

Atf İçin: Çelik T, Könen Adıgüzel S, Adıgüzel AO, 2021. Gümüş Nanoparçacıklarının *Kribbella turkmenica* 16K104 Aracılığıyla Sentezi, Karakterizasyonu, Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi ve Genotoksik Potansiyelinin Değerlendirilmesi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(4): 3138-3151.

To Cite: Çelik T, Könen Adıgüzel S, Adıgüzel AO, 2021. Synthesis of Silver Nanoparticles by *Kribbella turkmenica* 16K104, Their Characterization, Antimicrobial Properties and Genotoxic Potential. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(4): 3138-3151.

Gümüş Nanoparçacıklarının *Kribbella turkmenica* 16K104 Aracılığıyla Sentezi, Karakterizasyonu, Antimikrobiyal Aktivitesinin Belirlenmesi ve Genotoksik Potansiyelinin Değerlendirilmesi

Tuğba ÇELİK¹, Serpil KÖNEN ADIGÜZEL², Ali Osman ADIGÜZEL^{1*}

ÖZET: Gümüş nanoparçacıklarının (AgNPs) bakteriler aracılığıyla ekstraselüler sentezi çevre dostu ve ekonomik bir yaklaşım olması nedeniyle oldukça popüler hale gelmiştir. Sunulan bu çalışmada AgNP'ler *Kribbella turkmenica* 16K104'ün kültür sıvısı kullanılarak sentezlenmiştir. Fiziko-kimyasal koşulların ve kültür ortamı bileşenlerinin AgNP'lerin sentezi üzerine etkileri araştırılarak optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Optimum koşullar altında sentezlenen AgNP'ler karakterize edilmiştir. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi ile sentezlenen parçacıkların küresel şekilde oldukları belirlenmiştir. Dinamik Işık Saçılımı (DLS) analizi ile AgNP'lerin 4-20 nm boyutları arasında homojen dağılım gösterdikleri görülmüş, ortalama parçacık boyutunun 6 nm ve zeta potansiyelinin ise -30.6 ± 10.1 olduğu tespit edilmiştir. Sentezlenen AgNP'lerin patojen bakteriyel suşlar karşısında önemli düzeyde inhibe edici ve bakteriyosidal etki gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, AgNP'lerin Hep G2 hücreleri üzerindeki genotoksik potansiyeli değerlendirilmiş ve 24 saatlik maruziyette AgNP'lerin $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ 'ye kadar önemli bir genotoksik etkisi gözlemlenmemiştir. Sunulan bu çalışma ile farmasötik, gıda, tekstil ve polimer endüstrileri için uygun fiziksel ve biyolojik özelliklere sahip AgNP'lerin *Kribbella* taksonunda bir bakteri türü aracılığıyla sentezi literatüre kazandırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Gümüş nanoparçacıkları, yeşil sentez, *Kribbella*, antimikrobiyal aktivite, Hep G2, genotoksisite

Synthesis of Silver Nanoparticles by *Kribbella turkmenica* 16K104, Their Characterization, Antimicrobial Properties and Genotoxic Potential

ABSTRACT: Extracellular synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) by bacteria has become very popular due to its environmentally friendly and economical approach. In the present study, AgNPs were synthesized culture liquid of *Kribbella turkmenica* 16K104. Effects of physico-chemical conditions and components of culture medium on synthesis of AgNPs were investigated and then synthesis was optimized. AgNPs synthesized under optimum condition were characterized. Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis showed that the particles were spherical in shape. Dynamic Light Scattering (DLS) analysis Indicated that AgNPs were 4-20 nm in size and showed homogeneous distribution. Average particle size and zeta potential of AgNPs was detected to be 6 nm and -30.6 ± 10.1 , respectively. It was determined that the AgNPs exhibited inhibitory and cidal activity against significant bacterial strains. In addition, genotoxic potential of the AgNPs on Hep G2 cells was assessed. Significant genotoxic effect did not observe after exposure with 0-16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of AgNPs for 24 h. As a result, this is the first report on the extracellular synthesis of AgNPs with usage potential in pharmaceutical, food, textile and polymer industries using a *Kribbella* species.

Keywords: Silver nanoparticles, green synthesis, *Kribbella*, antimicrobial activity, Hep G2, genotoxicity

¹Tuğba ÇELİK, Ali Osman ADIGÜZEL ([Orcid ID: 0000-0002-5602-5886](https://orcid.org/0000-0002-5602-5886)), Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Samsun, Türkiye

²Serpil KÖNEN ADIGÜZEL ([Orcid ID: 0000-0002-7959-3771](https://orcid.org/0000-0002-7959-3771)), Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Isparta, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Ali Osman ADIGÜZEL, e-mail: adiguzel.ali.osman@gmail.com

Bu çalışma Tuğba ÇELİK'in yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

GİRİŞ

Nanoparçacıklar boyutları 0.1-100 nm arasında değişiklik gösteren atom kümeleridir. Geniş yüzey alanına sahip olmaları, yüksek enerjili olmaları ve daha az kusurlu şekilleri nedeniyle fiziksel, kimyasal, elektronik, elektrik, mekanik, manyetik, termal, optik ve biyolojik özellikleri açısından yığın halindeki ve mikron boyutundaki malzemelerden farklılık göstermektedirler (Hussain ve ark., 2016; Rafique ve ark., 2016). Son yılların en öne çıkan malzemelerinden olup mühendislik uygulamalarında, tıpta, endüstride, kozmetikte, farmakoloji ve çevre biyoteknolojisinde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadırlar (de Souza ve ark., 2019). Bunlar arasından en yaygın kullanıma sahip olanları gümüş nanoparçacıklarıdır (AgNP'ler). AgNP'ler geniş spektrumlu antimikrobiyal etkiye sahiptirler ve metal, plastik, macun ve kumaş gibi ürünlere karıştırılarak yeni kompozit materyallerin yapımında kullanılabilirler.

AgNP'ler geleneksel olarak kimyasal indirgeme, gama ışını radyasyonu ile indirgeme, mikroemülsiyon, lazer ablasyonu, otoklavlama, mikrodalga ile fırınlama ve fotokimyasal redüksiyon gibi kimyasal ve fizikokimyasal yöntemler kullanılarak üretilmektedirler (Ahmad ve ark., 2019). Ancak, bu geleneksel yöntemlerde toksik bileşenlerin kullanımı, toksik yan-ürün oluşumu, yüksek enerji ihtiyacı ve yüksek işletme maliyeti gibi sınırlamalar olduğu için "yeşil sentez" olarak da adlandırılan organizmaların ya da organizmalardan elde edilen bileşenlerin kullanıldığı sentez süreçlerine olan ilgi artmıştır (Taha ve ark., 2019).

AgNP'lerin yeşil sentezi ökaryotik ve prokaryotik organizmaların kullanıldığı süreçler olarak gruplandırılabilir. Ökaryotlar ile gerçekleştirilen sentez süreçlerinde indirgeyici ajan olarak sıklıkla bitkilerden elde edilmiş özütler kullanılmaktadır (Sharma ve ark., 2019). Bitkilerin kullanıldığı sentez süreçleri sonunda elde edilen AgNP'lerin her ne kadar güçlü antimikrobiyal etkileri ve yüksek biyolojik uyumlulukları görülsede üretim maliyetleri oldukça yüksektir. Endemik bitkilerin toplanması, kültüre edilebilir bitkilerin geliştirilmesi için gerekli ilaçlama, sulama ve alan ihtiyacı giderleri nanopartikül sentez maliyetini önemli ölçüde artırmaktadır. Ayrıca, bitki özütlerinin elde edilme süreçlerinde suyun dışında çözücülerin kullanılması ve ekstraksiyonun yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilmesi de yüksek maliyetlere sebep olmaktadır (Das ve Smita, 2018; Rajkumar ve ark., 2019). Diğer ökaryotlardan alglerin, mayaların ve küflerin hücre içi moleküllerinin ya da hücre dışına salgıladıkları bileşenlerin kullanıldığı sentez süreçlerine ilişkin de çok sayıda araştırma rapor edilmiştir (Saratale ve ark., 2018; Zhao ve ark., 2018; Vinoth ve ark., 2019). AgNP'lerin sentezinde bu organizmaların daha az kullanışlı olmasındaki ana sebep ise sentezde rol alan moleküllerin saflaştırılmalarındaki ya da rekombinant DNA teknolojisiyle üretilmelerindeki zorluktur (Khan ve ark., 2018).

AgNP'lerin sentezinde kullanılan prokaryotların başında bakteriler gelmektedir (Narayanan ve Sakthivel, 2010). Bakteriyel sentez intraselüler ve ekstraselüler olmak üzere iki farklı yöntemle yapılabilmektedir (Singh ve ark., 2015). İntraselüler sentezde uygun bir kültür ortamında geliştirilen bakteri hücrelerinin ozmotik olarak parçalanmasıyla açığa çıkan hücre lizatı indirgeyici ajan olarak kullanılır (Adiguzel ve ark., 2018; Abdollahnia ve ark., 2020). Ekstraselüler sentezde ise aynı amaç için bakteriyel gelişim sonrasında elde edilen kültür sıvısı kullanılmaktadır (İqtedar ve ark., 2019; Taha ve ark., 2019) İntraselüler sentez maliyeti ilave bir liziz basamağı gerektirdiği için daha yüksektir. Ayrıca, intraselüler AgNP sentezi sonrasında arta kalan hücre atığının başka bir amaçla kullanım olanağı bulunmazken, ekstraselüler sentez sonrası kalan biyokütlenin protein kaynağı olarak hayvan yemi ya da bitki gelişimini teşvik etmek amacıyla organik gübre olarak kullanılma potansiyeli bulunmaktadır.

Toprakta yaygın olarak bulunan aktinobakteriler polimerlerin parçalanmasında ve minerallerin jeokimyasal dönüşümünde başat rol oynamaktadırlar (Katsuyama, 2019). Aktinobakteriler, AgNP'lerin sentezinde indirgeyici ve stabilize edici rol oynayan başta enzimler olmak üzere çok sayıda metaboliti hücre dışına salgılama yeteneğine sahiptirler (Anteneh ve Franco, 2019). Bundan dolayı, AgNP'lerin ekstraselüler olarak sentezinde kullanım potansiyeline sahiptirler. Literatürde AgNP'lerin aktinobakteriyel türler aracılığıyla ekstraselüler sentezine yönelik az sayıda araştırma bulunmaktadır. Bunların çoğunda ise *Streptomyces* taksonunda yer alan türler kullanılmıştır (Sanjenbam ve ark., 2014; El-Naggar ve Abdelwahed, 2014; Kumar ve ark., 2015).

Gerçekleştirilen bu çalışmada, *Kribbella turkmenica* 16K104 kullanılarak AgNP'lerin ekstraselüler sentezi, sentez koşullarının optimizasyonu ve sentezlenen nanoparçacıkların karakterizasyonu üzerine odaklanılmıştır. Ayrıca, sentezlenen AgNP'lerin biyolojik özellikleri ve genotoksik potansiyeli belirlenmiştir. Sunulan bu çalışma, *Kribbella* taksonunda sınıflandırılan bir bakteri türü ile AgNP'lerin sentezine ilişkin bilgimiz dahilindeki ilk çalışmadır.

MATERYAL VE METOT

Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Gümüş nanopartiküllerinin sentezinde kullanılan *Kribbella turkmenica* 16K104 izolatı Dr. Nevzat Şahin ve Dr. Hayrettin Saygın'dan temin edilmiştir (Saygın ve ark., 2019). *K. turkmenica* 16K104 Uluslararası Streptomyces Projesi Besiyeri 2'de (ISP2: 4 g L⁻¹ maya özütü, 10 g L⁻¹ malt özütü, 4 g L⁻¹ glukoz ve 20 g L⁻¹ agar) 30 °C'de 3 gün süre ile inkübe edilerek geliştirilmiştir. Sentezlenen nanoparçacığın antibakteriyel özelliklerinin belirlenmesi amacıyla patojenik *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. (VRE), *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia* spp., *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Citrobacter freundii*, *Corynebacterium striatum*, *Streptococcus pneumoniae* suşları kullanılmıştır. Patojen bakteri suşları Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı'ndan temin edilmiştir. Bu suşlar Mueller Hinton Agar (MHA: 2 g L⁻¹ et infüzyonu, 17.5 g L⁻¹ kazein hidrolizatu, 1.5 g L⁻¹ çözünebilir nişasta ve 13.0 g L⁻¹ agar) yüzeyinde 35 °C'de 24 saat inkübe edilerek geliştirilmiştir. Çalışmada kullanılan tüm bakteri suşları %20 oranında (v/v) gliserol içeren Nutrient Broth çözeltilisi içerisinde -20 °C'de uzun süreli olarak saklanmıştır. Çalışmada kullanılan tüm besiyerlerinin pH'ları 1 M NaOH ve 1 M HCl kullanılarak 7.2 ± 0.2'ye ayarlanmıştır. Besiyerlerinin sterilizasyonu 1 atm basınç altında ve 121 °C sıcaklıkta Tuttnauer 3870MLV marka otoklav ile gerçekleştirilmiştir.

AgNP'lerin Sentezi ve Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu

ISP2 besiyeri üzerinden alınan bir öze dolusu *K. turkmenica* 16K104 MGYP besiyerinde (3 g L⁻¹ malt özütü, 3 g L⁻¹ maya özütü, 5 g L⁻¹ pepton, 10 g L⁻¹ glukoz, pH 7.2 ± 0.2) 30 °C'de 180 rpm çalkalamalı koşullar altında 5 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, *K. turkmenica* 16K104 kültürünün 10 000 x g'de 10 dk santrifüjlenmesiyle elde edilen kültür sıvısı reaksiyon karışımı ana bileşeni olarak kullanılmıştır. AgNP'lerin sentezi için reaksiyon ortamı 49 mL kültür sıvısı üzerine 1 mL AgNO₃ çözeltisi eklenerek hazırlanmıştır. AgNO₃ konsantrasyonunun AgNP'lerin sentezi üzerine etkisinin araştırılması için farklı konsantrasyonlarda AgNO₃ (0,5-3 mM) içeren reaksiyon karışımları (pH 8.0) 40 °C'de 2 gün inkübe edilmiştir. Sıcaklığın AgNP'lerin sentezi üzerine etkisinin araştırılması için pH'sı 8.0 olan ve 2 mM AgNO₃ içeren reaksiyon karışımı farklı sıcaklıklarda (20-50 °C) 2 gün inkübe edilmiştir. Son olarak, pH'nın AgNP'lerin sentezi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, farklı pH'lara sahip (pH 4-10) ve 2 mM AgNO₃ içeren reaksiyon karışımları 50 °C'de 2 gün süre ile inkübe edilmiştir.

Üretim ve optimizasyon çalışmalarında reaksiyon ortamlarının açık sarı renkten koyu kahverengimsi renge dönüşmesi nanopartikül oluşumunu göstermiştir. Ayrıca, sentezlenen nanopartiküllerin yüzey plazmon rezonanslarını (Surface Plasmon Rezonans, SPR) gösteren pikler reaksiyon karışımlarının 300-800 nm dalgaboyları arasındaki absorpsiyon spektrumlarının çizilmesi ile gösterilmiştir. Spektrumun çizilmesi için ölçümler 1 nm çözünürlükte UV-Vis spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir deneyin negatif kontrolü için kültür sıvısı yerine ultra saf su kullanılmıştır.

AgNP'lerin Sentezi İçin Kültür Besiyerinin Optimizasyonu

K. turkmenica 16K104'ün kültüve edildiği besiyerindeki bileşenlerin AgNP'lerin sentezi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla *K. turkmenica* 16K104 farklı konsantrasyonlarda pepton (0-2 g L⁻¹), maya özütü (0-3 g L⁻¹), malt özütü (0-3 g L⁻¹) ve glukoz (0-10 g L⁻¹) içeren modifiye edilmiş MGYB besiyerlerinde 30 °C'de ve 180 rpm çalkalamalı koşullar altında 5 gün süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyon 250 mL'lik erlenlerde 50 mL besiyeri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda, kültür sıvıları santrifügasyonla (10 000 x g, 10 dk) geri kazanıldıktan sonra pH'ları 9.0'a ayarlanmıştır. Sentez 49 mL kültür sıvısı ve 1 mL 100 mM'lık AgNO₃ ile hazırlanan karışımın 50 °C'de 2 gün süre ile karanlıkta inkübe edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda reaksiyon karışımı 2 kat saf su ile seyreltilerek 300-800 nm dalgaboyları arasındaki absorpsiyon spektrumları çizilmiştir.

AgNP'lerin Karakterizasyonu

Karakterizasyon çalışmaları için AgNP'ler 13 000 x g'de 20 dk santrifüjlenerek çöktürülmüş ve ultra saf su ile 3 kere yıkandıktan sonra karakterizasyon çalışmaları için hacminin 2 katı kadar saf su içerisinde +4 °C'de saklanmıştır. Şekil ve boyut analizi için, AgNP'ler 2 mm²'lik lam parçaları üzerinde kurutulduktan sonra altınla kaplanarak Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ile görüntülenmiştir. Nanoparçacıkların elemental analizi ise Enerji Dağılım Spektrometresi (EDS) ile gerçekleştirilmiştir. Boyut dağılımları Dinamik Işık Saçılımı (DLS) ile yüzey yükleri ise zeta potansiyeli ölçümü ile belirlenmiştir.

Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları İçin Aşı Süspansiyonlarının Hazırlanması

Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında mililitresinde yaklaşık 1.5 x 10⁸ bakteri bulunan süspansiyonlar aşı olarak kullanılmıştır. Aşı süspansiyonu; MHB besiyerinde geliştirilen bakterilerin santrifügasyonla (10 000 x g, 10 dk) çöktürülmesinden sonra %0.9'luk NaCl çözeltisinde (fizyolojik tuzlu su, FTS) seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Bu süspansiyonlar her çalışma için taze olarak hazırlanmış ve 30 dk içinde kullanılmıştır. Bakteri sayıları MacFarland standartları kullanılarak hesaplanmıştır.

Disk Difüzyon Yöntemi

Aşı süspansiyonlarından 100 µL alınarak MHA besiyeri yüzeyine yayıldıktan sonra steril test diskleri (6 mm) besiyerlerinin yüzeylerine yerleştirilmiştir. Sonrasında, diskler üzerine saf su ile hazırlanmış 32, 64 ve 128 µg mL⁻¹'lik AgNP kolloyidal çözeltilerinden 15'er µL emdirilmiştir. Besiyerleri 37 °C'de 2 gün süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, test diskleri etrafında inhibisyon zon oluşumu gözlemlenmiştir. Negatif kontrol için disk üzerine 15'er µL saf su emdirilmiştir.

Minimum İnhibe Edici Konsantrasyon (MİK) ve Minimum Bakteriyosidal Konsantrasyon (MBC) Değerlerinin Belirlenmesi

Sentezlenen AgNP'lerin patojenlere karşı MİK değerlerinin belirlenmesi için mikrodilüsyon tekniği kullanılmıştır. AgNP'lerin MHB besiyeri ile hazırlanan 0.5-512 µg mL⁻¹'lik ikişer katlı seri dilüsyonlarının herbirinden 150'şer µL mikrotitrasyon kuyucuklarına aktarılmış ve üzerlerine 147'şer

μL MHB besiyeri ilave edilmiştir. Daha sonra, her bir kuyucuğa mililitresinde yaklaşık 5×10^7 hücre bulunan bakteri süspansiyonundan $3 \mu\text{L}$ eklenerek plakalar 24 saat boyunca 37°C 'de bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda, mikrotitrasyon kuyucuklarında bakteriyel gelişimin gözlemlenmediği en düşük AgNP konsantrasyonu MİK değeri olarak saptanmıştır. MBC değerinin bulunması için bakterilerin gelişim gösteremediği kuyucuklardan 10'ar μL çekilerek MHA yüzeyine damlatılmış ve besiyerleri 37°C 'de 24 saat inkübe edildikten sonra koloni oluşumu gözlemlenmiştir. Bakteriyosidal etki gösteren en düşük AgNP konsantrasyonu MBC değeri olarak değerlendirilmiştir. Çalışmalar her bir bakteri için 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Negatif kontrol olarak AgNP'siz besiyeri kullanılmıştır.

AgNP'lerin Genotoksisite Potansiyelinin Araştırılması

Bu çalışmada nanopartikülün genotoksisite potansiyelinin değerlendirilmesinde model hücre olarak Hep G2 hücre hattı seçilmiştir. Hep G2 hücre hattı çeşitli ajanların sitotoksisite ve genotoksisitesinin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Hep G2 hücreleri; % 10 dana serumu, % 1 penisilin – streptomisin içeren Eagle's Minimum Essential mediumda 37°C 'de % 5 CO_2 içeren atmosferde çoğaltılmıştır. Hücreler %80-95 konfluent olduğunda, fosfat tamponu ile iki kez yıkanmış ve tripsin-EDTA kullanılarak hücreler kaldırılmıştır. Hücre canlılığı ve sayısı Cedex Smart Slide kullanılarak belirlenmiştir. İstenen sayıda hücre 24 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve 24 saat boyunca hücrelerin tutunması sağlanmıştır. 24 saat sonunda hücreler AgNP'lerinin belirlenen konsantrasyonlarına 24 saat boyunca maruz bırakılmıştır. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak hidrojen peroksit kullanılmıştır.

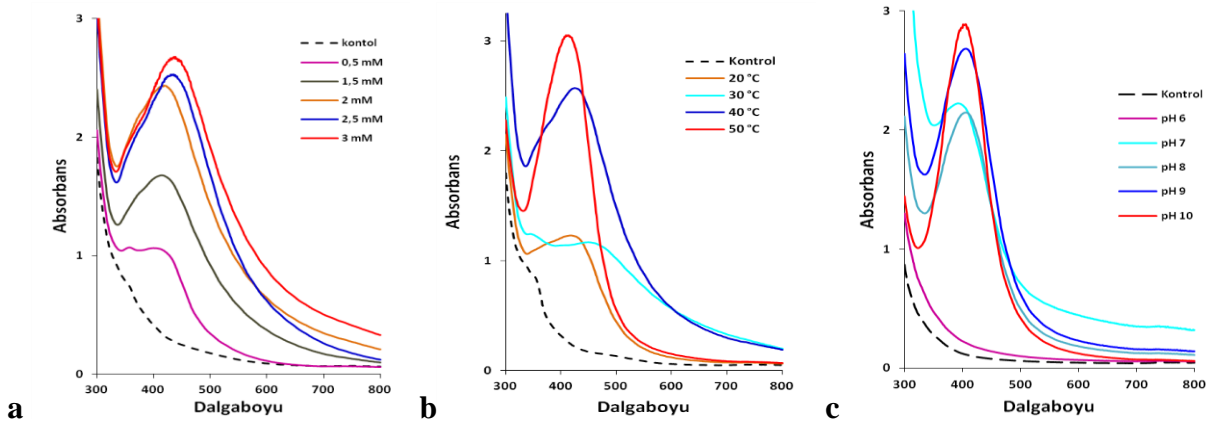
Tek hücre jel elektroforezi olarak da bilinen komet testi, bazı küçük değişiklikler uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Gümüş nanoparçacıklarının belirlenen konsantrasyonlarına 24 saatlik maruziyetini takiben, hücreler tripsin-EDTA kullanılarak kaldırılmıştır. Tripan mavisi kullanılarak hücre canlılığı belirlenmiştir. Sonrasında hücreler düşük erime noktalı agarla karıştırılmış ve daha önce normal erime noktalı agarla kaplanmış lamlara yayılmıştır. Lamelle kapatılan lamlar 20 dakika boyunca 4°C 'de bekletilmiştir. 20 dakika sonunda lameller nazikçe kaldırılmış ve lamlar 1 saat boyunca soğuk lizis solüsyonunda bekletilmiştir. Lizis aşaması ve bundan sonraki basamakların hepsi DNA hasarını önlemek için karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Lizis işleminden sonra lamlar, elektroforez solüsyonunda 20 dakika bekletildikten sonra 300 mA, 25 V, 20 dakika yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işleminden sonra lamlar nötralize edilmiştir. Hava ile kurutulan lamlar etidyum bromid ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) ile işaretlenmiş ve floresan mikroskop kullanılarak hücrelerdeki DNA hasarı kuyruk uzunluğuna göre değerlendirilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

AgNP Sentezi İçin Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu

AgNP'lerin sentezi reaksiyon karışımının açık sarı renkten koyu kahverengiye dönüşümüyle kalitatif olarak, UV-Vis spektrofotometrik analizlerle ise kantitatif olarak takip edilebilmektedir. AgNP'lerin sentezi reaksiyon karışımının spektral analizi sonucunda 400-450 nm arasında belirgin bir yüzey plazmon pikinin açığa çıkmasına sebep olmaktadır. Daha önce gerçekleştirilen birçok araştırmada reaksiyon karışımında artan nanoparçacık miktarına paralel olarak yüzey plazmon pikine ait tepe noktası optik yoğunluğunun (OD) arttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, bu pikin keskinliği sentezlenen parçacıkların boyut dağılımının görece homojenliğini göstermektedir. Bundan dolayı AgNO_3 konsantrasyonu, sıcaklık ve pH'nın *K. turkmenica* 16K104 kültür sıvısı ile AgNP'lerin sentezi üzerine etkileri yüzey plazmon pikinin varlığı, şiddeti ve genişliği temel alınarak değerlendirilmiştir. Sentez sonrası reaksiyon karışımlarının 300-800 nm dalgaboyları arasındaki absorpsiyon spektrumları Şekil

1'de gösterilmiştir. Negatif kontrollerin hiçbirinde AgNP'lerin senteziyle ilişkili bir renk değişimi meydana gelmemekle birlikte absorpsiyon spektrumlarında herhangi bir yüzey plazmon pikine rastlanmamıştır. Reaksiyon karışımındaki AgNO₃ konsantrasyonunun 0.5 mM'dan 2 mM'a artırılmasıyla sentezlenen AgNP'lere ait yüzey plazmon piki tepe noktalarının optik yoğunluğunda önemli bir artış kaydedilmiştir. Fakat AgNO₃ konsantrasyonunun daha fazla artırılması yüzey plazmon piki tepe noktasına ait optik yoğunluk değerinde önemli bir artış meydana getirmemiştir. Ayrıca, AgNO₃ konsantrasyonunun 2 mM'dan 2.5 mM ve 3 mM'a yükseltilmesi neticesinde pik tepe noktasının 416 nm'den 438 nm'ye kaydığı ve piklerin genişlediği gözlemlenmiştir. Bu durum; sentezlenen nanopartiküllerin boyutlarında artış, homojenitesinde ise azalma olduğu şeklinde yorumlandığı için optimum AgNO₃ konsantrasyonu 2 mM olarak belirlenmiştir. İnkübasyon sıcaklığının 40 °C'nin altına düşürülmesi nanoparçacık sentezinde önemli oranda azalmaya sebep olmuştur. Ayrıca, bu sıcaklıklarda yüzey plazmon piklerinin genişlediği de gözlemlenmiştir. Sentez sürecinin 50 °C'de gerçekleşmesiyle nanoparçacıkların yüzey plazmon pikine ait tepe noktasının optik yoğunluğunda artış gözlemlenmiştir. Diğer sıcaklıklarla karşılaştırıldığında, 50 °C'de sentezlenen AgNP'lere ait yüzey plazmon pikinin daha keskin olduğu da tespit edilmiştir. Reaksiyon karışımındaki kültür sıvısının pH'sı 6'ya ayarlandığında AgNP'lerin sentezi gerçekleştirilememiştir. AgNP'lerin sentez yoğunluğunun pH 7 ve pH 8'de benzer seviyelerde olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, pH 9 ve pH 10'da AgNP'lerin sentezinde önemli bir artış tespit edilmiştir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde AgNP'lerin sentezi için en uygun AgNO₃ konsantrasyonunun 2 mM olduğu, sıcaklık ve pH derecelerinin ise sırasıyla 50 °C ve pH 10 olduğuna karar kılınmıştır.



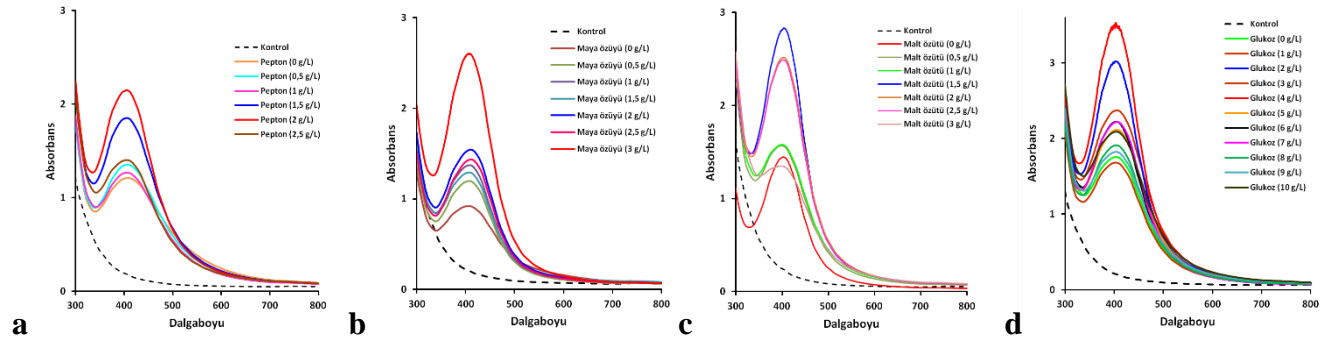
Şekil 1. Farklı AgNO₃ konsantrasyonunda (a), farklı sıcaklıklarda (b) ve farklı pH'larda (c) sentezlenen AgNP'lerin 300-800 nm dalga boyları arasındaki absorpsiyon spektrumları

Streptomyces albogriseolus (Samundeeswari ve ark., 2012), *Streptomyces* sp. LK3 (Karthik ve ark., 2014), *Pilimelia columellifera* (Golińska ve ark., 2016), *Nocardiosis valliformis* (Rathod ve ark., 2016) ve *Streptomyces* sp. NH28 (Skladanowski ve ark., 2016) gibi aktinobakterilerle gerçekleştirilen çalışmalarda AgNP'lerin ekstraselüler sentezi için reaksiyon ortamına 1 mM AgNO₃ ilave edilmiştir. Çalışmalar neticesinde, yüzey plazmon piki tepe noktalarının 420-423 nm aralıklarında olduğu ve bu piklere ait maksimum absorpsiyonun ise 0.2-1 OD (optik yoğunluk) olduğu rapor edilmiştir. *Streptacidiphilus* sp. CGG11'nin kültür sıvısı ile gerçekleştirilen sentez çalışmasında ise başlangıçtaki AgNO₃ konsantrasyonu 1.5 mM'a ayarlanmış ve 27 °C'de 7 günlük inkübasyon sonunda sentezlenen AgNP'lere ait yüzey plazmon piki tepe noktasının 420-430 nm arasında ve OD değerinin yaklaşık 1.2 olduğu bildirilmiştir (Railean-Plugaru ve ark., 2016). Sunduğumuz bu çalışmada, reaksiyon koşullarının

optimizasyonu neticesinde tepe noktası 405 nm ve OD'si 2.89 olan yüzey plazmon piki elde edilmiştir. Bu durum, reaksiyon koşulları optimizasyonunun önemini ortaya koymaktadır.

AgNP'lerin Sentezi İçin Kültür Besiyerinin Optimizasyonu

Biyolojik yollarla sentezlenen nanoparçacıkların ticari olarak kullanılabilmesinde ve kimyasal yöntemlerle sentezlenen muadilleri ile rekabet edebilmesindeki kritik etmenlerden biri maliyetleridir. Bu nedenle bakterinin geliştirildiği kültür ortamı bileşenlerinin AgNP'lerin sentezi üzerine etkileri yüzey plazmon pikinin şiddeti ve genişliği temelinde araştırılmış ve sentez maliyeti azaltılmıştır (Şekil 2). Buna göre, pepton yoğunluğunun 2.5 g L^{-1} 'den 2 ve 1.5 g L^{-1} ye düşürülmesiyle nanoparçacıkların sentezinde önemli seviyede artış kaydedilmiştir. Peptonun daha düşük konsantrasyonlarında ise nanoparçacıkların sentezinde azalma gözlemlenmiştir. Besiyerindeki maya özütü konsantrasyonunun azaltılması ise nanoparçacıkların sentezini önemli oranda azaltmıştır. Malt özütü konsantrasyonu 1.5 g L^{-1} 'nin üzerine çıkarıldığında ya da altına düşürüldüğünde nanoparçacıkların sentezinde azalma görülmüştür. Ayrıca, besiyerinde bulunan glukoz konsantrasyonunun AgNP'lerin sentezi üzerine etkisi araştırılmış ve en uygun konsantrasyonun 4 g L^{-1} olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, nanopartikül sentezinde kullanılmak üzere *K. turkmenica* 16K104'nın kültürasyonu için besiyerinde bulunması gereken optimum pepton, maya özütü, malt özütü ve glukoz konsantrasyonun sırasıyla 2 g L^{-1} , 3 g L^{-1} , 1.5 g L^{-1} ve 4 g L^{-1} olması gerektiği tespit edilmiştir. Böylece, daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere AgNP'ler optimum koşullar altında sentezlenmiştir. Bu koşullarda sentezlenen AgNP'ler için tepe noktası 403 nm 'de olan güçlü ve keskin bir yüzey plazmon piki belirlenmiştir.



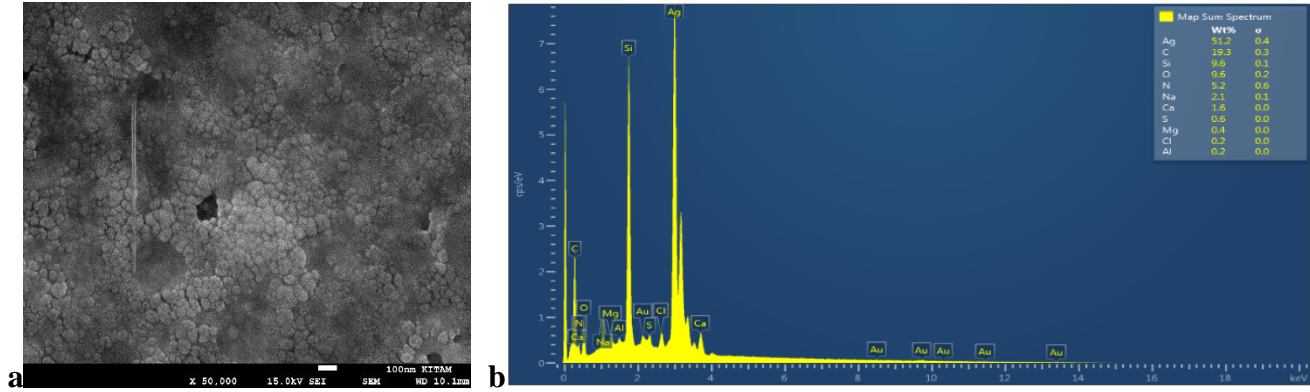
Şekil 2. *K. turkmenica* 16K104'nın kültürüne eildiği besiyerinde farklı konsantrasyonlarda pepton (a), maya özütü (b), malt özütü (c) ve glukoz (d) varlığında sentezlenen AgNP'lerin 300-800 nm dalgaboyları arasındaki absorpsiyon spektrumları

AgNP'lerin Karakterizasyonu

Optimum koşullar altında sentezlenen AgNP'lerin SEM görüntüleri Şekil 3a'da gösterilmiştir. AgNP'lerin 50000 büyütme ile alınan SEM mikrofrafına göre küresel şekilde oldukları ve boyutlarının ise 5-50 nm arasında değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Benzer şekilde; *Sinomonas mesophila* MPKL 2 (Manikprabhu ve ark., 2016), *Halomonas* sp. (Abdollahnia ve ark., 2020), *Pseudomonas* sp. THG-LS1.4 (Singh ve ark., 2018), *Sporosarcina koreensis* DC4 (Singh ve ark., 2016), ve *Enterobacter cloacae* (Ashraf ve ark., 2019) aracılığıyla ekstraselüler olarak sentezlenen AgNP'lerin 50 nm'den daha küçük oldukları belirtilmiştir. Bununla birlikte; bazı araştırmacılar ise *Bacillus subtilis* (Altinsoy ve ark., 2019), *Bacillus mojavensis* BTCB15 (İqtedar ve ark., 2019) ve *Bacillus brevis* (Saravanan ve ark., 2018) ile üretilen AgNP'lerin ise 50 nm'den büyük olduklarını rapor etmişlerdir.

SEM ile görüntülenen AgNP'lerin varlığı EDS analizi sonucunda tespit edilen güçlü gümüş sinyali ile teyit edilmiştir (Şekil 3b). Ayrıca, kaplamadan kaynaklı altına (Au), analiz yapılan zeminin cam olmasından kaynaklı silisyuma (Si), reaksiyon karışımındaki organik bileşiklerin nanopartikül

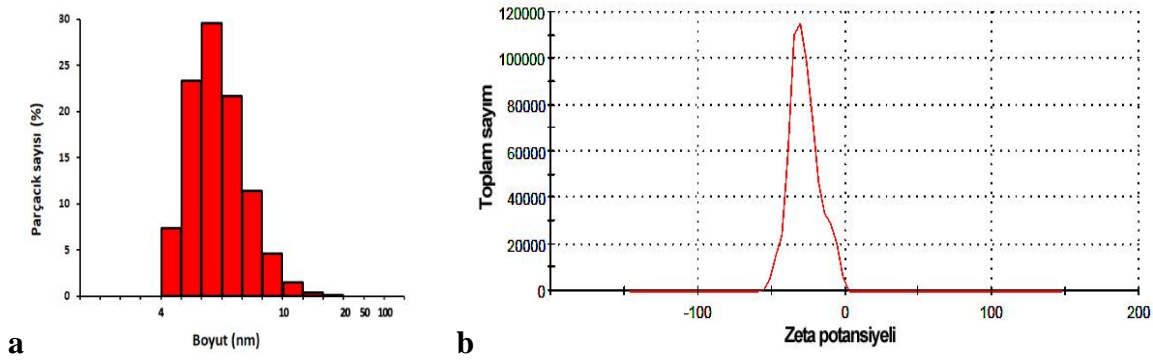
yüzeyinde stabilize edici ajan olarak bulunmasından kaynaklı olarak da azot (N), oksijen (O) ve kükürte (S) ait sinyaller de gözlemlenmiştir.



Şekil 3. Optimum koşullarda sentezlenen AgNP'lerin SEM mikrografı (a) ve elemental analiz sonuçlarını gösteren EDS grafiği (b)

Sentezlenen AgNP'lerin boyut dağılımları DLS ile araştırılarak Şekil 4a'da gösterilmiştir. Analiz sonucunda hesaplanan 0.311'lik polidispersite indisi ($PDI < 0.5$) AgNP'lerin boyut dağılımının homojen olduğunu göstermiştir. Nanopartiküllerin endüstriyel uygulamalarda kullanılabilmesi için çözelti içerisindeki boyut dağılımının oldukça dar sınırlar içinde olması arzu edilmektedir. DLS analizi neticesinde sentezlenen AgNP'lerin arzu edildiği gibi 4-20 nm boyutları arasında dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Literatür araştırması neticesinde, sentezlenen AgNP'lerin boyut dağılımının *Bacillus FUM1* (Bahrami-Teimoori ve ark., 2019), *Streptomyces griseoplanus* SAI-25 (Vijayabharathi ve ark., 2018), *Pseudomonas deceptionensis* DC5 (Jo ve ark., 2016), *Streptomyces rochei* MHM13 (Abd-Elnaby ve ark., 2016.), *Stenotrophomonas maltophilia* (Oves ve ark., 2013) ve *Sporosarcina koreensis* DC4 (Singh ve ark., 2016) ile sentezlenen AgNP'lere göre daha dar sınırlar içerisinde olduğu görülmüştür. Ayrıca, ortalama parçacık büyüklüğü 6 nm olarak hesaplanmıştır. Farklı aktinobakteriyel türler aracılığıyla sentezlenen AgNP'lerle karşılaştırıldığında, *K. turkmenica* 16K104 ile sentezlenen AgNP'lerin ortama boyutlarının daha küçük olduğu görülmektedir (Otari ve ark., 2012).

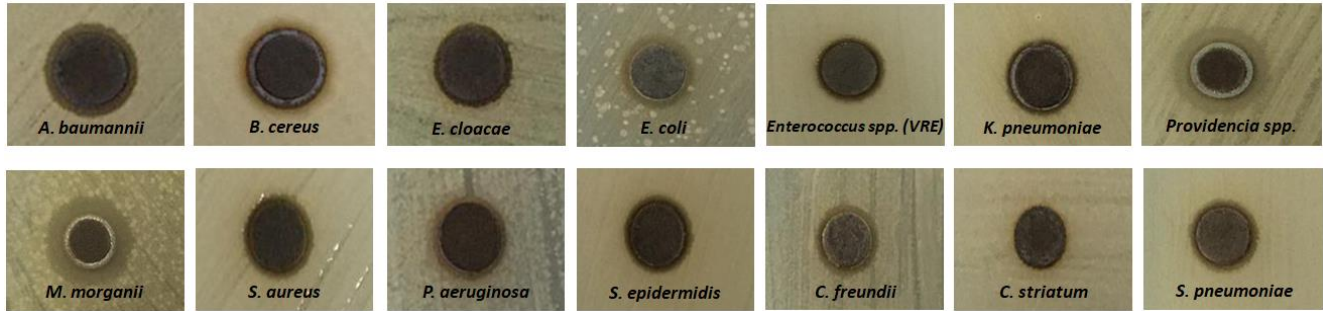
Nanoparçacıkların karakterizasyonunda önemli diğer bir parametre ise sahip oldukları zeta potansiyelleridir. Zeta potansiyeli 0 mV ve 0 mV'ye yakın olan parçacıkların kararlılıkları düşük olduğu için topaklanma ve sedimentasyon eğilimindedirler (Yazıcı ve ark., 2018; Budama-Kılınç, 2019). Fakat kolloidal bir çözelti önemli ölçüde pozitif ($> +30$ mV) veya negatif (< -30 mV) zeta potansiyeline sahipse birbirlerini itecekleri için daha iyi dağılım gösterirler. *K. turkmenica* 16K104 aracılığıyla sentezlenen AgNP'lerin zeta potansiyeli -30.6 ± 10.1 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4b). Anasane ve ark. (2016) filogenetik olarak *Pilimelia columellifera* ile oldukça yakın ilişkili olan aktinobakteriyel bir izolat aracılığıyla sentezledikleri AgNP'lerin zeta potansiyelini $-18,6$ mV olarak ölçmüşlerdir. Mohanta ve Behera (2014). *Streptomyces* sp. SS2 ile sentezlenen AgNP'lerin zeta potansiyelini ise $-17,7 \pm 5.30$ mV olarak tespit etmişlerdir.



Şekil 4. DLS analizi sonucunda *K. turkmenica* 16K104 aracılığıyla sentezlenen AgNP'lerin boyut dağılımını (a) ve zeta potansiyelini (b) gösteren grafikler

AgNP'lerin Disk Difüzyon Tekniği ile Bakteriler Üzerine Etkilerinin Taranması

Sentezlenen AgNP'lerin patojen bakteri suşlarına karşı antibakteriyal etkisi kolay ve hızlı bir yöntem olan disk difüzyon testi ile kalitatif olarak belirlenmiştir. Çalışma neticesinde, AgNP'lerin *A. baumannii*, *B. cereus*, *E. cloacae*, *E. coli*, *Enterococcus* spp. (VRE), *K. pneumoniae*, *Providencia* spp., *M. morgani*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *C. freundii*, *C. striatum* ve *S. pneumoniae* üzerine antibakteriyal etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanısıra, nanoparçacıkların filtreden besiyerine difüzyon oranlarının yetersiz olmasından dolayı konsantrasyon artışına paralel olarak zon çapında artış gözlemlenememiştir. Patojen bakteri suşların geliştirildiği besiyerlerine yerleştirilmiş nanoparçacıkların emdirildiği filtrelerin etrafında gözlemlenen inhibisyon zonları Şekil 5'de gösterilmiştir.



Şekil 5. *K. turkmenica* 16K104 aracılığıyla sentezlenen AgNP'lerin patojenlere karşı antibakteriyal etkilerini gösteren inhibisyon zonları

AgNP'lerin Bakterilere Karşı MİK ve MBC Değerleri

K. turkmenica 16K104 aracılığıyla sentezlenen AgNP'lerin test edilen patojen bakteri suşlarına karşı MİK ve MBC değerleri Çizelge 1'de gösterilmiştir. AgNP'ler en yüksek inhibe edici etkiyi 0.25 µg/mL'lik MİK değeri ile *E. coli* üzerine gösterirken en düşük etkiyi 4 µg mL⁻¹'lik MİK değeri ile *M. morgani* ve *Providencia* spp. üzerine göstermişlerdir. En yüksek bakteriyosidal etkiyi ise *P. aeruginosa* ve *S. aureus* karşısında sergilemişlerdir. Bununla birlikte, *E. cloacae* ve *C. freundii* için MBC değerleri 32 µg mL⁻¹ olarak gözlemlenirken *C. striatum*, *Providencia* spp. ve *S. pneumoniae* için MBC değerinin çalışılan aralıkların üzerinde olduğu tespit edilmiştir.

Literatürde aktinobakteriler aracılığıyla sentezlenmiş AgNP'lerin antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesine yönelik disk difüzyon yöntemiyle gerçekleştirilen fazla sayıda araştırma mevcuttur (Hemmati ve ark., 2019; Dhanaraj ve ark., 2020; Göl ve ark., 2020) Fakat aktinobakteriler aracılığıyla sentezlenmiş AgNP'lerin MIC ve MBC değerlerinin rapor edildiği çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Buszewski ve arkadaşlarının (2018) gerçekleştirdiği çalışmada *Streptacidiphilus durhamensis* aracılığıyla sentezlenen AgNP'lerin MİK değerlerinin *S. aureus*, *E. coli* ve *K. pneumoniae*, *B. subtilis*'e

karşı $6.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ iken *P. aeruginosa*'ya karşı ise $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, bu bakterilere karşı MBC değerlerinin ise $50-100 \mu\text{g mL}^{-1}$ arasında olduğu belirlenmiştir (Buszewski ve ark., 2018). Başka bir çalışmada Radhod ve arkadaşları (2016) *Nocardiosis valliformis* OT1 aracılığıyla sentezledikleri AgNP'lerin *B. subtilis*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*'ya karşı MİK değerlerini $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulmuşlardır. Aynı çalışmada *S. aureus* ve *K. pneumoniae*'ya karşı MİK değerlerinin $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ve $70 \mu\text{g mL}^{-1}$ olduğunu da rapor etmişlerdir. Wypij ve arkadaşları (2018) *Streptomyces calidiresistens* IF11 kullanarak sentezledikleri AgNP'lerin *E.coli* ve *B. subtilis*'e karşı MİK değerlerini $96 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak belirlemişlerdir. Railean-Plugaru ve arkadaşlarının (2016) gerçekleştirdikleri çalışmada ise *Streptacidiphilus* sp. CGG11n aracılı sentezlenen AgNP'lerin *B. subtilis*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*'a karşı MİK ve MBC değerleri sırasıyla $6,25 \mu\text{g/mL}$ ve $50 \mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. *K. turkmenica* 16K104 ile sentezlenen AgNP'lerin antibakteriyal etkinliğinin aktinobakteriler aracılığıyla sentezlenen diğer AgNP'lerle kıyaslandığında oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Görülen güçlü antibakteriyal etkinin sentezlenen AgNP'lerin muadillerinden daha küçük boyutlarda olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü nanopartiküllerin boyutları küçüldükçe etki ettiği yüzey alanı artmaktadır. Ayrıca, yeşil sentez yoluyla elde edilen nanopartiküllerin antimikrobiyal özelliklerinin indirgeyici ve stabilize edici ajanların farklılığına bağlı olarak sentezlendikleri kaynağa göre değişmekte olduğu bu çalışma ile bir kez daha açıkça görülmüştür (Singh ve ark., 2015).

Çizelge 1. *K. turkmenica* 16K104 aracılığıyla sentezlenen AgNP'lerin test edilen bakterilere karşı MİK ve MBC değerleri

Bacteria	MİK ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MBC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>A. baumannii</i>	2	16
<i>B. cereus</i>	0.5	2
<i>C. striatum</i>	0.5	-
<i>E. cloacae</i>	0.5	32
<i>E. coli</i>	0.25	8
<i>K. pneumoniae</i>	1	8
<i>Enterococcus</i> spp. (VRE)	1	8
<i>M. morgani</i>	4	16
<i>Providencia</i> spp.	4	-
<i>P. aeruginosa</i>	1	1
<i>S. aureus</i>	1	1
<i>S. epidermidis</i>	1	8
<i>S. pneumoniae</i>	1	-
<i>C. freundii</i>	1	32

AgNP'lerin Genotoksik Potansiyelleri

DNA hasarının değerlendirilmesi için kuyruk uzunlukları Tip 0: Hasarsız hücre (kuyruksuz hücre), Tip I: Az hasarlı hücre, Tip II: Düşük hasarlı, Tip III: Orta hasarlı ve Tip IV: Yüksek hasarlı (Uzun ve dağınık kuyruk) olmak üzere gruplandırılmıştır (Şekil 6). Genotoksisite değerlendirmesinde genetik hasar indeksi (GHI) verilmiştir. GHI ise aşağıda verilen eşitlikte gösterildiği gibi hesaplanmıştır.

$$\text{GHI} = [(\% \text{ Tip 0} \times 0) + (\% \text{ Tip 1} \times 1) + (\% \text{ Tip 2} \times 2) + (\% \text{ Tip 3} \times 3) + (\% \text{ Tip 4} \times 4)] / 100$$



Şekil 6. Hep G2 hücrelerinin *K. turkmenica* 16K104 aracılığıyla sentezlenen AgNP'lere maruziyeti sonucu oluşan **kuyruk tiplerinin** floresan mikroskop görüntüleri. **a)** Tip 0, **b)** Tip 1, **c)** Tip 2, **d)** Tip 3 ve **e)** Tip 4

Testin duyarlılığının belirlenmesi için hücreler H₂O₂'ye maruz bırakılmıştır. Maruziyet sonrasında GHI değerinde negatif kontrole (0.67 ± 0.02) kıyasla önemli bir artış (1.87 ± 0.4) gözlemlenmiştir. Hücrelerin 0.25, 0.5, 1, 2, 4 ve 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ yoğunluklarında AgNP'lere maruziyeti sonucunda GHI indeksi sırasıyla yaklaşık 0.69 ± 0.02 , 0.71 ± 0.01 , 0.74 ± 0.01 , 0.78 ± 0.02 , 0.80 ± 0.03 ve 0.92 ± 0.03 olarak hesaplanmıştır. İstatistiki olarak değerlendirildiğinde GHI değerlerinde önemli bir artış gözlemlenmemiştir. Diğer taraftan, hücreler 16 ve 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ yoğunluklarında AgNP'lere maruz bırakıldığında negatif kontrole kıyasla GHI indeksinde önemli bir artış olduğu gözlemlenmiştir.

SONUÇ

Gerçekleştirilen çalışma çerçevesince gümüş nanoparçacıklarının sentezi yenilenebilir bir kaynak olan *K. turkmenica* 16K104 bakterisi kullanılarak düşük maliyetli ve kolay bir yöntemle başarı ile gerçekleştirilmiştir. Sentez sırasında toksik kimyasallara ve yüksek sıcaklık gibi sert ortam koşullarına ihtiyaç duyulmaması sunulan yöntemin gümüş nanoparçacıklarının hem çevre dostu hem de güvenli şekilde büyük ölçekli üretimi için kullanılabilme potansiyelinin olduğunu göstermektedir. Görece küçük boyutlarda olmaları ve homojen dağılım göstermeleri sentezlenen gümüş nanoparçacıkların endüstriyel uygulamalarda kullanım olanağını arttırmaktadır. Ayrıca sentezlenen nanoparçacıkların *B. cereus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterococcus* spp. (VRE), *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *S. epidermidis*' e karşı güvenli şekilde inhibe edici ve öldürücü ajan olarak kullanılabilmesi belirlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı "PYO.-FEN.1904.20.006" numaralı proje ile destekleyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Proje Yönetim Ofisi Başkanlığı'na teşekkür ederiz. Ayrıca, çalışmada kullanılan *K. turkmenica* 16K104'ü temin ettiğimiz Dr. Nevzat ŞAHİN ve Dr. Hayrettin SAYGIN'A teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması

Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamışlardır.

KAYNAKLAR

- Abd-Elnaby HM, Abo-Elala GM, Abdel-Raouf UM, Hamed MM, 2016. Antibacterial and Anticancer Activity of Extracellular Synthesized Silver Nanoparticles From Marine *Streptomyces rochei* MHM13. The Egyptian Journal of Aquatic Research, 42(3): 301-312.
- Abdollahnia M, Makhdoumi A, Mashreghi M, Eshghi H, 2020. Exploring the potentials of Halophilic Prokaryotes From a Solar Saltern for Synthesizing Nanoparticles: The Case of Silver and Selenium. Plos One, 15(3): e0229886.
- Adiguzel AO, Adiguzel SK, Mazmanci B, Tunçer M, Mazmanci MA, 2018. Silver Nanoparticle Biosynthesis from Newly Isolated Streptomyces Genus From Soil. Materials Research Express, 5(4): 045402.
- Ahmad F, Ashraf N, Ashraf T, Zhou RB, Yin DC, 2019. Biological Synthesis of Metallic Nanoparticles (MNPs) by Plants and Microbes: Their Cellular Uptake, Biocompatibility, and Biomedical Applications. Applied Microbiology and Biotechnology, 103(7): 2913-2935.
- Altinsoy BD, Karatoprak GŞ, Ocoy I, 2019. Extracellular Directed Ag NPs Formation and Investigation of Their Antimicrobial and Cytotoxic Properties. Saudi Pharmaceutical Journal, 27(1): 9-16.
- Anasane N, Golińska P, Wypij M, Rathod D, Dahm H, Rai M, 2016. Acidophilic Actinobacteria Synthesised Silver Nanoparticles Showed Remarkable Activity Against Fungi-Causing Superficial Mycoses in Humans. Mycoses, 59(3): 157-166.
- Anteneh YS, Franco CMM, 2019. Whole Cell Actinobacteria as Biocatalysts. Frontiers in Microbiology, 10: 77.

- Ashraf N, Ahmad F, Jing Jie C, Tuo Di Z, Feng-Zhu Z, Yin, DC, 2019. Optimization of *Enterobacter cloacae* Mediated Synthesis of Extracellular Silver Nanoparticles by Response Surface Methodology and Their Characterization. *Particulate Science and Technology*, 1-13.
- Bahrami-Teimoori B, Pourianfar HR, Akhlaghi M, Tanhaeian A, Rezayi M, 2019. Biosynthesis and Antibiotic Activity of Silver Nanoparticles Using Different Sources: Glass Industrial Sewage-Adapted *Bacillus* sp. and Herbaceous *Amaranthus* sp. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 66(5): 900-910.
- Budama-Kılınç Y, 2019. Klorojenik Asit Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Üretimi ve Antimikrobiyal Etkinliğinin Belirlenmesi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 49(1): 47-54.
- Buszewski B, Railean-Plugaru V, Pomastowski P, Rafińska K, Szultka-Mlynska M, Golinska P, Wypij M, Laskowski D, Dahm H, 2018. Antimicrobial Activity of Biosilver Nanoparticles Produced by a Novel *Streptacidiphilus durhamensis* Strain. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 51(1): 45-54.
- Das M, Smita SS 2018. Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Bark Extracts of *Butea monosperma* (Lam.) Taub. and Study of Their Antimicrobial Activity. *Applied Nanoscience*, 8(5): 1059-1067.
- de Souza TAJ, Souza LRR, Franchi LP, 2019. Silver Nanoparticles: An Integrated View of Green Synthesis Methods, Transformation in the Environment, and Toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 171: 691-700.
- Dhanaraj S, Thirunavukkarasu S, John HA, Pandian S, Salmen SH, Chinnathambi A, Alharbi SA, 2020. Novel Marine *Nocardiopsis dassonvillei*-DS013 Mediated Silver Nanoparticles Characterization and its Bactericidal Potential Against Clinical Isolates. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27: 991-995.
- El-Naggar NEA, Abdelwahed N A, 2014. Application of Statistical Experimental Design for Optimization of Silver Nanoparticles Biosynthesis by a Nanofactory *Streptomyces viridochromogenes*. *Journal of Microbiology*, 52(1): 53-63.
- Golińska P, Wypij M, Rathod D, Tikar S, Dahm H, Rai M, 2016. Synthesis of Silver Nanoparticles From Two Acidophilic Strains of *Pilimelia columellifera* subsp. pallida and Their Antibacterial Activities. *Journal of Basic Microbiology*, 56(5): 541-556.
- Göl F, Aygün A, Seyrankaya A, Gür T, Yenikaya C, Şen F, 2020. Green Synthesis and Characterization of *Camellia sinensis* Mediated Silver Nanoparticles for Antibacterial Ceramic Applications. *Materials Chemistry and Physics*, 123037.
- Hemmati S, Rashtiani A, Zangeneh MM, Mohammadi P, Zangeneh A, Veisi H, 2019. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Fritillaria* flower extract and their antibacterial activity against some human pathogens. *Polyhedron*, 158: 8-14.
- Hussain I, Singh NB, Singh A, Singh H, Singh SC, 2016. Green Synthesis of Nanoparticles and its Potential Application. *Biotechnology Letters*, 38(4): 545-560.
- Iqtedar M, Aslam M, Akhyar M, Shehzaad A, Abdullah R, Kaleem A, 2019. Extracellular Biosynthesis, Characterization, Optimization of Silver Nanoparticles (AgNPs) Using *Bacillus mojavensis* BTCB15 and its Antimicrobial Activity Against Multidrug Resistant Pathogens. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 49(2): 136-142.
- Jo JH, Singh P, Kim YJ, Wang C, Mathiyalagan R, Jin CG, Yang DC, 2016. *Pseudomonas deceptionensis* DC5-Mediated Synthesis of Extracellular Silver Nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(6): 1576-1581.
- Karthik L, Kumar G, Kirthi AV, Rahuman AA, Rao KB, 2014. *Streptomyces* sp. LK3 Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles and Its Biomedical Application. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(2): 261-267.
- Katsuyama Y, 2019. Mining Novel Biosynthetic Machineries of Secondary Metabolites From Actinobacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 83(9): 1606-1615.
- Khan AU, Malik N, Khan M, Cho MH, Khan MM, 2018. Fungi-Assisted Silver Nanoparticle Synthesis and Their Applications. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41(1): 1-20.

- Kumar PS, Balachandran C, Duraipandiyar V, Ramasamy D, Ignacimuthu S, Al-Dhabi NA, 2015. Extracellular biosynthesis of Silver Nanoparticle Using *Streptomyces* sp. 09 PBT 005 and its Antibacterial and Cytotoxic Properties. *Applied Nanoscience*, 5(2): 169-180.
- Manikprabhu D, Cheng J, Chen W, Sunkara AK, Mane SB, Kumar R, das M, Hozzein WN, Duan YQ, Li WJ, 2016. Sunlight Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles by a Novel Actinobacterium (*Sinomonas mesophila* MPKL 26) and its Antimicrobial Activity Against Multi Drug Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 158: 202-205.
- Mohanta YK, Behera SK, 2014. Biosynthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles by *Streptomyces* sp. SS2. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(11): 2263-2269.
- Mohanta YK, Behera, SK, 2014. Biosynthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles by *Streptomyces* sp. SS2. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(11): 2263-2269.
- Narayanan KB, Sakthivel N, 2010. Biological Synthesis of Metal Nanoparticles by Microbes. *Advances in Colloid and Interface Science*, 156(1-2): 1-13.
- Otari SV, Patil RM, Nadaf NH, Ghosh SJ, Pawar SH, 2012. Green Biosynthesis of Silver Nanoparticles From an Actinobacteria *Rhodococcus* sp. *Materials Letters*, 72: 92-94.
- Oves M, Khan MS, Zaidi A, Ahmed AS, Ahmed F, Ahmad E, Sherwani A, Owais M, Azam A, 2013. Antibacterial and Cytotoxic Efficacy of Extracellular Silver Nanoparticles Biofabricated From Chromium Reducing Novel OS4 Strain of *Stenotrophomonas maltophilia*. *PloS One*, 8(3).
- Rafique M, Sadaf I, Rafique MS, Tahir MB, 2017. A review on Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45(7): 1272-1291.
- Railean-Plugaru V, Pomastowski P, Wypij M, Szultka-Mlynska M, Rafinska K, Golinska P, Dahm H, Buszewski B, 2016. Study of Silver Nanoparticles Synthesized by Acidophilic Strain of Actinobacteria Isolated From the of *Picea sitchensis* Forest Soil. *Journal of Applied Microbiology*, 120(5): 1250-1263.
- Rajkumar T, Sapi A, Das G, Debnath T, Ansari A, Patra JK, 2019. Biosynthesis of Silver Nanoparticle Using Extract of *Zea mays* (Corn Flour) and Investigation of Its Cytotoxicity Effect and Radical Scavenging Potential. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 193: 1-7.
- Rathod D, Golinska P, Wypij M, Dahm H, Rai M, 2016. A new report of *Nocardiopsis valliformis* Strain OT1 From Alkaline Lonar Crater of India and its Use in Synthesis of Silver Nanoparticles With Special Reference to Evaluation of Antibacterial Activity and Cytotoxicity. *Medical Microbiology and Immunology*, 205(5): 435-447.
- Samundeeswari A, Dhas SP, Nirmala J, John SP, Mukherjee A, Chandrasekaran N, 2012. Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Actinobacterium *Streptomyces albogriseolus* and Its Antibacterial Activity. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 59(6): 503-507.
- Sanjenbam P, Gopal J V, Kannabiran K, 2014. Anticandidal Activity of Silver Nanoparticles Synthesized Using *Streptomyces* sp. VITPK1. *Journal De Mycologie Médicale*, 24(3): 211-219.
- Saratale RG, Karuppusamy I, Saratale GD, Pugazhendhi A, Kumar G, Park Y, Ghodake GS, Bharagava RN, Banu JR, Shin HS, 2018. A Comprehensive Review on Green Nanomaterials Using Biological Systems: Recent Perception and Their Future Applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 170: 20-35.
- Saravanan M, Barik SK, MubarakAli D, Prakash P, Pugazhendhi A, 2018. Synthesis of Silver Nanoparticles From *Bacillus brevis* (NCIM 2533) and Their Antibacterial Activity Against Pathogenic Bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 116: 221-226.
- Saygin H, Ay H, Guven K, Sahin N, 2019. *Kribbella turkmenica* sp. nov., Isolated From the Karakum Desert. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(8): 2533-2540.
- Sharma V, Kaushik S, Pandit P, Dhull D, Yadav JP, Kaushik S, 2019. Green Synthesis of Silver Nanoparticles from Medicinal Plants and Evaluation of Their Antiviral Potential Against Chikungunya Virus. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(2): 881-891.
- Singh H, Du J, Singh P, Yi TH, 2018. Extracellular Synthesis of Silver Nanoparticles by *Pseudomonas* sp. THG-LS1. 4 and Their Antimicrobial Application. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 8(4): 258-264.

- Singh P, Singh H, Kim YJ, Mathiyalagan R, Wang C, Yang DC, 2016. Extracellular Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles by *Sporosarcina koreensis* DC4 and Their Biological Applications. *Enzyme and Microbial Technology*, 86: 75-83.
- Singh R, Shedbalkar UU, Wadhvani SA, Chopade BA, 2015. Bacteriogenic Silver Nanoparticles: Synthesis, Mechanism, and Applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(11): 4579-4593.
- Składanowski M, Golinska P, Rudnicka K, Dahm H, Rai M, 2016. Evaluation of Cytotoxicity, Immune Compatibility and Antibacterial Activity of Biogenic Silver Nanoparticles. *Medical Microbiology and Immunology*, 205(6): 603-613.
- Taha ZK, Hawar SN, Sulaiman GM, 2019. Extracellular Biosynthesis of Silver Nanoparticles from *Penicillium italicum* and its Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxicity Activities. *Biotechnology Letters*, 41(8-9): 899-914.
- Vijayabharathi R, Sathya A, Gopalakrishnan S, 2018. Extracellular Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Streptomyces griseoplanus* SAI-25 and its Antifungal Activity Against *Macrophomina phaseolina*, the Charcoal Rot Pathogen of Sorghum. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14: 166-171.
- Vinoth S, Shankar SG, Gurusaravanan P, Janani B, Devi JK, 2019. Anti-larvicidal activity of Silver Nanoparticles Synthesized from *Sargassum polycystum* Against Mosquito Vectors. *Journal of Cluster Science*, 30(1): 171-180.
- Wypij M, Świecimska M, Czarnecka J, Dahm H, Rai M, Golinska, P. 2018. Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Silver Nanoparticles Synthesized from two Haloalkaliphilic Actinobacterial Strains Alone and in Combination With Antibiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 124(6): 1411-1424.
- Zhao X, Zhou L, Riaz Rajoka MS, Yan L, Jiang C, Shao D, Zhu J, Shi J, Huang Q, Yang H, Jin M, 2018. Fungal silver nanoparticles: synthesis, application and challenges. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(6): 817-835.