

Çevre Dostu Bir Yaklaşım: One-Pot (Tek-Kap) Yeşil Sentez ile AgNP Sentezi, Kitosan Konsantrasyonunun Tanecik Boyutu Üzerine Etkisi ve Antibakteriyel Aktiviteleri

Filiz Kara * 

Başkent Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Endüstri Mühendisliği Bölümü, 06790, Ankara, Türkiye

Öne Çıkanlar

- Yeşil sentez, pahalı kimyasalların kullanımını ortadan kaldırdığı ve çevre dostu olduğu için sıklıkla tercih edilmektedir.
- AgNP'ler geniş antimikrobiyal aktiviteleri nedeniyle en yaygın kullanılan nanopartiküllerdir.
- AgNP'ler sadece kitosan kullanılarak otoklavda one-pot yeşil sentez yöntemiyle sentezlenmiştir.
- Kitosan konsantrasyonunun AgNP'lerin boyut ve antibakteriyel özelliklerini etkilediği belirlenmiştir.

Makale Bilgileri

Geliş: 21/08/2024

Kabul: 29/09/2024

Anahtar Kelimeler

Yeşil sentez,
AgNP,
Kitosan,
Antibakteriyel aktivite.

Öz

Gümüş nanopartikül (AgNP), hem indirgeyici hem de stabilize edici ajan olarak hareket eden kitosan (CS) kullanılarak tek-kap (one-pot) yeşil sentez yöntemi ile otoklavda sentezlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda kullanılan kitosanın (%0,3-0,9 w/v) oluşan AgNP (AgNP-CS0.3-AgNP-CS0.9) özellikleri üzerine etkisi incelenmiştir. UV-vis spektrumları, AgNP-CS'ler için karakteristik olan 423-432 nm aralığında pik göstermiştir. Fizikokimyasal özellikler taramalı elektron mikroskobu (SEM), X-ışını kırınımı (XRD), zetasizer gibi farklı yöntemler kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar kitosan konsantrasyonunun artmasıyla nanopartikül boyutunun azaldığını ve en küçük boyuta sahip örneğin yüzey merkezli kübik (fcc) kristal yapıdaki AgNP-CS-0.9 olduğunu ortaya koymuştur. Tüm örnekler *Escherichia coli* (*E. coli*) ve *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)'a karşı antibakteriyel aktiviteye sahipken en yüksek aktiviteyi AgNP-CS-0.9 sergilemiştir. Nanopartikül boyutu küçüldükçe antibakteriyel etkinliğin arttığı belirlenmiştir. Herhangi bir toksik kimyasalın kullanılmadığı, düşük maliyetli, kolay olan bu yöntem çok geniş kullanım alanına sahip AgNP'lerin eldesi için alternatif bir uygulama sunmaktadır.

An eco-friendly approach: One-pot green synthesis of AgNPs, the effect of chitosan concentration on particle size, and antibacterial activity

Highlights

- Green synthesis is frequently preferred due to its elimination of the use of expensive chemicals and its environmentally friendly nature.
- AgNPs are the most commonly used nanoparticles due to their broad antimicrobial activities.
- AgNPs were synthesized only using chitosan through a one-pot green synthesis method in an autoclave.
- It has been determined that chitosan concentration affects the size and antibacterial properties of AgNPs.

Article Info

Received: 21/08/2024

Accepted: 29/09/2024

Keywords

Green synthesis,
AgNP,
Chitosan,
Antibacterial activity.

Abstract

Silver nanoparticles (AgNPs) were synthesized in an autoclave by one-pot green synthesis method using chitosan (CS) which acts as both a reducing and stabilizing agent. The effect of different concentrations of chitosan (0.3-0.9 w/v) on the properties of the resulting AgNPs (AgNP-CS0.3-AgNP-CS0.9) was investigated. UV-vis spectra showed a peak in the range of 423-432 nm, which is characteristic for AgNP-CSs. Physicochemical properties were evaluated using various methods such as scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), and zetasizer. The results revealed that the nanoparticle size decreased with increasing chitosan concentration, and the smallest size was observed for AgNP-CS-0.9 (50 nm) with a face-centered cubic (fcc) crystal structure. All samples exhibited antibacterial activity against both *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), with the highest activity shown by AgNP-CS-0.9, indicating that antibacterial efficacy increased as nanoparticle size decreased. This low-cost, easy method, which does not involve the use of any toxic chemicals, offers an alternative application for the production of AgNPs with a wide range of applications.



Makale, Creative Commons 4.0 (CC BY NC SA) uluslararası lisansı altında açık erişim olarak yayımlanmaktadır.

* Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Filiz Kara, fkara@baskent.edu.tr



1. GİRİŞ

Nanopartiküller, çapları 1 ile 100 nm arasında değişen parçacıklardır. Nanopartiküllerin yüzey/hacim oranına bağlı olarak sahip olduğu gelişmiş özellikler nedeniyle çok çeşitli endüstrilerde kullanılmaktadır [1]. Gümüş nanopartiküller (AgNP'ler), sahip oldukları benzersiz özellikler sayesinde (elektriksel, optik ve katalitik özellikler, antibakteriyel, antifungal, antioksidan, anti-kanser, anti-inflamatuar, antikoagülan aktivite gibi) yer aldıkları geniş uygulama alanları nedeniyle son yıllardaki en popüler çalışma konularından biri hâline gelmişlerdir [2]. AgNP'lerin en faydalı özelliklerinden biri antimikrobiyal aktiviteleridir. Antimikrobiyal direncin artmasıyla tehdit edilen bir dünyada, AgNP'lerin ilaç dağıtım sistemlerinde kullanılması, ortaya çıkan bu sorunun çözülmesine yardımcı olabilir. Bu nedenle, büyük ölçekli sentezleri, özellikle sağlık alanında son derece faydalı olma potansiyeline sahiptir. Şu anda, AgNP çoklu ilaca dirençli bakteriler de dâhil olmak üzere çeşitli bulaşıcı ve patojenik mikroorganizmalara karşı gösterdikleri geniş antimikrobiyal aktiviteleri nedeniyle en yaygın kullanılan nanopartiküllerdir. 1628 nanoteknoloji ürününden en az 383'ü gümüş nanopartiküller içermektedir [3, 4].

Gümüşün modifikasyonu ile elde edilen AgNP'lerin en önemli özellikleri sentez koşullarına bağlı olarak boyutlarının ve şekillerinin ayarlanabilir olmasıdır. AgNP'lerin biyolojik aktiviteleri, nanopartiküllerin boyutuna, şekline, kimyasal bileşimine, redoks potansiyeline, partikül çözünmesine, iyon salınımına, kaplama ve agregasyon derecesine bağlıdır [5]. Ayrıca, nanopartiküllerin mevcut yüzey alanı ve yüzey yükü de biyolojik etkileşimde önemli bir rol oynamaktadır. AgNP'ler çok düşük konsantrasyonlarda bile etkilidir, bu da gümüş salımı (partikül ve/veya Ag⁺ şeklinde) nedeniyle toksisite olasılığını en aza indirir. Ancak AgNP'lerin mevcut potansiyel toksisitesinin sadece metal birikimiyle ilgili olmadığı, aynı zamanda nanopartiküllerin sentezinde kullanılan sentetik yöntemlerle de ilgili olduğu ortaya koyulmuştur [6]. Geleneksel AgNP sentezi için toksik kimyasalların kullanılması AgNP'lerin uygulanabilirliğini sınırlar. Bu durum toksik maddeler kullanmadan çevre dostu alternatif yöntemler geliştirmeye yönelik ihtiyacı arttırdığından yeşil sentez kullanılmaya başlanmıştır [7]. Yeşil sentez, geleneksel kimyasal sentezden daha faydalıdır çünkü daha az maliyetlidir, kirliliği azaltır ve çevre ve insan sağlığı güvenliğini artırır [8]. Yeşil yolla sentez, pahalı kimyasalların kullanımını ortadan kaldırdığı ve çevre dostu olduğu için son on yıllarda sıklıkla tercih edilmektedir.

Nanoteknolojide en çok çalışılan polimerlerden biri toksik olmayan, kokusuz, biyoyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen bir biyopolimer olan kitosandır. Metal nanopartiküllerin sentezi için hem indirgeyici hem de stabilize edici ajan, şekil yönlendirici veya boyut kontrollü sağlayan ajan olarak yeşil kimyasal yollarla metal nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılmaktadır. Metal nanopartiküllerin fizikokimyasal stabiliteilerinin iyileştirilmesi, ilaç salımının kontrol edilmesi, doku penetrasyonunun ve hücre etkileşimlerinin teşvik edilmesi ve antimikrobiyal etkinliğin artırılması gibi avantajlar sağlamaktadır [9].

Kararlı AgNP'ler, herhangi bir toksik kimyasal kullanmadan sadece kitosan ve AgNO₃ kullanılarak one-pot yeşil sentez yöntemiyle otoklavda sentezlenebilmektedir. Yöntem ilk olarak Venkatesham ve arkadaşları tarafından 2014 yılında literatüre kazandırılmıştır [10]. AgNP'lerin oluşumu üzerinde zaman (10-60 dakika), gümüş nitrat konsantrasyonunun değişimi (0,1-0,5%) ve kitosan konsantrasyonu (0,1-0,5%) gibi farklı parametrelerin etkisi incelenmiştir. Seçilen bir örnek için AgNP varlığında 4-nitrofenolün sodyum borohidrit ile katalitik indirgenme ve *E. coli* ve *Micrococcus luteus*'a karşı antimikrobiyal aktivitesi sunulmuştur [10]. 2017 yılında Biao ve arkadaşları kararlı Ag kolloid sentezlemek için aynı yöntemi kullanmış 140°C sıcaklıkta 4 saat tepkime süresinde pH değişiminin etkisi incelenmişlerdir. pH 5,0'da AgNP'ler küresel simetriye sahipken pH 4,0'da üçgen ve kesik üçgen nanoplate baskın olmuştur. pH 5,0'da sentezlenen AgNP'ler, *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine ve *C. albicans* mantarına karşı etkili antimikrobiyal etkinlik göstermişlerdir [11]. Wongpreecha ve arkadaşları 2018 yılında %0,4 AgNO₃ (w/v) ve %0,3 CS (w/v) çözeltileri ile one-pot yeşil prosese dayalı yöntemde sıcaklık ve basınç girdisi etkilerini araştırmışlar ve en iyi sentez koşulunu, otoklavda 120°C olarak önermişlerdir. Sentezlenen AgNP-CS hem *E. coli* hem de *S. aureus*'a karşı etkili antibakteriyel aktivite göstermiştir. Ayrıca, AgNP-CS'nin yüzeyindeki CS kaplamasının, ticari sitratla stabilize edilmiş AgNP ile karşılaştırıldığında sitotoksisiteyi azalttığı kanıtlanmıştır [12].

Hileuskaya ve arkadaşları farklı moleküler ağırlıktaki kitosanları (20 ila 1200 kDa) indirgeyici ajanlar ve partikül stabilizatörleri olarak kullanmışlardır. Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere ve mantarlara karşı en yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip kitosan-Ag nanoparçacıklarının sentezinin optimum parametreler kitosanın moleküler ağırlığı 20000 ve 30000 Da, reaksiyon süresi 60 ve 90 dakika bulunmuştur [13]. Ayrıca Mirajkar ve arkadaşları 2021 yılında yaptıkları çalışmada kitosan-gümüş nanokompozitler (CSN-AgNP), normal kitosan (yüksek moleküler ağırlıklı (MW), NL-CSN) ve γ ışınları ile ışınlanarak elde edilen oligokitosanlar (düşük MW, IR-CSN) ile hazırlamışlardır. NL-CSN ve IR-CSN (%0,0-2,5 w/v), gümüş nitrat (%0,0-2,5 w/v) konsantrasyonlarının etkisi incelenmiştir. AgNP sentez derecesi IR-CSN'de NL-CSN'den daha fazla bulunmuş. IR-CSN-AgNP'ler, *E. coli*'ye karşı yüksek bir antimikrobiyal aktivite ve *Fusarium oxysporum* f sp. *ciceris*'a karşı antifungal aktivite sergilemiştir. Çalışma aynı zamanda sürdürülebilir tarımda fitopatojenlerin kontrolü için γ -ışınlanmış kitosan-gümüş nanokompozitlerin geliştirilmesi ve kullanılması için yeni seçenekler sunmuştur [14]. Bu çalışmayı literatürdeki benzer çalışmalardan kitosan konsantrasyonunun sentezlenen AgNP'lerin morfolojisi ve antibakteriyal aktivitesi üzerine etkisinin incelenecek olması ayrılmaktadır.

Çalışmanın amacı yeşil sentez yöntemiyle AgNP sentezlenmesi ve elde edilen AgNP'lerin morfolojik ve antibakteriyal özellikleri üzerine kitosan konsantrasyonunun etkisinin incelenmesidir. AgNP'ler herhangi bir toksik kimyasal olmadan sadece kitosan kullanılarak otoklavda one-pot yeşil sentez yöntemiyle sentezlenmiştir. Sentezlenen nanopartiküller UV-vis spektrometre, XRD, SEM ve DLS kullanılarak karakterize edilmiştir. Ayrıca sentezlenen AgNP'lerin antibakteriyel etkinlikleri *Escherichia coli* ATCC 11229 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'e karşı kuyu difüzyon yöntemiyle incelenmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Çalışmada AgNP sentezinde kullanılan kitosan (düşük moleküler ağırlıklı, 150 000 kDa, 81DD) Fluka'dan (Seelze, Almanya), AgNO₃ ISOLAB chemicals'dan temin edilmiştir. Nutrient sıvı besi yeri ve susuz asetik asit Merk'ten (Darmstadt, Almanya) alınmıştır. Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu suşları Gram pozitif *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC 25923 ve Gram negatif *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 11229 Gazi Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarından temin edilmiştir.

AgNP sentezinde kullanılan otoklav, özel programlar için 105°C-135°C sıcaklık çalışma ayar aralığına, 1-300 dakika zamanlayıcısına, 96 L hücre hacmine, 316 L paslanmaz çelik iç yüzey yapısına sahip NÜVE NC 90M dik tip (Ankara, Türkiye) otoklavdır.

2.2. One-pot AgNP Yeşil Sentezi

10 mL kitosan çözeltisinin (%1'lik susuz asetik asitte 0,3; 0,6 ve 0,9 w/v olarak hazırlanan çözelti isimleri sırasıyla CS0.3, CS0.6, CS0.9 olarak adlandırılmıştır) ile 10 mL AgNO₃ çözeltisi (%0,4 w/v deiyonize suda) 700 rpm'de 5 dakika karıştırılmasının ardından otoklavda 15 psi basınç altında 120°C sıcaklıkta 50 dakika bekletilmiştir. Sentezde kullanılan kitosan konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen nanopartiküller; AgNP-CS0.3, AgNP-CS0.6, AgNP-CS0.9 şeklinde isimlendirilmiştir [10, 12].

2.3. AgNP'lerin Karakterizasyonu

AgNP oluşumu 200-800 nm aralığında UV-vis spektrofotometre (Digilab Hitachi U-1800, Tokyo, Japonya) kullanılarak izlenmiştir. AgNP'lerin parçacık boyutu dağılımı ve zeta potansiyelleri zeta sizer cihazı (MALVERN Nano ZS90) ile analiz edilmiştir. Analiz 25°C'de 173°'lik sabit bir saçılma açısında gerçekleştirilmiştir. AgNP'lerin X-ışını kırınım desenleri Cu K α radyasyonu ile 0 ila 90 arasında 2 θ aralığında X-ışını difraktometresi (XRD, MiniFlex; Rigaku Co., Tokyo, Japonya) ile elde edilirken AgNP'lerin boyutları ve şekilleri, x20000, x50000 ve x100000 büyütme ile 30 kV hızlandırma voltajında bir Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM, QUANTA 400F Field Emission, Hills-boro, Oregon, ABD) kullanılarak karakterize edilmiştir.

2.4. Antibakteriyal Aktivite

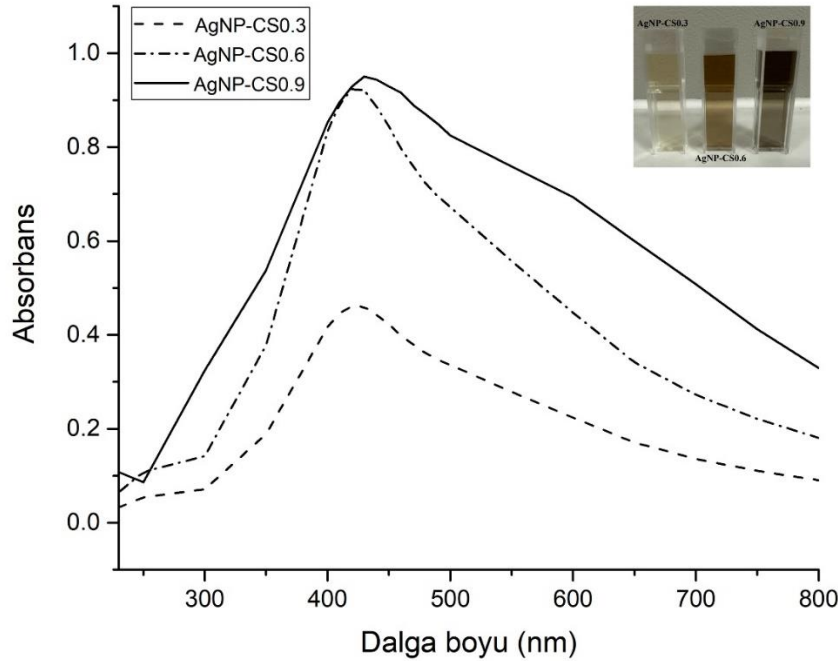
Yeşil sentez ile elde edilen AgNP'lerin antibakteriyal aktiviteleri Gram negatif *E. coli* ATCC 11229 ve Gram pozitif *S. aureus* ATCC 25923 patojenlerine karşı kuyu difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir.

Kuyu Difüzyon Yöntemi: ilk olarak patojen mikroorganizmalar Nutrient sıvı besi ortamında 37°C'de 18-24 saat geliştirilmiştir ardından bakteri yoğunlukları McFarland 0,5'e (mililitre başına 10^7 - 10^8 koloni oluşturan birimi temsil eden; cfu/mL) ayarlanmıştır. 20 mL Nutrient katı besiyerine yoğunluğu ayarlanmış bakteri çözeltilisinden 100 µL eklenerek yayma ekim yapılmış ardından katı besiyerinde 4 mm çapında (agar delici corkborer ile) kuyular oluşturulmuştur. Oluşturulan kuyulara 50 µL aynı konsantrasyonlardaki (3 µg/mL deiyonize suda) AgNP-CS0.3, AgNP-CS0.6 ve AgNP-CS0.9 çözeltileri koyulmuş ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda inhibisyon zon çapı kumpas ile ölçülmüştür. Deney 2 paralelli olarak gerçekleştirilmiştir [15].

3. BULGULAR

3.1. UV-vis Spektroskopisi Analizi

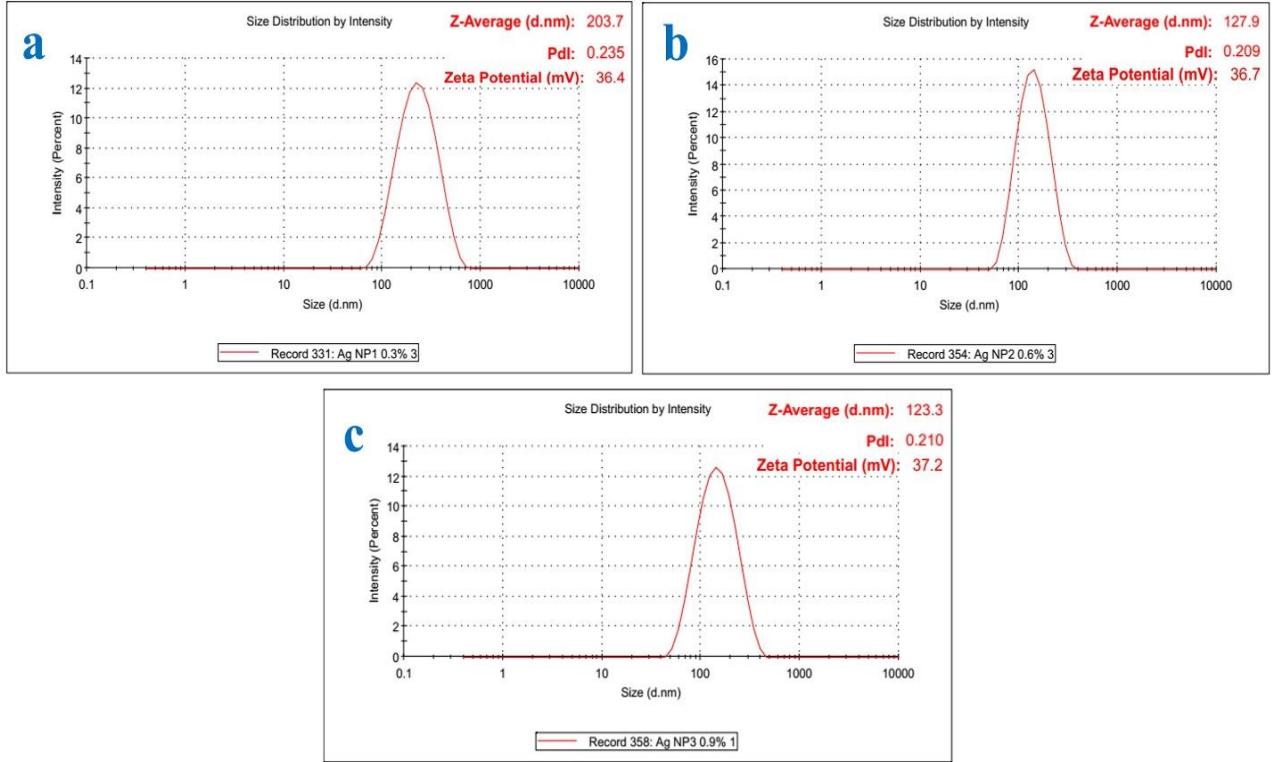
Nanopartikül oluşumu UV-vis spektroskopisi ile analiz edilmiş ve örneklerin absorpsiyon spektrumları Şekil 1'de verilmiştir. İlk olarak kitosan çözeltilerinin başlangıçtaki soluk sarı renklerinin kullanılan kitosanın artan konsantrasyonuna bağlı olarak deney sonunda CS0.3, CS0.6, CS0.9 için sırasıyla sarımsı kahverengi, açık kahverengi ve koyu kahverengiye dönüşmüş olması nanopartikül oluşumunun bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. Ayrıca spektrumlardaki, 400-450 nm arasındaki absorpsiyon pikinin varlığı da Ag^{+} 'nin Ag^0 indirgenerek AgNP oluşumunu kanıtlamıştır. Örneklerin Şekil 1'deki UV-vis spektrumları incelendiğinde absorpsiyon piklerinin maksimum AgNP-CS0.3, AgNP-CS0.6 ve AgNP-CS0.9 örnekleri için sırasıyla 423 nm, 425 nm ve 432 nm olduğu belirlenmiştir. Örneklerin absorpsiyon değerleri karşılaştırıldığına kitosan miktarının artmasıyla elde edilen AgNP'lerin absorpsiyon değerleri artmıştır. Bu değerler AgNP-CS0.3, AgNP-CS0.6 ve AgNP-CS0.9 için sırasıyla 0,46-0,95 arasındadır. Absorpsiyon piklerinin şekilleri incelendiğinde ise kitosan miktarının artmasıyla piklerin genişlediği gözlenmiştir.



Şekil 1. Sentezlenen AgNP-CS0.3, AgNP-CS0.6 ve AgNP-CS0.9 örneklerinin UV-vis absorpsiyon spektrumları

3.2. Parçacık Boyutu ve Zeta Potansiyeli Analizi

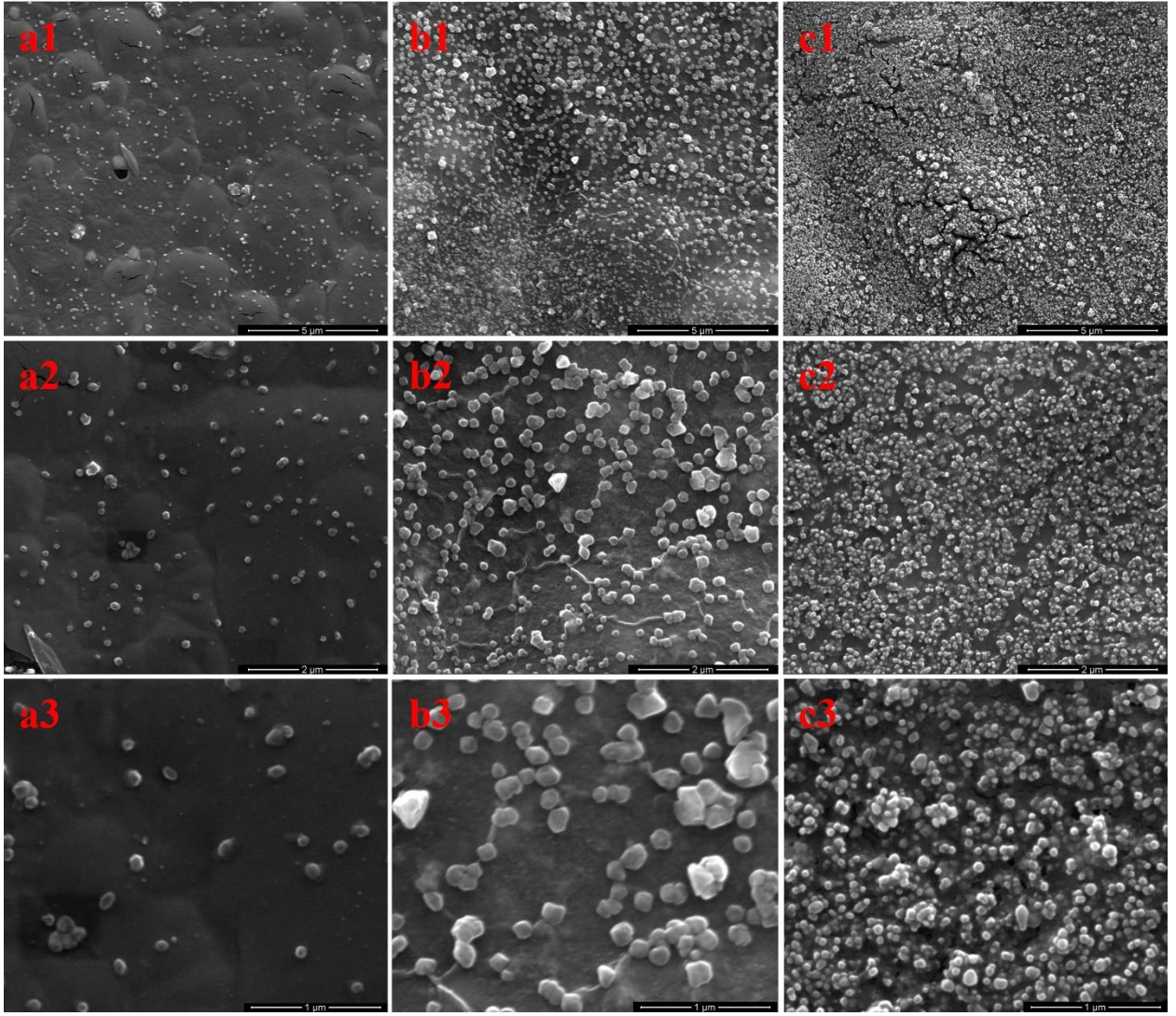
Yeşil olarak sentezlenen AgNP'lerin ortalama partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyelleri bir nano zetasiser ile belirlenmiştir. Çözeltideki nanopartiküllerin boyutunun belirlenmesinin arkasındaki teori dinamik ışık saçılımıdır (DLS) [16]. Şekil 2'de örneklerin partikül dağılımını, PDI değerleri ve zeta potansiyelleri verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde AgNP-CS0.3, AgNP-CS0.6 ve AgNP-CS0.9 örneklerinin sırasıyla ortalama boyutlarının 203,7 nm, 127,9 nm ve 123,3 nm olduğu, PDI değerlerinin 0,235, 0,209 ve 0,210 olduğu belirlenmiştir. DLS sonuçlarına göre kitosan konsantrasyonunun artmasıyla partikül boyutunun küçüldüğü belirlenmiştir. Örneklerin zeta potansiyel değerleri AgNP-CS0.3 de +36,4 mV, AgNP-CS0.6 de +36,7 mV ve AgNP-CS0.9 de ise +37,2 mV olarak belirlenmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. AgNP-CS0.3 (a), AgNP-CS0.6 (b) ve AgNP-CS0.9 (c) örneklerinin parçacık boyut dağılımları ve zeta potansiyelleri

3.3. SEM Analizi

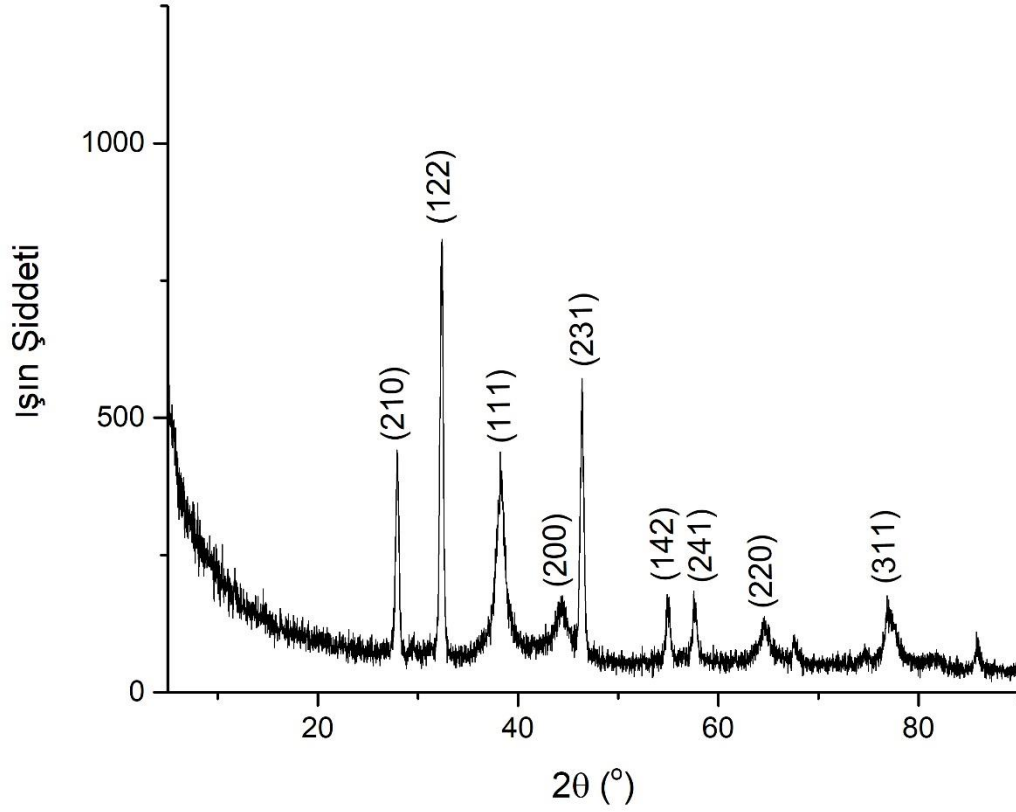
Sentezlenmiş AgNP'lerin morfolojik özellikleri SEM kullanılarak incelenmiş ve görüntüler Şekil 3'te verilmiştir. Şekil 3 incelendiğinde yeşil sentezle elde edilen tüm AgNP örneklerinin belirgin küresel morfolojiye sahip olduğu ve kitosan konsantrasyonu arttıkça oluşan tanecik sayısının arttığı görülmüştür. Kitosan konsantrasyonu arttıkça nanopartikül boyutlarının küçüldüğü (AgNP-CS0.3, AgNP-CS0.6 ve AgNP-CS0.9 için sırasıyla yaklaşık ortalama 100 nm, 80 nm ve 50 nm) ve taneciklerin aglomerasyonunun arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 3. Kitosan miktarına bağlı olarak elde edilen AgNP-CS0.3 (a), AgNP-CS0.6 (b) ve AgNP-CS0.9 (c) örneklerinin farklı büyütmelelerdeki ($\times 20000$, $\times 50000$ ve $\times 100000$) SEM görüntüleri

3.4. XRD Analizi

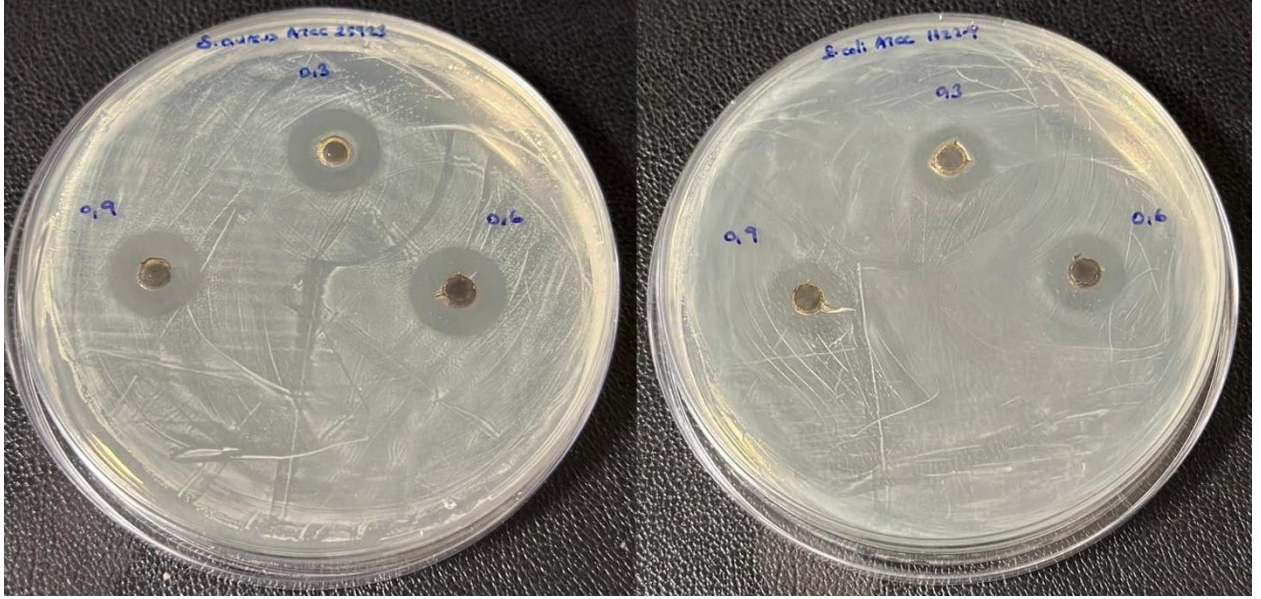
Yeşil sentezlenmiş AgNP'lerin kristal yapısını belirlemek için XRD tekniği kullanılmıştır. AgNP-CS0.9 örneğine ait Şekil 4'da verilmiş olan XRD deseninde 2θ kırınım pikleri $27,90^\circ$, $32,35^\circ$, $38,26^\circ$, $44,31^\circ$, $46,36^\circ$, $54,95^\circ$, $57,60^\circ$, $64,47^\circ$ ve $77,09^\circ$ 'de gözlenmiştir. Bu piklerin sırasıyla (210), (122), (111), (200), (231), (142), (241), (220), (311) yansıma düzlemi indekslerine karşılık geldiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre AgNP'lerin yüzey merkezli kübik (fcc) kristal yapıda olduğunu belirlenmiştir [17, 18].



Şekil 4. AgNP-CS0.9 örneğinin XRD kırınım deseni

3.5. Antibakteriyel Aktivite

AgNP-CS0.3, AgNP-CS0.6 ve AgNP-CS0.9 örneklerinin *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı antibakteriyel aktivitesi kuyu difüzyon yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bakterilerin üreyemediği inhibisyon bölgesine ilişkin tüm konsantrasyonlarda one-pot yeşil sentez yöntemiyle sentezlenen AgNP örnekleri için diskin etrafındaki net bölge gözlemlenmiş ve Şekil 5'te verilmiştir. Ayrıca örneklerinin inhibisyon bölgesinin çapı ölçülmüş ve sonuçlar Çizelge 1'de verilmiştir. Çizelge 1 incelendiğinde AgNP-CS0.3, AgNP-CS0.6 ve AgNP-CS0.9 örneklerinin oluşturdukları zon çapları sırasıyla *S. aureus*'a karşı 9,1 nm, 9,2 nm ve 9,4 nm ve *E. coli*'ye karşı 6,6 nm, 6,7 nm ve 7,2 nm olarak ölçülmüştür. Sonuçlar tüm örneklerinin her iki bakteriyi inhibe etmede etkili olduğunu ancak *S. aureus*'a karşı daha yüksek aktivite sergilediğini göstermiştir. En etkin antibakteriyel etkinliği sahip olan örnek AgNP-CS0.9 olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla sonuçlar NP boyutunun küçülmesinin antibakteriyel etkinliği artırdığını göstermiştir.



Şekil 5. AgNP-CS0.3, AgNP-CS0.6, AgNP-CS0.9 örneklerinin *S. aureus* ve *E. coli* bakterilerine karşı kuyu difüzyon zonları

Çizelge 1. AgNP-CS0.3, AgNP-CS0.6, AgNP-CS0.9 örneklerinin *S. aureus* ve *E. coli* bakterilerine karşı inhibisyon zon çapları (mm)

	AgNP-CS0.3	AgNP-CS0.6	AgNP-CS0.9
<i>S. aureus</i> 25923	9,1 ± 0,1	9,2 ± 0,0	9,4 ± 0,1
<i>E. coli</i> 11229	6,6 ± 0,7	6,7 ± 0,7	7,2 ± 0,7

4. TARTIŞMA

AgNP'lerin sentezinde kullanılan one-pot yeşil sentez yönteminin başarılı olduğunun ilk kanıtı kitosan çözeltilerinin başlangıçtaki renklerinin değişerek kahverengimsi hâl alması olmuştur. Ardından AgNP oluşumu UV-vis spektroskopisi ile AgNP-CS0.3, AgNP-CS0.6 ve AgNP-CS0.9 örneklerinin absorpsiyon piklerinin 420-435 nm aralığında gözlenmesiyle doğrulanmıştır (Şekil 1). Absorpsiyon pikinin şekli, absorpsiyon yoğunluğu ve dalga boyu analiz edilerek AgNP'lerin özellikleri ve nanopartikül dağılımları değerlendirilebilmektedir [19]. Oluşan nanopartiküllerin miktarındaki artış; pikin absorpsiyon değerinin artışına, partikül boyutundaki artış; pikin tepe noktasının daha uzun dalga boyu bölgesine kaymasına ve parçacıkların boyut dağılımının homojenliğinin bozulması da pikin genişlemesine sebep olmaktadır [13]. Öncelikle 410 ve 450 nm arasında yer alan absorpsiyon piklerinin AgNP'lerin küresel morfolojisine işaret ettiği kabul edilmiştir [20]. Kitosan konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak piklerin absorpsiyon değerleri artmış ve bu durum oluşan AgNP miktarının artması olarak yorumlanmıştır. Aynı şekilde kitosan konsantrasyonunun artması pikin tepe noktasının daha uzun dalga boyu bölgesine kaymasına neden olmuştur [21]. Yine kitosan konsantrasyonundaki artışın pikin genişlemesine sebep olmasından dolayı AgNP'lerin boyut dağılımının homojenliğinin bozulduğu sonucuna varılmıştır [12]. Nate ve arkadaşlarının yaptıkları yeşil AgNP sentezinde (oda sıcaklığında ve N₂ atmosferde) UV-vis spektrumu sonuçlarına göre kitosan konsantrasyonundaki artışın pikin tepe noktasının daha uzun dalga boyu bölgesine kaymasına, absorpsiyon değerinin artmasına ve pik genişlemesine sebep olduğunu bildirmişlerdir [22].

AgNP-CS örneklerinin ortalama boyutlarının 203,7-127,9-123,3 nm, PDI değerlerinin ise 0,235-0,209-0,210 olduğu DLS ile belirlenmiştir (Şekil 2). Kitosan konsantrasyonunun sentezlenen AgNP'lerin boyutlarını etkilediği, bu etkinin konsantrasyonun artmasıyla nanopartikül boyutunun küçülmesi şeklinde olduğu belirlenmiştir. Polidispersite indeksi (PDI), bir numunenin boyutuna bağlı olarak heterojenliğini tanımlayan bir parametredir. PDI ölçeği 0 ile 1 arasında değişir (0 monodispers ve 1 polidispers olmak üzere) [23]. Örneklerin PDI değerlerinin 0,2 civarında olması örneklerin düşük polidispersitede olduğunu düşündürmüştür. Zeta potansiyeli ise nanopartiküllerin yüzey yükünün bir göstergesidir. Literatüre göre, zeta potansiyeli +30 mV'den yüksek veya -30 mV'den düşük olan nanopartiküller kararlı olarak kabul edilir [24]. Şekil 2'de örneklerin zeta potansiyeli sonuçlarının +30 mV'den büyük olduğu (36,4-36,7-37,2 mV) belirlenmiştir. Süspansiyondaki tüm partiküller büyük bir negatif veya pozitif zeta potansiyeline sahip olduğunda, birbirlerini itme eğiliminde olacaklar ve partiküllerin bir araya gelme eğilimi olmayacaktır. Ancak, partiküller düşük zeta potansiyel değerlerine sahipse, partiküllerin bir araya gelmesini ve topaklaşmasını engelleyecek bir kuvvet olmayacaktır [25]. Dolayısıyla yeşil sentezlenmiş AgNP'lerin yüksek pozitif zeta potansiyeline sahip olmalarının ortamdaki partiküller arasındaki itmenin olduğu ve formülasyonun stabilitesini arttırabileceği düşünülmüştür. Benzer şekilde one-pot yeşil sentezle AgNP çalışmalarında kitosanla stabilize edilmiş AgNP'ler için 30 mV'den daha büyük pozitif zeta potansiyel değerleri bildirilmiştir [12-14].

SEM sonuçlarına göre (Şekil 3) örnek boyutlarının AgNP-CS0.3, AgNP-CS0.6 ve AgNP-CS0.9 için sırasıyla yaklaşık ortalama 100 nm-50 nm arasında olduğu söylenebilir. Yeşil sentezle elde edilen tüm AgNP örneklerinin belirgin küresel morfolojiye sahip olduğu ve kitosan çözelti konsantrasyonu arttıkça nanopartikül boyutunun küçüldüğü bulunmuştur. Kitosanın metal nanopartiküllerin yeşil sentezindeki bir rolünün de boyut kontrolü olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda AgNP'lerin boyutunun daha yüksek kitosan konsantrasyonunda azaldığı ortaya koyulmuştur [26,27]. Bu durumu açıklayan hipotez Phan ve arkadaşlarının CS ile yeşil sentezledikleri AuNP [28] ve PaNP [29] boyutunun, kullandıkları CS konsantrasyonu arttıkça azaldığını belirledikleri çalışmaları sonucunda önerdikleri hipotezle açıklanabilir. Bu hipoteze göre, CS varlığında metal nanopartiküllerin oluşumu sırasında, pozitif yüklü CS, metal çekirdekleri ile güçlü bir elektrostatik etkileşime sahiptir. Daha yüksek CS konsantrasyonu, CS ve metal çekirdeklerinin daha güçlü etkileşimine yol açar. Bu güçlü etkileşim, öncüllerin metal çekirdeklere bağlanmasını engeller. Böylece, metal çekirdekleri yüksek konsantrasyonda CS çözeltisi varlığında daha fazla büyüyemez [30]. Çalışmada, DLS analizinde AgNP'lerin boyutlarının SEM ile belirlenen değerden daha büyük olduğu tespit edilmiştir. SEM görüntülerinde (Şekil 3) gözlenen yer yer aglomere olan grupların DLS ile ölçüme (Şekil 2) katılmasının ortalama partikül boyutunun yüksek çıkmasında etkili olduğu düşünülmüştür. Ayrıca genel olarak DLS ile elde edilen nanopartiküllerin ortalama boyutu elektron mikroskopundan elde edilen değerlerden daha büyük olma eğiliminde olduğu bilinmektedir. Bunun sebebi, sulu ortamda partiküllerin etrafında hidrodinamik bir küre olduğundan DLS ölçümünde saçılan ışığı analiz ederken partikül çapının daha büyük yorumlanmasına yol açması olarak açıklanmaktadır [31]. Benzer şekilde Mirajkar ve arkadaşlarının çalışmalarında TEM sonuçlarına göre bulunan AgNP çapları DLS de çok daha büyük olarak ölçülmüştür [14].

AgNP-CS0.9 örneğinin XRD kırınım deseni (Şekil 4) standart gümüş değerlerinin mevcut literatürüne göre (JCPDS 04-0783) sırasıyla (210), (122), (111), (200), (231), (142), (241), (220), (311) yansıma düzlemi indekslerine karşılık gelen 27,90°, 32,35°, 38,26°, 44,31°, 46,36°, 54,95°, 57,60°, 64,47° ve 77,09° 2θ kırınım pikleri sergilemiştir. AgNP'lerin kırınım deseni, yüzey merkezli kübik kristal AgNP kırınım deseni ile iyi bir uyum içinde olduğunu açıkça göstermiştir. Literatürde benzer şekilde yeşil sentez ile sentezlenen AgNP'lerin XRD sonuçlarına göre AgNP'lerin yüzey merkezli kübik kristal yapıda olduğu belirlenmiştir [10,12,13,32]. Khan ve arkadaşları, AgNP'leri ıslak kimyasal çözelti yöntemi kullanarak sentezlemiş ve (111), (200), (220), (311), (222), (400), (331) ve (420) kristal düzlemlerinin 2θ değerlerine 38,1°, 44,09°, 64,36°, 77,29°, 81,31°, 97,92°, 110,81° ve 114,61° sahip fcc yapısında NP'ler olduklarını bildirmişlerdir [32].

AgNP-CS0.3, AgNP-CS0.6 ve AgNP-CS0.9 örneklerinin antimikrobiyal aktiviteleri *S. aureus*'a karşı 9,1-9,2 ve 9,4 nm arasında ve *E. coli*'ye karşı 6,6-6,7 ve 7,2 nm olarak tespit edilmiştir (Çizelge 1). Sonuçlar tüm örneklerinin *S. aureus*'a karşı daha etkin antibakteriyal aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. En yüksek antibakteriyal aktiviteye sahip örnek AgNP-CS0.9 olmuştur. Metal nanopartiküllerin hücre duvarını ve eksuda hücre materyallerini tahrip ettiğinden *S. aureus*'un daha fazla protein sızdırabileceği bildirmiştir [33]. Dolayısıyla elde edilen sonucun *S. aureus* ve *E. coli* arasındaki hücre duvarı farklılığından kaynaklanması mümkün görünmektedir [11]. Hücre duvarının hayati bir işlevi koruyucu bir bariyer görevi görerek antimikrobiyal ajanların ve bakteriyi öldürebilecek ya da zarar verebilecek diğer toksik maddelerin girişini engellemek ya da yavaşlatmaktır. Gram negatif *E. coli*'nin hücre duvarı %50 lipopolisakkarit, %35 fosfolipid ve %15 lipoproteinden oluşan ve yaklaşık 6-18 nm kalınlığında olan bir dış zardan oluşurken Gram pozitif *S. aureus*'un hücre duvarında dış membran bulunmamaktadır. Bu da nanopartiküller ile hücre duvarı arasında bozunma gerçekleşene kadar daha kolay etkilene izin vererek, *S. aureus* proliferasyonunu daha etkili bir şekilde engellemesine sebep olduğunu düşündürmüştür [34, 35]. Sonuçlara göre her iki bakteri türü için de antibakteriyal etkinlik sırası AgNP-CS0.3<AgNP-CS0.6<AgNP-CS0.9 şeklindedir. Dolayısıyla AgNP-CS örneklerinin nanoboyutlarının antibakteriyal özellikleri üzerinde etkili olduğu ve nanopartikül boyutunun küçülmesiyle sentezlenen AgNP'lerin antibakteriyal etkinliğinin arttığı sonucuna ulaşılmıştır. Literatürde de benzer şekilde AgNP'lerin antibakteriyal aktivitelerinin büyük ölçüde boyuta bağlı olduğu, bunun da daha küçük nanopartiküllerin bakteri hücresiyle doğrudan temas edebilen daha geniş yüzey alanıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir [4, 36, 37].

Bu çalışmada, AgNP'ler herhangi bir toksik kimyasal kullanılmadan, sadece kitosan ile kolayca otoklavda sentezlenmişlerdir. Kitosan konsantrasyonunun sentezlenen AgNP özellikleri üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Kuyu difüzyon testi, tüm örneklerin *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı antibakteriyal aktiviteye sahip olduklarını göstermiştir. Elde edilen nanopartiküllerin toksisitesi, antioksidan etkinliği, antikanser etkinliği gibi biyolojik aktiviteleri ileri çalışmalar yapılarak belirlendikten sonra one-pot yeşil sentez yöntemiyle elde edilen AgNP'lerin eczacılık, biyomalzeme dâhil pek çok alanlarda kullanılabilir bir aday olduğu ortaya koyulabilir.

TEŞEKKÜR

Çalışmada vermiş olduğu destekten dolayı Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğr. Gör. Dr. Berat ÇINAR ACAR'a teşekkür ederim.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarın bu makalenin içeriğiyle ilgili olarak beyan edeceği hiçbir çıkar çatışması yoktur.

YAZAR KATKI ORANI

Filiz Kara: Kavramlaştırma, Metodoloji, Araştırma, Makalenin yazımı-Orijinal taslak, İçerik analizi, Makalenin yazımı- İnceleme ve Düzenleme, Makalelin doğruluğunun kontrolü.

KAYNAKLAR

- [1] Vishwanath, R., and Negi, B. (2021). Conventional and green methods of synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial properties. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 4, 100205.
- [2] Huq, M. A., Ashrafudoulla, M., Rahman, M. M., Balusamy, S. R., and Akter, S. (2022). Green synthesis and potential antibacterial applications of bioactive silver nanoparticles: A review. *Polymers*, 14 (4), 742.
- [3] Lekha, D. C., Shanmugam, R., Madhuri, K., Dwarampudi, L. P., Bhaskaran, M., Kongara, D., Tesfaye, J. L., Nagaprasad, N., Bhargavi, V. L. N., and Krishnaraj, R. (2021). Review on silver nanoparticle synthesis method, antibacterial activity, drug delivery vehicles, and toxicity pathways: Recent advances and future aspects. *Journal of Nanomaterials*, 11, 4401829.
- [4] Bruna, T., Maldonado-Bravo, F., Jara, P., and Caro, N. (2021). Silver nanoparticles and their antibacterial applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (13), 7202.
- [5] Ferdous, Z., and Nemmar, A. (2020). Health impact of silver nanoparticles: A review of the biodistribution and toxicity following various routes of exposure. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 2375.

- [6] Mijndonckx, K., Leys, N., Mahillon, J., Silver, S., and Van Houdt, R. (2013). Antimicrobial silver: Uses, toxicity and potential for resistance. *BioMetals*, 26(4), 609-621.
- [7] Mikiciuk, J., Mikiciuk, E., Wrońska, A., and Szterk, A. (2016). Antimicrobial potential of commercial silver nanoparticles and the characterization of their physical properties toward probiotic bacteria isolated from fermented milk products. *Journal of Environmental Science and Health-Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 51(4), 222-229.
- [8] Ying, S., Guan, Z., Ofoegbu, P. C., Clubb, P., Rico, C., He, F., and Hong, J. (2022). Green synthesis of nanoparticles: Current developments and limitations. *Environmental Technology and Innovation*, 26, 102336.
- [9] Phan, T. T. V., Phan, D. T., Cao, X. T., Huynh, T. C., and Oh, J. (2021). Roles of chitosan in green synthesis of metal nanoparticles for biomedical applications. *Nanomaterials*, 11(2), 1-15.
- [10] Venkatesham, M., Ayodhya, D., Madhusudhan, A., Veera Babu, N., and Veerabhadram, G. (2014). A novel green one-step synthesis of silver nanoparticles using chitosan: Catalytic activity and antimicrobial studies. *Applied Nanoscience*, 4(1), 113-119.
- [11] Biao, L., Tan, S., Wang, Y., Guo, X., Fu, Y., Xu, F., Zu, Y., and Liu, Z. (2017). Synthesis, characterization and antibacterial study on the chitosan-functionalized Ag nanoparticles. *Materials science & engineering. C, Materials for Biological Applications*, 76, 73-80.
- [12] Wongpreecha, J., Polpanich, D., Suteewong, T., Kaewsaneha, C., and Tangboriboonrat, P. (2018). One-pot, large-scale green synthesis of silver nanoparticles-chitosan with enhanced antibacterial activity and low cytotoxicity. *Carbohydrate Polymers*, 199, 641-648.
- [13] Hileuskaya, K. S., Mashkin, M. E., Kraskouski, A. N., Kabanava, V. S., Stepanova, E. A., Kuzminski, I. I., Kulikouskaya, V. I., and Agabekov, V. E. (2021). Hydrothermal synthesis and properties of chitosan-silver nanocomposites. *Russian Journal of Inorganic Chemistry*, 66(8), 1128-1134.
- [14] Mirajkar, S., Rathod, P., Pawar, B., Penna, S., and Dalvi, S. (2021). γ -Irradiated chitosan mediates enhanced synthesis and antimicrobial properties of chitosan-silver (Ag) nanocomposites. *ACS Omega*, 6(50), 34812-34822.
- [15] Collins, C. H., Lyne, P. M., and Grange, J. M. (1995). *Microbiological Methods* (7th bs). Oxford, United Kingdom: Butterworth-Heinemann Ltd., 168-185.
- [16] Alharbi, N. S., Alsubhi, N. S., and Felimban, A. I. (2022). Green synthesis of silver nanoparticles using medicinal plants: Characterization and application. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 15(3), 109-124.
- [17] Meng, Y. (2015). A sustainable approach to fabricating Ag nanoparticles/PVA hybrid nanofiber and its catalytic activity. *Nanomaterials*, 5, 1124-1135.
- [18] Patil, R. B., and Chougale, A. D. (2021). Analytical methods for the identification and characterization of silver nanoparticles: A brief review. *Materials Today: Proceedings*, 47, 5520-5532.
- [19] Olenin, A. Y. (2020). Changes in spectral properties of aqueous silver sols induced by complexation on the surface of nanoparticles. *Russian Journal of Inorganic Chemistry*, 65(4), 581-586.
- [20] Rafiuddin, Z. Z. (2012). Silver nanoparticles to self-assembled films: Green synthesis and characterization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90(1), 48-52.
- [21] Jiang, X. C., Chen, W. M., Chen, C. Y., Xiong, S. X., and Yu, A. B. (2011). Role of temperature in the growth of silver nanoparticles through a synergetic reduction approach. *Nanoscale Research Letters*, 6, 32.
- [22] Nate, Z., Moloto, M. J., Mubiayi, P. K., and Sibiya, P. N. (2018). Green synthesis of chitosan capped silver nanoparticles and their antimicrobial activity. *MRS Advances*, 3(42-43), 2505-2517.
- [23] Wang, Y., and Wei, S. (2022). Green fabrication of bioactive silver nanoparticles using *Mentha pulegium* extract under alkaline: An enhanced anticancer activity. *ACS Omega*, 7(1), 1494-1504.
- [24] Urnukhsaikhan, E., Bold, B. E., Gunbileg, A., Sukhbaatar, N., and Mishig-Ochir, T. (2021). Antibacterial activity and characteristics of silver nanoparticles biosynthesized from *Carduus crispus*. *Scientific Reports*, 11(1), 1-12.
- [25] Elamawi, R. M., Al-Harbi, R. E., and Hendi, A. A. (2018). Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Trichoderma longibrachiatum* and their effect on phytopathogenic fungi. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28(1), 28.
- [26] Kalaivani, R., Maruthupandy, M., Muneeswaran, T., Hameedha Beevi, A., Anand, M., Ramakritinan, C. M., and Kumaraguru, A. K. (2018). Synthesis of chitosan mediated silver nanoparticles (Ag NPs) for potential antimicrobial applications. *Frontiers in Laboratory Medicine*, 2(1), 30-35.
- [27] Canama, G. J. C., Delco, M. C. L., Talandron, R. A., and Tan, N. P. (2023). Synthesis of chitosan-silver nanocomposite and its evaluation as an antibacterial coating for mobile phone glass protectors. *ACS Omega*, 8(20), 17699-17711.
- [28] Phan, T. T. V., Nguyen, V. T., Ahn, S. H., and Oh, J. (2019). Chitosan-mediated facile green synthesis of size-controllable gold nanostars for effective photothermal therapy and photoacoustic imaging. *European Polymer Journal*, 118, 492-501.
- [29] Phan, T. T. V., Hoang, G., Nguyen, V. T., Nguyen, T. P., Kim, H. H., Mondal, S., Manivasagan, P., Moorthy, M. S., Lee, K. D., and Junghwan, O. (2019). Chitosan as a stabilizer and size-control agent for synthesis of porous flower-shaped palladium nanoparticles and their applications on photo-based therapies. *Carbohydrate Polymers*, 205, 340-352.

- [30] Phan, T. T. V., Phan, D. T., Cao, X. T., Huynh, T. C., and Oh, J. (2021). Roles of chitosan in green synthesis of metal nanoparticles for biomedical applications. *Nanomaterials*, 11(2), 273.
- [31] Chettri, P., Vendamani, V. S., Tripathi, A., Singh, M. K., Pathak, A. P., and Tiwari, A. (2017). Green synthesis of silver nanoparticle-reduced graphene oxide using *Psidium guajava* and its application in SERS for the detection of methylene blue. *Applied Surface Science*, 406, 312-318.
- [32] Khan, M. A. M., Kumar, S., Ahamed, M., Alrokayan, S. A., and AlSalhi, M. S. (2011). Structural and thermal studies of silver nanoparticles and electrical transport study of their thin films. *Nanoscale Research Letters*, 6(1), 1-8.
- [33] Paul, B., Bhuyan, B., Purkayastha, D. D., and Dhar, S. S. (2016). Photocatalytic and antibacterial activities of gold and silver nanoparticles synthesized using biomass of *Parkia roxburghii* leaf. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 154, 1-7.
- [34] Xing, Y., Liao, X., Liu, X., Li, W., Huang, R., Tang, J., Xu, Q., Li, X., and Yu, J. (2021). Characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized with the peel extract of mango. *Materials*, 14(19), 5878.
- [35] Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Akbar Ashkarran, A., Jimenez de Aberasturi, D., Larramendi, I. R. de, Rojo, T., Serpooshan, V., Parak, W. J., and Mahmoudi, M. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 30(10), 499-511.
- [36] Agnihotri, S., Mukherji, S., and Mukherji, S. (2013). Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Advances*, 4(8), 3974-3983.
- [37] Korshed, P., Li, L., Liu, Z., Mironov, A., and Wang, T. (2019). Size-dependent antibacterial activity for laser-generated silver nanoparticles. *Journal of Interdisciplinary Nanomedicine*, 4(1), 24-33.