



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HALOFİLİK ARKELERLE SENTEZİ YAPILAN GÜMÜŞ
NANOPARTİKÜLÜNÜN KARAKTERİZASYONU**

SUPHİ TOHOĞLU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HATAY
OCAK - 2023**



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HALOFİLİK ARKELERLE SENTEZİ YAPILAN GÜMÜŞ
NANOPARTİKÜLÜNÜN KARAKTERİZASYONU**

SUPHİ TOHOĞLU
ORCID:0000-0002-2994-9653

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Danışman
Prof. Dr. Birgül ÖZCAN
ORCID: 0000-0001-9003-8480

HATAY
OCAK - 2023

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HALOFİLİK ARKELERLE SENTEZİ YAPILAN GÜMÜŞ
NANOPARTİKÜLÜNÜN KARAKTERİZASYONU**

SUPHİ TOHOĞLU
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Birgül ÖZCAN danışmanlığında hazırlanan bu tez **17/01/2023** tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **OYBİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Birgül ÖZCAN
Başkan

Prof. Dr. Ali Tuncay ÖZYILMAZ
Üye

Doç. Dr. Muhsin AYDIN
Üye

Kod No:1437

Doç. Dr. Cengiz KARACA
Enstitü Müdürü

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 21.YL.003

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

17/01/2023

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

Suphi TOHOĞLU

ÖZET

HALOFİLİK ARKELERLE SENTEZİ YAPILAN GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLÜNÜN KARAKTERİZASYONU

Optimum üremeleri için genellikle yüksek konsantrasyonda (150–200 g/l üzerinde) NaCl'e ihtiyaç duyan halofilik arkeler çeşitli biyoteknolojik uygulamalar yönünden geniş bir potansiyele sahiptir. Nanomalzemelerin biyojenik sentezi, üretim açısından yeşil ve daha çevre dostu bir yöntem sağlaması nedeniyle nanoteknoloji alanında büyük ilgi görmektedir. Bu çalışmada 5 farklı halofilik arke suşu (A235, A212, B65, CHB1 ve F75A) ile yüksek tuzlu kompleks ortamda üretilen gümüş nanopartiküllerinin karakterizasyonu amaçlanmıştır. Nanopartiküllerin kimyasal karakterizasyonu XRD, SEM/EDX ve DLS yöntemleri ile belirlenmiştir ve biyolojik aktiviteleri amacıyla antibakteriyel etkinlikleri çalışılmıştır. Haloarkeal gümüş nanopartiküllerin XRD analizi ile kristalit alan boyutlarının, karakteristik Bragg piki gözlenen 111 düzleminde 6.3-24 nm arasında ve yüzey merkezli kübik yapıda olduğu belirlenmiştir. Hücre içi sentezlenen gümüş nanopartiküllerinin küresel formda olduğu ve analizi yapılan preparat içerisinde %78.7-94.2 arasında değişen ağırlıklarda yer aldığı SEM/EDX ile tespit edilmiştir. DLS analizleriyle partikül boyutlarının yaklaşık olarak 31.05-190.07 nm arasında değiştiği bulunmuştur. Disk difüzyon yöntemiyle herhangi bir antibakteriyel etki saptanmamıştır. Bu çalışma ile yüksek ticari potansiyele sahip gümüş nanopartiküllerinin yüksek tuzlu ortamlarda gelişen halofilik arkelerle üretilebileceği ortaya konulmuştur.

2023, 40 sayfa

Anahtar Kelimeler: Halofilik arke, gümüş nanopartikülü, XRD, SEM-EDS, DLS antibakteriyel aktivite

ABSTRACT

CHARACTERIZATION of SILVER NANOPARTICLES SYNTHESIZED by HALOPHILIC ARCHAEA

Halophilic archaea, which generally require high concentrations of NaCl (over 150–200 g/l) for optimum their growth, have a wide potential for different biotechnological applications. Biogenic synthesis of nanomaterials is of great interest in the field of nanotechnology, as it provides a green and more environmentally friendly method of production. In this study, it was aimed to characterize the silver nanoparticles synthesised at complex medium with high salt by 5 different strains (A235, A212, B65, CHB1 and F75A) of halophilic archaea. Chemical characterization of nanoparticles was determined by XRD, SEM/EDX and DLS methods and antibacterial activities were studied for biological activities. By XRD analysis of haloarchaeal silver nanoparticles, it was shown that the crystallite area sizes in the 111 plane, where the characteristic Bragg peak is observed, are between 6.3-24 nm and that they have a face-centered cubic structure. It was determined by SEM/EDX that the intracellularly synthesized silver nanoparticles were in spherical form and were in weights varying between 78.7-94.2% in the analyzed preparation. Particle sizes were found to vary between approximately 31.05-190.07 nm by DLS analysis. No antibacterial effect was detected by the disc diffusion method. With this study, it has been demonstrated that silver nanoparticles with high commercial potential can be produced by halophilic archaea growing in high salt environments.

2023, 40 pages

Key Words: Halophilic archaea, silver nanoparticle, XRD, SEM-EDS, DLS, antibacterial activity

TEŞEKKÜR

Tez çalışmasının her aşamasında yardım, bilgi, tecrübe ve desteğini esirgmeden sunarak her konuda beni yönlendiren danışman hocam sayın Prof. Dr. Birgül ÖZCAN'a,

Çalışmalar esnasında fikir ve önerileri ile katkıda bulunan HMKÜ Kimya bölümü öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Ali Tuncay ÖZYILMAZ'a, kimyasal karakterizasyon çalışmalarında destek olan Çankırı Karatekin Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Öğretim Görevlisi İbrahim FİLAZİ'ye,

Laboratuvar çalışmaları esnasında yapmış olduğu katkı ve yardımları nedeniyle Eren BİÇER'e ve manevi anlamda motivasyonumu sürekli yüksek tutmamı sağlayan Erdal KARATEKE'ye, Rahime OKÇU'ya,

Eğitim hayatım boyunca beni maddi ve manevi olarak destekleyen, güvenen ve daima yanımda olan eşim Yeliz ERGÜN TOHOĞLU, kızlarım Ada TOHOĞLU, Öykü TOHOĞLU, annem Vedia TOHOĞLU, babam Edip TOHOĞLU, kardeşlerim Fatma KORMAZ ve Cemile HARNUBOĞLU ve kuzenim Barış TAHAOĞLU'na,

Tezin uygulama aşamasında 21.YL.003 no'lu proje ile vermiş oldukları maddi ve manevi destekten dolayı, HMKÜ BAP birimine teşekkür ederim.

Sevgili annem ve babamın aziz hatıralarına saygıyla...

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	VII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	11
3.1. Materyal.....	11
3.1.1. Kimyasallar ve Cihazlar	11
3.1.2. Halofilik Arkeler, Bakteriler ve Üretim Ortamları	11
3.2. Yöntem	11
3.2.1. Halofilik Arke İzolatlarının Kültürü.....	11
3.2.2. Gümüş Nanopartikül Üretimi	12
3.2.3. Gümüş Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu	12
3.2.3.1. Kristalografik Karakterizasyon	12
3.2.3.2. Taramalı Elektron Mikroskobu-EDX (SEM-EDX) Analizi	12
3.2.3.3. Nanopartikül Boyut ve Dağılım Analizi (Dinamik ışık saçılım spektroskopisi)	13
3.2.4. Gümüş Nanopartiküllerin Antibakteriyel Etkisinin Belirlenmesi	13
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	15
4.1. Haloarkeal Gümüş Nanopartiküllerinin X-Işını Kırınım (XRD) Analizi Sonuçları ..	15
4.2. Taramalı Elektron Mikroskobu- Enerji Dağılımlı X Işını Spektroskopisi (SEM-EDS) Analizi Sonuçları	18
4.3. Nanopartikül Boyut ve Dağılım Analizi (DLS) Sonuçları	25
4.4. Gümüş Nanopartiküllerinin Antibakteriyel Etkinliği	29
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	31
KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 5.1. Halofilik arke izolatları ile üretilen gümüş nanopartiküllerinin kütlece miktarı.....	32
--	----



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. A235 izolatının sentezlediği hücre içi gümüş nanopartiküllerinin XRD spektrumu.....	15
Şekil 4.2. A212 izolatının sentezlediği hücre içi gümüş nanopartiküllerinin XRD spektrumu.....	16
Şekil 4.3. B65 izolatının sentezlediği hücre içi gümüş nanopartiküllerinin XRD spektrumu.....	16
Şekil 4.4. CHB1 izolatının sentezlediği hücre içi gümüş nanopartiküllerinin XRD spektrumu.....	17
Şekil 4.5. F75A izolatının sentezlediği hücre içi gümüş nanopartiküllerinin XRD spektrumu.....	18
Şekil 4.6. A235 izolatının sentezlediği hücre içi gümüş nanopartiküllerinin (a) SEM görüntüsü, (b) EDS yüzey haritası, (c) Yüzey elementel kompozisyon spektrumları.....	19
Şekil 4.7. A212 izolatının sentezlediği hücre içi gümüş nanopartiküllerinin (a) SEM görüntüsü, (b) EDS yüzey haritası, (c) Yüzey elementel kompozisyon spektrumları.....	20
Şekil 4.8. B65 izolatının sentezlediği hücre içi gümüş nanopartiküllerinin (a) SEM görüntüsü, (b) EDS yüzey haritası, (c) Yüzey elementel kompozisyon spektrumları.....	21
Şekil 4.9. CHB1 izolatının sentezlediği hücre içi gümüş nanopartiküllerinin (a) SEM görüntüsü, (b) EDS yüzey haritası, (c) Yüzey elementel kompozisyon spektrumları.....	22
Şekil 4.10. F75A izolatının sentezlediği hücre içi gümüş nanopartiküllerinin (a) SEM görüntüsü, (b) EDS yüzey haritası, (c) Yüzey elementel kompozisyon spektrumları.....	23
Şekil 1.11. A235, A212, B65, CHB1 ve F75A izolatlarının SG ortamında sentezlediği hücre içi gümüş nanopartiküllerinin SEM mikrografları (A235, A212 ve B65 için Büyütme X30000, CHB1 ve F75A için X50000).....	24
Şekil 1.12. A235 suşu ile üretilen Ag nanopartiküllerin boyutuna göre % dağılımı (DLS).....	26
Şekil 1.13. A212 suşu ile üretilen Ag nanopartiküllerin boyutuna göre % dağılımı (DLS).....	26
Şekil 1.14. B65 suşu ile üretilen Ag nanopartiküllerin boyutuna göre % dağılımı (DLS).....	27
Şekil 1.15. CHB1 suşu ile üretilen Ag nanopartiküllerin boyutuna göre % dağılımı (DLS).....	28
Şekil 1.16. F75A suşu ile üretilen Ag nanopartiküllerin boyutuna göre % dağılımı (DLS).....	28
Şekil 1.17. Gümüş nanopartiküllerinin agar disk difüzyon görüntüsü, a; <i>Escherichia coli</i> , b: <i>Enterococcus faecalis</i> (St.; standart antibiyotik diskleri).....	30

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

A°	: angström
°C	: derece Celsius
g	: gram
keV	: klielektron volt
kob	: koloni oluşturan birim
kV	: kilo volt
L	: litre
mA	: mili amper
mL	: mililitre
mM	: milimolar
µg	: mikrogram
rpm	: rotation per minute (dakikadaki dönme sayısı)

KISALTMALAR

EDX/EDS	: enerji dağılımlı x ışını spektroskopisi
SEM	: taramalı elektron mikroskobu
ICDD	: uluslararası kırınım veri merkezi
OD	: optik dansite (yoğunluk)
SG	: Sehgal-Gibbons
TEM	: geçirmeli elektron mikroskobu
XRD	: x ışını difraktometresi

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji, elementleri nano ölçekte (1–1000 nm) ele alan ve geliştirmekte olan bir bilimdir. Nanomalzemeler, bulk halindeki örneklerine göre, yüksek yüzey/hacim oranı ve bazı fizikokimyasal özellikler yönünden kuantum etkilerinin düzenlenebilmesi gibi benzersiz özelliklere sahiptirler (Jeevanandam ve ark., 2018). Gıda, elektronik, ilaç, yakıt, kimyasal, polimer, çevre sağlığı dahil olmak üzere daha pek çok çeşitli endüstriyel alanda nanomalzemelerin kullanımı artarak devam etmektedir (Duran ve ark., 2011; Singh ve ark., 2011). Günümüzde kullanımları kaçınılmaz hale geldiği için özellikle gümüş, altın, platin, titanyum, paladyum, demir, alüminyum ve bakır metalik nanopartiküllerine ilgi giderek artmaktadır (Ahmed ve ark., 2016).

Bileşiklerin bulk (düzenli) ölçekten nano boyuta dönüştürülmesi, nanomateryallerin nanoteknolojide uygulanmasındaki ilk aşamadır (Abdollahnia ve ark., 2020). Genel olarak, nanopartiküllerin sentezlerinde "aşağıdan yukarıya" veya "yukarıdan aşağıya" olmak üzere iki yaklaşım bulunmaktadır. Aşağıdan yukarıya yaklaşımı, nanopartiküllerin kimyasal (kimyasal indirgeme) ve biyolojik yöntemlerle (mikroorganizma ve bitkiler vb.) üretilmesini kapsamaktadır. Bu aşamada atomlar, nano ölçekli bir parçacığa dönüşen yeni çekirdekleri oluşturmak üzere kendiliğinden bir araya gelmektedir (Ahmed ve ark., 2016). Yukarıdan aşağıya yaklaşımda ise bulk materyal, öğütme, püskürtme, termal/lazerle kesme, çeşitli litografik teknikler veya kimyasal aşındırma ile boyutu azaltılarak daha küçük partiküllere dönüştürülmektedir. Nanopartikül sentezinde kullanılan çeşitli fiziko-kimyasal yöntemler, pahalı olmaları ve üretilen nanopartiküllerin yüksek kümelenme (aglomerasyon) eğilimine sahip olmalarının yanı sıra toksik kimyasallar kullanılması nedeniyle de tehlikeli olup büyük biyolojik risklere sahiptirler (Singh ve ark., 2018; Patra ve ark., 2014; Ahmed ve ark., 2016b, c; Baruwati ve ark., 2009; Ikram ve ark., 2015).

Aşağıdan yukarıya yaklaşımın kimyasal sentez kısmında, sol-jel işlemleri, kimyasal buhar biriktirme, sprey piroliz, lazer piroliz ve atomik/moleküler yoğunlaştırma ve aerosol işlemleri gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemde nanopartiküllerin boyut ve şekil gibi morfolojik parametreleri, kullanılan kimyasalların konsantrasyonu ve reaksiyon koşulları (sıcaklık ve pH gibi) değiştirilerek ayarlanabilmektedir. Ancak kimyasal yöntemle sentezlenen nanomateryaller özel bir amaç ya da bir uygulamada

kullanılabilme yönünden çeşitli sınırlamalara sahip olabilmektedirler; uygun koşulların bulunmadığı ortamlardaki stabiliteleri, nanopartiküllerin temel mekanizma ve modelleme faktörlerinin tam olarak bilinmemesi, biyobirikim/toksisite özellikleri, ayrıntılı analiz işlemi gerektirmeleri, donanımlı personel ihtiyacı ve geri dönüşüm/tekrar kullanım/rejenerasyon gibi (Singh ve ark., 2018).

Nanopartikül sentezlemek için canlı organizma veya ürünlerinin kullanıldığı aşağıdan yukarıya “yeşil sentez” yaklaşımı günümüzde büyük ilgi görmektedir. Biyo-temelli yaklaşım olan yeşil sentez, diğer tekniklerin yarattığı sınırlamalara sahip olmayıp yüksek verim ve çevreyle uyumlu olma avantajlara ve aynı zamanda malzeme bilimi ve teknolojisi alanına önemli katkılar sunma potansiyeline sahiptir. Ayrıca yeşil sentez nanopartikül üretimi, atık oluşumunu önlemekte ya da en aza indirmekte, yan ürün çıkışı ya da kirliliği azaltmakta, daha güvenli veya toksik olmayan çözücü veya yardımcı maddeler ve yenilenebilir hammaddelerin kullanımına olanak sağlamaktadır. Biyolojik yolla nanopartiküllerin yeşil sentezi, çeşitli mikroorganizma ve bunların enzimlerinin ve bitki ekstrakt ya da izolatu gibi bitkisel ürünlerin kullanılması temeline dayanmaktadır (Singh ve ark., 2018 ve 2020; Jamkhande ve ark., 2019).

Doğal biyojenik metalik nanopartikül sentezi iki şekilde gerçekleşmektedir; metal iyonlarının, mikroorganizma ve enzimleri aracılığıyla kimyasal olarak kararlı forma indirgendikleri biyoredüksiyondur. Bu yöntemde oluşan metalik nanoyapılar, kompleks ortamdan güvenli bir şekilde ayrılacak düzeyde kararlı ve inert yapıdadırlar (Karnani ve ark., 2013; Pantidos ve ark., 2014). İkincisi ise, sulu ortamdaki metal katyonların hücre duvarına bağlanarak duvar ve peptitlerle etkileşimi ile kararlı nanopartiküllerin oluşturulduğu biyosorpsiyondur (Yong ve ark., 2002; Pantidos ve ark., 2014).

Çeşitli habitatlarda üreme yönünden doğal bir yeteneğe sahip olan mikroorganizmalar hızlı çoğalırlar ve üretilmeleri kolaydır. Mikroplar yüksek metal konsantrasyonlarına adapte olabilmekte ve hücre dışı veya hücre içi yollarla inorganik maddeleri nanopartiküllere indirgeyebilmektedirler. Mikroplar, ortamlarında bulunan metal iyonlarını absorblayarak enzimatik indirgeme yoluyla elementel forma dönüştürürler. Ayrıca, mikroorganizmalar tarafından sentezlenen nanopartiküller üretildikleri esnada yine mikroplar tarafından üretilen stabilize edici hücresel metabolitlerle de kapatılarak aşınmaya ve oksitlenmeye karşı kararlı yapılarını korumaktadırlar (Capping) (Costa ve ark., 2020; Koul ve ark., 2021).

Biyojenik nanopartikül sentezi, organizmanın yapısı ve metabolik aktivitesine bağlı olarak hücre dışı veya hücre içi bir süreçle gerçekleşmektedir. Hücre dışı üretimde, kültür ortamındaki mikroorganizma hücreleri ayrıldıktan sonra geriye kalan ve mikrobiyal enzimlerin (redüktazlar) bulunduğu ekstraselüler ortam nanopartikül üretiminde kullanılır. Metal iyonlarından hücresiz bir ortamda enzimatik olarak nanopartikül oluşması sağlanmaktadır. Hücre içi üretimde nanopartikül sentezi için mikrobiyal hücrelerin hücresel mekanizması kullanılır. Hücre içi işlem sırasında metal iyonları mikrobiyal hücreler tarafından absorblanır ve hücresel enzimlerle metal iyonları hücre içinde nanopartiküllere dönüştürülür. Ayrıca kültür ortamından ayrılan biyokütle ile metal iyonu birleştirilerek de nanopartikül üretilmektedir. Pozitif yüklü metal iyonları negatif yüke sahip hücre zarfında (duvar) tutulur ve enzimler aracılığıyla nanopartikül forma redüklenir. Enzimlerle biyoredüksiyon sonrası hücre duvarında nanokümeler halinde oluşan nanopartiküller çözelti ortamına difüze olmaktadır (Das ve ark., 2014; Yadav ve ark., 2015; Al-Dhabi ve ark., 2018; Marooufpour ve ark., 2019; Kalabegishvili ve ark., 2012). Hücre içi veya dışı yolla sentezlenen nanopartiküllerin morfolojisi, benzerlikleri ve etkileşimleri XRD (X-ışını kırınımı), SEM (taramalı elektron mikroskobu), TEM (transmisyon elektron mikroskobu) ve FTIR (Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi) aracılığıyla belirlenmektedir (Jevaaan ve ark., 2012).

Düşük maliyetli ve çevre dostu metalik nanopartikül üretiminde çeşitli bakteri, mantar, alg ve bitki türleri kullanılmıştır (Gour ve Jain, 2019; Gahlawat ve Choudhury 2019). Prokaryotik arkeal nanopartikül sentezi daha az çalışılmıştır (Beeler ve Singh 2016).

Woese ve arkadaşları yaşamı moleküler datalar üzerinden üç domain'e ayırmıştır: *Eukarya*, *Bacteria* ve *Archaea*. Başlarda *Archaea* domaininin, ekstrem çevresel nişlerle sınırlı olduğu kabul ediliyordu, ancak devam eden araştırmalar bu domain üyelerinin toprak, deniz suyu ve insan bedeni gibi beklenmedik ortamlarda da mevcut olduğunu göstermiştir. Yaşam Ağacı'nın arkeal dalındaki büyüme hızla devam etmektedir. Günümüzde *Archaea* üyelerinin biyosferde önemli rollere sahip olduğu kabul edilmektedir. Dünyadaki biyokütlenin önemli bir bölümünü oluşturmalarına rağmen, büyük bir kısmı henüz keşfedilmemiş durumdadır (Woese ve ark., 1990; Antunes ve ark.,). Arkeler, dünyadaki hemen hemen her ortamda yaşamakta ve bazı üyeleri aşırı çevre koşullarında hayatta kalmak için adapte olmuştur (Rampelotto, 2013).

Archaea domaini, *Euryarchaeota* filumu, *Halobacteria* sınıfı içerisinde yer alan halofilik arkeler, yaşamak için en fazla tuza ihtiyaç duyan ve en yüksek tuz konsantrasyonlarına dayanabilen mikroorganizmalardır.

Halofilik arkeler denizel veya denizel olmayan tuzlu su, tuz gölü ve tuzlu toprak gibi yüksek oranda tuz içeren ortamlarda yaşarlar. Dünya genelinde yaygın olarak bulunurlar ve optimum üremeleri için en az %15 (2,5 mol/L) tuz konsantrasyonuna ihtiyaç duyarlar. Hatta haloarkeal türlerin büyük bir kısmı doygun (~%35, 6 mol/L) tuz konsantrasyonlarında üreyebilmektedir (Cui ve Dyll-Smith, 2021, Oren, 2014; Oren ve ark., 2009). Yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşamaya adapte olmuş halofilik arkeler, fosil bazlı polimerlerin yerini alma potansiyeline sahip biyo-polyester (polihidroksi alkonatlar) üretimi, klinik ve farmasötik öneme sahip gaz vezikülü üretimi, yapay retina protezleri, optik bellekler, holografik işlemci ve biyosensör geliştirilmesi alanında gibi çok sayıda teknik uygulamaya ilham kaynağı olmuş bakteriyorodopsin üretimi, farmasötik, gıda veya kozmetik endüstrisinde yaygın kullanılan likopen, beta karoten gibi ürünlerin üretimi, günümüzde endüstriyel süreçlerin ve araştırmaların hayati bileşenleri haline gelen ve gelecekte daha da büyük bir rol oynayacak enzimlerin üretimi gibi pek çok biyoteknolojik uygulama için potansiyel organizmalardır (Pfeifer ve ark., 2021). Sonuç olarak, haloarkeal hücreler ya da bileşenleri bilinen ve yaygın bulunan diğer prokaryotlar için uygun olmayan koşullarda biyopolimer, hidrolitik enzim, biyosüpfaktan, biyoyakıt üretimi, biyoremediasyon ve metalik nanopartikül üretimi gibi biyoteknolojik işlemlerde kullanım potansiyeline sahiptirler (Srivastava ve Kowshik, 2015, Abdollahnia 2020).

Halofilik arkeler, hücre içi enzimatik indirgeme yöntemiyle metallerin oksidasyon düzeyini değiştirerek ya da hücre dışında tutarak yüksek konsantrasyonlardaki ağır metal ve metaloidleri tolere ve detoksifiye etme yeteneğine sahiptirler. Bu detoksifikasyon işlemleri sırasında metalik iyonları nanopartiküllere dönüştürebilmektedirler. (Buda ve ark., 2019, Bini, 2010; Voica ve ark., 2016). Ancak halofilik arkelerin metalik nanopartikül sentezi ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bunlar arasında gümüş, selenyum, tellür, altın, çinko, krom ve nikel yer almaktadır (Buda ve ark., 2019; Patil ve ark., 2014, Costa ve ark., 2020, Abdollahnia ve ark., 2020, Srivastava ve ark., 2013, 2014 ve 2015; Das ve ark., 2014; Nagar ve ark., 2022; Can 2021).

Gümüş, kendine özgü fiziko-kimyasal özellikleri nedeniyle en önemli nanopartiküllerden biridir. Sulu çözeltide bulunan gümüş iyonları mikroorganizmalar tarafından biyolojik olarak koloidal gümüşe indirgenmektedir. Bu süreçte Ag^+ önce metalik gümüş atomlarına indirgenmekte ardından oligomerik kümeler halinde Ag^0 oluşmaktadır. Son aşamada ise bu kümeler gümüş nanopartiküllerine dönüştürülmektedir. Yüksek düzeyde kimyasal ve termal stabilite göstermesi, maliyetinin düşük olması, çevre dostu özelliğe sahip olması ve tıbbi uygulama potansiyeline sahip olması nedeniyle günümüzde biyolojik gümüş nanopartikülü sentezine olan ilgiyi arttırmıştır (Arul ve ark., 2017; Valodkar ve ark., 2010; Sharma ve ark. 2009). Gümüş nanopartiküllerinin biyolojik özellikleri uzun süreden beri bilinmektedir ve bilinen tüm antibakteriyel nanopartiküller arasında en yüksek bakterisit aktiviteye ve biyoyumluluğa sahiptir. Gümüş bileşikleri, bakteriyel hücresel proteinlerin çökmesini sağlayarak ve mikrobiyal solunum zincir sistemini bloke ederek hem aerobik hem de anaerobik bakterilere karşı etkili olmaktadır. Yapılan çalışmalar boyutu küçülerek nano boyuta ulaşan gümüşün antimikrobiyal aktivitesinin arttığını göstermiştir (Chudsama ve ark., 2010; Abbasi ve ark., 2016).

Sağlık alanında, mevcut antibiyotiklere karşı dirençli bakteri suşlarının gelişmesi sorunu yeni bakterisit ajanların bulunmasını teşvik etmektedir. Elemental gümüş ve gümüş tuzları, on yıllardır tedavi edici ve önleyici sağlık hizmetlerinde antimikrobiyal ajan olarak kullanılmıştır ve kullanılmaya devam etmektedir. Gümüş iyonlarının, membranda bulunan kükürtlü proteinler, DNA gibi fosfor içeren bileşiklerle etkileşime girerek bu moleküllerin işlevlerini ve replikasyonu engellediği, ATP üretimine giren bazı hücresel proteinlerin ve enzimleri inaktive etmesinin yanı sıra ribozomal proteinlerin ekspresyonunu engellediği bildirilmiştir. Bununla birlikte, gümüş nanopartiküllerin bakterisidal etkilerinin mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Gümüş nanopartiküllerinin bakteri membran bileşenleri ile etkileşime girdikten sonra membranda yapısal değişikliklere ve hasara neden olarak hücre ölümüne yol açtığı belirtilmiştir (Kyriacou ve ark., 2004; Panacek ve ark., 2006; Pal ve ark. 2007). Ayrıca mikroorganizmaların, geleneksel ve dar hedefli antibiyotiklerde olduğu gibi gümüşe karşı direnç geliştirme olasılığının düşük olduğu da kabul edilmektedir. Çünkü metaller organizmalarda farklı ve çok sayıda hedefe atak yapmaktadır, bu da mikropların kendilerini korumak için aynı anda bir dizi mutasyon geçirme zorunluluğu anlamına gelmektedir (Chudsama ve ark., 2010 ve Pal ve ark. 2007).

Tez çalışması ile Türkiye'nin farklı tuzlu alanlarından izole edilmiş 5 farklı halofilik arke suşu ile kompleks yüksek tuzlu ortamda gümüş nanopartikülleri sentezlenmiş ve üretilen nanopartiküllerin kimyasal karakterizasyonları yapılarak antibakteriyel etkinliklerinin bulunup bulunmadığı belirlenmiştir.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Virüsler dahil olmak üzere çeşitli bakteri, maya, mantar ve alg türü, çeşitli metalik, metal sülfür, metal oksit ve alaşım nanopartiküllerinin üretiminde kullanılmıştır. Mikroorganizmalarda metalik nanopartikül sentezi, organizmanın doğasına ve metabolik aktivitesine bağlı olarak hücre içi veya hücre dışı bir süreçle gerçekleşmektedir.

Halofilik arkeler de diğer halofilik yada nonhalofilik diğer mikroorganizmalar gibi doğal ortamlarında metallerle karşılaşmaktadır (Srivastava ve Koswhik, 2015). Ancak bu organizmaların metal toleransı ve nanaopartikül sentezi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

Srivastava ve ark. (2013) çalışmalarında gümüş nitrat (AgNO_3 , 0,5 mM) bulunan yüksek tuzlu kompleks besiyerinde üretilen *Halococcus salifodinae* BK3 suşunda metal toleransı, gümüş redüksiyonu ve nanopartikül üretimini gerçekleştirmiş ve çalışma sonucunda, kararlı yapıda, çoğunlukla küresel formda hücre içi gümüş nanopartiküllerinin sentezlendiğini bildirmiştir. Gümüş nitrata adaptasyonun yapıldığı çalışmada kontroldekine benzer üreme kinetiğinin bulunduğu, metal konsantrasyonunun artışına bağlı olarak NADH bağımlı nitrat redüktaz aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Nitrat redüktazın, gümüş toleransının sağlanmasında, ingümüşün indirgenmesinde ve nanopartikül sentezinde rolü olduğu rapor edilmiştir. Üretilen gümüş nanopartikülleri spektroskopi, XRD, TEM ve EDAX kullanılarak karakterize edilmiş ve TEM analizleri sonucu kompleks ortamda üretilen gümüş nanopartikül boyutunun ortalama 50,3 nm olduğu bildirilmiştir.

Srivastava ve ark. (2014) *Halococcus salifodinae* BK6 suşu ile yaptıkları diğer bir çalışmada da yine iozlatın gümüş nitrata adaptasyonu yapılarak gümüş nanopartikülü üretilmiştir. Ultraviyole ve görünür ışık (UV-Vis) absorpsiyon spektroskopisi, XRD, TEM ve EDAX ile nanopartiküller karakterize edilmiş ve kompleks besiyerinde sentezlenen nanopartiküllerin ortalama boyutunun 50,3 nm ve kübik formda olduğu belirlenmiştir. Ayrıca gümüş nanopartiküllerinin agar disk difüzyon yöntemi ile *Escherichia coli* MTCC 2345, *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 2582, *Staphylococcus aureus* MTCC 737 ve *Micrococcus luteus* üzerinde antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirtilmiştir.

Patil ve ark. (2014), metal iyonu dirençli *Haloferax alexandrinus* suşu ile, %25 tuz içeren kompleks besiyerinde üretilerek elde edilen biyokütle (1-10 mg/ml) ile karanlık ve

ışıklı ortamda, %0.001–0.1 gümüş nitrat ve 2–11 aralığındaki pH derecelerinde nanopartikül üretimini kapsayan çalışmalarında, %0,05 gümüş nitrat ve %5 mg/ml hücre varlığında ve pH 7’de 4 dakika içerisinde nanopartikül üretiminin gerçekleştiğini bildirmiştir. TEM analizleri ile nanopartiküllerin düzensiz ve küresel formda olduğu ve partikül büyüklüğünün 2-60 nm arasında değiştiği belirtilmiştir. Agar-kuyu difüzyon yöntemiyle gümüş nanopartiküllerinin (5µg), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 8739 ve *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 suşları üzerinde antibakteriyel etkinliği belirlenmiş ve haloarkeal nanopartiküllere karşı en yüksek duyarlılığı *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 suşunun en düşük duyarlılığı ise *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 gösterdiği rapor edilmiştir.

Buda ve ark. (2019), gümüş nitrat içeren (0,072 mM) kompleks yüksek tuzlu ortamda *Halomicrobium mukohataei* DSM 12286 suşu ile gümüş nanoartikülü üretilen çalışmalarında, TEM analizleri sonucunda hücre içerisinde küresel formda ve 20-100 nm çapında nanopartiküllerin üretildiğini belirlemişlerdir. Ayrıca EDS analizi ile hücrelerin içinde, toplam elementel kompozisyonun %0,6’sı oranında elemental gümüşün mevcut olduğu teyit edilmiştir. Zeta potansiyeli ölçümleri ile gümüş nanopartiküllerinin oldukça negatif bir yüzey yüküne sahip olduğu bu nedenle saflaştırılmış nanopartiküllerin kararlı bir yapı göstereceği belirtilmiştir.

Costa ve ark. (2020) çalışmalarında, *Haloferax volcanii* H26 suşuna ait biyokütle ile gümüş ve altın nanopartikül üretimini gerçekleştirmiş ve çalışma kapsamında gümüş nitrat içeren ortamda 16 saat içerisinde ortam renginin koyu kahve renge dönüştüğü ve üretilen gümüş nanopartiküllerinin TEM analizleri sonucu ortalama boyutunun 25 nm ve şekillerinin küre benzeri olduğunu bildirmiştir. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi ile her iki nanopartikülün stabil bir protein kaplamasına sahip olduğu ve gümüş nanopartiküllerinin *Escherichia coli* ve *Pseudomonas putida* üzerinde antibakteriyel etkiye sahip olduğu bulunmuştur.

Abdollahnia ve ark. (2020), *Haloferax* sp. suşu ile intraselüler ve ekstraselüler gümüş nanopartikül üretimi kapsamlı çalışmalarında TEM analiz sonucunda ortalama gümüş nanopartikül boyutunun 26,34 nm olduğu, 0,26 polidispersite indeksi ile yüksek homojenite gösterdiğini bildirmiştir. Gümüş nanopartiküllerinin broth mikrodilüsyon

yöntemiyle *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9024, and *Bacillus subtilis* ATCC605 suşları üzerindeki MİK50 değerleri sırasıyla 20, 10, 40 ve 40 ppm olarak bulunmuştur.

Can (2021) çalışmasında 113 halofilik arke suşunun 6 farklı metal tuzuna (CrCl_3 , AgNO_3 , $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, ZnCl_2 , ZnSO_4 ve NiCl_2) adaptasyonunu sağlayarak gümüş, krom, çinko ve nikel nanopartikülü üretimini ve bu nanopartiküllerin kısmi karakterizasyonunu XRD ve SEM-EDS analizi ile belirlemiştir.

Halofilik arkeler ve gümüş nanopartikül sentezi ve karakterizasyonu ile ilgili sınırlı sayıdaki çalışmaların yanı sıra haloarkeal suşlar ile farklı nanopartikülü sentezi kapsamlı yine oldukça az sayıda çalışmalar da bulunmaktadır.

Srivastava ve ark. (2014b), gümüş nanopartikülü haricinde haloarkeal nanopartikül sentezi ile ilgili diğer çalışmalarında sodyum selenit içeren ortamda *Halococcus salifodinae* BK18 suşu ile hücre içi selenyum nanopartikülü üretimini gerçekleştirmiştir. Üretilen selenyum nanopartiküllerinin XRD ve TEM analizleri ile karakterizasyonları yapılmış ve altıgen kristal kafes formunda çubuk şekilli nanopartiküller üretildiği NADH bağımlı nitrat redüktazın selenyum nanopartikülü sentezinde ve metal toleransında rol oynadığı gösterilmiştir. Çalışma kapsamında üretilen nanopartiküllerin, HeLa hücre hatlarına karşı anti-proliferatif özellik gösterdiği ve normal hücre hattına karşı sitotoksik özellik göstermediği belirlenmiştir ve bu nedenle haloarkeal selenyum nanopartiküllerinin kanserde kemoterapötik ajanı olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.

Srviastava ve ark. (2015), yine *Halococcus salifodinae* BK3 suşu ile yaptıkları diğer bir çalışmada ise, 3 mM K_2TeO_3 varlığında organizmanın iğne şekilli tellür nanopartikülleri ürettiğini ve nanopartiküllerin hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif organizmalara karşı antibakteriyel etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Abdollahnia ve ark. (2020), *Halogeometricum* sp. suşu ile selenyum nanopartikülü üretimi ve nanopartikül karakterizasyonu kapsamlı çalışmalarında üretilen arkeal selenyum nanopartiküllerinin ortalama çapının 111,6 nm olduğu ve 0,26 polidispersite indeksi ile oldukça homojen bir yapıya sahip olduğunu bildirmiştir. *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, ve *B. subtilis* suşları üzerindeki MİK50 değerlerinin 100, 50, 100, 100 ppm olduğu belirlenmiştir.

Tag ve ark. (2021) çalışmalarında, *Haloferax* sp. NRS1 suşu ile biyolojik sentezini gerçekleştirdikleri gümüş nanopartiküllerini karakterize edilerek biyolojik aktivitelerini (tromboliz ve sitotoksiste gibi) belirlemiştir. TEM analizleri sonucunda gümüş

nanopartiküllerinin küresel şekilli olduğu ve boyutlarının 5,77-73,14 nm aralığında olduğu belirtilmiş ve XRD spektrumlarına göre kristal boyutunun 29,28 nm olduğu ve kristalografik bir düzlem gösterdikleri bildirilmiştir.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasallar ve Cihazlar

Tez çalışmasında Sigma veya Merck marka sodyum klorür (NaCl), magnezyum sülfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), potasyum klorür (KCl), demir sülfat ($FeSO_4$), hidroklorik asit (HCl), sodyum hidroksit (NaOH), trisodyum sitrat dihidrat ($Na_3C_6H_5O_7$), maya ekstraktı, gümüş nitrat ($AgNO_3$), diyaliz membranı, Müeller Hinton agar (MHA) Müeller Hinton broth (MHB) ve Brain heart infusion broth (BHIB) kullanılmıştır. Deneysel aşamalarda çalkalamalı ve statik inkübatör, spektrofotometre, manyetik karıştırıcı, pH metre, terazi, otoklav, laminar kabin, vorteks, sonikatör ve soğutmalı santrifüj kullanılmıştır.

3.1.2. Halofilik Arkeler, Bakteriler ve Üretim Ortamları

Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda yer alan mikroorganizma koleksiyonundaki halofilik arke izolatları ve MALDI-TOF MS ile identifikasyonu teyit edilmiş bakteri suşları kullanılmıştır. Derin dondurucuda saklanan arke izolatlarına ait gliserol stoklarının aktive edilerek üretilmesi amacıyla 200,00 g/L NaCl, 20,00 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3,50 g/L KCl, 3,30 g/L sodyum sitrat, 0,23 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 3,00 g/L maya ekstraktı içeren modifiye Sehgal-Gibbons (SG) besiyeri kullanılmıştır. SG besiyerinin pH'ı KOH ile 7,45'e ayarlanmıştır (Ozcan ve ark., 2006). Bakteri suşlarına ait gliserol stokları Brain Heart Infusion Broth (BHIB) besi yerine ekimi yapılarak aktive edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında Müeller Hinton Agar (MHA) ve Müeller Hinton Broth besiyerleri kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Halofilik Arke İzolatlarının Kültürü

$AgNO_3$ (0,50 ve 1,00 mM) içeren SG broth ortamında yüksek üreme yeteneği gösterdiği daha önce belirlenmiş (Can, 2021) 5 adet halofilik arke izolatı (A235, A212, B65, CHB1 ve F75A) çalışma kapsamında kullanılmıştır. İzolatlar SG besiyerinde çalkalamalı olarak (150 rpm) 37°C'de geliştirilerek aktive edilmiştir. Kültürlerin sabit

gün aralıklarıyla düzenli pasajları yapılmış ve kültürlerin üreme yönünden senkronizasyonu sağlanmıştır. Çalışmanın her aşamasında halofilik arke izolatlarının senkron kültürleri kullanılmıştır.

3.2.2. Gümüş Nanopartikül Üretimi

Gümüş nanopartikül üretimi amacıyla her bir izolat 0,50 mM AgNO₃ içeren kompleks SG ortamına ekilerek 150 rpm de 37°C'de optik üreme yoğunluğu 0,80 (OD600) ve üzeri oluncaya kadar 20 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası kültürler santrifüjlenerek (4°C, 9000 rpm, 30 dk.) hücre peleti toplanmıştır. Hücre peleti saf suda süspanse edilmiş ve ultrasonik işlemci ile (Bandelin) hücrelerin parçalanması sağlanmıştır. Hücre lizati süspansiyonları 20 cm uzunluğunda kesilerek hazırlanan diyaliz membran keselerine transfer edilerek 24 saat boyunca ultra saf suya karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz işleminde ilk 8 saat boyunca her 2 saatte bir su değişimi sağlanmıştır. Diyaliz işlemi sonrasında kese içerikleri steril tüplere transfer edilerek 60°C'de 12 saat kurutulmuştur ve elde edilen toz halindeki pelet gümüş nanopartikül kaynağı olarak kullanılmıştır (Low ve ark., 2009; Srivastava ve ark., 2013; Buda ve ark., 2019).

3.2.3. Gümüş Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

3.2.3.1. Kristalografik Karakterizasyon

Gümüş nanopartiküllerinin kristalografik karakterizasyonu Mustafa Kemal Üniversitesi Teknoloji ve Araştırma Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezinde X-ışını kırınım (XRD) cihazında yapılmıştır. Ölçümler için cihazda bulunan Rigaku Smartlab model X-ışını difraktometresi kullanılmıştır. Difraktometre CuK_α (1.5406 Å) ve 40 kV/30 mA'da çalıştırılmıştır. Haloarkeal nanopartikül tozunun ölçümleri, 5°-80° tarama aralığı ve 3.00°/dakika hızında yapılmıştır.

3.2.3.2. Taramalı Elektron Mikroskobu-EDX (SEM-EDX) Analizi

Gümüş nanopartiküllerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi için toz haline getirilerek homojenize edilmiş arkeal örneklerden yaklaşık 1 miligram numune SEM stabı üzerine yapıştırılmış karbon iletken banta yayılmıştır. Görüntüler, yüksek

vakum altında 15 kV akselerasyon voltajında Polaroid 545 referansındaki kolon içi sekonder elektron dedektöründe elde edilmiştir. Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDS) analizleri görünen bölge için 129 keV elektron dedektöründe yapılmıştır. Görüntü ve EDS analizleri 30 µm açıklıktaki diyafram ile 1024 x 768 Piksel görüntü/5,4 saniye tarama hızında gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.3. Nanopartikül Boyut ve Dağılım Analizi (Dinamik ışık saçılım spektroskopisi)

Toz haline getirilerek homojenize edilmiş arkeal nanopartikül örneklerinden yaklaşık 1 miligram alınarak üzerine 2 mL 10 mM KNO₃ sulu çözeltisi eklenmiştir. Elde edilen kolloid karışım yüksek hızda 2 dakika vortekslenmiştir. Tüplerin ağzı parafilmle kapatılarak 50 W gücündeki ultrasonik banyoda 15 dakika dispers edilmiştir. Ardından tüpler dik şekilde standa alınarak laboratuvar koşullarında 2 gün bekletilmiştir. Örneklerin vorteks ve dispersiyon işlemleri aynı koşullarda ardışık ve tekrarlı olmak üzere toplam 3 kez yapılmıştır. İşlem sonucunda zor çöken bir kolloid karışım elde edilmiştir. Elde edilen karışımlar analize başlamadan hemen önce 20 dakika boyunca ultrasonik banyoda dispers edilmiştir. Dispersiyon işlemi biten numunenin tamamı tüpten alınarak ölçüm küvetine aktarılmıştır. Örneğin hazırlandığı tüp ve kullanılan pipet ucu da toplamda 1 mL 10 mM KNO₃ çözeltisi ile yıkanarak ölçüm küvetindeki numune üzerine eklenmiştir. Ölçümler DLS tekniği ile ölçüm başlangıcında 120 saniye denge süresinde ve her bir ölçüm arası 5 saniye bekleme verilerek 3 tekrarlı şekilde yapılmıştır (Farrell ve Brousseau, 2014). Ayrıca okuması tamamlanan kolloidal numuneler 0,45 µm por çaplı selüloz asetat membran filtreden süzölmüş ve aynı şartlarda tekrar okuma işlemi yapılmıştır.

3.2.4. Gümüş Nanopartiküllerin Antibakteriyel Etkisinin Belirlenmesi

Gümüş nanopartiküllerinin antibakteriyel aktivitesi agar disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Antimikrobiyal etkinlik kapsamında klinik kaynaklı gram-negatif *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve gram-pozitif *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus agalactiae* bakterileri kullanılmıştır. Gliserol stoklarından BHI sıvı besiyerinde aktifleştirilen logaritmik faz kültürlerinin hücre

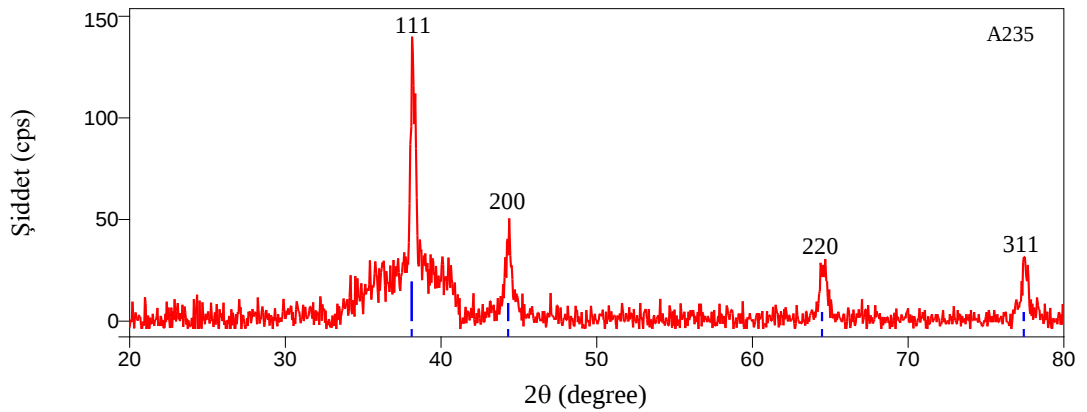
yoğunluğu, steril %0,85 NaCl içeren çözeti kullanılarak McFarland 0,50 ayarına göre ($\sim 1,50 \times 10^8$ kob/ml) yapılmıştır. MHA petrilerine yayma işlemi sonrasında 6 mm steril kâğıt disklere 25, 50 ve 100 µg/disk olacak şekilde emdirilmiş nanopartikül örnekleri agar yüzeyine yerleştirilmiştir. Petriler 37 °C'de 18 saat inkübe edilmiştir. Kontrol amacıyla Amikasin (30µg), Sefuroksim (30 µg), Gentamisin (10 µg) ve Eritromisin (15 µg) antibiyotik diskleri kullanılmıştır.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

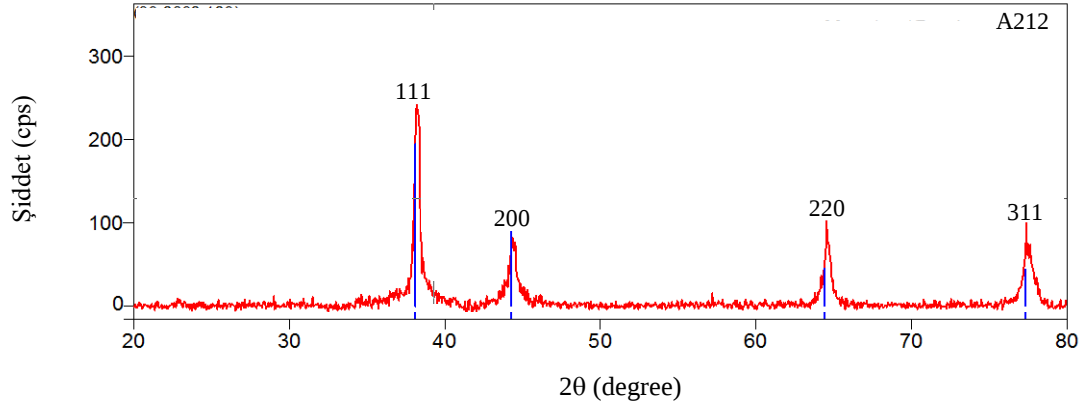
4.1. Haloarkeal Gümüş Nanopartiküllerinin X-Işını Kırınım (XRD) Analizi Sonuçları

Yüksek tuzlu SG besiyerinde üretilen 5 adet halofilik arke izolatlarının (A235, A212, B65, CHB1 ve F75A) içeren 0,50 mM AgNO₃ çözeltisinde hücre içinde sentezlenen gümüş nanopartiküllerinin kristal yapısını belirlemek ve doğrulamak için X-ışını kırınım (XRD) tekniği kullanılmıştır ve her bir izolata ait nanopartikülün XRD analiz sonuçları Şekil 4.1-4.5'te verilmiştir. Farklı halofilik arke izolatları tarafından üretilen nanopartiküller açısından, atomik dizilim sonucu oluşmuş farklı kristal fazları yansıtan dört farklı pik gözlenmiştir. Hem farklı arke izolatlarının varlığı hem de bu izolatların çözeltide farklı işlevleri, farklı 2 θ değerlerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu kapsamda en yoğun gümüş nanopartiküllerinin (111) kristal yapısına sahip olduğu tespit edilmiştir.



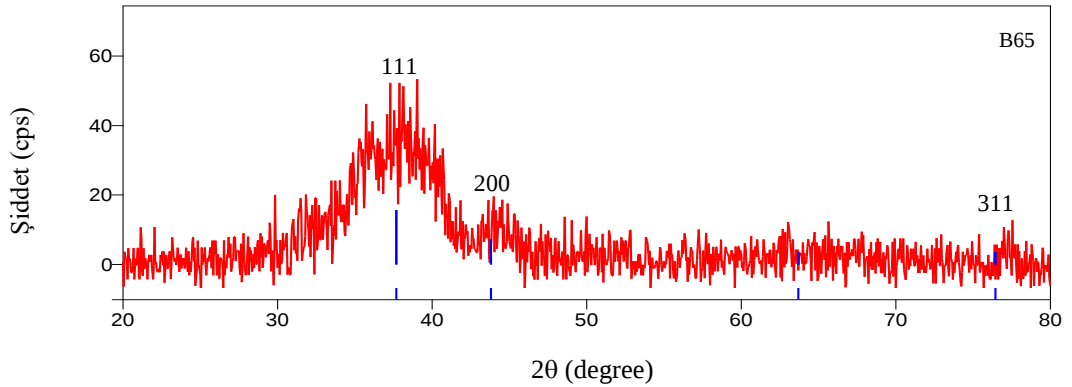
Şekil 4.1. A235 izolatının sentezlediği hücre içi gümüş nanopartiküllerinin XRD spektrumu

A235 izolatının sentezlediği nanopartiküllerde 38,26°, 44,32°, 64,43° ve 77,46° keskin pikler gözlenmiş ve sırasıyla 2 θ değerlerine karşılık gelen (111), (200), (220) ve (311) pik yansımalarına göre farklı kristal fazlara sahip nanopartiküller saptanmıştır. İzolatın sentezlediği gümüş nanopartiküllerinin daha çok (111) kristal yapısından oluştuğu görülmekte ve bu nanopartiküllerin kristal boyutunun 6,3 nm olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.2. A212 izolatının sentezlediği hücre içi gümüş nanopartiküllerinin XRD spektrumu

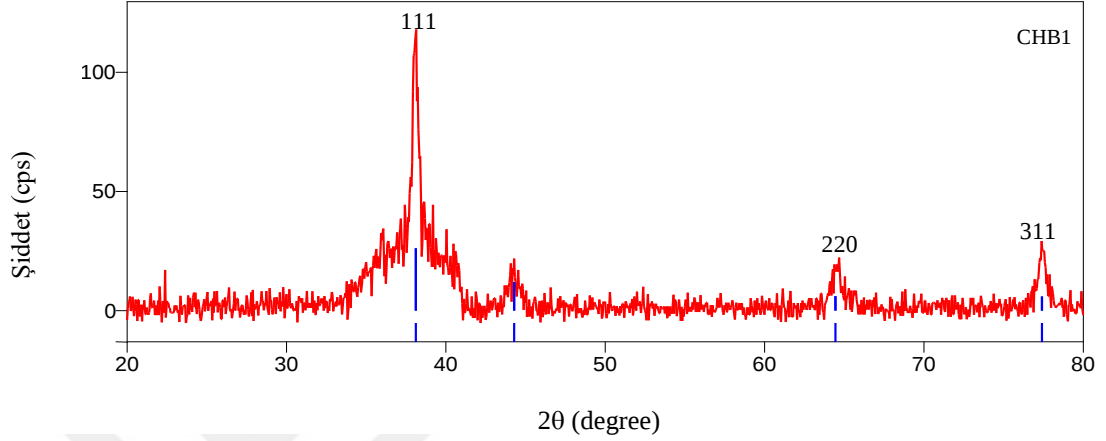
A212 izolatının sentezlediği gümüş nanopartiküllerinin 2θ kırınım desenleri (111), (200), (220) ve (311) ile ilişkili $38,18^\circ$, $44,33^\circ$, $64,56^\circ$ ve $77,31^\circ$ 'de dört keskin pik olarak belirlenmiştir. Bu nanopartiküllerden (111) kristal fazı en keskin pik olup, A235 izolatın ürettiklerinden daha yüksek pik şiddetine sahip olduğu tespit edilmiştir. İzolatın sentezlediği gümüş nanopartikülü örneklerinin kristal boyutu 24 nm olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.3. B65 izolatının sentezlediği hücre içi gümüş nanopartiküllerinin XRD spektrumu

Halofilik arke izolatı B65'e ait nanopartiküllerin kırınım deseninde (111), (200) ve (311) kristal fazların pik yansımalarının 2θ değerinde karşılık gelen değerleri $38,6^\circ$,

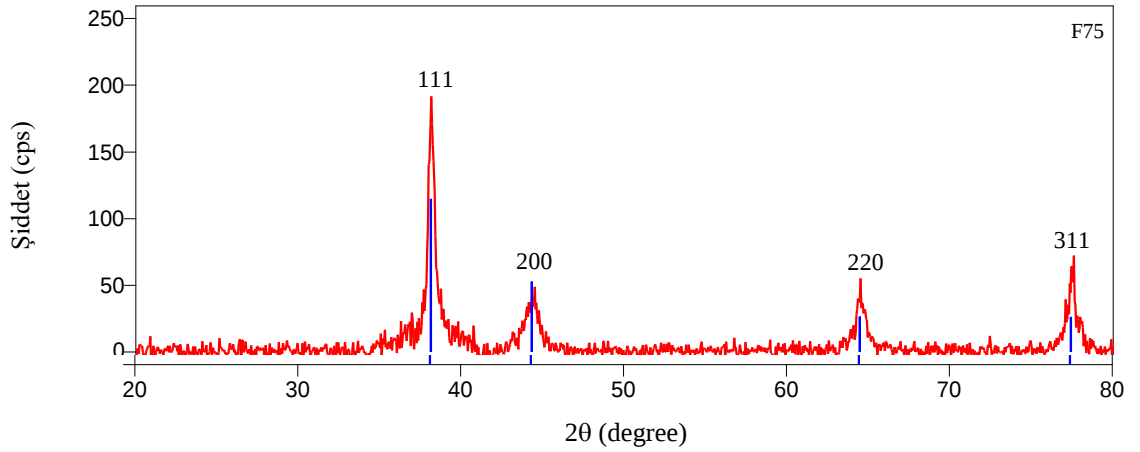
44,35° ve 77,29° olarak belirlenmiştir. Diğer kristal fazlara göre en yüksek pik şiddetine sahip (111) kristalin şiddeti, A235 ve A212 izolatların ürettikleri (111) fazlara göre oldukça düşük olduğu görülmüştür. Bu çalışmadan elde edilen AgNP'lerin kristal boyutu 1,38 nm olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.4. CHB1 izolatının sentezlediği hücre içi gümüş nanopartiküllerinin XRD spektrumu

CHB1 izolatının ürettiği gümüş nanopartiküllerine ait XRD deseninde (111), (220) ve (311) düzlemlerine karşılık gelen 2θ değerleri 38,12°, 64,43° ve 77,43° olarak belirlenmiştir. Nanopartiküllerin kristal boyutu 7 nm olarak hesaplanmıştır.

F75A izolatının sentezlediği gümüş nanopartikülü deseninde $2\theta = 38,13^\circ, 44,38^\circ, 64,46^\circ$ ve $77,42^\circ$ 'de dört keskin pik belirlenmiştir. Piklerin düzlemleri (111), (200), (220) ve (311) kristal fazları ile ilişkilidir. Sentezlenen gümüş nanopartikülü örneklerinin kristal boyutu 17,6 nm olarak bulunmuştur.



Şekil 4.5. F75A izolatının sentezlediği hücre içi gümüş nanopartiküllerinin XRD spektrumu

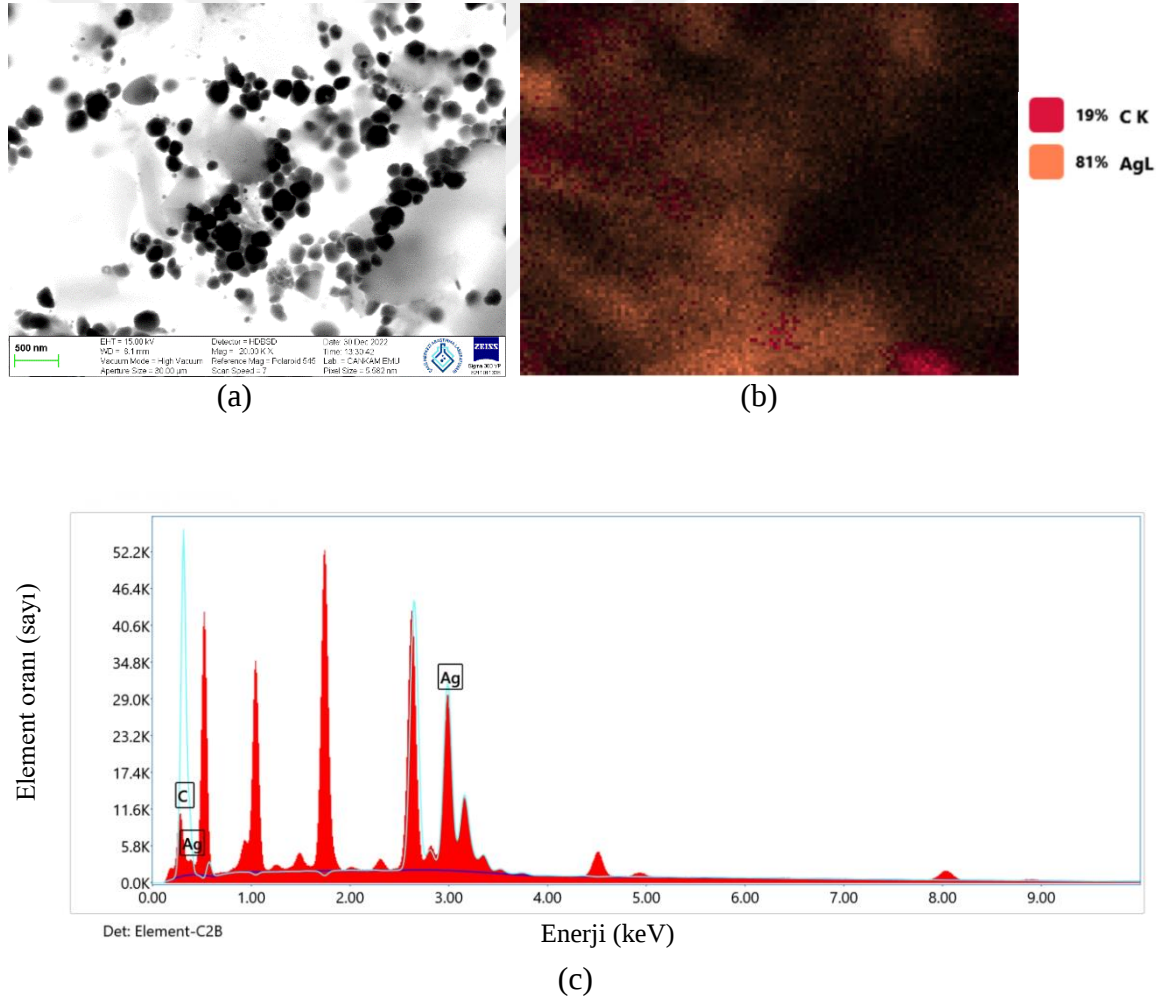
Yüksek tuz konsantrasyonunda sentezlenen gümüş nanopartiküllerine ait X-ışını kırınım desenleri, haloarkeal izolatların Ag^+ iyonlarını Ag^0 'a ($\text{Ag}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{Ag}$) indirgediğini göstermektedir. Desenlerdeki keskin piklere ait düzlemler, gümüş nanopartiküllerinin kristal yapıda ve yüzey merkezli kübik yapıda olduğunu göstermektedir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar, günümüze kadar haloarkeal (*Halococcus salifodinae* BK3, *Halococcus salifodinae* BK6, *Haloferax alexandrinus* ve *Haloferax* sp. NRS1) gümüş nanopartikülü sentez ve karakterizasyonu ile ilgili mevcut çalışmalardan elde edilmiş gümüş nanopartikül desenleri ile yüksek oranda benzerlik göstermektedir. 2θ değerine karşılık gelen 111, 200, 220 ve 311 düzlemleri için sırasıyla 37,84-38,21; 44,20-45,12; 64,38-66,56 ve 75,01-77,61 arasında değişen keskin piklerin elde edildiği bildirilmiştir. Ayrıca yine bu çalışmalarda Debye Scherrer's denklemi üzerinden gümüş nanopartiküllerinin kristal boyutlarının 12-55,45 nm arasında değişen büyüklüklerde olduğu bildirilmiştir (Srivastava ve ark., 2013, Srivastava ve ark., 2014, Patil ve ark., 2014, Tag ve ark., 2021).

4.2. Taramalı Elektron Mikroskobu- Enerji Dağılımlı X Işını Spektroskopisi (SEM- EDS) Analizi Sonuçları

Halofilik arke izolatlarının hücre içi sentezlediği gümüş nanopartiküllerine ait SEM görüntülerinden seçilen alan ve bu alanın elementel kompozisyonlarını gösteren EDS

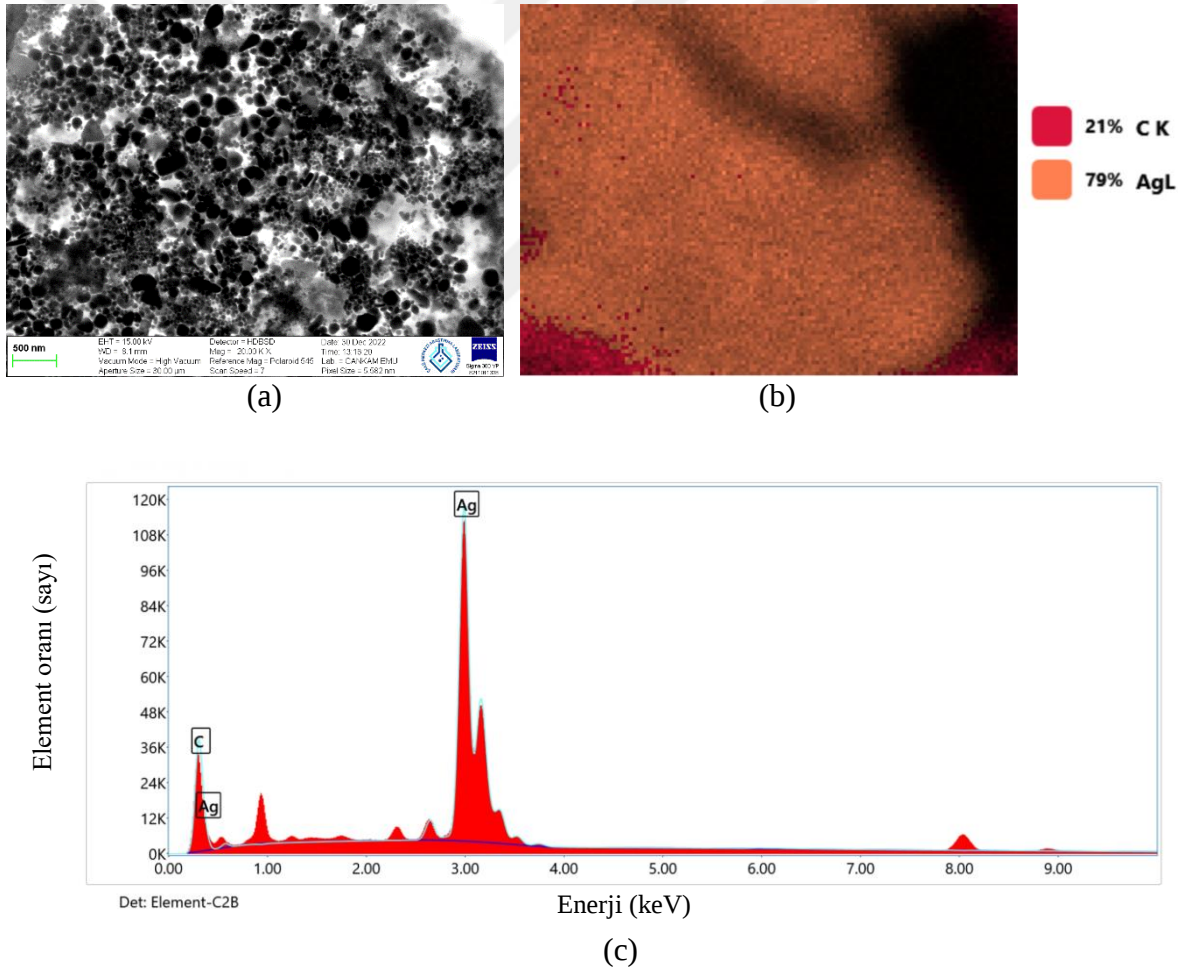
sonuçları Şekil 4.6-4.10’da ve nanopartikül morfolojilerinin belirlenmesi için yüksek büyütmeli SEM görüntüleri Şekil.11’de verilmiştir.

A235 izolatının sentezlediği nanopartiküllerin çoğunlukla birbirinden ayrılmış tekli formda ve küresel şekilli oldukları belirlenmiştir. Kümelenmenin görülmemesi fiziksel etkileşimin oldukça düşük düzeyde olduğuna işaret etmektedir. EDS analiz sonucu yüzey element içeriğinin %81’ni gümüş ve %19’unu karbon oluşturmaktadır (Şekil 4.6 ve 4.11). Karbon içeriği mikroorganizma kaynaklı olup beklenen gümüş nanopartikülünün sentezlendiği ve EDS haritasında homojen bir dağılımın söz konusu olduğu görülmektedir. Nanopartiküllerin EDS spektrum sonuçlarına bakıldığında 3,00 keV civarında gümüş atomlarından kaynaklanan keskin ve 0,30 keV civarında karbon ve gümüş atomlarından kaynaklanan daha zayıf pikler tespit edilmiştir.



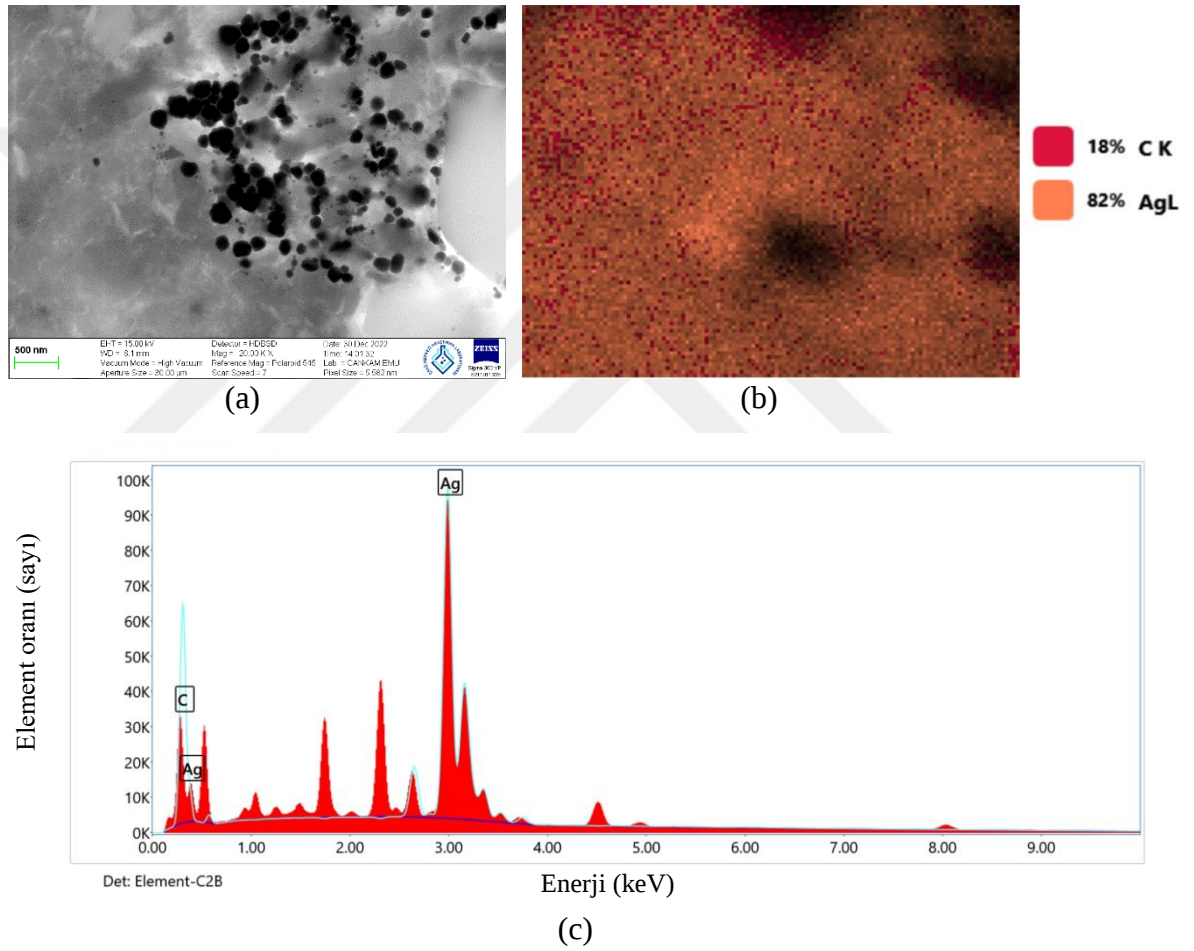
Şekil 4.6. A235 izolatının sentezlediği hücre içi gümüş nanopartiküllerinin (a) SEM görüntüsü, (b) EDS yüzey haritası, (c) Yüzey elementel kompozisyon spektrumları

SEM görüntülerinde A212 izolatına ait gümüş nanopartiküllerinin küresel formda ve genellikle kümelenmemiş tekli yapıda oldukları görülmektedir. EDS analizi için seçilen SEM görüntü alanının haritasında gümüş oranının %79, karbon oranının ise %21 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7 ve 4.11). EDS ile yapılan element bileşimi analizi 3 keV civarında gümüş atomlarından kaynaklanan güçlü bir absorpsiyon pikinin varlığını göstermektedir. Ayrıca 0,30 keV civarındaki karbon pikinin yanında zayıf bir gümüş pikinin bulunduğu görülmektedir (Şekil 4.7 ve 4.11). Gerek SEM ve gerekse EDS analizleri A212 suşunun homojen dağılım gösteren gümüş nanopartiküllerini sentezlediğini göstermektedir. Diğer taraftan A212 suşu ile üretilen Ag nanopartikül miktarının, A235 suşu ile üretilene göre çok az da olsa daha düşük olduğu görülmüştür.



Şekil 4.7. A212 izolatının sentezlediği hücre içi gümüş nanopartiküllerinin (a) SEM görüntüsü, (b) EDS yüzey haritası, (c) Yüzey elementel kompozisyon spektrumları

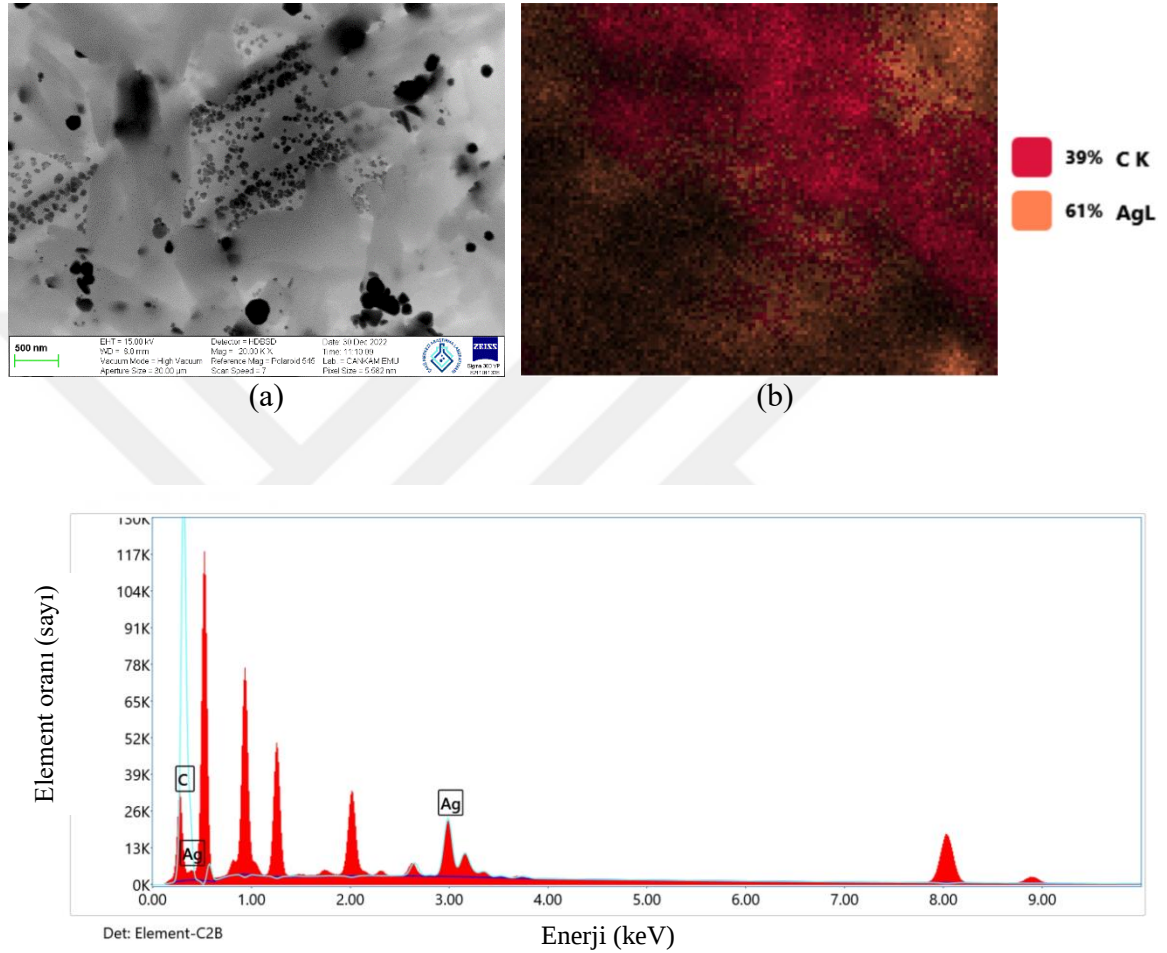
Diğer izolat B65'in kompleks ortamda sentezlediği gümüş nanopartiküllerinin birbirinden ayrılmış ve küresel formda olduğu ve yüzey elementel içeriğinin %82 oranında gümüş içerdiği bulunmuştur. EDS haritasından gümüşün homojen dağılım gösterdiği belirlenmiştir. EDS spektrumunda yaklaşık 3,00 keV'de gümüş atomlarından gelen güçlü bir pikin yanı sıra 0,30 keV civarında karbon atomu kaynaklı pike yakın keskin bir gümüş piki de tespit edilmiştir. B65 suşu ile üretilen Ag nanopartikül miktarının, A212 ve A235 suşları ile üretilenlere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.8. B65 izolatının sentezlediği hücre içi gümüş nanopartiküllerinin (a) SEM görüntüsü, (b) EDS yüzey haritası, (c) Yüzey elementel kompozisyon spektrumları

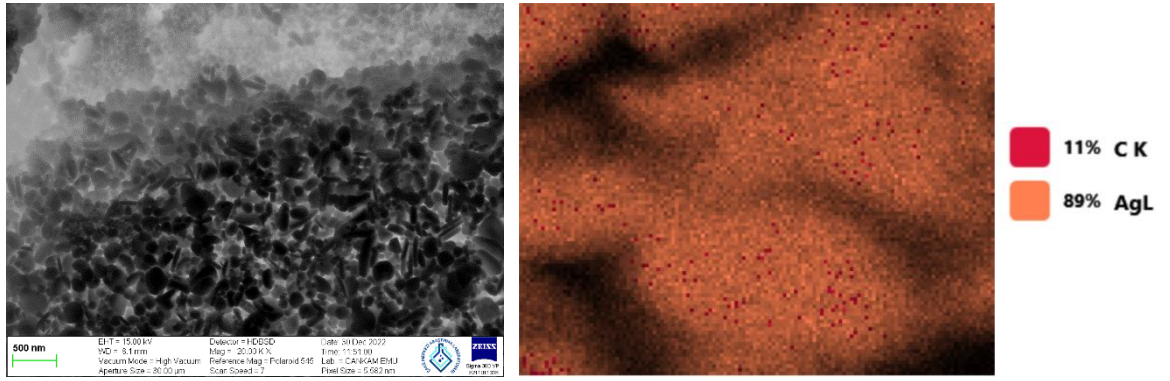
SEM görüntülerinde CHB1 izolatının kompleks besiyerinde ürettiği gümüş nanopartiküllerinin kümelenme göstermeyen küresel şekilde olduğu görülmektedir (Şekil 4.11). EDS haritasında homojen bir dağılımın bulunduğu ve yüzey element kompozisyonunun %61'ni gümüş nanopartiküllerinin oluşturduğu kalan kısmını (%39)

ise karbon olup hücreden kaynaklandığı tespit edilmiştir. EDS spektrumunda gümüş atomları kaynaklı 3,0 keV dolayında bir pik ve 0,30 keV civarında daha zayıf bir pik görülmüştür. Beş izolat arasından en zayıf gümüş piklerine bu organizmada rastlanmış olup, en düşük Ag nanopartikül bu suş ile üretilmiştir.



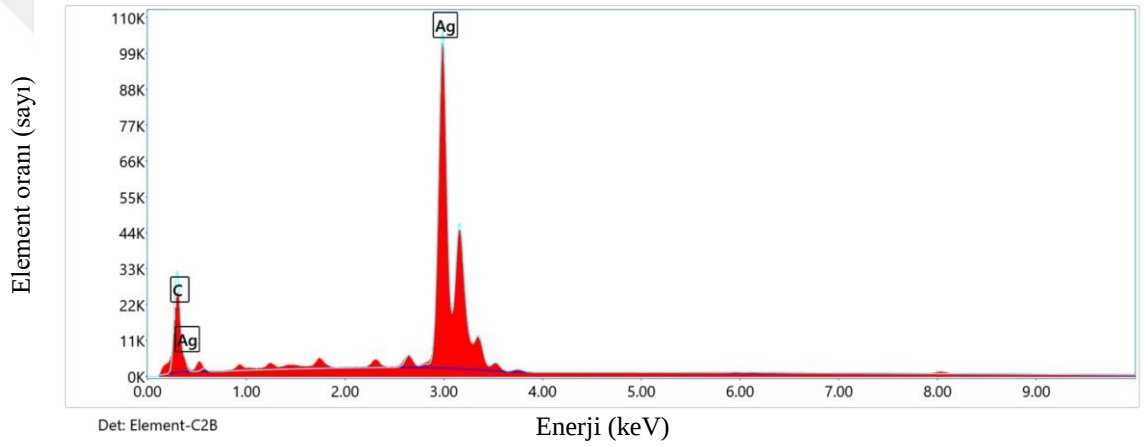
Şekil 4.9. CHB1 izolatının sentezlediği hücre içi gümüş nanopartiküllerinin (a) SEM görüntüsü, (b) EDS yüzey haritası, (c) Yüzey elementel kompozisyon spektrumları

F75A izolatının sentezlemiş olduğu nanopartiküllerin kümelenme göstermeyen küresel formda olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.11). EDS yüzey analizinde gümüş oranının %89, karbon oranının %11 olduğu ve homojen bir dağılımın bulunduğu görülmektedir. EDS spektrumunda gümüş atomlarından kaynaklanan 3,0 keV civarında oldukça güçlü ve karbon atomu pikine yakın 0,30 keV civarında zayıf bir pik tespit edilmiştir (Şekil 4.10). İzolatlar arasından en yüksek Ag nanopartikül miktarına bu suş ile ulaşılmıştır.



(a)

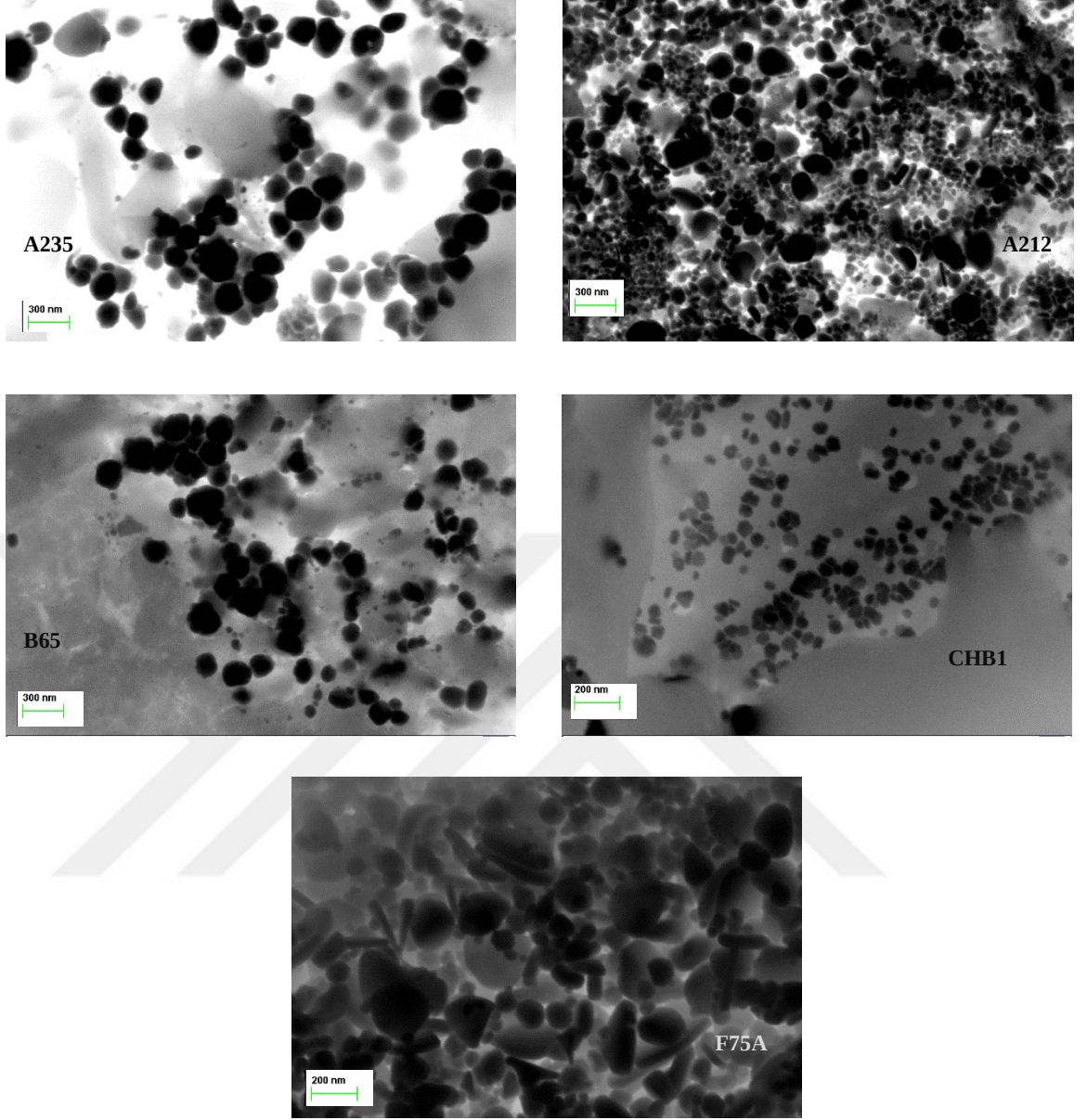
(b)



(c)

Şekil 4.10. F75A izolatinın sentezlediği hücre içi gümüş nanopartiküllerinin (a) SEM görüntüsü, (b) EDS yüzey haritası, (c) Yüzey elementel kompozisyon spektrumları

Beş izolatin EDS spektrum değerlerinin benzer olması, Ag nanopartiküllerin üretildiğini işaret etmekte olup, izolat çeşitliliğine bağlı olarak sadece miktarlarının farklı olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.11. A235, A212, B65, CHB1 ve F75A izolatlarının SG ortamında sentezlediği hücre içi gümüş nanopartiküllerinin SEM mikrografları (A235, A212 ve B65 için Büyütme X30000, CHB1 ve F75A için X50000)

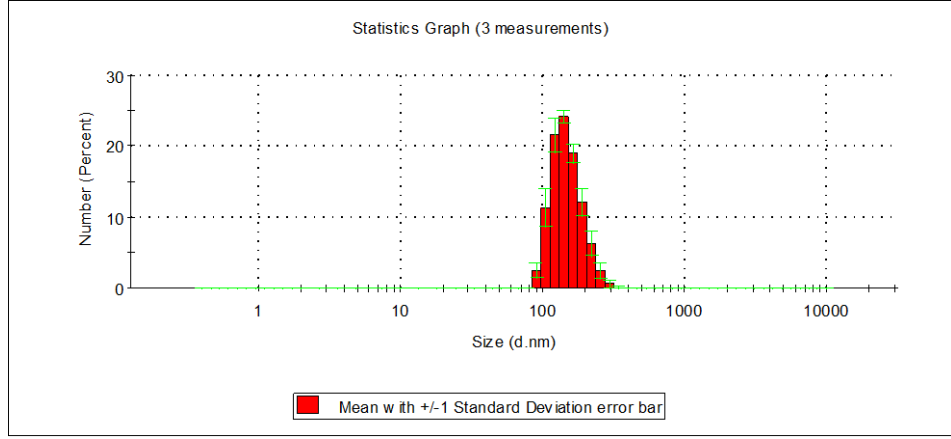
SEM analizlerinde tüm izolatlar tarafından üretilen gümüş nanopartiküllerin küresel formda ve kümelenmemiş çoğunlukla taneli yapıda olduğu belirlenmiştir. EDS haritalarında dağılımın homojen olduğu ve gümüş kompozisyonun %61-89 arasında değiştiği kalan oranları ise hücre kaynaklı karbonun oluşturduğu tespit edilmiştir. EDS spektrumları da elementel gümüşün karakteristik absorpsiyon bandlarını doğrulamıştır. AgNP'lerin yaklaşık 3,0 keV'de keskin ve 0,30 keV'de daha zayıf optik absorpsiyon pikleri verdiği tespit edilmiştir. Kompleks besiyerinde halofilik arke izolatları tarafından sentezlenen gümüş

nanopartiküllerine ait SEM/EDS analiz sonuçları diğer halofilik arke kaynaklı gümüş nanopartikülü içerikli çalışmalarda alınan SEM/TEM/EDS sonuçları ile yüksek oranda benzerlik göstermektedir. Srivastava ve ark. (2013) ve (2014) iki farklı *Halococcus salifodinae* suşu ile yaptıkları çalışmada haloarkeal gümüş nanopartiküllerinin küresel şekilli olduğunu ve EDS spektrumlarının 3,4 ve 0,2 keV’de elementel gümüşe ait pikleri gösterdiğini bildirmişlerdir. *Haloferax* sp suşunun ürettiği gümüş nanopartiküllerinin SEM analizleri küresel şekilli olduğu yansıtmış ve EDS spektrumunda 2,5-3,5 ve 1,0-2,0 keV’de gümüş atomları kaynaklı pikler tespit edildiği bildirilmiştir. *Haloferax* sp. suşunun sentezlediği intraselüler nanopartiküllerin 3,0 ve 3,2 keV’lik EDS gümüş pikleri verdiği tespit edilmiştir (Abdollahnia ve ark., 2020). Bu çalışmada SEM analizi yapılan gümüş nanopartiküllerinin genellikle küresel şekilde tekli ya da kümeler halinde bulunduğu rapor edilmiştir. Arkeal suşlar *Haloferax volcanii* ve *Halomicrobium mukohataei* ile yapılan çalışmalarda da küresel şekilli gümüş nanopartiküllerinin üretildiği bildirilmiştir (Buda ve ark., 2019 ve Costa ve ark., 2020).

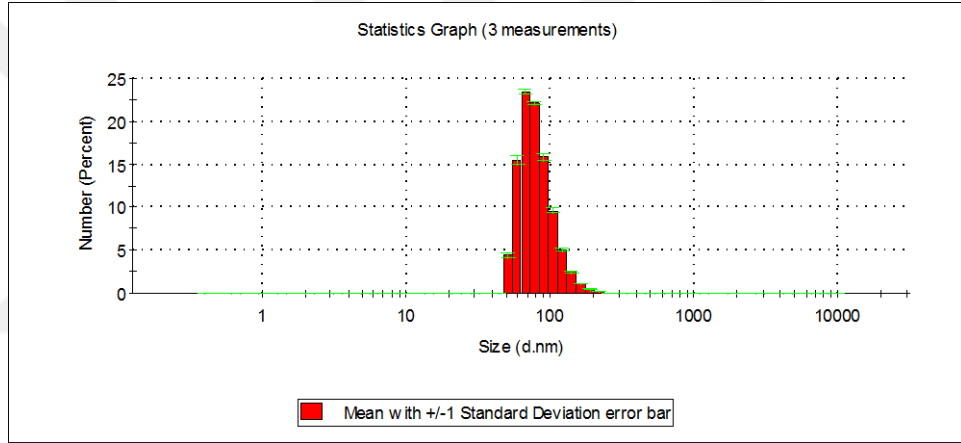
4.3. Nanopartikül Boyut ve Dağılım Analizi (DLS) Sonuçları

Nanopartiküllerin boyutu ve boyut dağılımı, dinamik ışık saçılımı (DLS) analiziyle belirlenmiştir (Şekil 4.12-16). A235 izolatının sentezlediği Ag nanopartikülü boyutlarının 91,28 ile 255 nm aralığında olduğu tespit edilmiştir. Üretilen partiküllerin boyutları %2,5’i 91,28, %11,3’ü 105,7, %21,7’i 122,4, %24,2’i 141,8, %19’u 164,2, %12,1’i 190,1 ve %6,2’i 220,2 nm olarak bulunmuştur (Şekil 4.12).

A212 izolatı tarafından sentezlenen Ag nanopartikülü boyut aralığı 78,82 ile 164,2 nm arasında belirlenmiş olup %22,1 oranı ile en fazla 78,82 nm boyutlu nanopartikül üretildiği tespit edilmiştir. Diğer dağılım oranları sırasıyla 91,28 nm (%15,8), 105,7 nm (%9,5), 122,4 (%5,1), 141,8 (%2,5) ve 164,2 (%1,1) olarak bulunmuştur (Şekil 4.13). Şekil 4.11’deki SEM görüntülerinin de yansıttığı gibi, A212 suşu ile üretilen Ag partikül boyutlarının, A235 suşuna göre daha düşük olduğu ve % dağılımının nanopartikül boyutunu daha fazla yansıttığı görülmektedir. Nanopartikül boyutu sınırlarında yer alan Ag nanopartiküllerinin yüksek % ile geniş aralıkta olması, besiyeri içerisinde hücrelerin homojen dağılımının bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Belirli bir alanda yığılan hücreler tarafından bu alandaki Ag⁺ iyonlarının indirgenmesini hızlandırılarak düzensiz çekirdeklenme ile farklı boyutlu atomik Ag partiküllerin oluşumuna neden olacaktır.

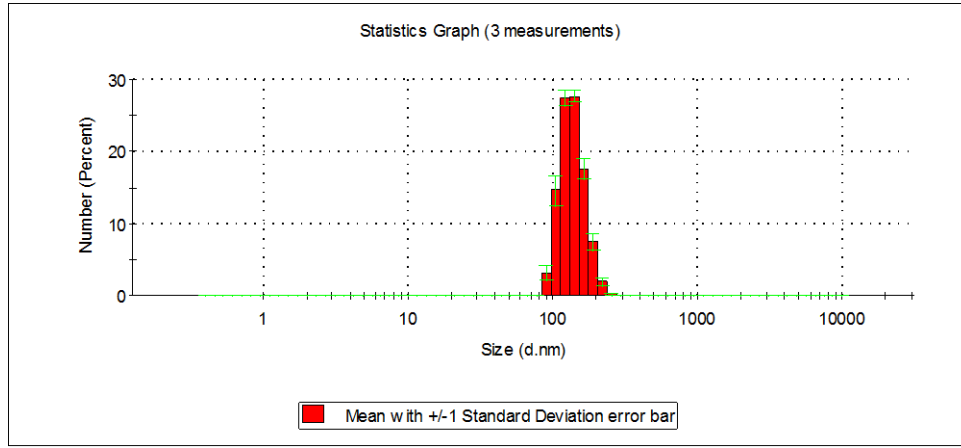


Şekil 4.12. A235 suşu ile üretilen Ag nanopartiküllerin boyutuna göre % dağılımı (DLS)



Şekil 4.13. A212 suşu ile üretilen Ag nanopartiküllerin boyutuna göre % dağılımı (DLS)

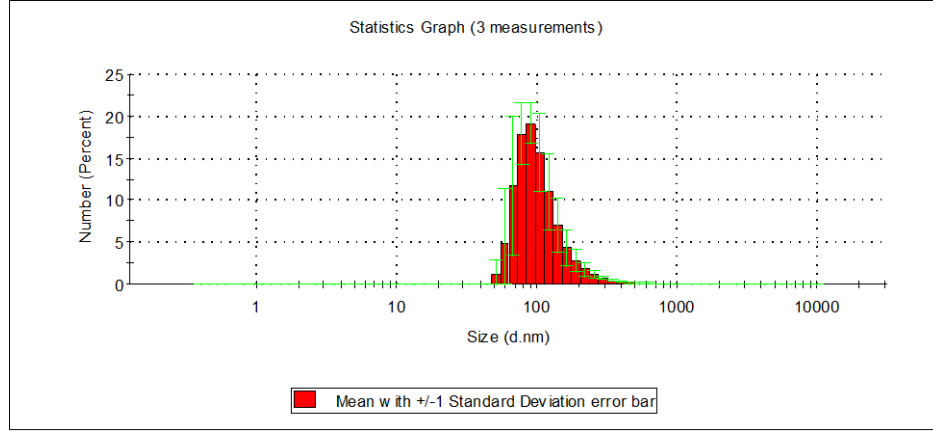
B65 izolatının sentezlediği Ag nanopartiküllerin boyut aralığının oransal olarak büyük kısmının 120-140 nm aralığında olduğu belirlenmiştir. DLS analizine göre %3,1'nin 91,28, %14,6'nın 105,7, %27,5'inin 122,4, %27,7'inin 141,8, %17,5'nin 164,2 ve %7,5'inin 190,1 nm olduğu bulunmuştur (Şekil 4.14). B65 suşu ile üretilen Ag partiküllerin sayıca % büyük miktarının 100 nm boyutu civarında olduğu ve bu boyut değerlerinin boyut değerlerinin birbirine yakınlığı besiyeri ortamındaki hücrelerin benzer düzeyde aktivite sergilediklerini göstermektedir.



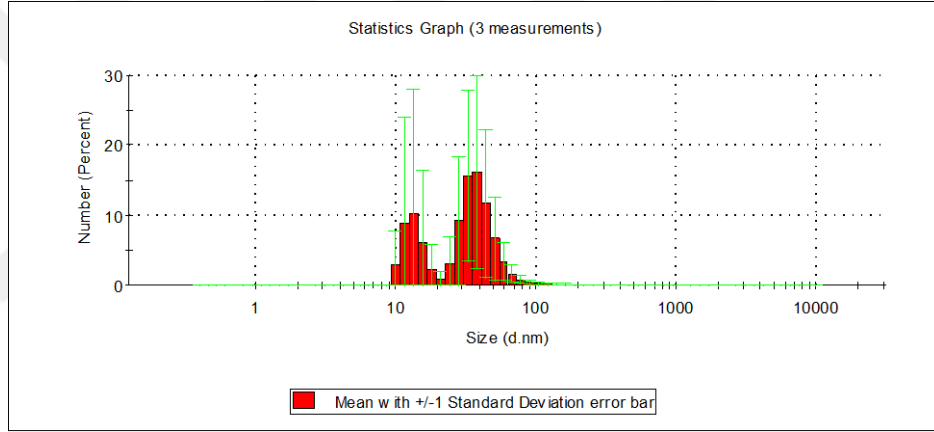
Şekil 4.14. B65 suşu ile üretilen Ag nanopartiküllerin boyutuna göre % dağılımı (DLS)

CHB1 izolatının ürettiği nanopartiküllerin 68,06 ile 458,7 nm aralığında olduğu tespit edilmiştir. Üretilen partikül boyutları %5'i 78,82, %10,3'ü 91,28, %14'ü 105,7, %14'ü 122,4, %12,7'i 141,8 ve %10,4'ü 164,2 nm olarak bulunmuştur (Şekil 4.15). CHB1 izolatı üretilen Ag partiküllerin % 50'den fazlasında boyutların birbirine yakın olması ve partikül boyutu artışı ile sayıca % miktarın azalması, bu suşun kültür ortamında düzenli bir indirgemenin meydana geldiğini göstermektedir.

Diğer izolatın (F75A) ürettiği gümüş nanopartiküllerinin 10,1-68,06 nm aralığında olduğu ve oransal olarak en fazla (%16,2) 37,84 nm boyutunda nanopartikül üretildiği belirlenmiştir. Tüm isolatlar arasında 100 nm'nin altındaki büyüklüklerde oransal olarak en fazla nanopartikül sentezi F75A'da tespit edilmiştir (Şekil 4.16). Bu durumu hem 4.11'deki SEM görüntülerindeki Ag partiküllerinin homojen dağılımı hem de Şekil 4.10'daki EDS elementel yüzey analizlerinde belirlenen %89 Ag atomlarının varlığı desteklemektedir. Bu kapsamda F75A izolatı hücrelerinin besiyeri içerisinde homojen dağılımlı olduğunu göstermekle birlikte, Ag⁺ iyonlarını indirgeme hızının diğer suşlara göre daha yavaş olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.15. CHB1 suşu ile üretilen Ag nanopartiküllerin boyutuna göre % dağılımı (DLS)



Şekil 4.16. F75A suşu ile üretilen Ag nanopartiküllerin boyutuna göre % dağılımı (DLS)

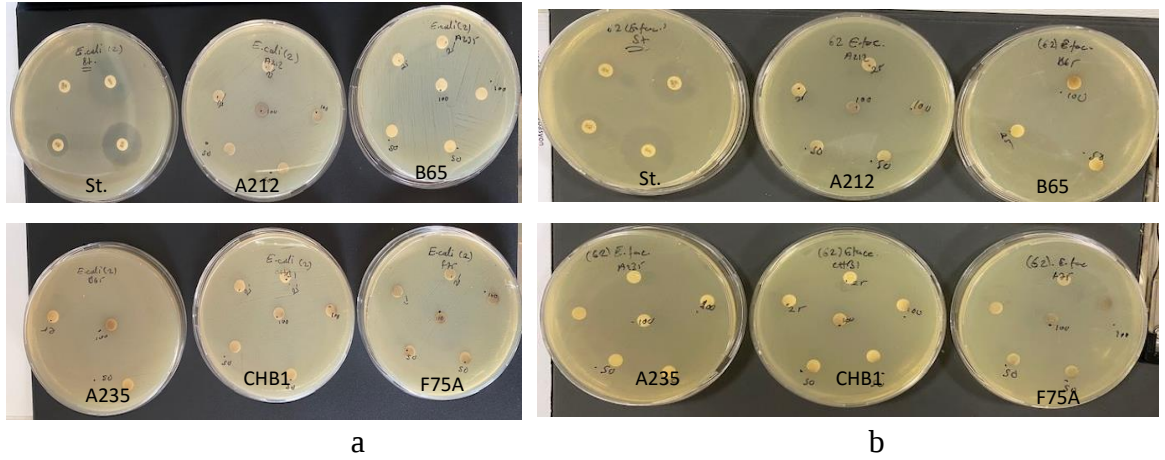
Halofilik arkelerle yapılan diğer çalışmalarda *Halococcus salifodinae* BK3 ve BK6 suşlarının ürettiği gümüş nanopartiküllerinin ortalama boyutunun 50,3 nm olduğu ve BK3'e ait aralığın 20-100 nm arasında değiştiği bildirilmiştir (Srivastava ve ark., 2013 ve 2014). *Halogeometricum* sp. ve *Haloferax alexandrinus* suşlarının sırasıyla 16-213,8 nm ve 2-60 nm aralığında ve ortalama 82,4 nm ve 18 nm boyutunda gümüş nanopartikülleri sentezlediği rapor edilmiştir (Abdollahnia ve ark., 2020; Patil ve ark., 2020). Buda ve ark. (2019), *Halomicrobium mucohatei*'nin 20-100 nm arasında değişen, Costa ve ark. (2020) ise *Haloferax volcanii*'nin ortalama 25 nm çapında gümüş nanopartikülleri sentezlediğini belirtmişlerdir. Bu çalışma kapsamında yer alan A235,

A212, B65, CHB1 ve F75A izolatlarının sentezlediği gümüş nanopartiküllerinin ortalama boyutlarının sırasıyla 161,34, 117,37, 147,9, 190,07 ve 31,05 nm ve büyük bir kısmının ise 100 nm'nin üzerinde olduğu bulunmuştur (Şekil 14.12-16). Nanomateryaller için uluslararası kabul görmüş tek bir tanımın mevcut olmamakla birlikte son zamanlarda İngiliz Standartları Enstitüsü tarafından boyut olarak "nano ölçek", 1-1000 nm aralığında ve nanopartikül, nano ölçekli boyuta sahip nano obje olarak tanımlanmıştır (Jeevanandam ve ark. 2018).

Gümüş iyonları elektron transferi ile gümüş metale dönüştüğünden nanopartikül boyut ve sayısı elektron transfer hızına bağlı olarak değişim gösterecektir. Biyolojik nanopartikül sentezinde ise elektron transferi organizma aracılığıyla gerçekleşmektedir ve üretilen Ag nanopartiküllerin boyut ve dağılımı, gümüş iyonu içeren besiyeri çözeltisi içerisindeki hücrelerin homojen dağılımından etkilendiği düşünülmektedir. Dolayısıyla 100 nm'nin üzerindeki partiküllerin varlığı, belirli bir bölgede biriken hücrelerin gümüş iyonlarına elektron transferini hızlandırarak oluşan Ag atomlarının biraraya gelmesiyle çekirdeklenmeyi sağlamasının ve Ag kristal yapıların partikül boyutunun büyümesine neden olmasının kanıtıdır. Prokaryotik yada ökaryotik mikroorganizmaların üreme ortamında yer alan gümüş iyonlarının elektron aktarımı ile gümüş metale indirgenerek (biyoredüksiyon) üretilebileceği bildirilmiş olup (El-Seedi ve ark. 2019), haloarkeal *H. salifodinae* BK3 ve BK6 suşlarıyla yapılan çalışmada detoksifikasyon amacıyla sentezlenen gümüş nanopartiküllerini NADH bağımlı Nitrat Redüktaz aracılığıyla katalizlenebileceği rapor edilmiştir (Srivastava ve ark., 2013; 2014).

4.4. Gümüş Nanopartiküllerinin Antibakteriyel Etkinliği

İzolatların sentezlediği ve üç farklı konsantrasyonda hazırlanan (25, 50 ve 100 µg/disk) gümüş partiküllerinin agar disk difüzyon yöntemi sonucunda antibakteriyel etkinlik göstermediği belirlenmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Gümüş nanopartiküllerinin agar disk difüzyon görüntüsü, a; *Escherichia coli*, b: *Enterococcus faecalis* (St.; standart antibiyotik diskleri).

Gümüş nanopartiküllerin antibakteriyel etkisinin mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte nanopartiküllerin sürekli gümüş iyonunu serbest bırakabileceği ve bu nedenle mikroorganizmaları öldürebileceği ileri sürülmektedir (Yin ve ark. 2020; Bapat ve ark., 2018). Partikül boyut ve şeklinin gümüş iyonu salınımını etkileyebileceği ve bu durumun teorik olarak Ostwald-Freundlich denklemi ile açıklanabildiği bildirilmiştir. Özellikle küresel veya yarı küresel forma sahip küçük gümüş nanopartiküllerinin daha geniş yüzey alanına sahip olmaları nedeniyle gümüş salımına daha yatkın oldukları ve bu nedenle kümelenmiş nanoparçacıkların daha az iyon salınımı yaptıkları rapor edilmiştir (Yin ve ark. 2020).

Halofilik arke kaynaklı gümüş nanopartikül sentezi yapılan önceki çalışmalarda üretilen nanopartiküllerin agar disk difüzyonla 10 ve 50 µg düzeyinde (Srivastava ve ark., 2013-2014), broth dilüsyon ile 10-20 ppm düzeylerinde (Abdollahnia ve ark. 2020), agar difüzyon ile 1mg/ml (Costa ve ark. 2020) ve 5µg düzeyinde Gram pozitif ve negatif bakteri suşları üzerinde antibakteriyel etkinlik gösterdikleri belirlenmiştir. Ancak çalışmamız kapsamında üretilen haloarkeal gümüş nanopartiküllerinin antibakteriyel etki göstermemesi, üretilen partiküllerin boyutunun büyük olması ve buna bağlı olarak küresel yapıdaki partiküllerin kendi tanecikleri arasındaki fiziksel etkileşim ile yüzey alanının daha da düşmesine neden olduğundan gümüş iyon salınımını olumsuz yönde etkilediği düşünülmektedir (Yin ve ark. 2020).

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Son on yılda dünyada malzeme bilimlerinde, özellikle nanomalzemelerde muazzam bir ilerleme gerçekleşmiştir. Bu malzemelerin çok çeşitli biyolojik, kimyasal, teknolojik ve çevresel uygulamaları araştırılmıştır. Nanomalzeme sentezi biyolojik, kimyasal ve fiziksel yöntem olmak üzere üç şekilde gerçekleştirilmektedir. Kimyasal ve fiziksel yöntemler maliyet ve çevre açısından bazı riskler içermektedir. Biyolojik yöntemler, yani yeşil yöntemler, nanomalzemelerin sentezi için nispeten daha uygun maliyetli, güvenli, verimli ve sürdürülebilir bir yoldur. Ayrıca büyük ölçekli üretimleri için daha kolay ölçeklendirme olanağı sunmaktadır ve yüksek basınç, enerji, sıcaklık ve toksik kimyasalların kullanımını içermemektedir. Nanopartiküllerin biyolojik yolla sentezi, indirgeyici ve kapatıcı etki (capping) gösteren mikroorganizma hücreleri veya enzimleri veya bitki ekstraktları içeren biyoaktif maddeler aracılığıyla gerçekleştirilmektedir (Jamkhande ve ark., 2019, Ali ve ark., 2022).

Nanomateriyal çeşitliği içerisinde, metalik nanopartiküller araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Bunlar arasından gümüş nanopartikülleri başta antimikrobiyal özellik olmak üzere antioksidan, antifungal, antienflamatuar, antiviral ve antianjiyogenez gibi biyolojik aktivitelere ve ayrıca hızlı teşhis görüntüleme, doku rejenerasyonu, ilaç taşıyıcı sistemler ve mediko-uygulamalı ürünlerin geliştirilmesi gibi biyomedikal uygulanabilirlik özelliklerine sahiptir (Nazir ve ark. 2021, Yasmin ve ark., 2020, Naseer ve ark. 2020, Iqbal ve ark. 2020). Gümüş nanopartiküllerinin aktif uygulandığı alanlar; tekstil ve ilaç endüstrisi, kozmetik, gıda paketlenme, plazmonik, kaplama, kataliz, sensörler, optoelektronik, temiz su teknolojisi, iklim değişikliği ve kirlilik kontrolü (Mathur ve ark. 2018; Iqbal ve ark. 2020, Kamran ve ark., 2019, Hosny ve ark., 2022).

Mikroorganizmalar kullanılarak nanoparçacıkların biyolojik sentezi temiz, biyoyumlu, toksik olmayan ve çevre dostu bir yöntemdir. Bu üretim yönteminde mikrobiyal hücrelerin yüksek düzeydeki fiziksel ve biyosentetik aktivitelerinden yararlanılır. Çok sayıda bakteri ve fungus çeşitli metalik, nanoparçacıkların sentezi için kullanılmıştır. Sentez, organizmanın doğasına ve metabolik aktivitesine bağlı olarak hücre içi veya hücre dışı bir süreç olabilmektedir. Halofiller, tuzlu ortamlarda gelişen ve sodyum klorür gereksinimlerine bağlı olarak hafif, orta veya aşırı derecede halofil olarak sınıflandırılabilen tuz seven organizmalardır. Halofilik arkeler üremeleri için 1.5M'ın üzeri ve doygunluk derecesindeki molar tuz konsantrasyonlarında optimum gelişirler ve

osmotik dengeyi sağlamak için hücrelerinde yüksek miktarda tuz (KCl) biriktirirler. Halofilik arkelerin doğal ortamlarında metallerle karşılaştığı bilinmektedir, ancak haloarchaea tarafından gümüş nanopartikülü sentezi hakkında literatürde çok az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Tez kapsamında 5 farklı halofilik arke izolatının sentezlediği gümüş nanopartiküllerinin kimyasal karakterizasyonları yapılarak antimikrobiyal yönden etkin olup olmadıkları değerlendirilmiştir. Her bir izolata ait nanopartikül örneklerinin XRD, SEM/EDS ve DLS analizleri ile gümüş nanopartiküllerinin varlığı, yaklaşık morfolojileri, boyut ve dağılım oranları belirlenerek kimyasal karakterizasyonları yapılmıştır. Hücre peleti kaynaklı preparatların ağırlık olarak yaklaşık %79-94 arasında küresel formu gümüş nano partikülü içerdiği gösterilmiştir (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. Halofilik arke izolatları ile üretilen gümüş nanopartiküllerinin kütlece miktarı

İzolat	% ağırlık (wt/wt)	
	Karbon	Gümüş
A235	7,54	92,46
A212	5,76	94,24
B65	9,65	90,35
CHB1	21,32	78,68
F75A	6,98	93,02

Sonuç olarak;

✓ A235, A212, B65, CHB1 ve F75A gibi beş farklı halofilik arke izolatı ile gümüş iyonları içeren yüksek tuzlu ortamda gümüş nanopartikül üretilebildiği çeşitli spektroskopik analizlerle belirlenmiştir,

✓ sentezlenen nanopartiküllerinin XRD spektrumlarında bütün izolatlar için 2θ değerleri benzerlik gösterirken, pik şiddetlerinin farklı olduğu gözlenmiştir. Bu durum izolatlar tarafından üretilen Ag nanopartiküllerinin farklı sayıda olmak üzere benzer kristal örgüye sahip olduklarını yansıtmaktadır,

✓ tüm izolatların ürettiği Ag nanopartiküllerinde (111) kristal örgüsünün baskın olduğu XRD sonuçlarından tespit edilmiştir,

✓ beş farklı izolatın ürettiği gümüş nanopartiküllerinin farklı boyutlarda ve küresel yapıda olduğu belirlenmiştir,

✓ üretilen gümüş nanopartiküllerinin SEM görüntüleri ile küresel yapıda oldukları tespit edilmekle birlikte farklı dağılımlara sahip oldukları gözlenmiştir,

✓ EDS yüzey harita sonuçlarına göre beş farklı izolatin ürettiği gümüş nanopartikülü miktarlarının farklı olduğu gözlenmiş ve en fazla oranın %89 ile F75A izolata ait olduğu tespit edilmiştir,

✓ EDS spektrum sonuçlarına göre üretilen gümüş nanopartiküllerinin spektrum değerlerinin benzer ve yaklaşık 3,0 keV dolaylarında olduğu gözlenmiştir. Bu veriler üretilen Ag partiküllerinin benzer kristal örgüye sahip olduklarını göstermektedir,

✓ DLS sonuçlarına göre, izolatlarca üretilen gümüş nanopartiküllerin boyutlarının ve % boyut dağılımlarının farklı olduğu gözlenmiştir. Bu farklı veriler besiyeri içerisinde hücre dağılımlarının homojen olmaması ve farklı aktivite göstermeleri kaynaklı olduğu düşünülmektedir,

✓ A235 ve B65 izolatlarının ürettiği Ag partiküllerinin, nano sınıfına girebilecek 91,28 ve 105,7 boyutlarına karşılık gelen toplam sayı sırasıyla yaklaşık %13,8 ve %17,7 olarak tespit edilmiştir.

✓ A235 ve B65 izolatlarının ürettiği Ag partiküllerinin çoğunlukla büyük boyutlu olması, izolatların besiyeri içerisinde homojen dağılmadığını ve bölgesel yığılmaların olduğunu düşündürmektedir,

✓ A212 izolatinin ürettiği Ag partiküllerin %47,4'ünün (%22,1'i 78,82; %15,8'i 91,28 ve %9,5'ü 105,7) nano sınıfına girebileceği tespit edilmiştir dolayısıyla homojen hücre dağılımının yanısıra biyolojik indirgeme yeteneğinin fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir,

✓ CHB1 izolatinin ürettiği Ag partiküllerin %30,4'lük kısmı (%1,1'i 68,06; %5,0'i 78,82; %10,3'i 91,28 ve %14,0'ü 105,7) nano Ag sınıfına girebilecek büyüklüktedir,

✓ CHB1 izolatinin ürettiği Ag partiküllerinin boyut büyüklüğünün artması ile partikül sayısının azaldığı belirlenmiştir,

✓ F75A izolatinin ürettiği Ag partiküllerinin tümünün nano sınıfına girdiği tespit edilmiştir, bu durum F75A izolatinde biyoredüksiyon yeteneğinin yüksek olduğunu göstermektedir,

Yukarıda verilen sonuçlar genelinde; boyut olarak çoğunlukla 100 nm üzerinde olduğu tespit edilen nanopartiküllerin çekirdeklenme aşamasının homojen hale gelmesi için hücrelerin süspanse halde bulunduğu kültür ortamındaki gümüş iyonu

konsantrasyonunda homojenite sağlanması amacıyla etkili karıştırma ve inkübasyon zamanlarının optimizasyonu ve farklı sıcaklıkların partiküller arası fiziksel etkileşimi azaltacağı öngörüsünden hareketle farklı sıcaklık derecelerinde Ag nanopartikül sentezi çalışmalarının yapılması önerilmektedir.



KAYNAKLAR

- Abbasi, E., Milani, M., Fekri Aval, S., Kouhi, M., Akbarzadeh, A., Tayefi Nasrabadi, H., Nikasa, P., Joo, S. W., Hanifehpour, Y., Nejati-Koshki, K., and Samiei, M., 2016. Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications and properties. **Critical Reviews in Microbiology**. 42(2), 173–180.
- Abdollahnia, M., Makhdoumi, A., Mashreghi, M., and Eshghi, H., 2020. Exploring the potentials of halophilic prokaryotes from a solar saltern for synthesizing nanoparticles: The case of silver and selenium. **PloS One**, 15(3), e0229886.
- Ahmed, S., Annu, S., Ikram, Y., Salprima, S., 2016. Biosynthesis of gold nanoparticles: A green approach. **Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology**. 161: 141-153.
- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B. L., and 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. (b)
- Ahmed, S., Ullah, S., Ahmad, M., and Swami, B.L., 2016. Green synthesis of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* aqueous leaf extract, **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, 9 (2016) 1–7 (c)
- Al-Dhabi, N.A., Mohammed Ghilan, A.-K. and Arasu, M.V., 2018. Characterization of silver nanomaterials derived from marine streptomyces sp. Al-dhabi-87 and its in vitro application against multidrug resistant and extended-spectrum beta-lactamase clinical pathogens. **Nanomaterials**. 8, 279.
- Ali, F., Younas, U., Nazir, A., Hassan, F., Iqbal, M., Hamza, B., Mukhtar, S., Khalid, A., and Ishfaq, A., 2022. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using strawberry seed extract and evaluation of their antibacterial and antioxidant activities, **Journal of Saudi Chemical Society**. 26(6), 101558.
- Antunes, A., Simões, M.F., Grötzinger, S.W., Eppinger, J., Bragança, J. and Bajic, V.B., 2017. Bioprospecting Archaea: Focus on Extreme Halophiles. In: Paterson, R., Lima, N. (eds) **Bioprospecting Topics in Biodiversity and Conservation**. vol 16. Springer, Cham. ISBN: 9783319479330.
- Arul, D., Balasubramani, G., Balasubramanian, V., Natarajan, T. and Perumal, P., 2017. Antibacterial efficacy of silver nanoparticles and ethyl acetate's metabolites of the potent halophilic (marine) bacterium, *Bacillus cereus* A30 on multidrug resistant bacteria. **Pathogens and Global Health**, 111(7), 367–382.
- Bapat, R. A., Chaubal, T. V., Joshi, C. P., Bapat, P. R., Choudhury, H., Pandey, M., Gorain, B., and Kesharwani, P., 2018. An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, 91, 881–898.
- Baruwati, B., Polshettiwar, V. and Varma, R.S., 2009. Glutathione promoted expeditious green synthesis of silver nanoparticles in water using microwaves, **Green Chemistry**, 11, 926-930.
- Beeler, E., and Singh, O.V., 2016. Extremophiles as sources of inorganic bio-nanoparticles. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 32(9), 156.
- Bini, E., 2010. Archaeal transformation of metals in the environment. **FEMS Microbiol Ecol**. 73:1–16.
- Buda, D.M., Bulzu, P.A., Barbu-Tudoran, L., Porfire, A., Pătraș, L., Sesărman, A., and Banciu, H.L., 2019. Physiological response to silver toxicity in the extremely

- halophilic archaeon *Halomicrobium mukohataei*. **FEMS Microbiology Letters**, 366(18), fnz231.
- Can, S.M., 2021, Halofilik arkelerde nanopartikül sentezi, **Mustafa Kemal Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü**, Yüksek lisans tezi, Hatay.
- Chudasama, B., Vala, A.K., Andhariya, N. *et al.*, 2010. Highly bacterial resistant silver nanoparticles: synthesis and antibacterial activities. **J Nanopart Res.** 12, 1677–1685.
- Costa, M. I., Álvarez-Cerimedo, M. S., Urquiza, D., Ayude, M. A., Hoppe, C. E., Fasce, D. P., De Castro, R. E., and Giménez, M. I., 2020. Synthesis, characterization and kinetic study of silver and gold nanoparticles produced by the archaeon *Haloferax volcanii*. **Journal of Applied Microbiology**, 129(5), 1297–1308.
- Cui, H.L. and Dyall-Smith, M.L., 2021. Cultivation of halophilic archaea (class *Halobacteria*) from thalassohaline and athalassohaline environments. **Mar Life Sci Technol.** 3, 243–251.
- Das, V. L., Thomas, R., Varghese, R. T., Soniya, E. V., Mathew, J., and Radhakrishnan, E. K., 2014. Extracellular synthesis of silver nanoparticles by the *Bacillus* strain CS 11 isolated from industrialized area. **3 Biotech**, 4(2), 121–126.
- Dura'n, N., Marcato P.D., Dura'n, M., Yadav, A., Gade, A. And Rai M., 2011. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptide, bacteria, fungi, and plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 90(5):1609–24.
- El-Seedi, H. R., El-Shabasy, R. M., Khalifa, S. A. M., Saeed, A., Shah, A., Shah, R., Iftikhar, F. J., Abdel-Daim, M. M., Omri, A., Hajrahnd, N. H., Sabir, J. S. M., Zou, X., Halabi, M. F., Sarhan, W., and Guo, W., 2019. Metal nanoparticles fabricated by green chemistry using natural extracts: biosynthesis, mechanisms, and applications. **RSC advances**. 9(42), 24539–24559.
- Farrell, E. and Brousseau, J.L., 2014. Guide for DLS sample preparation v5.
- Gahlawat G. and Choudhury, A.R., 2019. A review on the biosynthesis of metal and metal salt nanoparticles by microbes. **RSC Advances**. 26;9(23):12944-12967.
- Gour, A. and Jain, N. K., 2019. Advances in green synthesis of nanoparticles. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**. 47(1), 844–851.
- Hosny M., Fawzy M., Eltaweil A.S., 2022. Green synthesis of bimetallic Ag/ZnO@Biohar nanocomposite for photocatalytic degradation of tetracycline, antibacterial and antioxidant activities. **Sci. Rep.** 12, 7316.
- Iqbal, D.N., Nazir, A., Iqbal, M., Yameen, M., 2020. Green synthesis and characterization of carboxymethyl guar gum: Application in textile printing technology, **Green Process. Synth.** 9 (1), 212-218.
- Iqbal, M., Zafar, H., Mahmood, A., Niazi, M.B.K., Aslam, M.W., 2020. Starch-Capped Silver Nanoparticles Impregnated into Propylamine-Substituted PVA Films with Improved Antibacterial and Mechanical Properties for Wound-Bandage Applications. **Polymers**. 12, 2112.
- Ikram, S.A. 2015., Silver Nanoparticles: One Pot Green Synthesis Using Terminalia arjuna Extract for Biological Application. **Journal of Nanomedicine and Nanotechnology**. 6(04).
- Jamkhande, P.G., Ghule, N.W., Bamer, A.H. and Kalaskar, M.G., 2019. Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications, **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 53,101174

- Jeevan, P., Ramya, K. and Rena, A.E., 2012. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by culture supernatant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Indian Journal of Biotechnology**. 11, 72–76.
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y.S., Dufresne, A. and Danquah, M.K., 2018. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, 9(1), 1050–74.
- Kalabegishvili, T.L., Kirkesali, E.I., Rcheulishvili, A.N., Ginturi, E.N., Murusidze, I.G., Pataraya, D.T., Gurielidze, M.A., Tsertsvadze, G.I., Gabunia, V.N. and Lomidze, L.G., 2012. Synthesis of gold nanoparticles by some strains of *Arthrobacter* genera. **Journal of Materials Science & Engineering A: Structural Materials: Properties, Microstructure and Processing**. 2, 164–173.
- Kamran, M., Haroon, M., Saheed, A.P., Almohammed, A.R., Al-Saadi, A.A., Saleh, T.A., 2019. Characterization of valeric acid using substrate of silver nanoparticles with SERS. **Journal of Molecular Liquids**. 273, 536–542.
- Karnani, R.L. and Chowdhary, A., 2013. Biosynthesis of silver nanoparticle by eco-friendly method, **Indian Journal of Nanoscience**. 1(1), 25–31.
- Koul, B., Poonia, A. K., Yadav, D., and Jin, J.O., 2021. Microbe-Mediated Biosynthesis of Nanoparticles: Applications and Future Prospects. **Biomolecules**, 11(6), 886.
- Kyriacou, S.V., Brownlow, W.J. and Xu X-H.N., 2004. Using nanoparticle optics assay for direct observation of the function of antimicrobial agents in single live bacterial cells. **Biochemistry** 43:140–147
- Low, A. and Bansal, V., 2010. A visual tutorial on the synthesis of gold nanoparticles. **Biomed Imaging Interv J**. 6(1):e9.
- Mathur, P., Jha, S., Ramteke, S., & Jain, N. K., 2018. Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**. 46(sup1), 115–126.
- Nagar, D.N., Ghosh, N.N. and Braganca, J.M., 2022. Green synthesis of selenium nanospheres and nanoneedles by halophilic archaea. **Appl Nanosci**. 12, 3983–3994.
- Naseer A., Ali A., Ali S., Mahmood A., Kusuma H.S., Nazir A., Yaseen M., Khan M.I., Ghaffar A., Abbas M. and Iqbal M., 2020. Biogenic and eco-benign synthesis of platinum nanoparticles (Pt NPs) using plants aqueous extracts and biological derivatives: environmental, biological and catalytic applications. **J. Mater. Res. Technol.** 9(4), 9093–9107.
- Nazir, A., Akbar, Baghdadi, H.B., Rehman, S., Al- Abbad, E., Fatima, M., Iqbal, M., Tamam, N., Alwadai, N. and Abbas, M., 2021. Zinc oxide nanoparticles fabrication using *Eriobotrya japonica* leaves extract: Photocatalytic performance and antibacterial activity evaluation. **Arabian J. Chem.** 14 (8).
- Oren, A., Arahall, D.R. and Ventosa, A., 2009. Emended descriptions of genera of the family *Halobacteriaceae*. **Int J Syst Evol Microbiol**. 59:637–642
- Oren, A., 2014. Taxonomy of halophilic Archaea: current status and future challenges. **Extremophiles**. 18:825–834.
- Ozcan, B., Cokmus, C., Coleri, A., Caliskan, M., 2006. Characterization of extremely halophilic archaea isolated from saline environment in different parts of Turkey. **Microbiology**, 75(6): 739–746.
- Pal, S., Tak, Y.K. and Song, J.M., 2007. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-

- negative bacterium *Escherichia coli*. **Appl Environ Microbiology**. 73:1712–1720.
- Panacek, A., Kvitek, L., Prucek, R., Kolar, M., Vecerova, R., Pizurova, N., Sharma, V.K., Nevecna, T., Zboril, R., 2006. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. **J Phys Chem B**. 110:16248–16253.
- Pantidos, N. And Horsfall, L.E., 2002. Biological synthesis of metallic nanoparticles by bacteria, fungi and plants. **Journal of Nanomedicine and Nanotechnology**. 5 (5), 1.
- Patil, S. Fernandes, J. Tangasali, R. and Furtado, I., 2014. Exploitation of *Haloferax alexandrinus* for biogenic synthesis of silver nanoparticles antagonistic to human and lower mammalian pathogens. **Journal of Cluster Science**, 25(2): 423-433.
- Patra, J.K and Baek, K.H., 2014. Green nanobiotechnology: factors affecting synthesis and characterization techniques. **Journal of Nanomaterials**. 219, Article ID 417305.
- Pfeifer, K., Ergal, I., Koller, M., Basen, M., Schuster, B., and Rittmann, S.K.R., 2021. Archaea Biotechnology. **Biotechnology advances**, 47, 107668.
- Rampelotto, P.H., 2013. Extremophiles and Extreme Environments. *Life*. 3(3):482-485.
- Sharma, V.K, Yngard, R.A and Lin, Y., 2009. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. **Adv Colloid Interface Sci**. 145:83–96.
- Singh, R. and Nalwa, H.S., 2011. Medical applications of nanoparticles in biological imaging, cell labeling, antimicrobial agents, and anticancer nanodrugs. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. 7(4): 489–503.
- Singh, J., Dutta, T., Kim, K. H., Rawat, M., Samddar, P., and Kumar, P., 2018. Green' synthesis of metals and their oxide nanoparticles: applications for environmental remediation. **Journal of nanobiotechnology**, 16(1), 84.
- Singh, Y., Kaushal, S., and Sodhi, R.S., 2020. Biogenic synthesis of silver nanoparticles using cyanobacterium *Leptolyngbya* sp. WUC 59 cell-free extract and their effects on bacterial growth and seed germination. **Nanoscale Advances**, 2(9), 3972–3982.
- Srivastava, P., Bragança, J., Ramanan, S.R. and Kowshik, M., 2013. Synthesis of silver nanoparticles using haloarchaeal isolate *Halococcus salifodinae* BK 3. **Extremophiles**, 17(5): 821-831.
- Srivastava, P., Braganca, J., Ramanan, S.R., and Kowshik, M., 2014. Green synthesis of silver nanoparticles by haloarchaeon *Halococcus salifodinae* BK6. **Advanced Materials Research**. 938: 236-241.
- Srivastava, P., Braganca, J.M. and Kowshik, M., 2014. In vivo synthesis of selenium nanoparticles by *Halococcus salifodinae* BK18 and their anti-proliferative properties against HeLa cell line. **Biotechnol Prog**. 30(6):1480-7.(b)
- Srivastava, P., Nikhil, E.V., Bragança, J.M. and Kowshik, M., 2015. Anti-bacterial TeNPs biosynthesized by haloarcheon *Halococcus salifodinae* BK3. **Extremophiles**. 19(4):875-84.
- Srivastava, P. and Kowshik, M., 2015. Biosynthesis of Nanoparticles from Halophiles. In: D.K. Maheshwari, M. Saraf (eds.), **Halophiles, Sustainable Development and Biodiversity**, Springer International Publishing Switzerland. ISBN: 978-3-319-14595-2

- Tag, H.M, Saddiq, A.A., Alkinani, M. and Hagagy, N., 2021. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Haloferax* sp. NRS1: image analysis, characterization, in vitro thrombolysis and cytotoxicity. **AMB Express**. 26;11(1):75.
- Valodkar M, Bhadoria A, Pohnerkar J. et al., 2010. Morphology and antibacterial activity of carbohydrate-stabilized silver nanoparticles. **Carbohydr Res**. 345:1767–1773.
- Voica, D. M., Bartha, L., Banciu, H. L. and Oren, A., 2016. Heavy metal resistance in halophilic Bacteria and Archaea. **FEMS Microbiology Letters**, 363(14), fnw146.
- Woese, C.R., Kandler, O. And Wheelis, M.L., 1990 Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proc Natl Acad Sci U S A** 87(12):4576–4579.
- Yadav, A., Kon, K., Kratosova, G., Duran, N., Ingle, A. P. and Rai, M., 2015. Fungi as an efficient mycosystem for the synthesis of metal nanoparticles: progress and key aspects of research. **Biotechnology Letters**, 37(11), 2099–2120.
- Yasmin S., Nouren S., Bhatti H.N., Iqbal D.N., Iftikhar S., Majeed J., Mustafa R., Nisar N., Nisar J., Nazir A., et al., 2020. Green synthesis, characterization and photocatalytic applications of silver nanoparticles using *Diospyros lotus*. **Green Process. Synth.** 9:87–96.
- Yin, I. X., Zhang, J., Zhao, I. S., Mei, M.L., Li, Q., and Chu, C.H., 2020. The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. **International journal of nanomedicine**, 15, 2555–2562.
- Yong, P., Rowson, N. A., Farr, J. P., Harris, I. R., and Macaskie, L.E., 2002. Bioreduction and biocrystallization of palladium by *Desulfovibrio desulfuricans* NCIMB 8307. **Biotechnology and bioengineering**, 80(4), 369–379.