

Corylus colurna L. (Türk Fındığı)'nin Yaprak Ekstraktı Kullanılarak Sentezlenen Gümüş Nanopartiküllerin Optimizasyonu ve Antifungal Aktivitesi*

Ceylan GEVREK^{1*}, Uğur YİĞİT¹, Muharrem TÜRKKAN¹

¹Ordu Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Ordu/TÜRKİYE

*Bu makale 1. yazarın Yüksek Lisans Tezi'nden üretilmiştir. Çalışma, Gülyalı Belediyesi tarafından desteklenmiş ve International Symposium on Microorganisms and The Biosphere'de sözlü özet bildiri olarak sunulmuştur.

Alınış tarihi: 31 Temmuz 2023, Kabul tarihi: 27 Eylül 2023

Sorumlu yazar: Muharrem TÜRKKAN, e-posta: muharremturkkan@gmail.com

Öz

Amaç: Bu çalışma, yüz merkezli merkezi kompozit tasarım (FCCCD)'a dayalı yanıt yüzey yöntemi (RSM) ile *Corylus colurna* yaprak ekstraktı kullanılarak mikrodalgada sentez edilen gümüş nanopartiküllerin (AgNP'lerin) üretimini optimize etmeyi, sentezlenen nanopartikülleri çeşitli spektroskopik ve mikroskopik yöntemlerle karakterize etmeyi ve bazı *Phytophthora* türleri üzerindeki antifungal etkilerini değerlendirmeyi amaçlamaktadır.

Materyal ve Yöntem: Çalışmada, yanıt yüzey yönteminin FCCCD'i, 350-420 nm spektral dalga aralığında maksimum AgNP miktarını elde etmek için üç farklı sentez değişkeni (AgNO₃ konsantrasyonu, fındık yaprak ekstraktı/AgNO₃ oranı ve reaksiyon süresi)'nin birleşik etkisini araştırmak için kullanılmıştır. Spektral eğri altındaki tahmini alan basit bir orta nokta kuralı kullanılarak Microsoft Office Excel programı yardımı ile hesaplanmıştır. Optimum koşullar altında sentezlenen fındık yaprak ekstraktı-AgNP'leri karakterize etmek için Ultraviyole Görünür (UV-Vis) Spektroskopisi, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi ve Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) kullanılmıştır. AgNP'lerin antifungal etkinliği, altı *Phytophthora* türü (*P. cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. citrophthora*, *P. nicotianae* ve *P. palmivora*)'ne karşı *in vitro* koşullarda denenmiş olup, deneme 6 tekerrürlü olarak yürütülmüştür.

Araştırma Bulguları: UV-Vis spektroskopisi, farklı koşullar altında sentezlenen AgNP'lerin tipik yüzey plazmon rezonans değerlerinin 396 ile 411 nm dalga boyu aralığında değiştiğini ortaya koymuştur. AgNO₃ konsantrasyonu, bitki yaprak ekstraktı/AgNO₃ oranı

ve reaksiyon süresi sırasıyla 5 mM, 0.1 ve 90 saniye olduğunda, araştırılan aralıkta optimum AgNP üretimi elde edilmiştir. FT-IR spektrumu, AgNP'lerin O-H, N-H, C=C, C-N ve C-O gruplarını içerdiğini ve fındık yaprak ekstraktındaki çeşitli bileşiklerin AgNP'lerin sentezinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. TEM analiz sonuçları, AgNP'lerin ortalama 17.48 nm (Gauss uyumu) büyüklüğe sahip küresel formda olduğunu ortaya koymuştur. Yeşil sentezlenen AgNP'lerin *P. cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. citrophthora*, *P. palmivora* ve *P. nicotianae*'nin misel gelişimini sırasıyla %81.67, %74.80, %73.54, %81.01, %74.50 ve %62.39'a kadar azaltmıştır. Ayrıca AgNP'lerin EC₅₀ değerlerinin 118.58-292.56 µg ml⁻¹ arasında değiştiği ve MIC değerlerinin ise 340 µg ml⁻¹'in üzerinde olduğu belirlenmiştir.

Sonuç: Bu çalışma, fındık yaprak ekstraktı ile sentezlenen AgNP'lerin, *Phytophthora* türlerinin neden olduğu hastalıkların mücadelesinde kullanılmak üzere daha fazla araştırılması gerektiğini önermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Corylus colurna*, gümüş nanopartikül, yüz merkezli merkezi kompozit tasarım, *Phytophthora*, toksisite

Optimization and Antifungal Activity of Silver Nanoparticles Synthesized Using the Leaf Extract of *Corylus colurna* L. (Turkish hazelnut)

Abstract

Objective: This study aims to optimize the production of microwave-synthesized silver

nanoparticles (AgNPs) using *Corylus colurna* leaf extracts with response surface methodology based on the face-centered central composite design (FCCCD), characterize the synthesized nanoparticles by various spectroscopic and microscopic methods, and evaluate their antifungal effects on some *Phytophthora* species.

Materials and Methods: In the study, the FCCCD of the response surface methodology was used to investigate the combined effect of three different synthesis variables (AgNO₃ concentration, hazelnut leaf extract/AgNO₃ ratio and reaction time) to achieve the maximum amount of AgNP at the spectral wavelength of 350-420 nm. The estimated area under the spectral curve was calculated with the help of Microsoft Office Excel program using a simple midpoint rule. Ultraviolet Visible (UV-Vis) Spectroscopy, Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy, and Transmission Electron Microscope (TEM) were used to characterize hazelnut leaf extract-AgNPs synthesized under optimum conditions. The antifungal activity of AgNPs was tested against six *Phytophthora* species (*P. cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. citrophthora*, *P. nicotianae* and *P. palmivora*) under *in vitro* conditions, and the experiment was carried out with 6 replications.

Results: UV-Vis spectroscopy revealed that typical surface plasmon resonance values of AgNPs synthesized under different conditions were in the wavelength range of 396 to 411 nm. Optimal AgNP production was achieved within the investigated range when the AgNO₃ concentration, plant leaf extract/AgNO₃ ratio, and reaction time were 5 mM, 0.1, and 90 seconds, respectively. FT-IR spectrum showed that AgNPs contain O-H, N-H, C=C, C-N, and C-O groups, and various compounds in hazelnut leaf extract play an important role in the synthesis of AgNPs. TEM analysis results revealed that AgNPs were in spherical form with an average size of 17.48 nm (Gaussian fit). Green synthesized AgNPs decreased mycelial growth of *P. cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. citrophthora*, *P. palmivora* and *P. nicotianae* by 81.67%, 74.80%, 73.54%, 81.01%, 74.50%, and 62.39%, respectively. In addition, it was determined that the EC₅₀ values of AgNPs varied between 118.58-292.56 µg ml⁻¹, and the MIC values were above 340 µg ml⁻¹.

Conclusion: This study suggests that AgNPs synthesized by hazelnut leaf extract should be further investigated for use in combating diseases caused by *Phytophthora* species.

Keywords: *Corylus colurna*, silver nanoparticles, face-centered central composite design, *Phytophthora*, toxicity

Giriş

Fındık, Fagales takımı Betulaceae familyası Corylaea alt familyası *Corylus* cinsi içerisinde yer alan çalı veya ağaç formundaki bitkiler olup, doğal olarak Anadolu, Balkanlar ve Kafkasya bölgesinde yayılış göstermektedir (Molnar, 2011; Botta ve ark., 2019). Filogenetik olarak 4 gruba ayrılmış olan fındığın 15 farklı türü (*C. tibetica*, *C. ferox* I. Grup; *C. colurna* ve *C. chinensis* II. Grup; *C. avellana*, *C. maxima*, *C. americana* ve *C. heterophylla* III. Grup; *C. cornuta* ve *C. sieboldiana* IV. Grup) ve alt tür (*C. avellana* var. *contorta*, *C. avellana* var. *pendula*, *C. avellana* var. *quercifolia*, *C. avellana* var. *aurea* ve *C. avellana* var. *purpurea*)'ü vardır. Günümüzde meyvecilik bakımından önemli ve ekonomik olarak en yaygın türü *C. avellana* L. (Avrupa fındığı)'dir (İslam ve ark., 2021).

C. colurna L. ise Türk ya da Bolu fındığı olarak bilinmekte ve 800-1700 m rakım arasında doğal olarak yetişmektedir. Tek dal olması ile diğer fındık türlerinden kolayca ayırt edilebilmektedir. Hem dikey hem de yatay olarak gelişen kuvvetli kazık kök yapısına sahiptir (Tosun, 2012). Nem isteği yüksek olan bu yabani tür ülkemizde özellikle Batı Karadeniz, Orta Karadeniz ve İç Anadolu'nun kuzey kesimlerinde doğal olarak yetişmektedir (Korkut ve ark., 2008; Polat ve Güney 2015; Ayan ve ark., 2016).

Türk fındığı ülkemizde yoğun olarak yetiştirilen *C. avellana*'ya anaç olarak kullanılmasının yanı sıra, odun dokusunun kırmızımtırak olması sebebiyle mobilyacılıkta ve peyzajda süs bitkisi olarak da kullanılmaktadır (Molnar, 2011). Ayrıca bu fındığın meyveleri yabani hayat için besin kaynağı olurken, kendisi de biyo-çeşitliliğe katkı sağlamaktadır (Arslan, 2005).

Bitkiler, insan ve hayvan hastalık ve zararlılarının yanı sıra çeşitli bitki hastalık ve zararlılarını kontrol etmek için de kullanılan birçok farklı biyo-aktif bileşik içeren değerli kaynaklardır (Lin ve ark., 2000; Alamri ve Moustafa, 2012). *C. colurna* yaprakları içerdiği kuersetin, mirisetin, 1-kafeoilkinik asit, 1,3-dikafeoilkinik asit, kateşin ve kaempferol gibi antioksidan ve flavonoidler nedeniyle halk hekimliğinde egzama, kızarıklık, şişlik, flebit, varis ve hemoroid tedavisinde kullanılmaktadır (Benov ve Georgiev, 1994; Riethmüller ve ark., 2016). Ayrıca Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı da

antibakteriyel etkinlik göstermektedir (Ceylan ve ark., 2013).

Nanoteknoloji, nano boyutta (1-100 nm) sentezi, nano malzemeleri ve fiziksel, kimyasal ve biyolojik sistemlerin tek tek atomlardan veya moleküllerden mikron altı boyutlara kadar değişen ölçeklerde uygulanmasını ve ayrıca ortaya çıkan nano malzemelerin daha büyük sistemlere entegrasyonunu kapsayan disiplinlerarası bir araştırma alanıdır (Bhushan, 2017). Nano boyut aralığı içerisinde, malzemelerin özellikleri makroskopik ölçekten tamamen farklı olup, nano ölçeğe yaklaştıkça malzemelerin birçok yeni ve yararlı özellikleri ortaya çıkmaktadır (Luther, 2006). Nanopartikül (NP)'ler fiziksel ve kimyasal yöntemler ile sentez edilebilmektedir (Henglein, 1989; Rodriguez-Sanchez, 2000; Bhushan, 2017). Ancak bu şekilde elde edilen sentezler toksik kimyasalların kullanılması ve çevreye olan olumsuz etkileri nedeniyle alternatif yöntemlerin geliştirilmesini gerekli kılmıştır (Lee ve ark., 2007; Iravani ve ark., 2014). Yeşil sentez (biyolojik yöntem) ile, NP'lerin eldesinde, kimyasal indirgeyici etkenlerin yerine bitki, fungus, bakteri ve liken gibi çeşitli canlı varlıklar kullanılmaktadır (Thakkar ve ark., 2010; Rai ve Yadav, 2013; Poulouse ve ark. 2014; Siddiqi ve ark., 2018). Biyolojik yöntem basit, hızlı, güvenilir, toksisite içermemesi ve çevre dostu olması nedeniyle NP sentezinde tercih edilmektedir (Bhushan, 2017). Günümüzde farklı bitkilerin ekstraktları indirgeyici ve kaplayıcı ajan olarak kullanılarak metalik NP'ler sentez edilmiş (Siddiqi ve ark., 2018) ve bunların çeşitli bitki hastalık etmenlerine karşı toksik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Mishra ve Singh, 2015). Diğer taraftan NP'lerin sentez süreci üzerine etki eden çeşitli faktörlerin araştırılması zaman alıcı ve oldukça maliyetli olup, bu değişkenlerin optimize edilmesi NP sentezi için oldukça kritik bir öneme sahiptir (Pourmortazavi ve ark., 2015). Mevcut çalışmada mikrodalga aracılığıyla *C. colurna* yaprak ekstraktlarından yeşil olarak elde edilen AgNP'lerin sentez süreci üzerine etki eden faktörlerin incelenmesinde, Yanıt Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology, RSM)'nin Yüz Merkezli Merkezi Kompozit Tasarım (Face-Centered Central Composite Design, FCCCD) modeli kullanılmıştır.

Tarımsal üretimi sınırlayan en önemli faktörlerden biri toprak kökenli fungal hastalık etmenleridir (Agrios, 2005). Bu etmenlerden *Phytophthora* sp., *Straminipila* (Chromista) alemi içerisinde yer almaktadır. *Phytophthora* cinsi tarım, orman, yem ve

süs bitkilerini enfekte eden yüzden fazla tür içermektedir (Kroon ve ark., 2012). Dünya çapında *Phytophthora* sp.'nin oluşturduğu hastalıklardan kaynaklanan ürün kayıplarının milyarlarca dolar olduğu tahmin edilmektedir (Wawra ve ark., 2012). *Phytophthora* hastalıkları ile mücadelede genelde kültürel önlem olarak ekim nöbeti, bitki artıklarının toplanması ve imhası, kullanılan alet ve ekipmanların düzenli olarak temizlenmesi ve dayanıklı çeşit kullanımı tavsiye edilmekte ve kimyasal mücadelede ise fungusitler kullanılmaktadır (Agrios, 2005). Ancak bu hastalıklarla mücadele, toprakta uzun yıllar canlılıklarını koruyabildikleri dayanıklı yapılarının olması (klamidospor, oospor vd.), hepsine karşı etkili fungusitlerin olmaması, fungusitlere karşı hızlı bir şekilde direnç kazanmaları ve kullanılan fungusitlerin maliyetlerinin yüksek olması nedeniyle oldukça zordur (Dobrowolski ve ark., 2008; Hu ve ark., 2008; Meng ve ark., 2011; Childers ve ark., 2015). Bu nedenle, günümüzde *Phytophthora*'ların neden olduğu hastalıkların mücadelesinde alternatif mücadele yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada, *C. colurna* yaprak ekstraktı kullanılarak mikrodalga fırın aracılığıyla AgNP'ler elde edilmiştir. AgNP'lerin sentez sürecine etki eden bağımsız değişkenleri optimize etmek için FCCCD kullanılmıştır. Sentez edilen AgNP'lerin 350-420 nm aralığındaki spektral alanı basit bir orta nokta kuralı kullanılarak Microsoft Office Excel programı ile hesaplanmıştır. Optimum koşullarda sentez edilen AgNP'lerin karakterizasyonu UV-Vis, FT-IR ve TEM analizleri ile yapılmıştır. Ayrıca optimum koşullarda sentez edilen AgNP'lerin antifungal etkinlikleri 6 farklı *Phytophthora* türü üzerinde *in vitro* koşullarda araştırılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Bitki materyali ve fungal kültür

Çalışmada bitki materyali olarak kullanılan *Corylus colurna* (Türk fındığı)'nın yaprak örnekleri Ordu ili Gülyalı ilçesinden toplanmıştır.

Phytophthora (*P. cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. citrophthora*, *P. nicotianae* ve *P. palmivora*) türlerine ait izolatlar Dr. İlker KURBETLİ (Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, BATEM)'den temin edilmiştir.

Fındık yaprak ekstraktının hazırlanması

Araziden toplanan fındık yaprakları üzerindeki kirliliği azaltmak için önce musluk suyu ardından saf su ile yıkandıktan sonra etüv (Ecocell LSIS-B2V/EC111, MMM Group, Almanya)'de 60°C'de

kurutmaya bırakılmıştır. 250 ml'lik beherlerin içerisine kurutulmuş yaprak örneğinden 5 gr tartılıp üzerine 100 ml saf su eklendikten sonra manyetik karıştırıcı bir ısıtıcı (MTOPS Ms300 Hsin Chu, Tayvan)'da 80°C'de 30 dk boyunca kaynatılmıştır. Oda sıcaklığında soğutulan ekstraktlar Whatman No. 1 (Merck KGaA, Almanya) filtre kağıdından geçirildikten sonra santrifüj (Hettich Mikro 220, Hettich EBA 200, Merck KGaA, Almanya) edilmiş ve kullanılıncaya kadar +4°C'de saklanmıştır.

AgNP'lerin optimizasyonu ve sentezi

Çizelge 1. Gümüş nanopartiküllerin yeşil sentezi için belirlenen bağımsız değişkenlerin sınır değerleri

Kod	Bağımsız değişkenler	Birim	Min.	Max.	Seviye		Ortalama	Std. Hata
					Düşük	Yüksek		
A	AgNO ₃ konsantrasyonu	mM	1.0	5.0	1 ↔ 1.0	1 ↔ 5.0	3.0	1.45
B	Ekstrakt/AgNO ₃ oranı	-	0.1	0.5	1 ↔ 0.1	1 ↔ 0.5	0.3	14.51
C	Reaksiyon süresi	sn	10.0	90.0	1 ↔ 10.0	1 ↔ 90.0	50.0	29.02

Çizelge 2. FCCCD kullanılarak fındık yaprak ekstraktı ile sentezlenmiş AgNP'lerin optimizasyonu için gerçekleştirilen deneme çalışmalarını gösteren tasarım matrisi

Standard order	Run	A:AgNO ₃	B:Ekstrakt/AgNO ₃ oranı	C:Reaksiyon süresi	Spektral alan (350-420 nm)
		konsantrasyonu mM	-	sn	
19	1	3	0.3	50	39.0243
20	2	3	0.3	50	37.5378
16	3	3	0.3	50	37.6153
4	4	5	0.5	10	34.3898
2	5	5	0.1	10	63.1126
9	6	1	0.3	50	12.6959
11	7	3	0.1	50	48.3042
3	8	1	0.5	10	8.94065
15	9	3	0.3	50	39.8173
8	10	5	0.5	90	64.2034
18	11	3	0.3	50	38.8073
5	12	1	0.1	90	21.8492
17	13	3	0.3	50	36.4928
13	14	3	0.3	10	29.1441
6	15	5	0.1	90	115.243
7	16	1	0.5	90	16.2441
12	17	3	0.5	50	26.6554
10	18	5	0.3	50	68.3551
14	19	3	0.3	90	54.4729
1	20	1	0.1	10	13.3628

Regresyon analizlerinde 2. dereceden

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

polynomial eşitliği kullanılmıştır. Eşitlikte y, spektral alanı; x bağımsız değişkenleri ve β ise regresyon katsayılarını ifade etmektedir.

AgNP'lerin yaklaşık 5-50 nm boyutlarında kantitatif varlığını temsil eden 350-420 nm aralığındaki spektral eğrinin tahmini alanı bir orta nokta kural formülü $y = \sum_{i=1}^n (a_i + a_{i+1}) / 2 * (d_i + d_{i+1})$

AgNP'lerin optimizasyonu Design Expert (versiyon 13, Stat-Ease, Inc., USA) programı kullanılarak Yüz Merkezli Merkezli Kompozit Tasarım (FCCCD) ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada AgNO₃ konsantrasyonu, bitki yaprak ekstraktı/AgNO₃ konsantrasyonuna oranı ve reaksiyon süresi olmak üzere üç bağımsız değişken optimize edilmiştir (Çizelge 1). FCCCD için her bir bağımsız değişkenin 3 farklı seviyesi kullanılarak 6'sı merkezde olmak üzere toplam 20 deneme gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2).

kullanılarak Microsoft Office Excel programı yardımıyla hesaplanmıştır (Chowdhury ve ark., 2016). Formülde y, spektral alan'ı; a, absorbans değerini ve dalga boyunu ifade etmektedir.

Veriler FCCCD'de yerine konduktan sonra elde edilen sonuçların değerlendirilmesi için matematiksel modelleme oluşturulmuştur. Programın yanıt için önerdiği kwadratik model belirlenirken R² değerleri değerlendirilmiştir. Sonra önerilen fonksiyonların hangisinin daha iyi bir deneysel tasarım modellediği ANOVA tablosu kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca en

iyi modelleme yapan fonksiyon belirlenirken; model (önemli), lack of fit (uyum eksikliği) (önemsiz), model terimleri [(Prob>F) <0.05], $R^2(\sim 1)$, ayarlanmış $R^2(\sim 1)$, öngörülen $R^2(\sim 1)$, ayarlanmış $R^2 \sim$ öngörülen R^2 , varyasyon katsayısı (coefficient of variation C.V, %; minimum) kriterlerinin tamamını en iyi şekilde karşılayacak fonksiyon seçilmiştir. Deneysel tasarımı modelleyen en iyi fonksiyon belirlendikten sonra, program tarafından RSM iki boyutlu ve üç boyutlu grafikleri oluşturulmuştur.

AgNP'lerin eldesi için, $AgNO_3$ (1, 3 ve 5 mM) çözeltisine bitki yaprak ekstraktı/ $AgNO_3$ konsantrasyonu farklı oranlarda (0.1, 0.3 ve 0.5) eklendikten sonra solüsyonun nihai pH'ı 0.1 M NaOH ile 10'a ayarlanmıştır. Takiben 800 watt güçteki mikrodalga fırında 10, 50 ve 90 saniye süresince AgNP sentez işlemi gerçekleştirilmiştir. Ag^{+1} iyonlarının indirgenme süreci, reaksiyon koşullarına bağlı olarak rengin açık sarıdan koyu kahverengiye değişmesiyle gözlenmiştir. Sentezlenen AgNP'ler 10000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra saf su ile yıkanıp, kurutulmuş ve 4°C'de saklanmıştır.

Optimum koşullarda üretilen AgNP'lerin karakterizasyonu

Fındık yaprak ekstraktı ile sentez edilen AgNP'lerin absorpsiyon spektrumları 200-1100 nm dalga boyu aralığında tarama (1 nm) yapan UV-Vis spektrofotometre (PerkinElmer Lambda 35, ABD) ile belirlenmiştir. AgNP solüsyonları mikropipet yardımıyla quartz küvetlere alınıp, saf su ile seyreltikten sonra, 200-700 nm aralığındaki spektrumları kaydedilmiştir.

Fındık yaprak ekstraktı ve optimize edilmiş AgNP'lerin yapılarındaki farklı fonksiyonel gruplar hakkında bilgi edinmek için FT-IR spektroskopisi (PerkinElmer Spektrum 65, ABD) kullanılmıştır. Analiz için, bitki yaprak ekstraktının ve AgNP'lerin 1 mg'leri 200 mg KBr ile karıştırıldıktan sonra bir pelet halinde preslenerek örneklerin FT-IR spektrumları geçirgenlik modunda 4000-400 cm^{-1} dalga boyu aralığında tespit edilmiştir.

Optimize edilmiş AgNP'lerin morfolojik özellikleri TEM (Hitachi HT7700, Hitachi Ltd., Japonya) ile ortaya konmuştur. Elde edilen NP'lerin görüntüleri ImageJ (versiyon 1.53i, National Institutes of Health, USA) programı ile işlendikten sonra ortalama partikül büyüklüğü OriginPro (2019b versiyon 9.6.5.169, OriginLab Corporation, USA) programının Gauss fonksiyonu kullanılarak belirlenmiştir.

AgNP'lerin antifungal etkinliklerinin belirlenmesi

Optimize edilmiş AgNP'lerin antifungal aktivitesi 6 *Phytophthora* (*P. cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. citrophthora*, *P. nicotianae* ve *P. palmivora*) türüne ait izolatlara karşı *in vitro* koşullarda Türkkan (2013)'a göre belirlenmiştir.

Sentezlenen AgNP'lerin farklı konsantrasyonları (42.5, 85, 127.5, 212.5, 255, 297.5 ve 340 $\mu g ml^{-1}$) otoklavda sterilize edilmiş ve 50°C'ye soğutulmuş 60 ml'lik V8 agar ortamına eklenmiştir. AgNP'ler manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak homojen bir şekilde tüm besin ortamına karışması sağlandıktan sonra 6 cm çapındaki petri kaplarına 10 ml olacak şekilde paylaştırılmıştır. Bu petri kapları, daha önceden besin ortamlarında geliştirilmiş olan 7 günlük fungus kültürlerinden mantar delici ile alınan 5 mm çaplı misel diskler ile inokule edilmiştir. Aynı koşullarda inkübe edilen kontrol grubu (sadece V8 agar) petri kaplarındaki fungusların gelişmeleri günlük olarak izlenerek petriyi kaplamaya yakın olduğunda, kontrol ve AgNP'lerin farklı dozlarını içeren petri kaplarındaki fungusların gelişimleri ortogonal olarak dijital kumpas (TorQ 150 mm Digital Caliper, Çin) ile ölçülmüştür. Miselyal gelişiminin engellenmesi aşağıdaki formül kullanılarak % engelleme olarak hesaplanmıştır. Deneme her AgNP konsantrasyonu için 6 tekerrürlü olarak yürütülmüştür.

Miselyal gelişiminin engellemesi (%) = [(kontrol petri kaplarındaki fungal gelişme-AgNP eklenmiş petri kaplarındaki fungal gelişme) / kontrol petri kaplarındaki fungal gelişme] * 100

Fungusların miselyal gelişimlerini %50 oranında azaltan konsantrasyon (EC_{50} =etkili konsantrasyon)'u hesaplamak için probit analizi (IBM SPSS İstatistik Programı, versiyon 2019, New York, ABD) kullanılmıştır. Misel büyümesini tamamen engelleyen minimum engelleyici konsantrasyon (MIC) değeri ise paralel denemelerle belirlenmiştir (Türkkan, 2013).

Bulgular ve Tartışma

Fındık yaprak ekstraktı ile AgNP'lerin mikrodalga fırın aracılığı ile yeşil sentezi

Mevcut çalışmada, $AgNO_3$ çözeltisindeki Ag^{+1} iyonlarının Ag^0 iyonlarına indirgenmesine aracılılık ederek yeşil olarak AgNP eldesinde *C. colurna* yaprak ekstraktı kullanılmıştır. Türk fındık yapraklarının biyolojik olarak aktif çok sayıda bileşik içerdiği bazı araştırmacılar tarafından daha önce rapor edilmiştir (Benov ve Georgiev, 1994; Riethmüller ve ark., 2016).

AgNP'lerin optimizasyonu

Deney tasarımında, RSM kullanılarak fındık yaprak ekstraktı ile sentez edilen AgNP'lerin 5-50 nm boyutlarındaki üretiminin maksimize edilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla bir RSM modeli FCCCD ile bağımsız değişken olarak belirlenen parametreler (AgNO₃ konsantrasyonu, fındık yaprak ekstraktı/AgNO₃ konsantrasyon oranı, reaksiyon süresi)'in bağımlı değişken yani 350-420 nm spektral bölgesi altında kalan alan üzerine etkileri değerlendirmek üzere 20 deneme yürütülmüştür. AgNP sentezinin optimal üretim değerlerinin belirlenmesinde bağımsız değişkenler ile yanıt arasındaki ilişkiyi ifade eden kuadratik model eşitlik 1'de verilmiştir.

$$Y = +1.92882 + 1.60255A + 1.73947B - 0.000917C - 1.09161AB + 0.004500AC - 0.009701BC - 0.067423A^2 - 3.21525B^2 + 0.000128C^2 \quad (1)$$

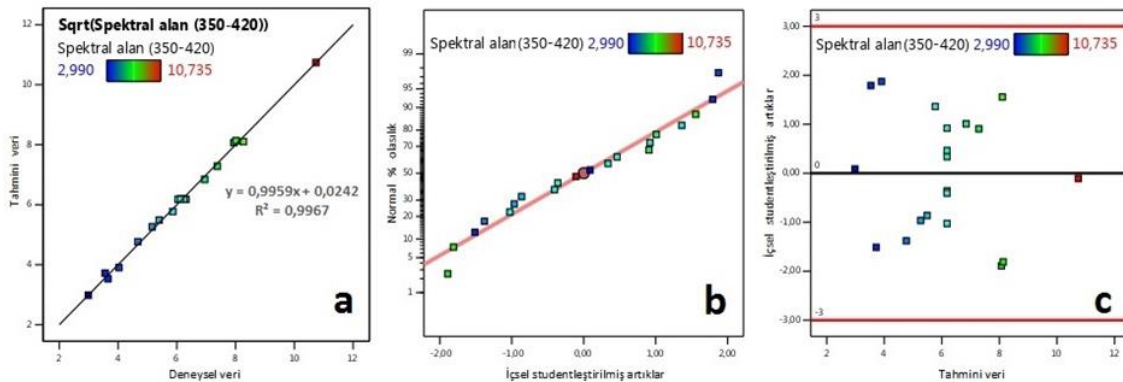
Çalışmada, yanıtlar içerisindeki maksimum (115.243) ve minimum (8.94065) oranı 12.89 olup, bu değer

Çizelge 3. FCCCD modeline ait ANOVA verileri

	Kareler Toplamı	df	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri	
Model	65.3	9	7.26	334.58	< 0.0001	önemli
A-AgNO ₃ konsantrasyonu (mM)	48.01	1	48.01	2213.89	< 0.0001	
B-Ekstrakt/AgNO ₃ oranı	6.24	1	6.24	287.74	< 0.0001	
C-Reaksiyon süresi (sn.)	8.06	1	8.06	371.9	< 0.0001	
AB	1.53	1	1.53	70.34	< 0.0001	
AC	1.04	1	1.04	47.82	< 0.0001	
BC	0.0482	1	0.0482	2.22	0.1669	
A ²	0.2	1	0.2	9.22	0.0125	
B ²	0.0455	1	0.0455	2.1	0.1781	
C ²	0.1149	1	0.1149	5.3	0.0441	
Residual	0.2168	10	0.0217			
Lack of Fit	0.1686	5	0.0337	3.5	0.0978	önemsiz
Pure Error	0.0482	5	0.0096			
Cor Total	65.51	19				
R²	0.9967					
Ayarlanmış R²	0.9937					
Tahminlenen R²	0.9659					

10'dan büyük olduğu için verilerin dönüşümü gerekmektedir. Bu nedenle, istatistiksel analizden önce, kare kök transformasyonu kullanılarak yanıtlar normal dağılıma uyacak şekilde dönüştürülmüştür.

Çizelge 3'te verilen kuadratik modele ait F değerinin yüksek ve p değerinin ise P<0.0001'den küçük olması modelin tahmin etme yeteneğinin güçlü olduğunu göstermektedir. Model terimlerinden A (AgNO₃), B (ekstrakt/AgNO₃ konsantrasyonu oranı), C (reaksiyon süresi), AB, AC ve A² ve C²'nin önemli olduğu görülmektedir (P<0.05). Ayrıca uyum eksikliği değeri 0.0978 olup, önemsizdir. Bu değerler bize modelin tahminleme gücünün yüksek olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda regresyon değeri (R² = 0.9967) hem gözlenen hem de tahmin edilen verilerin %99.67'sinin bu model kullanılarak açıklanabileceği anlamına gelmektedir (Şekil 1a). Ayrıca modele ait hem ayarlanmış R² değeri (0.9937) hem de tahminlenen R² değeri (0.9659) oldukça yüksektir.

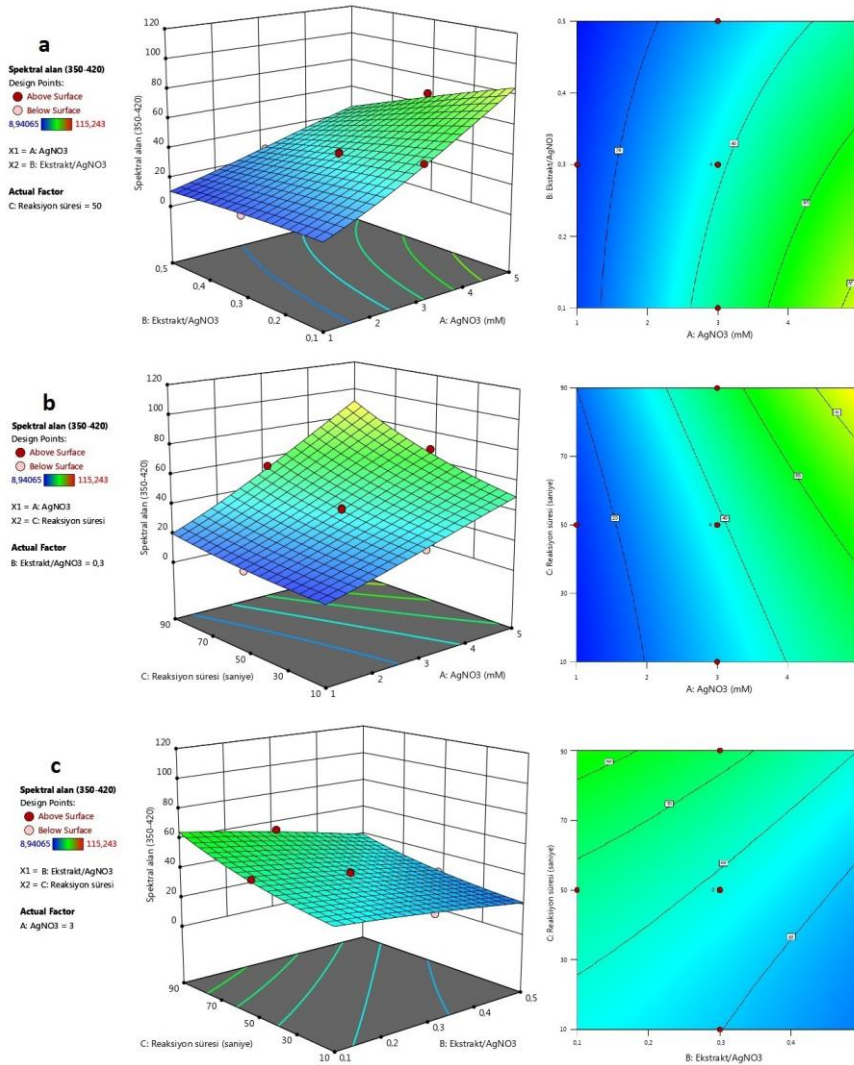


Şekil 1. FCCCD kullanılarak sentez edilmiş fındık yaprak ekstraktı-AgNP'lerin tanımlayıcı grafikleri: (a) tahmini ve deneysel verilerin dağılımı (R² denklemi), (b) Normallik, (c) artıkların dağılım

Önceki bir çalışmada R^2 değerinin 1'e yakın olmasının istatistiksel modelin uygun olduğunun bir göstergesi olduğunu rapor etmiştir (Reddy ve ark., 2008). Tüm bu sonuçlar bize deneysel ve tahmini sonuçlar arasındaki uyumun oldukça iyi olduğunu göstermektedir. Geliştirilen modelde artıklar, tahmin edilen ve gerçek değerler arasında rastgele bir dağılıma sahip olup, bu durum tüm artık değerlerin büyük sapmalar olmaksızın düz bir çizgi boyunca dağıldığını gösterir ve hata dağılımının normalliğini doğrulamaktadır (Şekil 1b). Ayrıca, Şekil 1c'de artıkların sıfır çizgisinin her iki tarafında rastgele dağıldığını ve kabul edilebilir sınırlar içinde olduğunu gösterilmektedir. Mondal ve Purkait (2017) tahmin edilen ve gerçek değerler arasındaki artıkların $\pm\%3$

aralığında olması gerektiğini belirterek kurulan modelin yeterli olduğunu göstermektedir.

Çalışmada AgNP üretimi üzerine etki eden değişkenler ve onların karşılıklı etkileri arasındaki ilişkiyi göstermek için 3D ve 2D kontur grafikleri kullanılmıştır. AgNO_3 konsantrasyonu ve fındık yaprak ekstrakt/ AgNO_3 konsantrasyon oranı arasındaki ilişki Şekil 2'de verilmiştir. Bu grafiğe göre AgNO_3 konsantrasyonu arttıkça sentez edilen AgNP üretiminin (350-420 nm aralığında) alanı da artmaktadır (Şekil 2a). Halbuki ekstrakt/ AgNO_3 konsantrasyon miktarının artışı bu durum paralelinde gerçekleşmemektedir. Dolayısıyla AgNO_3 konsantrasyonu 5 mM ve ekstrakt/ AgNO_3 konsantrasyon oranı 0.1 olduğunda AgNP üretim alanı maksimum olmaktadır.



Şekil 2. AgNP'lerin sentezini etkileyen bağımsız değişkenlerin birleşik etkilerini gösteren 3D ve 2D kontur grafikler: (a) AgNO_3 konsantrasyonu ve fındık yaprak ekstrakt/ AgNO_3 konsantrasyonu oranı, (b) AgNO_3 konsantrasyonu ve reaksiyon süresi ve (c) fındık yaprak ekstrakt/ AgNO_3 konsantrasyonu oranı ve reaksiyon süresi

Diğer taraftan AgNO_3 konsantrasyonuna paralel olarak reaksiyon süresi de arttıkça spektral alan yani AgNP üretim miktarı büyümektedir (Şekil 2b). Aksine reaksiyon süresine paralel olarak ekstrakt/ AgNO_3 konsantrasyon oranı arttıkça AgNP üretimi artmamakta, tersine azalış göstermektedir (Şekil 2c). Bu bulgular Cai ve ark. (2017)'in sonuçları ile uyumlu olup, mikrodalga fırın güç ve sentez süresini ayarlayarak 700-850 watt/dk 100 ml'lik solüsyonda yüksek kalitede AgNP üretiminin gerçekleştiği belirlenmiştir. Dahası daha düşük güç durumlarında gümüş iyonlarının tamamen indirgenemeyeceğini ve bununda daha düşük AgNP üretimi ile sonuçlandığını belirtmişlerdir. Saleeb ve ark. (2020) AgNO_3 konsantrasyonunun ve sentez süresinin SPR üzerindeki etkilerinin benzer olduğunu ve her ikisinin de artışına paralel olarak AgNP kalitesinin arttığını tespit etmişlerdir. Diğer taraftan Eshghi ve ark. (2021), 800 watt güç ve 180 sn reaksiyon süresine ayarlanmış mikrodalga fırın aracılığı ile AgNP sentezi için, 0.9 ml *C. avellana* yaprak ekstraktı ve 1 mM AgNO_3 çözeltisini içeren 25 ml solüsyonun optimum olduğunu ortaya koymuşlardır.

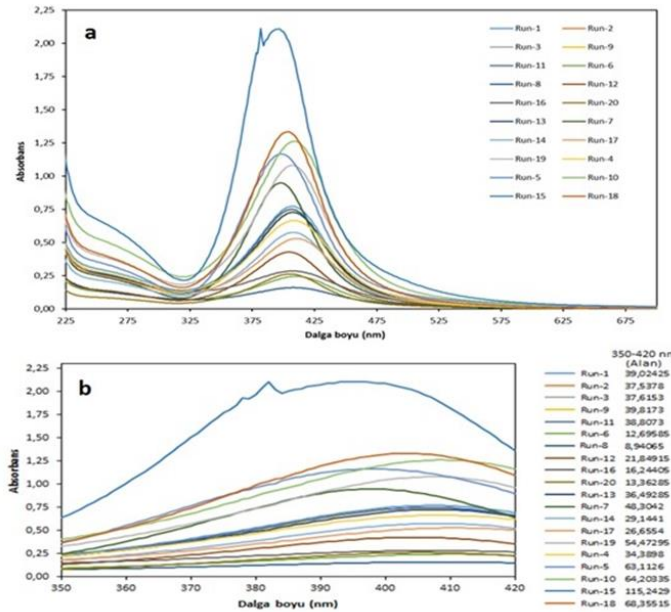
Optimum noktanın belirlenmesi ve geçerliliği

Optimizasyon çalışması sonucunda istenilirlik derecesi 1 olan tek bir koşul belirlenmiştir. Bu koşul 5 mM AgNO_3 konsantrasyonu, fındık yaprak ekstraktı/ AgNO_3 konsantrasyon oranı 0.1 ve 90 saniye reaksiyon süresi olarak belirlenmiştir. Optimum koşullarda 5 tekrarlı sentez

gerçekleştirilmiş olup, sentezler sonucunda model 115.417 spektral alan değeri tahminlerken, deneysel ortalama spektral alan sadece %3.1639 bir hata değeri ile 115.899 olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla bu hata değeri Design Expert yazılımının standart değeri (%20)'nden çok daha düşük olduğu için model parametre optimizasyonu için yeterli olduğu gösterilmiştir.

UV-Vis spektrum analizi

Sentez sonrası AgNP varlığı UV-Vis spektrum ölçümleri ile tespit edilmiştir. Fındık yaprak ekstraktı kullanılarak AgNP sentez işlemi tamamlandığında, NP'ler açık ve koyu kahverengi renk değişimi ile makroskobik olarak sentezlenen üründe gözlemlenmiş ve bunlara ait tipik yüzey plazmon rezonans (SPR) değerlerinin 396-411 nm aralığında olduğu belirlenmiştir. AgNP sentezinin göstergesi için spektral zirve aralığının 400-480 nm (Sreeram ve ark., 2008) arasında olduğu ve 350-420 nm aralığında AgNP büyüklüğünün yaklaşık 5-50 nm büyüklükte olduğu bildirilmiştir (Gurunathan ve ark., 2009; Noroozi ve ark., 2012). Çalışmada, farklı AgNO_3 (1, 3 ve 5mM) konsantrasyonları ve bitki yaprak ekstraktının farklı oranları (%0.1, 0.3 ve 0.5) ile 10, 50 ve 90 sn reaksiyon sürelerinde 800 watt güçte sentez edilen 20 farklı denemenin UV-Vis spektralleri ve bunlara ilişkin olarak 350-420 nm dalga boyu aralığındaki spektral alanlarına ait trapezoidal hesaplamalar gösterilmiştir (Şekil 3a, b).

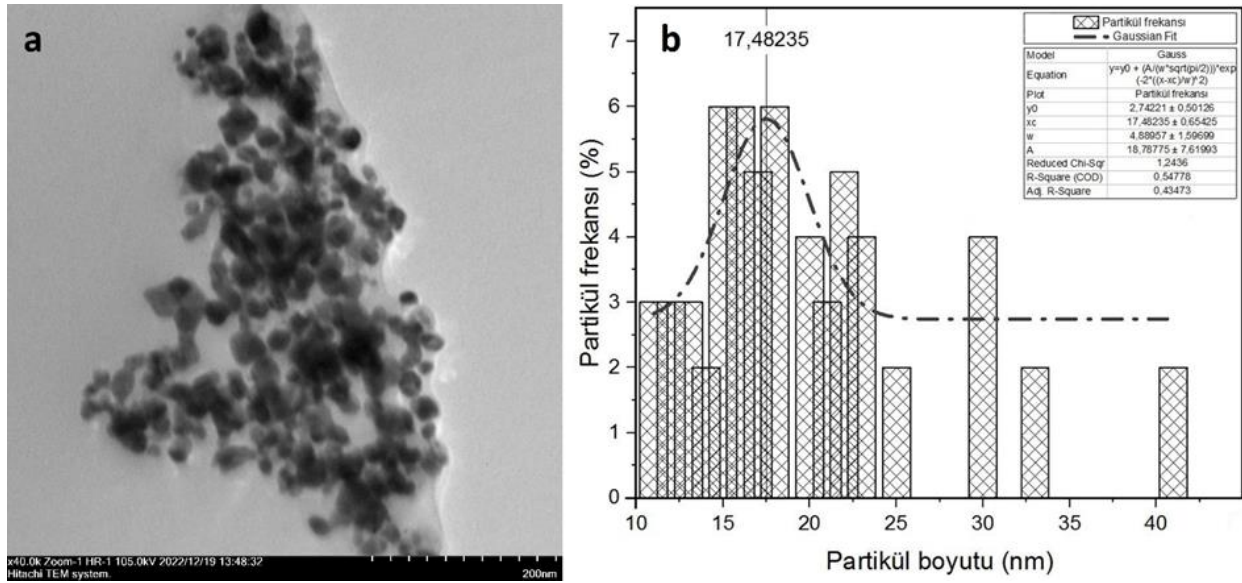


Şekil 3. FCCCD kullanılarak fındık yaprak ekstraktı ile sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis spektrası: (a) NP'lerin 225-700 nm aralığındaki UV-Vis spektrası ve (b) NP'lerin 350-420 nm aralığındaki spektral alanları

İletimli elektron mikroskop (TEM) analizi

TEM analizi, optimum koşullarda sentez edilen fındık yaprak ekstraktı-AgNP'lerin küresel formda ve ortalama büyüklüğünün 17.48 nm (partikül boyutu dağılımının Gauss uyumu) (11-41 nm, n=60) olduğunu göstermiştir (Şekil 4a, b). Önceki çalışmaların sonuçları çalışmamız paralelinde olup, farklı bitkilerin ekstraktları kullanılarak sentez edilen AgNP'lerin boyutlarının küçük ve şekillerinin küresel olduğu rapor edilmiştir. Örneğin yalancı tesbih ağacı (*Azadirachta indica*) bitkisinin indirgeyici ajan olarak kullanıldığı bir çalışmada, sentez oda sıcaklığında gerçekleştirilmiş ve TEM sonuçlarına göre elde edilen

ürünün şeklinin yuvarlak ve partikül çapının 34 nm olduğu belirlenmiştir (Ahmed ve ark., 2016). Diğer taraftan dağ düğüm otu (*Aerva lanata*) bitkisinin yaprak ekstraktı kullanılarak mikro dalga aracılığıyla sentez edilen altın (Au) ve gümüş (Ag) nanopartiküllerin sırasıyla 18.62 nm ve 17.97 nm boyutlarında olduğu tespit edilmiştir (Joseph ve Mathew, 2015). Başka bir çalışmada ise, Ali ve ark. (2015) mikrodalga fırın aracılığıyla sentez ettikleri ökaliptus (*Eucalyptus globulus*)-AgNP'lerin oluşum hızlarını ve boyutlarını geleneksel ısıtma ile kıyaslandıklarında, mikrodalga fırının reaksiyon hızını 20 kat arttırdığı ve NP boyutunu da yaklaşık 2.5-6 kat küçülttüğünü belirlemişlerdir.

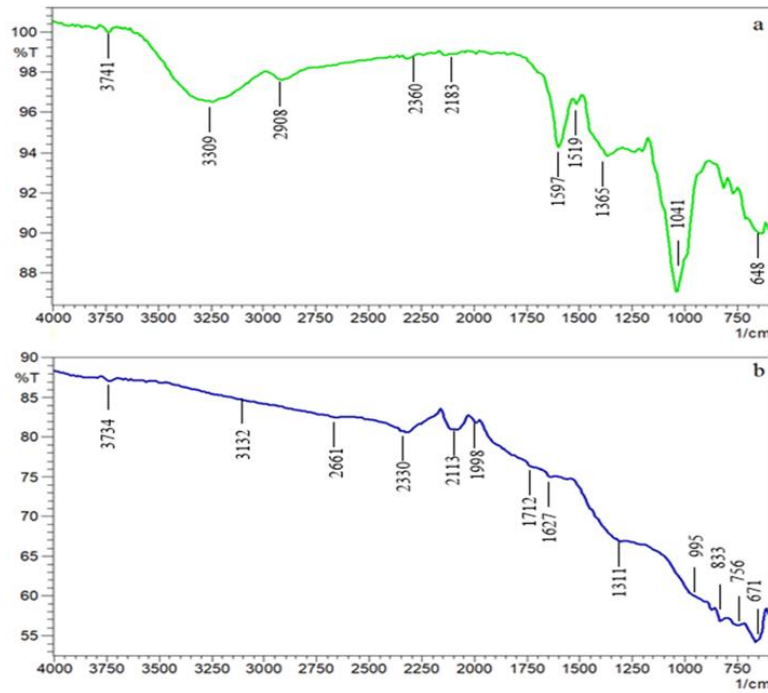


Şekil 4. Fındık yaprak ekstraktı-AgNP'lerin TEM görüntüsü (a) ve partikül boyutu dağılım histogramı (b)

Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi

Fındık yaprak ekstraktı ile optimum koşullarda sentez edilen AgNP'lerin fonksiyonel grupları FT-IR analizleri ile belirlenmiştir. Sentez edilen AgNP'lerin sentez ve stabilizasyonunda rol oynayan bitki ekstraktının sahip olduğu çeşitli fitokimyasalların rolü değerlendirilmiştir. Fındık yaprak ekstraktı ve AgNP'lerin FT-IR spektrumu Şekil 5'te verilmiştir. Bitki yaprak ekstraktının FT-IR spektrumunda 10 majör pik belirlenmiş olup, bunlar 3741 ve 3309 cm^{-1} O-H, alkol ve fenol grupları, 2908 cm^{-1} (C-H VE CH_2 ; alifatik hidrokarbonlar), 2360 cm^{-1} ($\text{O}\equiv\text{C}\equiv\text{O}$ gerilimi), 2183 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{C}$ gerilimi, alkin), 1597 cm^{-1} ($\text{C}\equiv\text{C}$), 1519 cm^{-1} (N-O), 1315 cm^{-1} (C-O ester grup), 1041 cm^{-1} (O-H deformasyonu) ve 648 cm^{-1} (C-C)'dir (Şekil 5a) FT-IR spektroskopisinde fındık yaprak ekstraktında

yer alan fonksiyonel grupların alkol, fenol, amin, karbonil ve ester gibi karakteristik özelliklerin absorpsiyon bantlarını göstermektedir (Wacławek ve ark., 2018; Doğanıyigit ve ark., 2019; Yiğit ve Türkkan, 2023). Flavonoid ve fenolik bileşikler muhtemelen π -elektron etkileşimi vasıtasıyla AgNP'lerin yüzeyine absorbe edebilir (Konvickova ve ark., 2018). Dolayısıyla fındık yaprak ekstraktındaki karbonil ve hidroksil gruplarının gümüş iyonlarının indirgenerek AgNP sentezinde rol oynayabilirler. Sentez edilen AgNP'lerin FT-IR spektrumunda 3734-671 cm^{-1} aralığında O-H, N-H, C=C, C-N ve C-O gruplarından kaynaklanan farklı pikler gözlenmiştir (Şekil 5b). Çalışmamıza benzer olarak Eshghi ve ark. (2021) AgNP sentezi için kullandıkları *C. avellana* ekstraktında indirgeyici aktiviteye sahip iki hidroksil ve karboksilik asit fonksiyonel grubunun mevcut olduğunu FT-IR analizleri ile ortaya koymuşlardır.



Şekil 5. Fındık yaprak ekstraktı (a) ve fındık yaprak ekstraktı-AgNP'lerin (b) FT-IR spektrumları

Antifungal aktivite

Fındık yaprak ekstraktı kullanılarak yeşil sentez yoluyla optimum koşullarda elde edilen AgNP'lerin antimikrobiyal aktiviteleri 6 farklı *Phytophthora* türüne karşı denenmiştir. Çalışmada kullanılan en yüksek konsantrasyonda ($340 \mu\text{g ml}^{-1}$) AgNP'ler *P. cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. citrophthora*, *P. nicotianae* ve *P. palmivora*'nın misel gelişimini sırasıyla %81.67, %74.80, %73.54, %81.01, %62.39

ve %74.50 oranında engellemiştir. Tüm *Phytophthora* türleri için AgNP'lerin EC_{50} değerleri $118.58-292.56 \mu\text{g ml}^{-1}$ arasında değişmiştir (Çizelge 4). Çalışmada hiçbir *Phytophthora* türü için denemede test edilen en yüksek konsantrasyonda tam engelleme gerçekleşmediği için MIC değeri $>340 \mu\text{g ml}^{-1}$ olarak tespit edilmiştir. Daha önceki bazı çalışmalarda, farklı bitki ekstraktları ile sentez edilen AgNP'lerin çeşitli fitopatogenik funguslara karşı güçlü antifungal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir.

Çizelge 4. Fındık yaprak ekstraktı-AgNP'lerin bazı *Phytophthora* türlerine karşı toksisiteleri

Fungi	EC_{50}^a ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	MIC ^b ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
<i>P. cactorum</i>	124.97 (115.77-134.12)	>340
<i>P. capsici</i>	215.01 (194.04-240.78)	>340
<i>P. cinnamomi</i>	118.58 (104.97-131.94)	>340
<i>P. citrophthora</i>	135.77 (123.55-148.21)	>340
<i>P. nicotianae</i>	118.68 (107.58-129.59)	>340
<i>P. palmivora</i>	292.56 (280.36-307.62)	>340

^aEtkili konsantrasyon (%50)

^bMinimum engelleyici konsantrasyon

Krishnaraj ve ark. (2012), *Botrytis cinerea*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* ve *Sclerotinia sclerotiorum* gibi bazı sklerotlu fungusların misel büyümesinin, $1500 \mu\text{g ml}^{-1}$ konsantrasyonundaki *A. indica*-AgNP'ler tarafından büyük ölçüde engellendiğini bildirmiştir. Al-Zahrani ve Al-Garni (2019), pırasa (*Allium ampeloprasum*) kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin MIC değerlerinin farklı *Aspergillus* türleri için 652 ile $2500 \mu\text{g ml}^{-1}$

arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Pelin otu (*Artemisia absinthium*) kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin ise *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. infestans*, *P. katsurae*, *P. palmivora*, *P. parasitica* ve *P. tropicalis* gibi farklı *Phytophthora* türlerine karşı $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ 'den çok daha düşük MIC değerine sahip olduğu gözlenmiştir (Ali ve ark., 2015). Ancak bu farklılıklar, AgNP'lerin sentezine aracılık eden bitkilerin biyokimyasal içeriklerinden ve hedef organizmalardaki farklılıktan kaynaklanmış olabilir.

AgNP'lerin toksisitesinin çok küçük yapıları, şekilleri ve formları ile ilgili olduğu ve AgNP'lerin mikrobiyal hücreye girdikten sonra hücre organellerinin normal fonksiyonlarını bozarak etki ettiği varsayılmaktadır (Buzea ve ark., 2007).

Sonuçlar

Yapmış olduğumuz çalışma kapsamında mikrodalga fırın vasıtasıyla *C. colurna* yaprak ekstraktı ile mikrodalga fırında 90 sn gibi kısa bir sürede Ag⁺ iyonlarının Ag⁰ iyonlarına indirgenmesi sağlanarak nano boyutta gümüş sentezi gerçekleştirilmiştir. AgNP sentezi için belirlenen bağımsız değişkenler (AgNO₃ konsantrasyonu, fındık yaprak ekstraktı/AgNO₃ konsantrasyon oranı, reaksiyon süresi) optimize edilmiş olup, optimum koşullarda sentez gerçekleştirilerek elde edilen *C. colurna* yaprak ekstraktı-AgNP'lerin karakterizasyonu UV-Vis, FT-IR ve TEM analizleri kullanılarak yapılmıştır. Karakterize edilmiş AgNP'lerin antifungal aktivitesi incelenmiş ve *P. cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi*, *P. citrophthora*, *P. palmivora* ve *P. nicotianae* türlerine karşı toksik aktivite sergilediği belirlenmiştir. Tüm *Phytophthora* türleri için AgNP'lerin EC₅₀ değerleri 118.58-292.56 µg ml⁻¹ arasında değişmektedir. Ayrıca MIC değerinin ise >340 µg ml⁻¹'in üzerinde olduğu bulunmuştur.

Çıkar çatışması

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Yazarların katkı beyanı

CG: Denemelerin kurulması ve yürütülmesi, laboratuvar analizlerinin yapılması ve makalenin yazılmasında katkıda bulunmuştur.

UY: Denemelerin kurulması ve yürütülmesi, laboratuvar analizlerinin yapılması ve makalenin yazılmasında katkıda bulunmuştur.

MT: Araştırmanın planlanması, denemelerin kurulması ve yürütülmesi, analizlerin yapılması, verilerin istatistiksel-grafiksel yorumları ve makalenin yazımı aşamalarında katkıda bulunmuştur.

Kaynaklar

Agrios, G.N. (2005). *Plant pathology* (5nd ed.). Burlington, USA. Elsevier academic press.

Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B. L., & Ikram, S., (2016). Green synthesis of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* aqueous leaf extract. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(1), 1-7.

Alamri, S.A., & Moustafa, M.F. (2012). Antimicrobial properties of 3 medicinal plants from Saudi Arabia against some clinical isolates of bacteria. *Saudi Medical Journal*, 33(3), 272-277.

Ali, K., Ahmed, B., Dwivedi, S., Saquib, Q., Al-Khedhairi, A. A., & Musarrat, J. (2015). Microwave accelerated green synthesis of stable silver nanoparticles with *Eucalyptus globulus* leaf extract and their antibacterial and antibiofilm activity on clinical isolates. *PLoS One*, 10(7), 1-20.

Al-Zahrani, S.S., & Al-Garni, S.M. (2019). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Allium ampeloprasum* leaves extract and its antifungal activity. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 10(1), 11.

Arslan, M. (2005). Batı Karadeniz Bölgesindeki Türk fındığı (*Corylus colurna* L.) populasyonlarının ekolojik ve silvikültürel yönden incelenmesi. Bolu, Türkiye.

Ayan, S., Ünal, E., Yer, E.N., Sakıcı, O.E., & İslam, A. 2016. Population diversity in Northwest Anatolia Forests in terms of nut characteristics of Turkish hazelnut (*Corylus colurna* L.) (Kastamonu province), *International Multidisciplinary Congress of Euroasia*, Odesa, Ukraine.

Benov, L., & Georgiev, N. (1994). The antioxidant activity of flavonoids isolated from *Corylus colurna*. *Phytotherapy Research*, 8(2), 92-94.

Bhushan, B. (Ed.). (2017). *Introduction to nanotechnology*. In Springer handbook of nanotechnology. Berlin: Springer.

Botta, R., Molnar, T. J., Erdogan, V., Valentini, N., Torello Marinoni, D., & Mehlenbacher, S. A. (2019). Hazelnut (*Corylus* spp.) breeding. *Advances in Plant Breeding Strategies: Nut and Beverage Crops*, 4, 157-219.

Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), 17-71.

Cai, Y., Piao, X., Gao, W., Zhang, Z., Nie, E., & Sun, Z. (2017). Large-scale and facile synthesis of silver nanoparticles via a microwave method for a

- conductive pen. *The Royal Society of Chemistry advances*, 7(54), 34041-34048.
- Ceylan, O., Sahin, M. D., & Avaz, S. (2013). Antibacterial Activity of *Corylus colurna* L. (Betulacea) and *Prunus divaricata* Ledep. subsp. *divaricata* (Rosaceae) from Usak, Turkey. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 19, 1204-1207.
- Childers, R., Danies, G., Myers, K., Fei, Z., Small, I.M., & Fry, W. E. (2015). Acquired resistance to mefenoxam in sensitive isolates of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 105(3), 342-349.
- Chowdhury, S., Yusof, F., Faruck, M.O., & Sulaiman, N. (2016). Process optimization of silver nanoparticle synthesis using response surface methodology. *Procedia Engineering*, 148, 992- 999.
- Dobrowolski, M. P., Shearer, B.L., Colquhoun, I.J., O'Brien, P. A., & Hardy, G.S. (2008). Selection for decreased sensitivity to phosphite in *Phytophthora cinnamomi* with prolonged use of fungicide. *Plant pathology*, 57(5), 928-936.
- Doğanyığıt, Z., Küp, F.Ö., Kaymak, E., Aslı, O., Burçin, O., & Akin, A.T. (2019). Gümüş nanopartiküllerin üzüm çekirdeği ekstraktının endotoksik kalp dokusundaki histolojik değişikliklere ve tnf ve bnp ekspresyonuna etkisi. *Bozok Tıp Dergisi*, 9(3), 87-96.
- Eshghi, M., Kamali-Shojaei, A., Vaghari, H., Najian, Y., Mohebian, Z., Ahmadi, O., & Jafarizadeh-Malmiri, H. (2021). *Corylus avellana* leaf extract-mediated green synthesis of antifungal silver nanoparticles using microwave irradiation and assessment of their properties. *Green Processing and Synthesis*, 10(1), 606-613.
- Gurunathan, S., Kalishwaralal, K., Vaidyanathan, R., Venkataraman, D., Pandian, S.R.K., Muniyandi, J., Hariharan, N., & Eom, S.H. (2009). Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74(1), 328-335.
- Henglein, A. (1989). Small-particle research: physicochemical properties of extremely small colloidal metal and semiconductor particles. *Chemical reviews*, 89(8), 1861-1873.
- Hu, J. H., Hong, C. X., Stromberg, E. L., & Moorman, G. W. (2008). Mefenoxam sensitivity and fitness analysis of *Phytophthora nicotianae* isolates from nurseries in Virginia, USA. *Plant Pathology*, 57(4), 728-736.
- 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.
- İslam, A., Tüfekçi, F., & Turan, A. (2021). Fındık (1. Bölüm: Genel Özellikler). Ankara, Türkiye, Nobel Akademik Yayıncılık, 1-22 s.
- Joseph, S., & Mathew, B. (2015). Microwave-assisted green synthesis of silver nanoparticles and the study on catalytic activity in the degradation of dyes. *Journal of Molecular Liquids*, 204, 184-191.
- Konvičková, Z., Holišová, V., Kolenčík, M., Niide, T., Kratošová, G., Umetsu, M., & Seidlerová, J. (2018). Phytosynthesis of colloidal Ag-AgCl nanoparticles mediated by *Tilia* sp. leachate, evaluation of their behaviour in liquid phase and catalytic properties. *Colloid and Polymer Science*, 296, 677-687.
- Korkut, D. S., Korkut, S., Bekar, I., Budakçı, M., Dilik, T., & Çakıcıer, N. (2008). The effects of heat treatment on the physical properties and surface roughness of Turkish hazel (*Corylus colurna* L.) wood. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(9), 1772-1783.
- Krishnaraj, C., Jagan, E. G., Rajasekar, S., Selvakumar, P., Kalaichelvan, P. T., & Mohan, N. J. C. S. B. B. (2012). Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(1), 50-56.
- Kroon, L. P. N. M., Brouwer, H., De Cock, A., WAM., & Govers, F. (2012). The *Phytophthora* genus anno 2012. *Phytopathology*, 102(4), 348-364.
- Lee, K. J., Jun, B. H., Choi, J., Lee, Y., Joung, J., & Oh, Y. O. (2007). Environmentally friendly synthesis of organic-soluble silver nanoparticles for printed electronics. *Nanotechnology*, 18(33), 335601.
- Lin, Y.L., Wang, W.Y., Kuo, Y.H., & Chen, C. F. (2000). Nonsteroidal constituents from *Solanum incanum* L. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 47(1), 247-251.

- Luther, W. (2006). International Strategy and Foresight Report on Nanoscience and Nanotechnology. Final Report, 49p.
- Meng, Q. X., Cui, X. L., Bi, Y., Wang, Q., Hao, J.J., & Liu, X.L. (2011). Biological and genetic characterization of *Phytophthora capsici* mutants resistant to flumorph. *Plant Pathology*, 60(5), 957-966.
- Mishra, S., & Singh, H. B. (2015). Biosynthesized silver nanoparticles as a nanoweapon against phytopathogens: exploring their scope and potential in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 1097-1107.
- Molnar, T. J. (2011). *Corylus*. C. Kole (Ed.) Wild crop relatives: genomic and breeding resources. Forest Trees içinde (15-48 ss). Springer, Germany.
- Mondal, P., & Purkait, M.K. (2017). Green synthesized iron nanoparticle-embedded pH-responsive PVDF-co-HFP membranes: optimization study for NPs preparation and nitrobenzene reduction. *Separation Science and Technology*, 52, 2338-2355.
- Noroozi, M., Zakaria, A., Moksini, M. M., Wahab, Z.A., & Abedini, A. (2012). Green formation of spherical and dendritic silver nanostructures under microwave irradiation without reducing agent. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8086-8096.
- Polat, S., & Güney, Y. (2015) Türk fındığı'nın (*Corylus colurna*) Türkiye'deki yeni bir yayılış alanı. *Akademik Sosyal Araştırmalar Dergisi*, 3(18), 449-460.
- Poulose, S., Panda, T., Nair, P.P., & Théodore, T., (2014). Biosynthesis of Silver Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14, 2038-2049.
- Pourmortazavi, S.M., Taghdiri, M., Makari, V., & Rahimi-Nasrabadi, M. (2015). Procedure optimization for green synthesis of silver nanoparticles by aqueous extract of *Eucalyptus oleosa*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136, 1249-1254.
- Rai, M., & Yadav, A. (2013). Plants as potential synthesizer of precious metal nanoparticles: progress and prospects. *IET Nanobiotechnology*, 7(3), 117-124.
- Reddy, L. V. A., Wee, Y. J., Yun, J. S., & Ryu, H. W. (2008). Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches. *Bioresource Technology*, 99(7), 2242-2249.
- Rodriguez-Sanchez, L., Blanco, M.C., & López-Quintela, M.A. (2000). Electrochemical synthesis of silver nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 104(41), 9683-9688.
- Riethmüller, E., Könczöl, Á., Szakál, D., Végh, K., Balogh, G.T., & Kéry, Á. (2016). HPLC-DPPH screening method for evaluation of antioxidant compounds in *Corylus* species. *Natural Product Communications*, 11(5), 4-641.
- Saleeb, N., Robinson, B., Cavanagh, J., Ross, J., Munir, K., & Gooneratne, R. (2020). Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in *Aporrectodea caliginosa* earthworms exposed to silver nanoparticles and silver nitrate in spiked soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(6), 1257-1266.
- Siddiqi, K.S., Husen, H. & Rao, R.A.K. (2018). A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal. *Journal of Nanobiotechnology*, 16:14. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0334-5>
- Sreeram, K. J., Nidhin, M., & Nair, B. U. (2008). Microwave assisted template synthesis of silver nanoparticles. *Bulletin of Materials Science*, 31, 937-942.
- Thakkar, K.N., Mhatre, S. S., & Parikh, R. Y. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(2), 257-262.
- Tosun, S., (2012). Cadde (Yol) Ağacı Olarak Amerika'da ve Avrupa'da Popülerleşen Türk Fındığı (*Corylus colurna* L.). *Orman ve Av Dergisi*, 3, 22-25.
- Türkkan, M. (2013). Antifungal effect of various salts against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*, the causal agent of *Fusarium* basal rot of onion. *Journal of Agricultural Sciences*, 19(3), 178-187.
- Wacławek, S., Gončuková, Z., Adach, K., Fijałkowski, M., & Černík, M. (2018). Green synthesis of gold nanoparticles using *Artemisia dracunculoides* extract: control of the shape and size by varying synthesis conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(24), 24210- 24219.

- Wawra, S., Belmonte, R., Löbach, L., Saraiva, M., Willems, A., & van West, P. (2012). Secretion, delivery and function of oomycete effector proteins. *Current Opinion in Microbiology*, 15(6), 685-691.
- Yiğit, U., & Türkkan, M. (2023). Antifungal activity and optimization procedure of microwave-synthesized silver nanoparticles using linden (*Tilia rubra* subsp. *caucasica*) flower extract. *International Journal of Chemistry and Technology*, 7(1), 195-207.