

## The Biosynthesis of Silver Nanoparticles and their Use as a Biosensor Material

Havva KARAHAN\*, Hatice ÇÖLGEÇEN

Zonguldak Bülent Ecevit University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, Zonguldak, Turkey

ORCID ID: Havva KARAHAN: <https://orcid.org/0000-0003-0518-6265>; Hatice ÇÖLGEÇEN: <https://orcid.org/0000-0001-8246-4279>

Received: 22.05.2021

Accepted: 10.12.2021

Published online: 15.12.2021

Issue published: 31.12.2021

**Abstract:** Various synthesis methods are being developed in order to increase the number of scientific fields where nanoparticles can be used. Recently, the biosynthesis methods have eliminated the limitations of the traditional synthesis methods such as physical and chemical ones. They have been also developed as an alternative synthesis method. With green synthesis called herbal nanofactories, primary and secondary metabolites in plants enable the reduction and capping of nanoparticles. The functional groups of alkaloids, phenolics, terpenoids, ketones, polysaccharides, proteins, vitamins, and amino acids in plants react with silver metals in ionic form and reduce “+” valued metals to “0” valued nanostructures. At the same time, functional groups of secondary metabolites form bonds with “0” valued silver nanometals and cover the surface of silver nanometals; thus, stabilization is achieved. Synthesis by biological methods provides high efficiency and rapid synthesis and the production cost of silver nanoparticle decreases. Moreover, biosynthesis is an environment-friendly technique as it takes place inside a living being. With the latest technology, silver nanoparticles stand out in the fields of biosensor and photoimaging. In this review, in which areas silver nanoparticles are used and their biosynthesis, stabilization, characterization, antibacterial mechanism, and use as a biosensor will be discussed.

**Keywords:** Green synthesis, bionanotechnology, characterization, secondary metabolite, antibacterial activity.

### Gümüş Nanopartiküllerinin Biosentezi ve Biosensör Materyali Olarak Kullanımı

**Öz:** Nanopartiküllerin kullanılabilceği bilim alanlarını arttırmak amacıyla son zamanlarda çeşitli sentezleme metotları geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu metotlardan biri nanopartiküllerin bitkiler aracılığıyla sentezlenmesidir. Günümüzde biosentez yönteminin kullanılması, fiziksel ve kimyasal yöntemler gibi geleneksel sentez yöntemlerinin sınırlamalarını ortadan kaldırmış, alternatif bir sentez yolu olarak geliştirilmiştir. Bitkisel nanofabrikalar olarak adlandırılan yeşil sentez ile bitkilerde bulunan primer ve sekonder metabolitler nanopartiküllerin indirgenmesi ve kapaticılığını mümkün kılmaktadır. Bitkilerde bulunan alkaloidler, fenolikler, terpenoidler, ketonlar, polisakaritler, proteinler, vitaminler, amino asitlerin fonksiyonel grupları iyon halindeki gümüş metalleri ile tepkimeye girerek “+” değerlikli metalleri “0” değerlikli nanometal yapılar indirgemektedir. Aynı zamanda sekonder metabolitlerin fonksiyonel grupları “0” değerlikli gümüş nanopartiküller ile bağlar oluşturarak gümüş nanopartiküllerin yüzeyini kaplar, böylece gümüş nanopartiküllerinin stabilizasyonu sağlanmış olur. Biyolojik yöntemler ile sentez hızlıdır, yüksek verim sağlar ve gümüş nanopartikülü üretimi maliyeti düşer. Aynı zamanda, biosentez yoluyla nanopartikül üretimi canlı içinde gerçekleştiğinden çevre dostu bir tekniktir. Son teknoloji ile gümüş nanopartiküller, biosensör ve fotogörüntüleme alanlarında öne çıkmıştır. Gümüş nanopartiküller ile bazı belirteçlerin spesifik olarak tespiti çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bu derlemede gümüş nanopartiküllerinin kullanım alanları, biosentezi, stabilizasyonu, karakterizasyonu, antibakteriyel mekanizması ve biosensör olarak kullanımına değinilecektir.

**Anahtar kelimeler:** Yeşil sentez, bionanoteknoloji, karakterizasyon, sekonder metabolit, antibakteriyel aktivite.

### 1. Giriş

Gümüş ( $Ag^+$ ) iyonunun; nötron sayısı 61, atom numarası (proton sayısı) 47, elektron sayısı 47, atom ağırlığı 107.87'dir. Argentum olarak da bilinen  $Ag^+$  yüksek elektriksel ve termal iletkenliğe sahip, yumuşak, beyaz, parlak ve saf formda bulunan bir geçiş metalidir (Howe & Dobson, 2002). Eski çağlardan beri madeni paralar, mutfak eşyaları, solüsyonlar, köpükler, merhemler ve losyonların içeriğinde kullanılmaktadır; bununla birlikte, tıp, elektronik ve ev uygulamaları gibi çeşitli alanlarda da kullanımı yaygındır.  $Ag^+$ 'nin kullanım alanı geniş olduğundan oldukça büyük öneme sahiptir. Gümüş sülfadiazin yara bölgesinde biyofilm oluşumunu önlemek için yanık yaralarının tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır.

Gümüş serbest oksijen moleküllerine maruz

kaldığında kendiliğinden oksitlenir (Sallah et al., 2020). Bu durum nanobilim ve nanoteknoloji uygulamalarında, nanomalzemelerin üretiminde önemli ve dikkat çeken bir ilerlemeye yol açmıştır. Gümüşün farklı kimyasal reaksiyonlarının anlaşılması gümüş nanopartiküllerin ( $AgNP$ 'ler) sentezi çalışmalarını hızlandırmıştır.

$AgNP$ 'ler atık sularda veya bitki materyallerinde doğal olarak birikmektedir (Howe & Dobson, 2002), bununla birlikte deneysel çalışmalar için fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere çeşitli yöntemler kullanılarak  $AgNP$ 'lerin sentezi gerçekleştirilmektedir. Fiziksel yöntemlerde buhar yoğunlaştırma, lazer ablasyon, gama ışınması ve elektron ışınlanması  $AgNP$ 'lerin sentezinde en sık kullanılan yaklaşımlardır (Iravani et al., 2014; Sallah et al., 2020). Kimyasal yöntemlerde metal tuzlarını indirgemek için su veya organik çözücülere ihtiyaç vardır.

\*Corresponding author: [havva01030@gmail.com](mailto:havva01030@gmail.com)

Bu yöntem üç önemli kimyasal madde üzerine yoğunlaşır: indirgeyici maddeler, metal öncüler ve stabilize edici veya kapatıcı ajanlar. Biyolojik yöntemlerde ise bitki ekstraktları, funguslar ve bakteriler kullanılarak AgNP'lerin biyosentezi gerçekleştirilmektedir (Gudikandula & Maringanti, 2016). AgNP'lerin sentezi için; fiziksel ve kimyasal yöntemlerde daha fazla enerji, yüksek basınç, sıcaklık ve kimyasallara ihtiyaç duyulurken biyolojik yöntemlerde AgNP'lerin sentezi *in vivo* gerçekleşir. Fiziksel ve kimyasal yöntemlerin dezavantajları göz önünü alındığında AgNP'lerin sentezi için biyolojik yöntemler tercih edilmektedir (Gudikandula & Maringanti, 2016; Sharifi-Rad et al., 2020). Biyolojik yöntemler; çevre dostu, ucuz, tek basamaklıdır, bununla birlikte tehlikeli veya toksik kimyasallar kullanılmadığı için güvenlidir (Nabikhan et al., 2010).

AgNP'lerin biyosentezinde kullanılan bitki ekstraktları; fungus ve bakteriler ile karşılaştırıldığında daha fazla AgNP üretim potansiyeline sahiptir (Gudikandula & Maringanti, 2016). Bunun nedeni bitki ekstraktlarının içerdiği biyoaktif bileşiklerdir [primer

(proteinler, amino asitler) ya da sekonder metabolitlerdir (alkaloidler, fenolikler, terpenoidler, ketonlar, vitaminler)]. Bu bileşikler AgNP'lerin sentezinde indirgeyici ve kapatıcı ajan olarak rol oynar, aynı zamanda AgNP'lerin sentezlenmesi süresini kısaltır (Mukherjee et al., 2014; Sharifi-Rad et al., 2020).

AgNP'lerin farklı bitki türlerinden alınan eksplant kaynaklarının yanında bitki doku kültürü metodlarını kullanarak da üretildiği rapor edilmiştir (Mude et al., 2009; Nabikhan et al., 2010; Xia et al., 2016; Aref & Salem, 2020; Rashmi et al., 2021) (Tablo 1). Bitki doku kültürü, aseptik koşullar altında katı veya sıvı besin ortamlarında bitkilerin, dokuların, organların büyümesi ve çoğalması olarak tanımlanır. Bitki doku kültürü; kallus üretimi, sekonder metabolit üretimi, bitki gelişimi gibi çalışmalarda önemli bir rol oynamaktadır. Ek olarak, hızlı çoğalma, gen kaynağı korunması, somaklonal varyasyon, dihaploid bitki üretimi, somatik hibridizasyon, genetik mühendisliği için doku kültürü uygulamaları kullanılabilir.

Tablo 1. Bitki ekstraktları ile gümüş nanopartiküllerinin biyosentezi ve biyolojik aktivitesi.

Table 1. The biosynthesis and the biological activity of silver nanoparticles by plant extracts.

NP	Boyut (nm)	Morfoloji	pH	Isı (°C)	Bitki	Aktivite	Karakterizasyon	Kaynak
Ag	5-104	Heksagonal, Nanotriangles	2,11	30	<i>Medicago sativa</i> 'nın Tohum Ekstraktı	Antibakteriyal Aktivite	TEM, XRD, SEM, XPS, UV-Vis	Lukman et al., 2011
Ag	55-80 5-40	Küresel	-	35	<i>Cinnamomum camphora</i> 'nın Kallus Kültürü Ekstraktı	Antibakteriyal Aktivite	FT-IR, UV-Vis, XRD, TEM, EDX, SEM, DLS	Aref & Salem, 2020
Ag	60-80	Küresel	-	35	<i>Carica papaya</i> 'nın Kallus Ekstraktı	-	FTIR, SEM, UV-Vis	Mude et al., 2009
Ag	32.9	Küresel	6	32	<i>Centella asiatica</i> L.'nin Kallus Kültürü Ekstraktı	Antioksidan Aktivite	UV-Vis, XRD, TEM, EDAX, FTIR	Rashmi et al., 2021
Ag	5-20	Küresel	-	25	<i>Sesuvium portulacastrum</i> L.'nin Kallus ve Yaprak Ekstraktı	Antimikrobiyal Aktivite	TEM, XRD, FTIR	Nabikhan et al., 2010
Ag	44	Küresel	-	Oda Sıcaklığı	<i>Coleus aromaticus</i> 'un Yaprak Ekstraktı	Bacterisidal Aktivite	XRD, UV-Vis, EDAX, SEM, FTIR	Vanaja & Annadurai, 2013
Ag	6-27	Küresel	7,8,9,10,11	Oda Sıcaklığı	<i>Taxus yunnanensis</i> 'in Kallus Ekstraktı	Antibakteriyal ve Sitotoksik Aktivite	XRD, TEM, FTIR	Xia et al., 2016

AgNP'ler birçok moleküle kıyasla daha az kırılma indisine sahiptir. Biyomoleküller AgNP'lere bağlandığında yerel kırılma indisinde bir artış gösterir ve Ag'nin yok olma (soğurma veya saçılma) spektrumunu gözle görülür bir şekilde artırır. AgNP'lerdeki bu değişim ile çeşitli sensörlerin hedef moleküle etkili bir şekilde bağlandığı kanıtlanmıştır. Aynı zamanda AgNP'ler üzerindeki çeşitli kaplama (silika gibi) ajanları biyomoleküler saptamada etkili görev görür (Sotiriou & Pratsinis, 2011).

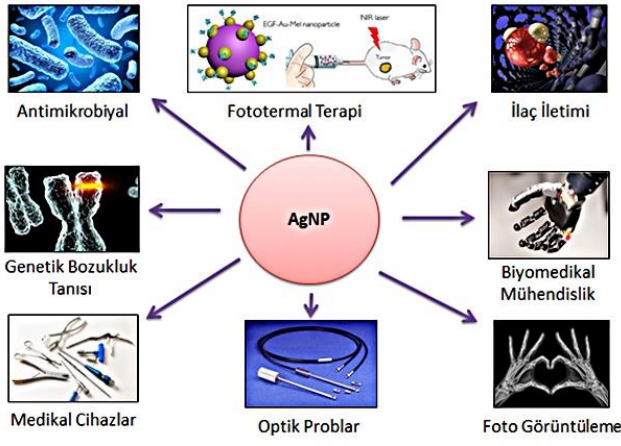
AgNP'lerin biyosensör materyali olarak kullanımı AgNP'lerin kimyasal stabilitesi, elektriksel iletkenliği ve katalitik aktivitesinin yüksek olması nedeniyle hedef maddenin tespit edilmesini güçlendirir. Algılama yüzeylerine elektro-statik çekim ile bağlanması AgNP'lerin stabilitesi ile yakından ilgilidir. Yüzeyde güçlü bir tutunma oluşturmak için genellikle yüzey kimyasal modifikasyonunun yapılması gerekir. Bu açıdan bakıldığında AgNP'ler yüzey kimyasal modifikasyonları için uygundur. Örneğin; AgNP'lerin yüzeyine bağlanması için trietoksisilan (3-Aminopropil), dallanmış polietilenimin (BTI), sitrat, lipoik asit, polietilen glikol (PEG) ve polivinilpirolidon en yaygın kullanılan

kimyasaldır (Toh et al., 2015; Tan et al., 2020).

Bu derlemede AgNP'lerin; kullanım alanları, bitki ekstraktları ve bitki doku kültürü yöntemleri ile biyosentezi, biyosentezi için kritik parametreler, karakterizasyonu, antimikrobiyal aktivite üzerindeki etki mekanizmaları ve AgNP'lerin biyosensör alanında kullanımını değerlendirmek amaçlanmıştır.

## 2. Gümüş Nanopartiküllerin Kullanım Alanları

AgNP'ler; fototermaal terapi, genetik hastalık teşhisi, biyomedikal mühendislik, tıbbi cihazlar, optik problemler, foto görüntüleme gibi mekanik, elektrik, manyetik, katalitik, fotokimyasal alanlarda (Calderón-Jiménez et al., 2017), bunlara ek olarak, ilaç taşıyıcı ve biyosensör olarak, yiyecek ve ürün paketlemede, su arıtma ya da su sterilizasyonunda, UV ışığın zararlı etkisini önlemede, deterjanlardaki antibakteriyel spreylerde, plastiklerde, kozmetik ve tekstilde kullanılmaktadır (Şekil 1) (Calderón-Jiménez et al., 2017; Gonzalez et al., 2017). AgNP'lerin kullanım alanının geniş olması verimli üretim tekniklerinin anlaşılmasını ve farklı yöntem yaklaşımlarını önemli kılmıştır.



Şekil 1. AgNP'lerin uygulama alanları.

Figure 1. Applications of AgNPs.

### 3. Gümüş Nanopartiküllerin Biyosentezi

Bitki materyali ya da bitki doku kültürü ile AgNP'lerin biyosentezi basit, hızlı, verimli ve çevre dostu olduğundan önemli bir tekniktir. Bitki doku kültürü teknikleriyle kallus üretimi; bitkinin yaprak, sürgün, kök veya hipokotil, epikotil, kotiledon, kök, apikal meristem ve ilk yapraklardan gerçekleştirilebilir. Bitki materyali ya da bitkiden elde edilen kallus ekstraktları kapatacıcı ve indirgeyici ajan olarak çok sayıda polar grup içerdiğinden AgNP'lerin stabilizasyonu için önemlidir.

*Arabidopsis thaliana*, *Centella asiatica*, *Hordeum vulgare*, *Linum usitatissimum*, *Sesuvium portulacastrum*, *Taxus yunnanensis*, *Cinnamomum camphora* gibi birçok bitkisel materyal ve bitki doku kültürü ile üretilen kallus ekstraktları AgNP'lerin biyosentezi için kullanılmıştır (Nabikhan et al., 2010; Mandeh et al., 2012; Netala et al., 2015; Anjum & Abbasi, 2016; Xia et al., 2016; Abbasi et al., 2017; Aref & Salem, 2020) (Tablo 1).

### 4. Gümüş Nanopartiküllerin Stabilitesi

Biyomoleküllerin AgNP'ler yüzeyine tutunması elektrostatik ve sterik etkileşimlerle olmaktadır. Bu reaksiyonlar pozitif Ag iyonuna bağlanan uygun stabilizör ile gerçekleşir. DNA, RNA, antikor, aptamer ve peptid gibi biyomoleküller bağlanarak AgNP'nin yüzeyine AgNP'ler tutuklanabilmektedir (immobilizasyon) (Tan et al., 2020). Aynı zamanda tiol grupları AgNP'lerin yüzeyinde immobilizasyon için kullanılmaktadır (Tan et al., 2020). Fakat AgNP'lerin yüzeyine biyomoleküllerin immobilizasyonunu sağlamak için AgNP'lerin agregatlaşmasının en aza indirilmesi önemlidir. Çözüm olarak AgNP'lerin optimum koşullarda üretilmesi gerekmektedir. Proteinler de hidrofobik olarak elektrostatik etkileşim ve değişken bağlar ile AgNP'lere bağlanabilmektedir (Szymanski & Porter, 2013). Sitrat kaplı AgNP'ler; tiol, antikor, amin, protein ve polimer olmak üzere çeşitli moleküllerle kolayca tutunmaktadır. Bununla birlikte PVP, AgNP'lerin yüzeyine çok güçlü bir şekilde bağlanır bu nedenle tanik asit veya sitrat kaplı AgNP'ye kıyasla daha yüksek stabilite gösterir. Biyomoleküllerin AgNP'lerin yüzeyine bağlanması genel olarak karboksil (COOH) veya amin grupları ile gerçekleşmektedir.

### 4.1. Bitki Ekstraktlarının İndirgeyici Ajan Olarak Kullanılması

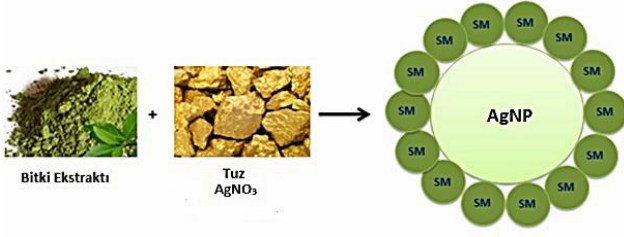
Bitki ekstraktları içerdiği çeşitli biyoaktif bileşikler sayesinde AgNP'lerin biyosentezinde indirgeyici ajan olarak rol oynar, dolayısıyla AgNP'lerin biyolojik olarak sentezlenmesi AgNP'lerin stabilitesini artırır. Aynı zamanda biyolojik olarak sentezlenen AgNP'ler immünojenik olmayan özellikler gösterir. Bu durum tıbbi uygulamalarda kullanılmak üzere geliştirilen biyosensörler için bir avantajdır.

İndirgeme, bir maddenin bileşimindeki hidrojen miktarının artması ya da oksijen miktarının azalmasıdır. Başka bir deyişle, iyon ya da atomun bir elektron ilâvesi ile daha düşük değerliğe inmesidir. AgNP'lerin indirgenebilmesi için indirgeme ajanı seçilmelidir. İndirgeme ajanı kimyasal indirgeme hızını etkilerken, stabilize edici ajan, sentezlenen AgNP'lerin yüzeyine seçici olarak bağlanacak ajanları öncelikli olarak düzenlemektedir (Oliveira et al., 2020). Hem indirgeme hem stabilize edici ajanın dikkatli bir şekilde seçilmesi AgNP'lerin morfolojileri üzerindeki kontrolü sağlayacaktır (Toh et al., 2015). Bu nedenle AgNP'lerin biyosentezi için kullanılacak bitki içerdiği metabolitler göz önüne alınarak değerlendirilmelidir. Bitki ekstraktlarının içerdiği biyoaktif bileşiklerden (fenolik asitler, oksalik, malik, askorbik asit, çözünür karbonhidratlar, tanen, omega-3, flavonoidler, alkaloidler, lignan) hangisinin AgNP'leri indirgediği kesin olarak bilinmediğinden bazı araştırmacılar bitkinin farklı kısımları (gövde, yapraklar, kök ve doku kültürü ürünleri) ile AgNP biyosentezleyerek bitkinin organları arasında farklılık olup olmadığını gözlemlemiştir (Gholamreza et al., 2014; Xia et al., 2016).

Rasheed et al. (2017) AgNP'lerin biyosentezi için indirgeme ajanı olarak *Artemisia vulgaris* yaprak ekstraktını kullanmıştır. Bununla birlikte, biyosentez ürünü olan AgNP'lerin biyolojik aktivite çalışmaları yapılmıştır (Rasheed et al., 2017). Biyosentez ürünü AgNP'ler güçlü antibakteriyel aktivite göstermiştir. Aynı zamanda AgNP'lerin antioksidan ve sitotoksikite etkisi, MCF-7 ve HeLa hücre hatlarına karşı umut verici olduğu bildirilmiştir.

### 4.2. Bitki Ekstraktlarının Kapatacıcı Ajan Olarak Kullanılması

İlaç iletimi, biyo-algılama ve biyo-görüntüleme gibi tıbbi uygulamalarda AgNP'leri kullanmak için AgNP'lerin stabilitesinin kusursuz olması zorunludur. Fakat AgNP'ler ile ilgili en önemli dezavantaj uzun süre kararlılıklarını koruyamamalarıdır. Ayrıca AgNP'ler çok reaktif oldukları için hava ile uzun süre temas sonucu kolayca oksitlenebilir. Monodispers ve polidispers AgNP'ler elde etmek için AgNP'lerin yüzey modifikasyonu gerekli olduğundan AgNP'leri yan ürünlerden saflaştırabilmek endüstriyel ölçekte AgNP'lerin kullanılmasının önünde bir engeldir. Bu nedenle çoğu uygulamada AgNP'lerin saf olarak sentezlendikten sonra aşınmaya ve oksitlenmeye karşı kararlı yapılarını korumak için yüzey aktif maddeler, polimerler, bitki ekstraktlarında bulunan metabolitler gibi organik bileşikler ya da silika ve karbon vb. inorganik tabakayla kaplanması gerekmektedir (Javed et al., 2020) (Şekil 2).



Şekil 2. Sekonder metabolitler, AgNP'lerin kapatıcı ve indirgeyici ajanlarıdır. SM: Sekonder Metabolitler, NP: Nanopartiküller.

Figure 2. Secondary metabolites are the capping and reducing agents of AgNPs. SM: Secondary Metabolites, NP: Nanoparticles.

AgNP'lerin biyosentezi için kullanılan *Solanum trilobatum* kabuğu kapama ajanı olarak kabul edilmiştir (Ramanathan et al., 2018). Rashid et al. (2019) AgNP'ler için kapama ajanı olarak dört farklı bitkiyi (*Rumex dantatus*, *R. Hastatus*, *Bergenia stracheyi* ve *B. ciliata*) kullanmıştır. Aynı zamanda farklı formüle edilmiş AgNP'lerin altı farklı bakteri suşuna (*Staphylococcus haemolyticus*, *S. aureus*, *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi* ve *Pseudomonas aeruginosa*) karşı güçlü antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir. AgNP'lerin aktivitesi, derişimlerinin artmasıyla artmıştır.

## 5. Gümüş Nanopartiküllerin Biyosentezi İçin Kritik Parametreler

Bilim insanları çeşitli alanlarda kullanmak üzere bütün AgNP bileşimleri; biyoyararlanım ve hareketliliği ciddi şekilde azaltan agregatlaşma potansiyeline sahiptir. AgNP'lerin agregat davranışı ve stabilizasyonu, pH, sıcaklık, inkübasyon periyodu, tuz konsantrasyonu, redoks koşulu, karışım oranı, iyonik güç, doğal organik madde konsantrasyonu ve AgNP'lerin yüzey kimyası gibi birçok değişkenin etkileşimine büyük ölçüde bağlıdır, bu değişkenler AgNP'ler arasındaki elektrostatik ve sterik etkileşimi etkilemektedir (Singh et al., 2016; Siddiqi & Husen, 2017).

### 5.1. pH'nın Gümüş Nanopartiküller Üzerindeki Etkisi

AgNP'lerin ortalama boyutu ve agregatlaşma eğilimi reaksiyon sisteminin pH'ına yüksek oranda bağlıdır, pH'ın etkisi çözülmüş oksijen konsantrasyonunun etkisinden daha güçlüdür (Alqađi et al., 2014; Fernando & Zhou, 2019). Lukman et al. (2011) 0.1 mM ve 0.01 mM AgNO<sub>3</sub> çözeltileri ile AgNP'lerin biyosentezi için *Medicago sativa* tohum ekstraktını kullanmıştır. AgNP'ler 2.0 ve 11.0 pH aralığında incelenmiştir. Numuneler 30°C'de inkübe edilmiştir. Çalışma, pH 11.0'daki reaksiyonda yüksek bir monodispersitenin elde edildiğini göstermiştir, pH 11.0'da ortalama boyut 11.5 nm'dir, ancak pH 2.0'da reaksiyon meydana gelmemiştir (Lukman et al., 2011).

Hegazy et al. (2014) ve Hegazy et al. (2015) 1 mM AgNO<sub>3</sub> çözeltisi ile AgNP'lerin biyosentezi için *Medicago sativa* L.'nin kallus ekstraktını kullanmıştır. Numuneler oda sıcaklığında yaklaşık 24 saat inkübe edilmiştir. Farklı pH aralıkları ve 2.0, 5.0, 7.0, 9.0, 10.0 ve 11.0 çalışılmıştır. pH 2.0'de 24 saatlik inkübasyondan sonra ekstraktın rengi değişmemiştir, bu yüzden araştırmacılar reaksiyonun devam etmediğini yorumlamıştır. Araştırmacılar, pH'ı ayarlanmamış örneklerde 2 ila 50 nm, pH 5.0'de 5 ila 60 nm, pH 10.0'da 35 ila 40 nm arasındaki boyut aralıkları gözlemlemiştir ve AgNP'lerin morfolojisi her iki durumda da (pH değeri ayarlanmamış ve pH değerleri ayarlanmış)

küresel, disk ve düzensizdir (Hegazy et al., 2014; Hegazy et al., 2015).

*Taxus yunnanensis*'in kallus ekstraktları kullanılarak AgNP'ler sentezlenmiştir. Farklı pH aralıkları çalışılmış ve 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 ve 11.0 pH'lı AgNP'ler, 439, 425, 411, 409 ve 450 nm'de maksimum absorbans göstermiştir. pH 10.0'da daha küçük boyutlu AgNP'lerin olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle AgNP'lerin biyosentezi için en uygun koşul olarak pH 10.0'u tercih etmişlerdir (Xia et al., 2016). Xia et al. (2016), 7.0-10.0 pH'da AgNP'lerin ortalama boyutunun küçülmesini absorpsiyon pikinin kısa dalga boyuna kaymasıyla ilgili olabileceğini bildirmiştir.

### 5.2. Sıcaklığın Gümüş Nanopartiküller Üzerindeki Etkisi

1 mM gümüş nitrat (AgNO<sub>3</sub>) çözeltisi ile AgNP'leri üretmek için *Carica papaya*'nın kallus ekstraktı kullanılmıştır. Numuneler, yaklaşık 24 saat boyunca 35°C'de inkübe edilmiştir (Mude et al., 2009). 1 mM AgNO<sub>3</sub> çözeltisi ile AgNP'leri üretmek için *Citrullus colocynthis* (L.) Schrader'ın kökten elde edilen kallus ekstraktı kullanılmıştır. İndirgeme için numuneler yaklaşık 24 saat boyunca 35°C'de inkübe edilmiştir (Satyavani et al., 2011). Selenyum ve AgNO<sub>3</sub> kullanarak *Spermacoce hispida*'nın yaprak sulu ekstraktlarından selenyum NP'ler ve AgNP'ler sentezlenmiştir. Ekstraktlar farklı sıcaklık (4, 20, 40 ve 60°C'de 15 dakika), farklı pH aralıkları (6.0, 7.0, 8.0, 9.0 veya 10.0), farklı AgNO<sub>3</sub> ve selenyum konsantrasyonları (0.5:49.5, 2:48, 4:46 ve 6:44) ve inkübasyon zamanı ile optimize edilmiştir. Sonuçlar, Sh-SeNP'lerin sentezi için optimum koşulun, pH 9.0'da, 4:46 oranında ve Sh-ALE için 30 mM selenious asit çözeltisi, 10 dakika boyunca 40°C'de inkübe edildiğinde bulunmuşken, AgNP'ler için optimum şartın pH 8.0'de, 4:46 oranında 1 mM AgNO<sub>3</sub>'ta 10 dakika boyunca 40°C'de inkübe edildiğinde bulunmuştur (Vennila et al., 2018).

### 5.3. İnkübasyon Süresinin Gümüş Nanopartiküller Üzerindeki Etkisi

AgNO<sub>3</sub> kullanarak *Sesuvium portulacastrum* L.'nin kallus ve yaprak ekstraktlarından AgNP'ler sentezlenmiştir. Ekstraktlar farklı inkübasyon süresi ile inkübe edilmiştir (0-10-20-30-40-50dk, 1-2-3-4-6-24-48 s). Sonuçlar, sarıdan kahverengiyeye kademeli olarak renk değişimi göstermiştir ve inkübasyon sırasında AgNP'lerin yoğunluğu artmıştır. 420 nm'de renk yoğunluğunun inkübasyon süresi ile arttığını bildirmiştir. 24 saatlik inkübasyondan sonra renk değişmemiştir. Araştırmacılar, renk yoğunluğunun, yaprak ekstraktları ile karşılaştırıldığında kallus ekstraktlarında daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir (Nabikhan et al., 2010).

### 5.4. Tuz Konsantrasyonunun Gümüş Nanopartiküller Üzerindeki Etkisi

*Linum usitatisimum*'nun sulu ekstraktları ve TDZ-içerikli kallus kullanılarak AgNP'lerin biyosentezinin optimum aralığı bulmak için farklı konsantrasyonlarda 1 mM AgNO<sub>3</sub> (1:1, 1:2, 1:5, 1:10 v/v) denenmiştir. AgNP'li kallus ekstraktının biyoindirgenmesi AgNP'li bitki ekstraktının biyoindirgenmesinden daha kısa sürede tamamlanmıştır. Ayrıca, AgNP'lerin biyoindirgenmesi için farklı zamanlarda (0-10-20-30-40-50dk, 1-2-3-4-6-24s) çalışılmıştır. Sulu ekstraktların reaksiyon karışımı 6 saat içinde tamamlanmıştır. TDZ içerikli kallus

reaksiyonundaki Ag iyonlarının indirgenmesi 2 saat içerisinde tamamlanmıştır (Anjum & Abbasi, 2016).

## 6. Gümüş Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

AgNP'ler morfolojilerine (boyut, şekil, yüzey alanı) ve dağılıma özelliklerine göre karakterize edilir. Genel karakterizasyon teknikleri: ultraviyole görünür spektroskopisi (UV-Vis), atomik kuvvet mikroskopisi (AFM), taramalı elektron mikroskobu (SEM), geçirimli elektron mikroskobu (TEM), X-ışını toz difraksiyonu (XRD), fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), indüktif eşleşmiş plazma kütle spektroskopisi (ICP-MS), dinamik ışık saçılımı (DLS), enerjili dağınımlı spektroskopisi (EDS), brunauer-emmett-teller tekniği (BET)'dir

(Nabikhan et al., 2010; Khatami et al., 2015; Netala et al., 2015; Bao et al., 2016; Moldovan et al., 2016; Patra et al., 2016; Vennila et al., 2018) (Tablo 2).

AgNP'lerin spektrumları UV-Vis ile 250 ila 800 nm dalga boyu arasında taranarak belirlenmektedir. AgNP'lerin morfolojisini SEM ile belirlemek için AgNP'ler kurutularak stamlara yapıştırılmaktadır. AgNP'li ekstraktların TEM ile analizinde ise ekstraktlar kaplı gridler üzerine damlatılarak kurutulmaktadır. AgNP'lerin kristal yapısını belirlemek için XRD tarama aralığı 20° ile 80° arasında olmalıdır. AgNP'leri FTIR ile analiz edebilmek için kurutulmuş numune kullanılmalı, bununla birlikte FTIR 4cm<sup>-1</sup> çözünürlükte ve spektrumu 450-4000cm<sup>-1</sup> aralığında ayarlanmalıdır (Mude et al., 2009).

Tablo 2. Gümüş nanopartiküllerin karakterizasyon teknikleri ve temel işlevleri.

Table 2. The characterization techniques and main functions of silver nanoparticles.

Karakterizasyon Tekniği	Amaç	Referans
UV-Spektrofotometre	AgNP'lerin karakterizasyonunu ve stabilitesini değerlendirir.	Zook et al., 2011; Gorham et al., 2012
SEM	AgNP'lerin morfolojisini belirler. Görüntülerden histogram elde edilir. NP'ler manuel olarak ölçülür ve sayılır.	Chen et al., 2017
TEM	AgNP'lerin boyutu, morfolojisi ve boyut dağılımını ölçer. SEM ile karşılaştırıldığında daha iyi çözünürlük sağlar.	Parvathiraja et al., 2021
XRD	Atomik ölçekte kristallik derecesini ölçer. AgNP'lerin yapısını, partikül boyutlarını analiz eder, bileşiklerini tanımlar.	Pal et al., 2017
FTIR	AgNP'lerin oluşturduğu çeşitli kimyasal bağları karakterize eder.	Baudot et al., 2010
ICP-MS	Ag <sup>+</sup> iyonlarının konsantrasyonunu belirler.	Bao et al., 2016
DLS	AgNP'lerin boyutunu ölçer. Farklı pH ve sıcaklık koşullarında zaman içindeki stabiliteyi değerlendirir.	Zhang & Zhang, 2014

AgNP'lerin karakterizasyon yöntemleri ile ilgili birçok araştırmacı çalışmıştır. Nabikhan et al. (2010) AgNP'leri XRD kullanarak yoğun olarak belirlemiştir. AgNP'lerin şekli ve boyutu TEM kullanılarak karakterize edilmiştir. Sentezlenmiş AgNP'lerin 5 ila 20 nm arasında değişen ve farklı büyüklükte küre şeklinde olduğu görülmüştür. Proteinlere işaret eden amid I, II ve III'e karşılık gelen ekstraktlarda yüksek pikler elde edilmiştir ve bunlar FTIR analizi ile belirlenmiştir. Araştırmacılar, flavonların ve terpenoidlerin olduğuna işaret eden aromatik halkalara, geminal metillere ve eter bağlarına karşılık gelen pikleri de kaydetmişlerdir (Nabikhan et al., 2010). Satyavani et al. (2011) AgNP'lerin morfolojisini 20-80 nm<sup>-1</sup> yay sabiti ve rezonans frekansı 209-286 kHz olan AFM ile karakterize etmiştir. Numunenin spektrumu FTIR kullanılarak 4 cm<sup>-1</sup> çözünürlükte 400-4000 cm<sup>-1</sup> aralığında kaydedilmiştir. AgNP'lere bağlanan aromatik halka ve bağlı amid bölgesi içeren polifenoller FTIR ile belirlenmiştir (Satyavani et al., 2011). Xia et al. (2016) XRD kullanılarak AgNP'leri nano-kristaller şeklinde belirlemiştir. Sentezlenen küresel AgNP'ler, TEM kullanılarak 6.4 ila 27.2 nm arasındaki boyut aralığı ile karakterize edilmiştir. Kallus ekstraktlarında fitokimyasallar FTIR kullanılarak incelenmiştir (Xia et al., 2016). Vennila et al. (2018) AgNP'leri UV-Vis kullanılarak karakterize etmiştir. AgNP'lerin morfolojisi ve boyutu SEM ile araştırılmıştır. Element analizi için EDX analizi yapılmıştır. AgNP'lerin toplam yüzey alanı, ASAP 2010 yüzey alanı analizörü metrometrleri kullanılarak BET yöntemi ile belirlenmiştir. AgNP'lerin kristal yapısı, tarama aralığı 20° ile 80° arasında olan XRD kullanılarak belirlenmiştir. AgNP'lerin yüzey fonksiyonel grupları FTIR ile 4000-500 cm<sup>-1</sup> dalga boyu taraması yapılarak incelenmiştir (Vennila et al., 2018). Birçok araştırmacı

benzer yöntemler ile AgNP'lerin karakterizasyonunu yapmıştır.

## 7. Gümüş Nanopartiküllerin Antibakteriyal Aktivite Mekanizması

Bakteriler AgNP'lere maruz kaldığında, AgNP'lerin oksidasyonundan üretilen gümüş iyonlarının pozitif yükü ile bakterilerin negatif yüklü hücre zarı arasındaki elektrostatik çekim nedeniyle bakterilerin hücre duvarına veya zarına yapışma eğilimindedir (Choi et al., 2010). Aynı zamanda, AgNP'ler bakteri hücre duvarındaki kükürt içeren proteinlere karşı güçlü bir afiniteye sahiptir. Böylece, AgNP'ler hücre içine kolayca girebilmektedir (Şekil 3). Bununla birlikte, antibakteriyal çalışmalarda AgNP'lerin yüzeyine bağlanan kapatıcı ajanların kullanımı da önemlidir. Araştırmacılar, Tween-80, sodyum dodesil sülfat (SDS), polivinilpirolidon ile AgNP'ler kapatıldığında AgNP'lerin antibakteriyal aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir (Kvitek et al., 2008; Toh et al., 2015).

AgNP'lerin bakteri zarına bağlanması hücre zarının yapısında geri dönüşü olmayan morfolojik değişikliklere neden olmaktadır (Abdalla et al., 2020). Dolayısıyla bakteri lipid çift tabakasının bütünlüğünde ve hücre zarının geçirgenliğinde bir kayba neden olabilir. Hücre yapısındaki değişiklik, hücre zarının geçirgenliğinin artmasına neden olabilir ve bu da hücrenin çeşitli aktivitelerini düzenli olarak yapabilmesini olumsuz etkiler. Örneğin, AgNP'lerden gümüş iyonlarının salınması; potasyum iyonlarının taşınmasını ve salınmasını değiştirir böylece, hücrelerin taşıma aktivitesini etkiler. Hücre zarı geçirgenliğinin artması sitoplazma, proteinler, iyonlar ve hücresel enerji rezervuarı ATP gibi hücresel içeriklerin kaybına da neden

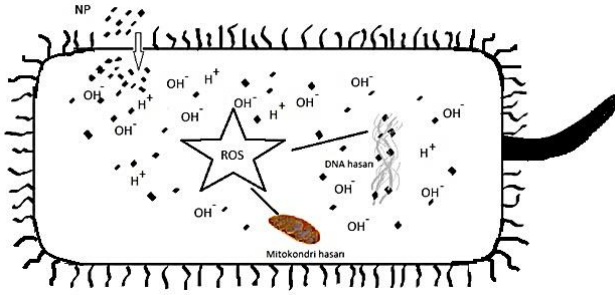
olabilir (Wakshlak et al., 2015). TEM görüntüleri AgNP'lerin, membran depolarizasyonu ve destabilizasyonu yoluyla gram-negatif bakterilerin (*E. coli* ve *S. typhimurium*) bütünlüğünü etkilediğini göstermiştir. *Lactobacilli*'de AgNP'lerin bakterisit etkisi araştırılmış, asidik büyüme koşullarının AgNP'lerin çözünürlüğünü ve hidroksil radikallerinin (-OH) üretimini uyardığı bildirilmiştir (Tian et al., 2018). -OH radikalleri, hücresel reaktif oksijen türlerinde (ROS) bir artışa neden olarak DNA ve mitokondri hasarıyla hücrenin ölümüne yol açmaktadır (Ahmed et al., 2016) (Şekil 4).

*Lawsonia inermis* (Henna)'nın sulu ekstraktı ile AgNP'ler biyosentezlenmiş ve AgNP'lerin insan patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivitesi olduğu bildirilmiştir (Kumar & Kathireswari, 2016). *Taxus*

Tablo 3. Biyomolekülleri tespit eden AgNP-konjuge problemler.

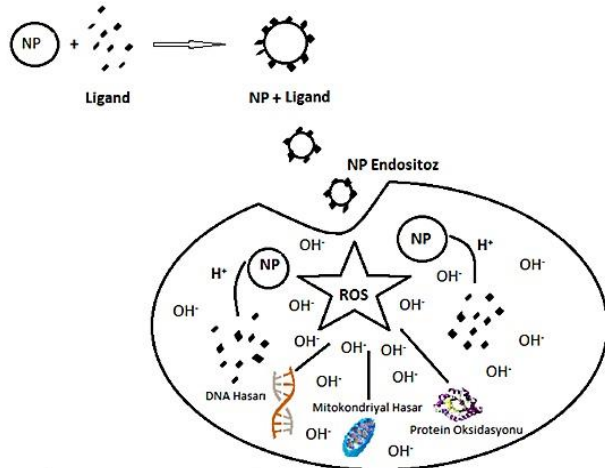
Table 3. AgNP-conjugated probes detect biomolecules.

Hedef	Prob	Sensör	Sınır limiti	Kaynak
Melamin	Sülfanilik asit	Kolorimetrik	10.6 nM	Song et al., 2015
C-reaktif protein	Antikor	İmmunofloresans	30 pg/mL	Zhao et al., 2017
DNA	DNA	Elektrokimyasal	50 pM	Cheng et al., 2009
Alfa fetal	Antikor	Eliza	0.23 ng/mL	Xuan et al., 2016
Biyotin	Streptavidin	LSPR	-	Kim & Lee, 2012
Glukoz	Glukoz oksidaz	Elektrokimyasal	-	Chen et al., 2012



Şekil 3. AgNP'lerin antibakteriyel aktivitesi.

Figure 3. The antibacterial activity of AgNPs.



Şekil 4. AgNP'lerin sitotoksik aktivitesi.

Figure 4. The cytotoxic activity of AgNPs.

Bakteri tespiti için bakteri hücresi üzerindeki dış yüzey proteininin AgNP'ler tarafından tespit edilmesi hedeflenmektedir. Bakteriye tespit etmek için prob olarak antikor, DNA veya aptamer kullanılmaktadır. Etkili bir

*yunnanensis* kallus ekstraktı kullanılarak AgNP'ler sentezlenmiş ve insan kanser hücrelerinde sitotoksitesi ve antibakteriyel aktivitesi incelenmiştir (Xia et al., 2016).

## 8. Gümüş Nanopartiküllerin Biyosensör Alanında Kullanımı ve Bakterilerin Tespiti

Viral, bakteriyel enfeksiyon ve kanser gibi çeşitli hastalıkların etkili bir şekilde tedavi edilebilmesi için erken teşhis önemlidir. Bu hastalıklar; problemler, DNA, protein, antikor ya da enzim salgılanmasıyla tespit edilmektedir. Diğer NP'ler gibi, AgNP'ler de biyosensör alanında aktif olarak kullanılmaktadır (Loiseau et al., 2019). AgNP-konjuge biyomoleküller, hedef moleküllere karşı yüksek derecede stabilite ve hassasiyet gösterir. Bu nedenle AgNP-konjuge problemlerin (Tablo 3), hedeflenmiş biyomolekülleri daha hızlı tespit ettiği kanıtlanmıştır.

tespit için problemler AgNP'lerin yüzeyine konjuge edilmektedir. Tüm bakteriyi tespit edebilmek için genellikle Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) ya da lokalize yüzey plazmon rezonansı teknikleri kullanılmaktadır (Naja et al., 2007). Bakteri ile birlikte aynı zamanda influenza, insan immün yetmezlik virüsü, herpes simpleks virüsü ve Ebola virüsü gibi viral hastalıkların erken teşhisi de bu teknikler sayesinde kolaylaştırılmıştır, böylece kişilerin erken evrede tedavi edilmesi sağlanmaktadır. AgNP'ler kullanılarak bakteri tespiti, algılama sınırını geliştirmek için ihtiyaç duyulan bir tekniktir. Araştırmacılar AgNP-konjuge prob molekülü ile bakterilerin tespitini kanıtlamıştır (Naja et al., 2007; Liu et al., 2010). *Rhodococcus rhodochrous* ve *E. coli* bakteri türleri AgNP'ler ile SERS tekniği kullanılarak tespit edilmiştir (Naja et al., 2007). Bununla birlikte, diğer tekniklere kıyasla *E. coli*'nin AgNP'ler ile 10 kat daha iyi tespit edildiği kanıtlanmıştır. AgNP'ler altın nanopartikül ile birleştirilerek *E. coli* üzerinde denenmiştir. AgNP'ler ve altın nanopartikülleri kompleksi yüzey plazmon rezonansı ile *E. coli*'yi daha etkili bir şekilde tespit etmiştir.

## 9. Sonuçlar

Son on beş yıldır bitki ekstraktları ve bitki doku kültürü yöntemleri ile AgNP'lerin üretimi, stabilizasyonu ve karakterizasyonu çalışmaları aktif bir şekilde yapılmaktadır. Bitkisel tabanlı nanoteknoloji ile AgNP'lerin üretimi, toksik kimyasallar içermediğinden ve çevre dostu, ucuz bir yöntem olduğundan önemli ve ilgi çekici bir konudur. Özellikle kallus ve süspansiyon kültüründe daha fazla miktarda AgNP'nin üretilebileceği konusunda pek çok çalışma bulunmaktadır. AgNP'lerin üretimi ile ilgili yeni metodlar keşfetmek AgNP'lerin toksisitesinin en aza indirilmesi açısından önemlidir. Bununla birlikte, yeni sentez teknikleri sayesinde en basitten en olağandışı şekillere kadar farklı şekilli partiküller üretilmektedir. Bu, AgNP'lerin daha birçok özelliğini keşfetmek için bir avantajdır.

AgNP'ler AuNP'lere kıyasla kimyasal olarak daha az kararlı ve daha az biyo-uyumlu olmalarına rağmen, LSPR özelliklerinden dolayı biyosensör olarak daha hassastır, bu nedenle biyosensör tasarımında AgNP'lerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu araştırmaların çoğu yeni-güncel konu olduğundan farklı stratejiler denenmelidir: örneğin; genel strateji LSPR bandının kayması esasına dayanırken daha fazla hassas olan RIS'ler sayesinde nanopartiküllerin biyosensör alanında uygulanmasına olan ilginin artması beklenmektedir.

Nanoteknoloji gelecekte tahmin dahi edilemeyen birçok yeni gelişmelere imkân sağlayacaktır. Biyoteknoloji ve nanomateryallerin kullanılmasıyla şaşırtıcı önemli gelişmeler yaşanacaktır. Yeni teşhis ve tedavi yöntemleri geliştirilebilecek, akıllı ilaçlar tasarlanabilecektir, kanser tedavilerinde kullanım potansiyeli olan farklı metotlar belirlenebilecek ve insan ömrünün uzaması, yaşam kalitesinin artması nanoteknolojik gelişmeler ile gerçekleştirilebilecektir.

**Etik kurul onayı:** Bu çalışma için etik kurul onayı alınmasına gerek yoktur.

**Çıkar çatışması:** Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan etmiştir.

## Kaynaklar

- Abbasi, B.H., Anjum, S., & Hano, C. (2017). Differential effects of in vitro cultures of *Linum usitatissimum* L. (Flax) on biosynthesis, stability, antibacterial and antileishmanial activities of zinc oxide nanoparticles: a mechanistic approach. *Royal Society of Chemistry Advances*, 7, 15931-15943. <https://doi.org/10.1039/C7RA02070H>
- Abdalla, S.S.I., Katas, H., Chan, J.Y., Ganasan, P., Azmi, F., & Busra, M.F. (2020). Antimicrobial activity of multifaceted lactoferrin or graphene oxide functionalized silver nanocomposites biosynthesized using mushroom waste and chitosan. *RSC Advances*, 10, 4969-4983. <https://doi.org/10.1039/C9RA08680C>
- Ahmed, S.A., Ahmad, M., Swami, B.L., & Ikram, S. (2016). A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal of Advanced Research*, 7(1), 17-28. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2015.02.007>
- Alqadi, M.K., Abo Noqta, O.A., Alzoubi, F.Y., Alzoubi, J., & Aljarrah, K. (2014). pH effect on the aggregation of silver nanoparticles synthesized by chemical reduction. *Materials Science-Poland*, 32, 107-111. <https://doi.org/10.2478/s13536-013-0166-9>
- Anjum, S., & Abbasi, B.H. (2016). Thidiazuron-enhanced biosynthesis and antimicrobial efficacy of silver nanoparticles via improving phytochemical reducing potential in callus culture of *Linum usitatissimum* L. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 715-728. <https://doi.org/10.2147/IJN.S102359>
- Aref, M.S., & Salem, S.S. (2020). Bio-callus synthesis of silver nanoparticles, characterization, and antibacterial activities via *Cinnamomum camphora* callus culture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 27, 101689. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101689>
- Bao, D., Oh, Z.G., & Chen, Z. (2016). Characterization of Silver Nanoparticles Internalized by *Arabidopsis* Plants Using Single Particle ICP-MS Analysis. *Frontiers in Plant Science*, 7, 32. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00032>
- Baudot, C., Tan, C.M., & Kong, J.C. (2010). FTIR spectroscopy as a tool for nano-material characterization. *Infrared Physics and Technology*, 53, 434-438. <https://doi.org/10.1016/j.infrared.2010.09.002>
- Calderón-Jiménez, B., Johnson, M.E., Montoro Bustos, A.R., Murphy, K.E., Winchester, M.R., & Vega Baudrit, J.R. (2017). Silver nanoparticles: Technological advances, societal impacts, and metrological challenges. *Frontiers in Chemistry*, 5(6). <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00006>
- Chen, L., Xie, H., & Li, J. (2012). Electrochemical glucose biosensor based on silver nanoparticles/multiwalled carbon nanotubes modified electrode. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 16, 3323-3329. <https://doi.org/10.1007/s10008-012-1773-9>
- Chen, S., Quan, Y., Yu, Y.L., & Wang, J.H. (2017). Graphene quantum dot/silver nanoparticle hybrids with oxidase activities for antibacterial application. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 3, 313-321. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.6b00644>
- Cheng, G.F., Huang, C.H., Zhao, J., Tan, X.L., Hep, G., & Fang, Y.Z. (2009). A Novel Electrochemical Biosensor for Deoxyribonucleic Acid Detection Based on Magnetite Nanoparticles. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 37(2), 169-173. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(08\)60083-3](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(08)60083-3)
- Choi, O., Yu, C.P., Esteban Fernández, G., & Hu, Z. (2010). Interactions of nanosilver with *Escherichia coli* cells in planktonic and biofilm cultures. *Water Research*, 44, 6095-6103. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.069>
- Fernando, I., & Zhou, Y. (2019) Impact of pH on the stability, dissolution and aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Chemosphere*, 216, 297-305. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.122>
- Gholamreza, A., Varshosaz, J., & Shahbazi, N. (2014). Synthesis of silver nanoparticle using *Portulaca oleracea* L. extracts. *Nanomedicine Journal*, 1(2), 94-99.
- Gonzalez, D.A.C., Leo, B.F., Ruenraroengsak, P., Chen, S., Goode, A.E., Theodorou, I. G., ..... & Porter, A.E. (2017). Silver nanoparticles reduce brain inflammation and related neurotoxicity through induction of H2S-synthesizing enzymes. *Scientific Reports*, 7, 42871. <https://doi.org/10.1038/srep42871>
- Gorham, J.M., MacCuspie, R.I., Klein, K.L., Fairbrother, D.H., & Holbrook, D. (2012). UV-induced photochemical transformations of citrate-capped silver nanoparticle suspensions. *Journal of Nanoparticle Research*, 14. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1139-3>
- Gudikandula, K., & Maringanti, S.C. (2016). Synthesis of silver nanoparticles by chemical and biological methods and their antimicrobial properties. *Journal of Experimental Nanoscience*, 11(9). <https://doi.org/10.1080/17458080.2016.1139196>
- Hegazy, H.G., Rabie, G.H., Shabaan, L.D., & Raie, D.S. (2014). Extracellular Synthesis of Silver Nanoparticles by Callus of *Medicago sativa*. *Life Science Journal*, 11(10), 1211-1214.
- Hegazy, H.G., Shabaan, L.D., Rabie, G.H., & Raie, D.S. (2015). Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Cell Free Callus Exudates of *Medicago sativa* L. *Pakistan Journal of Botany*, 47(5), 1825-1829.
- Howe, P.D., & Dobson, S. (2002). Silver and Silver Compounds: Environmental Aspects, World Health Organization & International Programme on Chemical Safety, Geneva.
- Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S.V., & Zolfaghari, B. (2014). Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 9(6), 385-406.
- Javed, R., Zia, M., Naz, S., Aisida, S.O., Ain, N., & Ao, Q. (2020). Role of capping agents in the application of nanoparticles in biomedicine and environmental remediation: recent trends and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, 18, 172. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00704-4>
- Khatami, M., Nejad, M.S., Salari, S., & Almani, P.G.N. (2015). Plant-mediated green synthesis of silver nanoparticles using *Trifolium resupinatum* seed exudate and their antifungal efficacy on *Neofusicoccum parvum* and *Rhizoctonia solani*. *IET Nanobiotechnology*, 10, 4, 237-243. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2015.0078>
- Kim, J.Y., & Lee, J.S. 2012. Multiplexed DNA Detection with DNA-Functionalized Silver and Silver/Gold Nanoparticle Superstructure Probes. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 33(1), 221. <http://dx.doi.org/10.5012/bkcs.2012.33.1.221>
- Kumar, K.S., & Kathireswari, P. (2016). Biological synthesis of Silver nanoparticles (Ag-NPS) by *Lawsonia inermis* (Henna) plant aqueous extract and its antimicrobial activity against human pathogens. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(3), 926-937. <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.503.107>
- Kvitek, L., Panáček, A., Soukupová, J., Kolář, M., Večeřová, R., Prucek, R., Holecová, M., & Zbořil, R. (2008). Effect of Surfactants and Polymers on Stability and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles (NPs). *The Journal of Physical Chemistry C*, 112(15), 5825-5834. <https://doi.org/10.1021/jp711616v>
- Liu, X., Knauer, M., Ivleva, N.P., Niessner, R., & Haisch, C. (2010). Synthesis of Core-Shell Surface-Enhanced Raman Tags for Bioimaging. *Analytical Chemistry*, 82(1), 441-446. <https://doi.org/10.1021/ac902573p>
- Loiseau, A., Asila, V., Boitel-Aullen, G., Lam, M., Salmain, M., & Boujday, S. (2019). Silver-Based Plasmonic Nanoparticles for and Their Use in Biosensing. *Biosensors*, 9(2), 78. <https://doi.org/10.3390/bios9020078>
- Lukman, A.I., Gong, B., Marjo, C.E., Roessner, U., & Harris, U.T. (2011). Facile synthesis, stabilization, and anti-bacterial performance of discrete Ag nanoparticles using *Medicago sativa* seed exudates. *Journal of Colloid and Interface Science*, 353, 433-444. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.09.088>

- Mandeh, M., Omid, M., & Rahaie, M. (2012). *In Vitro* Influences of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles on Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Tissue Culture, Biological Trace Element Research*, 150, 376-380. <https://doi.org/10.1007/s12011-012-9480-z>
- Moldovan, B., David, L., Achim, M., Clichici, S., & Filip, G.A. (2016). A green approach to phyto-mediated synthesis of silver nanoparticles using *Sambucus nigra* L. fruits extract and their antioxidant activity. *Journal of Molecular Liquids*, 221, 271-278. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.06.003>
- Mude, N., Ingle, A., Gade, A., & Rai, M. (2009). Synthesis of Silver Nanoparticles Using Callus Extract of *Carica papaya* - A First Report. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 18(1), 83-86. <https://doi.org/10.1007/BF03263300>
- Mukherjee, S., Chowdhury D., Kotcherlakota R., Patra S., Vinothkumar B., Bhadra M.P., ..... & Patra, C.R. (2014). Potential theranostics application of bio-synthesized silver nanoparticles (4-in-1 system). *Theranostics*, 4, 316-335. <https://doi.org/10.7150/thno.7819>
- Nabikhan, A., Kandasamy, K., Raj, A., & Alikunhi, N.M. (2010). Synthesis of antimicrobial silver nanoparticles by callus and leaf extracts from saltmarsh plant, *Sesuvium portulacastrum* L.. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79, 488-493. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.05.018>
- Naja, G., Bouvrette, P., Hrapovic, S., & Luong, J.H.T. (2007). Raman-based detection of bacteria using silver nanoparticles conjugated with antibodies. *Analyst*, 132(7), 679-86. <https://doi.org/10.1039/B701160A>
- Netala, V.R., Kotakadi, V.S., Nagam, V., Bobbu, P., Ghosh, S.B., & Tartte, V. (2015). First report of biomimetic synthesis of silver nanoparticles using aqueous callus extract of *Centella asiatica* and their antimicrobial activity. *Applied Nanoscience*, 5, 801-807. <https://doi.org/10.1007/s13204-014-0374-6>
- Oliveira, P. F. M., Michalchuk, A. A. L., Marquardt, J., Feiler, T., Prinz, C., Torresi, R. M., & Emmerling, F. (2020). Investigating the Role of Reducing Agents on Mechanosynthesis of Au Nanoparticles. *CryslEngComm*, 22, 6261-6267. <https://doi.org/10.1039/D0CE00826E>
- Pal, S., Nisi, R., Stoppa, M., & Licciulli, A. (2017). Silver-Functionalized bacterial cellulose as antibacterial membrane for wound-healing applications. *ACS Omega*, 2, 3632-3639. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b00442>
- Parvathiraja, C., Shailajha, S., Shanavas, S., & Gurung J. (2021). Biosynthesis of silver nanoparticles by *Cyperus pangorei* and its potential in structural, optical and catalytic dye degradation. *Applied Nanoscience*, 11, 477-491. <https://doi.org/10.1007/s13204-020-01585-7>
- Patra, J.K., Kwon, Y., & Baek, K.H. (2016). Green biosynthesis of gold nanoparticles by onion peel extract: Synthesis, characterization and biological activities. *Advanced Powder Technology*, 27, 2204-2213. <https://doi.org/10.1016/j.apt.2016.08.005>
- Ramanathan, S., Gopinath, S.C.B., Anbu, P., LakshmiPriya, T., Kasim, F.H., & Lee, C.G. (2018). Eco-friendly synthesis of *Solanum trilobatum* extract-capped silver nanoparticles is compatible with good antimicrobial activities. *Journal of Molecular Structure*, 1160, 80-91. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.01.056>
- Rasheed, T., Bilal, M., Iqbal, H.M.N., & Li, C. (2017). Green biosynthesis of silver nanoparticles using leaves extract of *Artemisia vulgaris* and their potential biomedical applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 158, 408-15. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.020>
- Rashid, S., Azeem, M., Khan, S.A., Shah, M.M., & Ahmad, R. (2019). Characterization and synergistic antibacterial potential of green synthesized silver nanoparticles using aqueous root extracts of important medicinal plants of Pakistan. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 179, 317-25. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.04.016>
- Rashmi, V., Prabhushankar, H.B., & Sanjay, K.R. (2021). *Centella asiatica* L. callus mediated biosynthesis of silver nanoparticles, optimization using central composite design, and study on their antioxidant activity. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 146, 515-529. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02086-3>
- Sallah, A., Naomi, R., Utami, N.D., Mohammad, A.W., Mahmoudi, E., Mustafa, N., & Fauzi, B. (2020). The Potential of Silver Nanoparticles for Antiviral and Antibacterial Applications: A Mechanism of Action. *Nanomaterials*, 10(8), 1566. <https://doi.org/10.3390/nano10081566>
- Satyavani, K., Ramanathan, Y., & Gurudeeban, S. (2011). Green Synthesis of Silver Nanoparticles by Using Stem Derived Callus Extract of Bitter Apple (*Citrullus Colocynthis*). *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 6(3), 1019-1024. [https://doi.org/10.1007/1019\\_Satyavani.pdf](https://doi.org/10.1007/1019_Satyavani.pdf)
- Sharifi-Rad, M., Pohl, P., Epifano, F., & Álvarez-Suarez, J.M. (2020). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Astragalus tribuloides* Delile. Root Extract: Characterization, Antioxidant, Antibacterial, and Anti-Inflammatory Activities, *Nanomaterials*, 10, 2383. <https://doi.org/10.3390/nano10122383>
- Siddiqi, K.S., & Husen, A. (2017). Recent advances in plant-mediated engineered gold nanoparticles and their application in biological system. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 40, 10-23. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.11.012>
- Singh, P., Kim, Y.J., Zhang, D., & Yang, D.C. (2016). Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 34, 7. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.02.006>
- Song, J., Wu, F., Wan, Y., & Ma, L. (2015). Colorimetric detection of melamine in pretreated milk using silver nanoparticles functionalized with sulfanilic acid. *Food Control*, 50, 356-361. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.08.049>
- Sotiriou, G.A., & Pratsinis, S.E. (2011). Engineering nanosilver as an antibacterial, biosensor and bioimaging material. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 1(1), 3-10. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2011.07.001>
- Szymanski, M.S., & Porter, R.A. (2013). Preparation and quality control of silver nanoparticle-antibody conjugate for use in electrochemical immunoassays. *Journal of Immunological Methods*, 387(1-2), 262-269. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.11.003>
- Tan, P., Li, H.S., Wang, J., & Gopinath, S.C.B. (2020). Silver nanoparticle in biosensor and bioimaging: Clinical perspectives. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, <https://doi.org/10.1002/bab.2045>
- Tian, X., Jiang, X., Welch, C., Croley, T.R., Wong, T.Y., Chen, C., ..... & Yin, J.J. (2018). Bactericidal Effects of Silver Nanoparticles on Lactobacilli and the Underlying Mechanism. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10, 8443-8450. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b17274>
- Toh, S., Jurkschat, K., & Compton, R.G. (2015). The Influence of the Capping Agent on the Oxidation of Silver Nanoparticles: Nano-impacts versus Stripping Voltammetry. *Chemistry-A European Journal*, 21, 2998-3004. <https://doi.org/10.1002/chem.201406278>
- Vanaja, M., & Annadurai, G. (2013). *Coleus aromaticus* leaf extract mediated synthesis of silver nanoparticles and its bactericidal activity. *Applied Nanoscience*, 3, 217-223. <https://doi.org/10.1007/s13204-012-0121-9>
- Vennila, K., Chitra, L., Balagurunathan, R., & Palvannan, T. (2018). Comparison of biological activities of selenium and silver nanoparticles attached with bioactive phytoconstituents: green synthesized using *Spermacoce hispida* extract. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 9, 5-15. <https://doi.org/10.1088/2043-6254/aa9f4d>
- Wakshlak, R.B.K., Pedahzur, R., & Avnir, D. (2015). Antibacterial activity of silver-killed bacteria: The "zombies" effect. *Scientific Reports*, 5, 1-5. <https://doi.org/10.1038/srep09555>
- Xia, Q.H., Ma, Y.J., & Wang, J.W. (2016). Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using *Taxus yunnanensis* Callus and Their Antibacterial Activity and Cytotoxicity in Human Cancer Cells. *Nanomaterials*, 6, 160. <https://doi.org/10.3390/nano6090160>
- Xuan, Z., Li, M., Rong, P., Wang, W., Li, Y., & Liu, D. (2016). Plasmonic ELISA based on the controlled growth of silver nanoparticles. *Nanoscale*, 39. <https://doi.org/10.1039/C6NR06079J>
- Zhang, H., & Zhang, C. (2014). Transport of silver nanoparticles capped with different stabilizers in water saturated porous media. *Journal of Materials and Environmental Science*, 5:231-236.
- Zhao, L., Yu, R.J., Ma, W., Han, H.X., Tian, H., Qian, R.C., & Long, Y.T. (2017). Sensitive detection of protein biomarkers using silver nanoparticles enhanced immunofluorescence assay. *Theranostics*, 7(4), 876-883. <https://www.thno.org/v07p0876.htm>
- Zook, J.M., Long, S.E., Cleveland, D., Geronimo, C.L.A., & MacCuspie, R.I. (2011). Measuring silver nanoparticle dissolution in complex biological and environmental matrices using UV-visible absorbance. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401, 1993. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5266-y>