Türevlerinin Sentezi ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi", Poster, Presented at the II. International Academic Research Congress, Antalya
8. Erdoğan, B. S. Yöntem, M. Koçak, F. E. Pehlivanoğlu, S. ve **Erci, F.**, (2016). "Evaluation of 25 OH D3 Vitamin Blood Lipid Parameters HDL LDL Total Cholesterol Triglyceride and TAS TOS PON and Aryl Esterase Levels in Postmenopausal Women".Sözlü, International Congress of Biological Sciences
9. Kocabaş, E. Küçükdemir, H. Kocabaş, H., **Erci F.**, ve Coşkun A. (2016). "Yeni Pirazol ve Pirazolin Türevlerinin Sentezi". Poster,III. Ulusal Organik Kimya Kongresi.
10. Eskici, B. Torlak, E. ve **Erci, F.**, (2016). "Analysis of Biofilm Production and Presence of icaA and icaD Genes in Staphylococcus aureus Strains Isolated from Milk Products". Sözlü, 2nd International Conference on Pure & Applied Science .
11. **Erci, F.** Torlak, E. Erci, V. Attar, A. ve Işildak, İ. (2016). "Development and formulation of new solid bio fertilizer macrocapsules". Poster, 2nd International Conference on Pure & Applied Science, İstanbul.
12. Erdoğan, B. S. Yöntem, M. **Erci, F.** ve Öncü, M. (2016). "The Role of Cardiac Markers in Diagnosis of Acute Myocardial Infarction". Poster,2nd International Congress on Applied Biological Sciences, Sarajevo.
13. Yöntem, M. Erdoğan, B. S. **Erci, F.** ve Yıldız, C. (2016). "Evaluation of Liver Function Tests in Diabetic Patients". 2nd International Congress on Applied Biological Sciences, Sarajevo
14. Erci, V. **Erci, F.** Torlak, E. Işildak, İ. ve Kizilkaya, R. (2015). "Comparison of Potentiometric and Spectrophotometric Methods for the Measurement of Extracellular Alkaline Phosphatase Activities in Soil". Poster 2nd ICSAE International Conference on Sustainable Agriculture and Environment, Konya.
15. Erci, V. **Erci, F.** Kizilkaya, R. & Işildak, İ. (2015). "Potentiometric Determination of Extracellular Urease Activities in Extracts of Soil Samples". Poster, 2nd ICSAE 2015 International Conference on Sustainable Agriculture and Environment, Konya.
16. **Erci, F.** ve Torlak, E. (2015). "Süt Tozlarının Muhafazası Esnasında Cronobacter'in Canlılığının Değerlendirilmesi". Poster, İç Anadolu Bölgesi 2. Tarım ve Gıda Kongresi, Nevşehir.
17. Tavukçuoğlu, Ö. Yildirim, R. Niğde, M. **Erci, F.** ve Işildak, İ. (2014). "Solid state membrane phosphate sensors for selective detection of phosphate in soil extractants". Poster, Bioeng'14 International Bioengineering Conference.
18. **Erci, F.** Niğde, M. Yildirim, R. Attar, A. Ağır, İ. Tavukçuoğlu, Ö. Ve Işildak, İ. (2014)."

A novel pH detector for the determination of anions in suppressed ion chromatography". Poster, Bioeng'14 International Bioengineering Conference.

19. Torlak, E. Yalcin, S. ve **Erci, F.**, (2016). "Effect of Tween 80 on Conjugated Linoleic Acid Production by Lactobacillus Strains", Poster, Bioeng'14 International Bioengineering Conference.
20. **Erci, F.** ve Khodakovskaya, M. (2013). "Analysis of intracellular localization of Arabidopsis thaliana calcium dependent lipid binding protein AtCLB". Sözlü, 2013 Meeting of the Southern Section of the American Society of Plant Biologists, Little Rock.
21. Sazak Çamaş, A. Tetik, İ. **Erci, F.** Veyisoğlu, A. ve Şahin, N. (2010). "Ege Marmara Ve Karadeniz İle İznik Gölü Sedimentlerinin Kültürlenebilir Actinobacteria Biyoçeşitliliğinin Moleküler Tekniklerle Belirlenmesi". Poster, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Denizli.

Proje

1. Pirolidin Temelli Tiyazol vee Tiyadiazin Türevlerinin Sentezi ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi, Necmettin Erbakan Üniversitesi tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı, , 20/03/2017 (Devam Ediyor) (ULUSAL)
2. Farklı NP'lerin Yeşil Sentezi ve Bitkilere Etkileri, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) projesi, Araştırmacı, 01/09/2014 - 01/09/2016 (ULUSAL)
3. Tablet Biyogübre Mikrobiyal Gübre Gelistirilmesi ve Üretimi, Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı TEKNOGİRİŞİM projesi, Yürütücü, , 08/06/2015 - 30/11/2016 (ULUSAL)

ÖDÜLLERİ

1. Teknogirişim Sermaye Desteği, BİLİM, SANAYİ VE TEKNOLOJİ BAKANLIĞI, 2015
2. Yurt Dışı Lisans Üstü Öğretim Bursu, MİLLİ EĞİTİM BAKANLIĞI, 2009
3. Biyoloji Bölüm Birinciliği, ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ, 2008