



## Extracellular biosynthesis of silver nanoparticle using *Tilia rubra* DC. extract and antifungal activity

Betül YILMAZ ÖZTÜRK <sup>\*1</sup>, Derviş ÖZTÜRK <sup>2</sup>  
ORCID: 0000-0002-1817-8240; 0000-0001-7189-7407

<sup>1</sup> Eskişehir Osmangazi University, Central Research Laboratory Application and Research Center, 26040, Eskişehir, Turkey

<sup>2</sup> Eskişehir Osmangazi University, Plant and Animal Production Department, Mahmudiye Equine Vocational School, 26800, Eskişehir, Turkey

### Abstract

Although nanoparticles synthesized by chemical reactions show a wide range of toxicities in various vertebrates and invertebrates, they are produced in large quantities to take advantage of their antifungal activities. Due to the remarkable disadvantages of conventional chemical methods, the green synthesis of metallic nanoparticles has acquired great attention in recent years. This method is proposed as an alternative to classical chemical methods with its low cost, environmentally friendly and simple approaches. Our aim in this study is to determine the suitability of *Tilia rubra* DC. extract in the extracellular synthesis of silver nanoparticles and characterize the material obtained. *T. rubra* extract has been studied for the first time for the biosynthesis of silver nanoparticles, forming surface plasmon resonance at 427 nm in UV-Vis spectrophotometer. Also, transmission electron microscope (TEM) images showed that nanoparticles have spherical morphology. According to TEM images, nanoparticles were found to be between 5-15 nm in size. X-ray diffraction (XRD) analysis, on the other hand, determined that the particles were crystalline with a face centered cubic geometry. Fourier transform infrared (FTIR) analysis was performed to identify possible biomolecules responsible for bio-reduction of silver ions. The antifungal effect of the biosynthesis silver nanoparticles on *Candida albicans*, a pathogenic yeast, was examined by the agar diffusion method, and as a result, the synthesized silver nanoparticles showed a significant inhibitory effect on *C. albicans*. Our results support the potential for future use of biosynthesized silver nanoparticles for industrial and biomedical applications, thanks to the environmentally friendly synthesis procedure.

**Key words:** green synthesis, *Tilia rubra*, silver nanoparticle, characterization, antifungal activity

----- \* -----

### *Tilia rubra* DC. ekstraktı kullanılarak gümüş nanopartikülün hücre dışı biyosentezi ve antifungal aktivitesi Özet

Kimyasal reaksiyonlarla sentezlenen nanopartiküller çeşitli omurgalı ve omurgasızlarda geniş bir toksisite yelpazesi sergilemeler de, antifungal aktivitelerinden yararlanmak üzere büyük miktarlarda üretilmektedir. Klasik kimyasal yöntemlerin dikkat çekici dezavantajları nedeniyle, metalik nanopartiküllerin yeşil sentezi son yıllarda büyük ilgi görmeye başlamıştır. Bu yöntem düşük maliyetli, çevre dostu ve basit yaklaşımları ile klasik kimyasal yöntemlere bir alternatif olarak önerilmektedir. Bu çalışmada amacımız, gümüş nanopartiküllerin hücre dışı sentezinde *Tilia rubra* DC. ekstraktının uygunluğunu belirlemek ve elde edilen materyali karakterize etmektir. Bunun yanı sıra biyosentezlenmiş gümüş nanopartiküllerinin antifungal etkisi değerlendirilmiştir. *T. rubra* ekstraktı, gümüş nanopartiküllerin biyosentezi için ilk kez çalışılmış olup UV-Vis spektrofotometresinde 427 nm'de yüzey plazmon rezonansı oluşturmuştur. Ayrıca geçirimsiz elektron mikroskop (TEM) görüntüleri nanopartiküllerin küresel morfolojiye sahip olduğunu göstermiştir. TEM görüntülerine göre nanopartiküllerin boyutlarının 5-15 nm arasında olduğu bulunmuştur. X-ışını kırınımı (XRD) analizi ise partiküllerin yüz merkezli kübik geometriye sahip kristal yapıda olduğunu belirlemiştir. Gümüş iyonlarının biyo-indirgenmesinden sorumlu olası biyomolekülleri tanımlamak için Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905308829609; Fax.: +902222394106; E-mail: byozturk@ogu.edu.tr

analizi yapılmıştır. Biyosentezlenmiş gümüş nanopartiküllerin patojen bir maya olan *Candida albicans* üzerindeki antifungal etkisi agar difüzyon metodu ile incelenmiş ve sonuç olarak sentezlenen gümüş nanopartikülleri, *C. albicans* üzerinde önemli inhibe edici etki göstermiştir. Sonuçlarımız, biyosentezlenmiş gümüş nanopartiküllerin çevre dostu sentez prosedürü sayesinde, gelecekte endüstriyel ve biyomedikal uygulamalar için kullanım potansiyeli olduğunu desteklemektedir.

**Anahtar kelimeler:** yeşil sentez, *Tilia rubra*, gümüş nanopartikül, karakterizasyon, antifungal aktivite

## 1. Giriş

Nanomalzemeler gelişmekte olan bir teknoloji olarak günlük hayatımızın tüm yönlerini etkilemektedir. Çünkü nanopartiküllerin (NP'lerin) benzersiz optoelektronik ve fizikokimyasal özellikleri ile çok çeşitli kullanım alanları bulunmaktadır. Tıp, tarım ve gıda endüstrileri, elektronik ve kozmetik bu alanların başında gelmektedir [1, -2] Bunun yanısıra ağır metal gibi çevresel kirleticilerin temizlenmesi için de nanoteknoloji tabanlı iyileştirme konuları üzerinde çok sayıda araştırma yapılmaktadır [3]. Tek bir nanopartikül bile çeşitli şekillerde birçok farklı sentez yöntemi kullanılarak üretilebilmiş ve bunun sonuçları ve canlılar üzerindeki etkileri toksikolojik çalışmalar ile araştırılmıştır [4-6]. Özellikle gümüş nanopartiküller (AgNP'ler), entegre devreler, sensörler, biyo-etiketleme, filtreler, hücre elektrotları ve kozmetik sağlık gibi alanlarda yaygın uygulamaları nedeniyle araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Ayrıca çeşitli tıbbi uygulamalarda ticari kullanımı nedeniyle, AgNP üretimindeki yıllık artışın dünya çapında yüzlerce ton olduğu tahmin edilmektedir. Gümüşün de içinde bulunduğu metal NP'ler, termal ayrışma, elektrokimyasal, mikrodalga destekli işlem ve kimyasal yöntemler gibi çeşitli yaklaşımlarla sentezlenir [7]. NP'lerin sentezinde için tehlikeli kimyasalların sık kullanımı, maliyetinin yüksek olması, aşırı sıcaklık ve toksik madde açığa çıkması gibi dezavantajlar bulunmaktadır. Örneğin kimyasal sentez aşamalarında sıkça kullanılan Sodyum borhidür ( $\text{NaBH}_4$ ) hem maliyeti yüksek bir ürün hem de indirgeyici olarak kullanıldıktan sonra giderilemeyen yan ürünler oluşturabilmektedir. Oluşan yan ürünler özellikle üretilen nanomalzemelerin uygulama olasılıklarını ve biyoyoumluluklarını ciddi şekilde sınırlayabilir. Bu yüzden metalik NP'lerin sentez aşamasında yüksek verimli, düşük maliyetli, toksik olmayan ve çevresel olarak iyi huylu prosedürler geliştirmeye ihtiyaç vardır. Bu nedenle, NP'lerin sentezi için biyolojik yaklaşım (biyosentez) önem kazanmaktadır. Yeşil kimya ya da yeşil sentez olarak bilinen bu yöntemde bitki ve bitki ürünleri, algler, mantarlar, maya, bakteriler ve virüsler dahil olmak üzere doğada bulunan çok çeşitli biyolojik kaynaklar kullanılabilir [8, 9] Yeşil sentezde kullanılan bu organizmaların, hücre içi veya hücre dışı inorganik nanomateryaller ürettiği bilinmektedir [1]. Bu tür biyoprosesler, çevre kirliliğinin azaltılmasında ve metallerin atıklardan geri kazanılmasında da etkili bir şekilde kullanılmıştır [10].

Doğal ürünler, biyomedikal araştırmacılar tarafından yıllardır çalışılmaktadır. Biyolojik materyallerin içeriği çeşitli rahatsızlıkların tedavisi için birçok sentetik veya yarı sentetik doğal analogun sentezine ilham vermiştir. Bitkilerin ticari uygulama için kullanılması, bünyesinde çok çeşitli biyomolekülleri bulundurması yönünden ve elde edilmesi kolay olduğu için nanomalzeme üretiminde umut verici bir araştırma alanıdır [11]. Bu nedenle, bu çalışmada, *Tilia rubra* DC. (Ihlamur) ekstraktı kullanılarak AgNP sentezi gerçekleştirilmiştir. *T. rubra*, Malvaceae familyasında yer almaktadır. Özellikle doğal olarak yetiştiği gibi ülkemizin çeşitli yerlerinde kültürde edilmektedir. *T. rubra*'nın yatıştırıcılar, sakinleştiriciler, diüretikler ve balgam söktürücüler gibi özellikleri bulunmaktadır. Ayrıca geleneksel tıpta gribal enfeksiyonu tedavi etme amacı için kullanılan ve tüm dünya çapında tanınan bir bitkisel üründür [12]. *T. rubra*'nın Akyuz vd., 2014 raporlarına göre 17 farklı fenolik bileşik olduğunu ve bunlardan 14 tanesi tanımlanıp güçlü bir antioksidan olduğu belirlenmiştir [13]. Frezza vd., 2020 raporlarına göre ise ihlamurda esas olarak flavonoidler, ardından organik asitler ve pentasiklik triterpenler tarafından oluşturduğu bildirilmiştir [14].

Bu çalışmada amacımız *T. rubra*'nın yapısında bulunan özellikle fenolik bileşiklerin çeşitliliği AgNP'lerinin sentezi için umut verici bir kaynak olarak görülmüş ve biyosentezlenen nanopartiküller UV-Vis, TEM, XRD, FTIR ile karakterize edilmiştir. Ayrıca gümüşün ( $\text{Ag}^+$ ) bitki ekstrakt kaynaklı indirgenmesini ( $\text{Ag}^0$ ) kullanarak fırsatçı bir patojen olan *C. albicans* türüne karşı antifungal aktivitesi de değerlendirilmiştir.

## 2. Materyal ve yöntem

### 2.1. Bitki Ekstraktının Hazırlanması

*T. rubra* ekstraktının hazırlanması için Tippyawat vd., (2016) kullandığı yöntem revize edilerek hazırlanmıştır [9]. Öncelikle *T. rubra* yaprakları deiyonize su ile 3 kez yıkanıp ve kurutulduktan sonra toz haline getirilen yapraklardan 5 g kullanılarak hazırlanmıştır. Bu yapraklardan bitki ekstraktını hazırlamak için 50 ml deiyonize su içinde kaynatılmış ve soğumaya bırakılmıştır. Soğutulan ekstrakt Whatman No 1 filtre kağıdı kullanılarak süzülmesi ve 4 °C'de bir buzdolabında saklanmıştır.

### 2.2. Biyosentezlenmiş Gümüş Nanopartiküllerin (T-AgNP) Sentezi ve Karakterizasyonu

T-AgNP numunelerinin hazırlanması için  $\text{AgNO}_3$  (Sigma Aldrich) stok çözeltisinden 0.1 mM olarak seyreltilmiş ve 1:1 oranında bitki ekstraktı ile oda sıcaklığında kuvvetli bir şekilde 24 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Kahverengi-siyahımsı bir renk oluşturan karışım gümüş iyonlarının indirgenmesi sonucunda oluşmuş ve 8000 rpm'de santrifüj edilerek elde edilen pellet 3 kez deiyonize su ile yıkandı. Nanopartikülleri toz haline getirebilmek için dondurarak kurutma işlemi bir liyofilizatör ile gerçekleştirilmiştir. Toz haline getirilen nanopartiküller karakterizasyona kadar  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır.

AgNP'lerin morfolojik özellikleri, 100 kV hızlanma voltajında bir JEOL JEM-1220 mikroskop kullanılarak geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile incelenmiştir. Kristal yapılar, X-ışını toz kırınımı Panalytical Empyrean marka XRD ile analiz edilmiştir. Taramalar Cu Ka tüpü kullanılarak bir 45 kV voltaj ve 40 mA akım analiz koşullarında  $5^\circ$ -  $80^\circ$  arasında  $2\theta$  açısında yapılmış ve T-AgNP'lerin optik özellikleri spektral analiz ile incelenmiştir. T-AgNP'lerin absorptans spektrumları, bir UV-Vis (AE-S90-2D Spectrophotometer, Çin) cihazı ile kaydedildi. Spektrumları belirlemek için ölçümler maksimum absorptans dalga boyunda kaydedilmiş ve taramalar 190-1100 nm dalga boyunda yapılmıştır. Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) çalışmaları bir Perkin Elmer Spectrum Two spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### 2.3. Antifungal Aktivite

Sentezlenen maddenin antifungal etkinliğini belirlemek için T-AgNP, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) tarafından önerilen kriterlere göre hazırlanmıştır [15]. Sentezlenen nanopartiküllerin antifungal duyarlılıkları agar difüzyon testi ile değerlendirilmiştir. *C. albicans* (ATCC 14053), ESOGÜ-ARUM'da bulunan stok kültürden sağlanmıştır. Çalışma öncesi maya hücrelerinin ekim ve büyüme ortamı için maya ekstraktı-pepton-D-glikoz (YPD) kullanılmıştır. Aynı zamanda AgNP'lerin antifungal aktivitesinin araştırılabilmesi için yapılan disk difüzyon yönteminde de YPD agar besiyeri kullanılmıştır [16]. Aktive edilmiş mikroorganizmaları McFarland 0.5 değerine ayarlanmış ve besi ortamına inokulasyonu sonrası 10, 20, 30 ve 40  $\mu\text{l}$  olacak şekilde T-AgNP'lerle hazırlanmış diskler, besi ortamına yerleştirilmiştir.  $37\text{ }^\circ\text{C}$  de inkübasyona bırakılarak ve 24 saat sonunda oluşan zonlar ölçüldü. Bu zonlar, standart antifungal bir antibiyotik olan amfoterisin B'nin zonları ile kıyaslanmış ve deneyler üç kez tekrar edilmiştir.

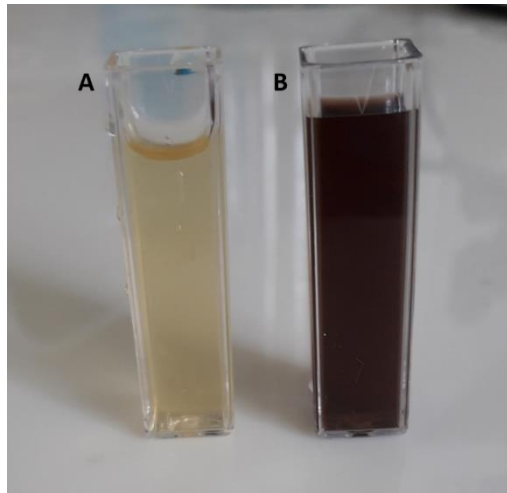
### 2.4. İnhibisyon Zon Çapı Tayini

Disk difüzyon tahlilleri ile bölge çapları, büyümede belirgin bir azalma olan noktadan ve gözle görülür bir büyüme olan noktaya milimetrik bir ölçek kullanarak ölçülmüştür. Bu ölçümler Wayne (2004) tarafından raporlandığı gibi 24 saat sonunda değerlendirilmiştir [17].

## 3. Bulgular

### 3.1. T-AgNP'lerin Karakterizasyonu

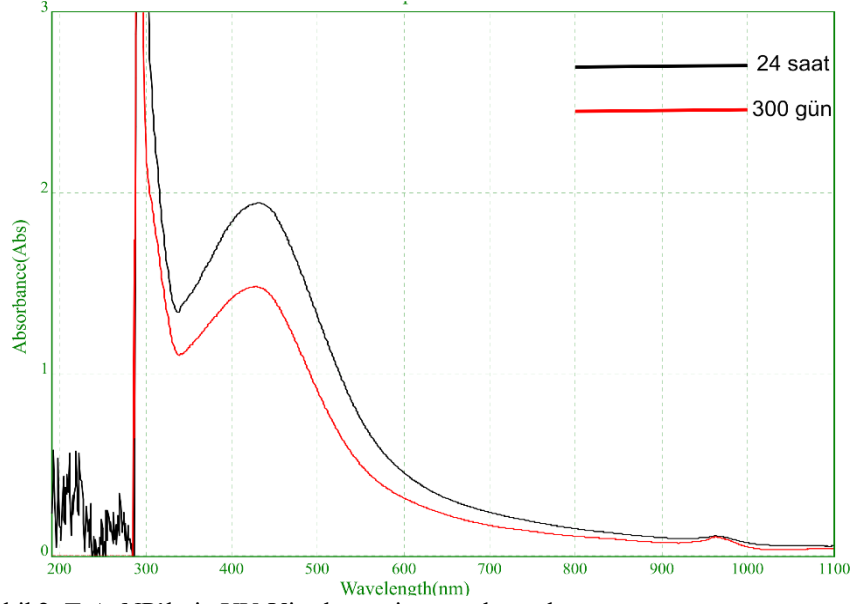
Biyosentezlenmiş T-AgNP'lerin ilk görünür işareti,  $\text{AgNO}_3$  ile *T. rubra* ekstrakt karışımlarının rengi açık sarıdan koyu kahve bir renge değişmesidir (Şekil 1). Bu renk değişimi,  $\text{Ag}^+$ 'nin  $\text{Ag}^0$ 'a indirgenmesi saptamak için morfolojik bir göstergedir [18].



Şekil 1.  $\text{AgNO}_3$  eklendikten sonra bitki ekstraktındaki renk değişikliği A. *Tilia rubra* ekstraktı B. Biyosentezlenmiş T-AgNP

Gümüş nanopartiküllerinin oluşturmuş olduğu renk, etkileşen bir elektromanyetik alanın neden olduğu serbest iletim elektronlarının kolektif salınımından dolayı ortaya çıkan yüzey plazmon rezonansına (SPR) bağlıdır [19]. SPR

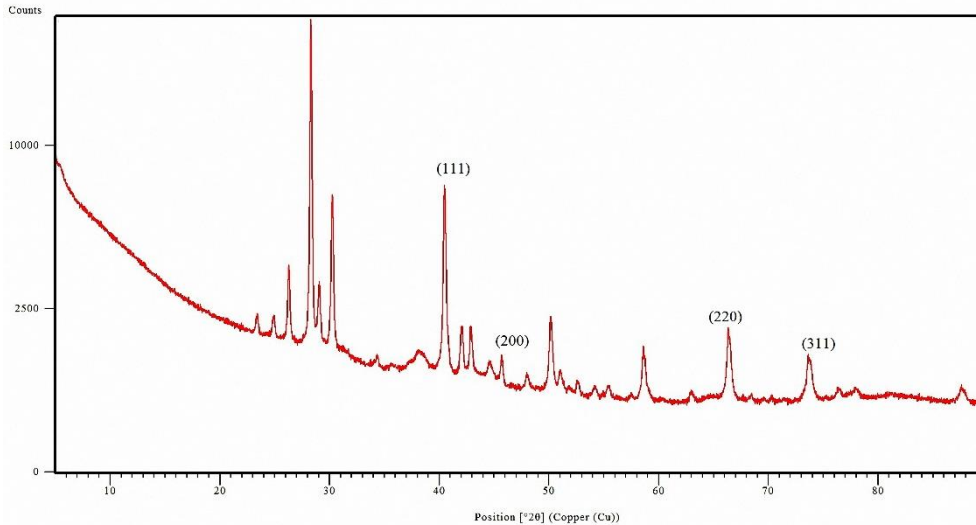
bandının oluştuğunu görmek için *T. rubra* içeren reaksiyon karışımının UV-Vis spektroskopisi ile ölçümü gerçekleştirilmiş, hatta nanopartiküllerin stabilitesini kontrol etmek amacı ile ikinci bir spektrum (300. gün) tekrar alınmıştır (Şekil 2).



Şekil 2. T-AgNP'lerin UV-Vis absorpsiyon spektrumları

Dalga boyundaki bir değişiklik, parçacık boyutu, şekli ve parçacıklar arasındaki özelliklerin bir ölçüsüdür [20]. Bu sonuçlara göre gümüş nitrat ile işlenmiş *T. rubra* ekstraksiyonu ile biyosentezlenmiş AgNP'ler 24 saat sonunda 427 nm aralığında 1.933 absorbans olarak bir pik göstermiştir (Şekil 2). Daha önce yapılan çalışmalara göre SPR bandının 350-450 nm aralığına karşılık geldiği bildirilmiştir [21]. Böylece T-AgNP'lerin yüksek bir SPR bandı oluşturduğu görülmüştür. 300. Gün (6 ay) sonunda yapılan ölçümde yine 427 nm aralığında en yüksek piki verirken sadece absorbans değeri düşmüştür. Bu sonuca göre nanopartiküllerin 6 ay boyunca stabilitesini koruduğu görülmüştür.

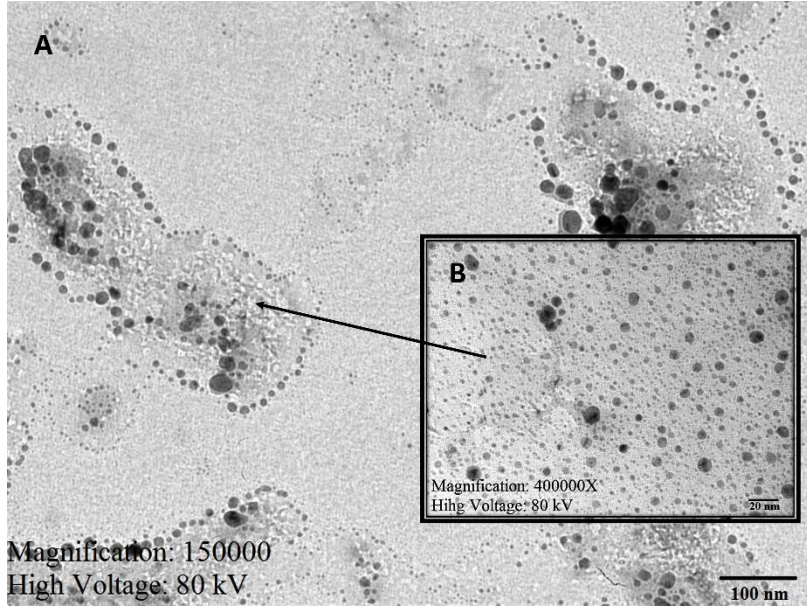
AgNP'lerin diğer bir karakterizasyonu için XRD metodu kullanıldı ve bu metodla saf kristal halde bulunan gümüş nanopartiküllerin patterni belirlenmiştir. Şekil 3 de görüldüğü gibi elde edilen kırınım sonuçları 39.02, 44.138, 64.747, 74.983 ve 82.220 açılarında bantlar göstermiştir. Bu sonuç, sırasıyla 111, 200, 220, 311 ve 222 Bragg düzlemlerine karşılık gelen gümüş kristal oluşumunu ortaya koymaktadır. Böylece, gümüş kristalitlerin yüz merkezli kübik (fcc) yapısını doğrulayan bir spektrum elde edilmiştir. (referans kod: 04-014-6889). Aynı zamanda spektrumda görülen diğer bantlar ise şekilsiz organik fazlarla ilişkili olduğu düşünülmektedir.



Şekil 3. *T. rubra* ile biyosentezlenen kurutulmuş T-AgNP'lerin X ışını kırınım profili

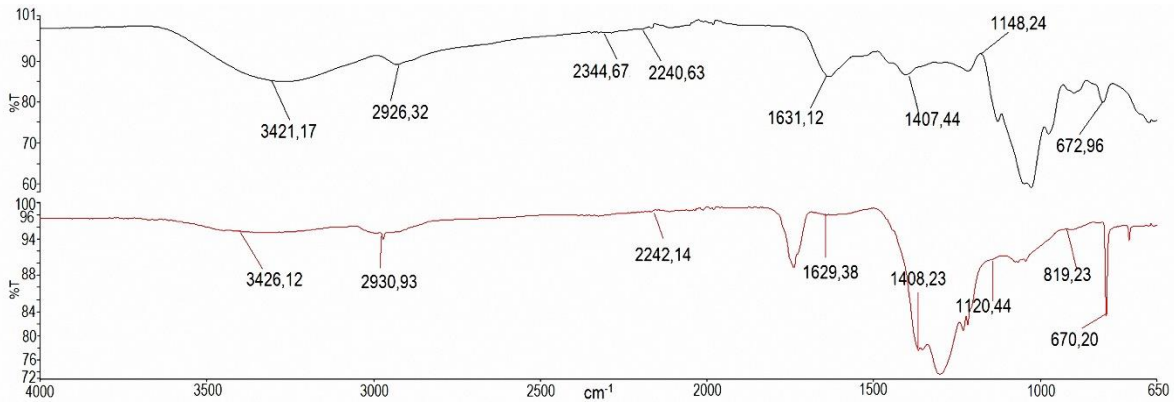
T-AgNP'lerin morfolojileri hakkında bilgi almak için TEM kullanılmış ve küresel morfolojide oldukları tespit edilmiştir. TEM verilerine göre, nanopartiküllerin *T. rubra* ekstraktının matrisinde tutunduğu görülmekle beraber, detaylı incelemede monodispers oldukları ve parçacıkların birbirinden iyi ayrıldığı görülmüştür (Şekil 4). Görüntü analizine dayanarak, parçacıkların ortalama boyutunun 5-15 nm olduğunu kanıtlanmıştır.





Şekil 4. Biyosentezlenmiş T-AgNP'lerin A (100 nm ölçeği) ve B'de (20 nm ölçeği) *T. rubra* ekstraktı ile elde edilen TEM elektron mikrografları.

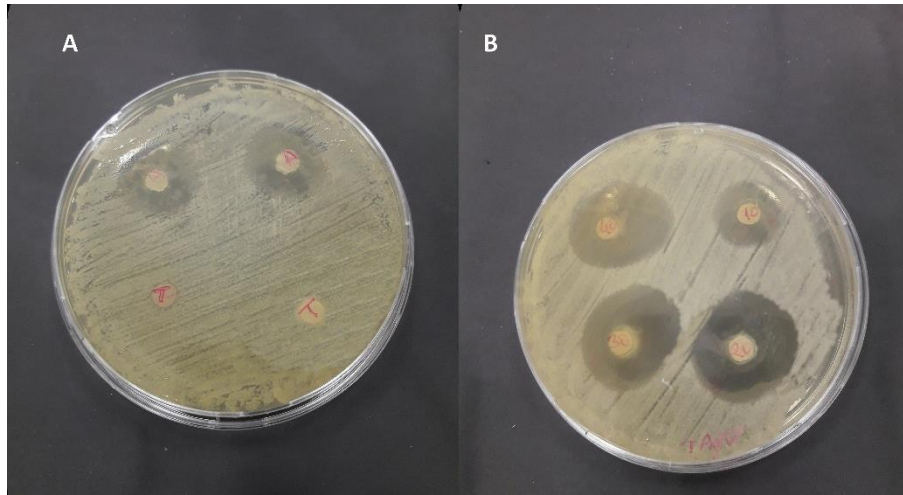
Biyosentezlenmiş T-AgNP sulu bitki ekstraktına ait FTIR spektrumları Şekil 5'te sunulmuştur. Ag iyonlarının azaltılmasından sorumlu metabolitler FTIR spektrumu kullanılarak tespit edilmiştir. Serbest OH grubuna sahip fenollerin ve alkollerin varlığında  $3426.12$  ve  $3421.17$   $\text{cm}^{-1}$ 'deki geniş bantları ile ortaya çıkmıştır.  $2930.12$  ve  $2926.56$   $\text{cm}^{-1}$ 'deki bantlar, lipidlerdeki alkanların varlığını temsil eder [22].  $2344.67$   $\text{cm}^{-1}$  bölgesi, sadece biyosentezlenmiş çözeltide  $\text{COO}^-$ 'nin simetrik olarak gerilme varlığını gösterir.  $2240.63$  ve  $2242.14$   $\text{cm}^{-1}$ 'deki bantlar  $\text{C}\equiv\text{C}$  grubuna atanır.  $1629.45$  ve  $1631.01$   $\text{cm}^{-1}$ 'deki absorpsiyon bantları, aromatik bileşiklerde ve amid I'de (düzlem dışında NH)  $\text{C}=\text{C}$ 'ye karşılık gelir [23].  $1408.23$  ve  $1407.54$   $\text{cm}^{-1}$ 'deki bantlar  $\text{S}=\text{O}$  (sülfat ester) grubunu gösterir.  $1398$   $\text{cm}^{-1}$ 'deki bantlar  $\text{COO}^-$  grupların  $\text{C}-\text{O}$  bandı ve proteinlerin  $\text{CH}_3$  ve  $\text{CH}_2$  bandına karşılık gelmektedir [24].  $1123$  ve  $1150.67$   $\text{cm}^{-1}$ 'deki bantlar karboksilik asit grubunun varlığını doğrular.  $819.43$   $\text{cm}^{-1}$ ,  $672.17$  ve  $670.58$   $\text{cm}^{-1}$ 'deki bantlar, bitki özündeki aromatik bileşiklerde ve T-AgNP'lerde  $=\text{CH}$  varlığını temsil eder [25]. Bu sonuçlara göre proteinlerde görülen serbest karboksilat grupları metal nanoparçacıklarına bağlanabilir ve onları stabil hale getirebilir. Bitki ekstraktının FTIR spektrumu ile biyosentezlenmiş T-AgNP'leri arasındaki absorpsiyon bantlarının pozisyonunda değişiklikler görülmüş ve bu durum piklerin kaymasıyla teyit edilmiştir. Bu durum, değişikliklerin sebebinin biyosentezlenme sırasında etkili olan bölgeler olduğunu düşündürmüştür.



Şekil 5. *T. rubra* ekstraktı ve *T. rubra* ekstraktı tarafından biyosentezlenmiş T-AgNP'lerinin FTIR spektrumu

### 3.2. T-AgNP'lerin Antifungal Aktivitesi

Küresel T-AgNP'lerin antifungal özellikleri de *C. albicans* patojenine karşı incelenmiş ve Şekil 6'da gösterilmiştir. T-AgNP'lerin *C. albicans* patojenine karşı iyi antifungal aktivite gösterdiği amfoterisin B ile karşılaştırma sonucunda görüldü. Biyosentezlenmiş T-AgNP'ler içeren her disk üzerine (10-40  $\mu\text{l}$  arasında değişen oranlarda) T-AgNP yüklenmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. *T. rubra* ekstraktının (T) ve *T. rubra* ekstraktından farklı miktardaki biyosentezlenmiş T-AgNP'lerin (10, 20, 30 ve 40 µl) *C.albicans*'a karşı antifungal aktivitesi, A, amfoterisin B

10 µl etken madde ile muamele edilen *C. albicans* hücrelerinin oluşturduğu disk zonu, Amfoterisin B ile elde edilen zon çapına benzerlik göstermiştir. Doz miktarı 20 µl olarak uygulandığında ise amfoterisin B muamelesinde elde edilene göre daha büyük bir zon oluşmuştur (Tablo 1). Etken madde miktarı 30 ve 40 µl olacak şekilde uygulanan disklerde ise elde edilen sonuç, 20 µl uygulanan doz sonuçları ile çok benzerlik göstermiştir. Bu sonuçlar, uygulanan nanopartikül miktarının 20 µl den fazla olması durumunda etkinin artmayacağını göstermiştir (Şekil 6).

Tablo 1. Biyosentezlenmiş T-AgNP'lerin ve bitki ekstraktının CLSI M44-A disk yöntemine göre karşılaştırılması

| Suş                                  | Etken madde                     | Zon çapı (mm) |
|--------------------------------------|---------------------------------|---------------|
| <i>Candida albicans</i> (ATCC 14053) | Amfoterisin B <sup>a</sup>      | 92-97         |
|                                      | <i>Tilia rubra</i> ekstraktı    | 0             |
|                                      | Biyosentezlenmiş T-AgNP (10 µl) | 82-90         |
|                                      | Biyosentezlenmiş T-AgNP (20 µl) | 100-105       |
|                                      | Biyosentezlenmiş T-AgNP (30 µl) | 98-102        |
|                                      | Biyosentezlenmiş T-AgNP (40 µl) | 98-105        |

<sup>a</sup> CLSI, Amfoterisin B 10 µg

#### 4. Sonuçlar ve tartışma

Günümüzde nanopartikülleri sentezlemek için kullanılan kimyasal ve fiziksel işlemlerin çoğunda toksik kimyasal ve yüksek enerjili bileşikler kullanılması, insan sağlığı ve çevre için ciddi riskler oluşturmaktadır. Bu yüzden araştırmacılar farklı yöntem arayışı içerisindeyler. Biyolojik kaynakları kullanan yeşil sentez yöntemleri zararlı kimyasal yöntemlerin yerini alabilir [26]. Yeşil sentez, AgNP'lerin sentezlenmesi sürecinde kimyasal ve enerji bileşiklerinin kullanımını azaltır. Dolayısıyla sentez aşaması ve sonrası için, ucuz, basit, kimyasal bileşiklerin kullanımı için azaltılmış gereksinimler ve en önemlisi, insan ve çevre sağlığı için risklerin azaltılması yeşil sentezi öne çıkaran avantajlarıdır [8]. Çalışmamızda *T. rubra* (Ihlamur), gümüş nanopartiküllerinin sentezi için kullanılmıştır. Bu çalışmada, ihlamur yaprağının sulu ekstraktı ile hazırlanan ve önce açık sarımsı renkte olan ekstrakt, AgNO<sub>3</sub> çözeltisi ile karıştırıldıktan sonra koyu kahverengi renkte bir süspansiyon oluşturmuştur. Ortaya çıkan renk değişimi UV-Vis ile incelendikten sonra elde edilen emilim spektrumu SPR bandı ile ortaya konulmuş ve bu durum Ag<sup>+</sup> iyonlarının, Ag<sup>0</sup> nanopartiküllerine indirgenmiş olduğunu göstermiştir [27].

*T. rubra* yaprağı ekstraktı kullanılarak T-AgNP'lerin oluşumu, XRD analizinde gözlenen karakteristik desenlerle uyumludur ve fcc simetrisi ile gümüşle eşleştiği tespit edilmiştir. Ayrıca, elde edilen XRD paternimiz önceki çalışmalarla benzerlik göstermektedir [28,29]

FTIR analizi, Ag<sup>+</sup> iyonlarının azaltılmasından ve T-AgNP'lerin stabilizasyonundan sorumlu olan *T. rubra* yaprak ekstraktında bulunan fonksiyonel grupları tanımlamak için yapılmıştır. FTIR sonuçlarına göre, *T. rubra* yaprağı ekstraktında bulunan aminin COO<sup>-</sup>, -OH ve CH<sub>3</sub> gibi fonksiyonel gruplarının muhtemelen Ag<sup>+</sup> iyonlarının metalik gümüşe (Ag<sup>0</sup>) dönüştürülmesinden sorumlu faktörler olduğunu göstermektedir. Bu duruma göre alkaloidler, proteinler ve aromatik bileşiklerin nanopartikülün şekillenmesinde rol aldığı söylenebilir [30].

Sentezlenmiş AgNP'lerin TEM görüntüleri 5-15 nm büyüklüktedir ve partiküller yüzey üzerinde yığılma yapmaksızın, eşit bir dağılımla oluşmuş küresel bir şekildedir. AgNP'lerin homojen bir şekilde dağılması *T. rubra* ekstraktının kalın bir biyomolekül tabakası ile kapsüllenmesine bağlanabilir.

*C. albicans*, maya mantarı üzerinde agar difüzyon testi ile test edilmiş ve kontrol ilacı olarak güçlü bir antifungal olan Amfoterisin B kullanılmıştır. Biyosentezlenmiş T-AgNP'lerin *C. albicans* üzerinde Amfoterisin B'den daha kuvvetli bir zon çapı oluşturduğu görülmüştür. Ekstraktın ise hiç etkisinin olmadığı görülmüştür. Biyosentezlenen AgNP'lerin Jaidev ve Narasimha'nın (2010) raporuna göre AgNP'lerin fungisidal özelliğinin, fungal hücre duvarındaki sülfhidril gruplarının etkisiz hale getirilmesi ile, çözünmeyen bileşiklerin oluşumuna ve hücre lizisine yol açan ve bununla birlikte hücre zarına bağlı enzimlerin ve lipidlerin varyasyonuna neden olduğunu ileri sürülmüştür [31]. Ghojavand ve ark. (2019) raporuna göre serbest radikallerin oluşumu, membran hasarı ve hücre duvarı ve zarı yüzeyinde çukur oluşumu antifungal etkiye yol açmış olabilir.

Dahası, serbest radikallerin üretimi, DNA ve proteinlerin kimyasal yapısına ciddi zararlar verebilir [32]. Antibiyotiğe dirençli enfeksiyonların sayısının artması günümüzdeki en önemli problemler arasında yer almaktadır. *C. albicans*, enfeksiyonla ilişkili en önemli biyofilm üreten mikroorganizmalar arasında yer almaktadır. Bu nedenle, alternatif stratejiler üzerinde ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır ve T-AgNP'ler antifungal etki bakımından umut verici sonuçlar göstermiştir.

Sonuç olarak *T. rubra* yaprak ekstraktı kullanılarak T-AgNP'lerin yeşil sentezi ile endüstriyel düzeyde ürün elde edilebileceği gibi, çevre dostu, güvenilir ve temiz bir yöntem rapor edilmiştir. XRD profilindeki spektrumlar T-AgNP'lerin kristal yapısının yüz merkezli kübik olduğunu doğrular. Aromatik bileşikler ve protein içeriği muhtemelen T-AgNP'lerin oluşumu için başlıca rol oynamıştır. Böylece FTIR spektrumu ile elde edilen veriler *T. rubra* ekstraktı içerisinde yer alan biyomoleküller, AgNP'lerinin sentezinden ve nanopartiküllerin son şeklinin verilmesinden (capping ajan), sorumlu olduğunu doğruladı. TEM ölçümlerinden, T-AgNP'lerin boyutunun 5-15 nm olduğu görülmüştür. UV-Vis ile 6 ay sonrasında bile aynı dalga boyunda SPR oluşturulmuştur. Ayrıca, biyosentezlenmiş T-AgNP'lerin *C. albicans*'a karşı iyi antifungal aktivite gösterdiği ve biyolojik uygulamalarda daha detaylı araştırmalar sonucunda potansiyel kullanımı olabileceğini düşündürmüştür.

### Teşekkür

Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (ARUM) çalışılmıştır.

### Kaynaklar

- [1] Thakkar, K. N., Mhatre, S. S., & Parikh, R. Y. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*, 6(2), 257-262. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.07.002>
- [2] Shedbalkar, U., Singh, R., Wadhvani, S., Gaidhani, S., & Chopade, B. A. (2014). Microbial synthesis of gold nanoparticles: current status and future prospects. *Advances in Colloid and Interface Science*, 209, 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.12.011>
- [3] Subramaniyam, V., Subashchandrabose, S. R., Thavamani, P., Megharaj, M., Chen, Z., & Naidu, R. (2015). Chlorococcum sp. MM11—a novel phyco-nanofactory for the synthesis of iron nanoparticles. *Journal of applied phycology*, 27(5), 1861-1869. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0492-2>,
- [4] Dağlıoğlu, Y., & Öztürk, B. Y. (2016). The assessment of biological accumulation on exposure in boron particles of *Desmodium multivariabilis*. *Biological Diversity and Conservation*, 9(3), 204-209.
- [5] Dağlıoğlu, Y., & Yılmaz Öztürk, B. (2018). Effect of concentration and exposure time of ZnO-TiO<sub>2</sub> nanocomposite on photosynthetic pigment contents, ROS production ability, and bioaccumulation of freshwater algae (*Desmodium multivariabilis*). *Caryologia*, 71(1), 13-23.
- [6] Yılmaz-Ozturk, B., & Daglioglu, Y. (2018). The Ecotoxicological Effects Of ZnO-TiO<sub>2</sub> Nanocomposite in *Chodatodesmus mucranulatus*. *Feb-Fresenius Environmental Bulletin*, 2951-2962.
- [7] Fatima, F., Bajpai, P., Pathak, N., Singh, S., Priya, S., & Verma, S. R. (2015). Antimicrobial and immunomodulatory efficacy of extracellularly synthesized silver and gold nanoparticles by a novel phosphate solubilizing fungus *Bipolaris tetramera*. *BMC microbiology*, 15(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0391-y>
- [8] Dağlıoğlu, Y., & Öztürk, B. Y. (2019). A novel intracellular synthesis of silver nanoparticles using *Desmodium* sp.(Scenedesmaceae): different methods of pigment change. *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*, 30(3), 611-621. <https://doi.org/10.1007/s12210-019-00822-8>
- [9] Tippayawat, P., Phromviyo, N., Boueroy, P., & Chompoosor, A. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles in aloe vera plant extract prepared by a hydrothermal method and their synergistic antibacterial activity. *PeerJ*, 4, e2589. <https://doi.org/10.7717/peerj.2589>
- [10] Swaminathanalyer, K. (2013). Biogenic production of palladium nanocrystals using microalgae and their immobilization on chitosan nanofibers for catalytic applications. *RSC advances*, 3(4), 1009-1012. <https://doi.org/10.1039/C2RA22402J>
- [11] Govindarajan, M., Rajeswary, M., Muthukumaran, U., Hoti, S. L., Khater, H. F., & Benelli, G. (2016). Single-step biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Zornia diphylla* leaves: a potent eco-friendly tool against malaria and arbovirus vectors. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 161, 482-489. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.06.016>
- [12] Demiray, S., Pintado, M. E., & Castro, P. M. L. (2009). Evaluation of phenolic profiles and antioxidant activities of Turkish medicinal plants: *Tilia argentea*, *Crataegi folium* leaves and *Polygonum bistorta* roots. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 54, 312-317.
- [13] Akyuz, E., Şahin, H., Islamoglu, F., Kolayli, S., & Sandra, P. (2014). Evaluation of phenolic compounds in *Tilia rubra*

- subsp. caucasica by HPLC-UV and HPLC-UV-MS/MS. *International journal of food properties*, 17(2), 331-343. <https://doi.org/10.1080/10942912.2011.631252>
- [14] Frezza, C., De Vita, D., Spinaci, G., Sarandrea, M., Venditti, A., & Bianco, A. (2020). Secondary metabolites of *Tilia tomentosa* Moench inflorescences collected in Central Italy: chemotaxonomy relevance and phytochemical rationale of traditional use. *Natural product research*, 34(8), 1167-1174. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1550487>
- [15] Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2004. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guideline. Document M44-A. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne, PA <https://doi.org/10.1128/JCM.01900-06>
- [16] Jorgensen, J. H., Turnidge, J. D. 2015, Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. In *Manual of Clinical Microbiology*, American Society of Microbiology, Eleventh Edition, 1253-1273. <https://doi.org/10.1128/9781555817381.ch71>
- [17] Wayne, P. A. (2004). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. CLSI m44-a.
- [18] Khatami, M., & Pourseyedi, S. (2015). *Phoenix dactylifera* (date palm) pit aqueous extract mediated novel route for synthesis high stable silver nanoparticles with high antifungal and antibacterial activity. *IET nanobiotechnology*, 9(4), 184-190. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2014.0052>
- [29] Krishnaraj, C., Jagan, E. G., Rajasekar, S., Selvakumar, P., Kalaichelvan, P. T., & Mohan, N. J. C. S. B. B. (2010). Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(1), 50-56. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.10.008>
- [20] Prasad, T. N., Kambala, V. S. R., & Naidu, R. (2013). Phyconanotechnology: synthesis of silver nanoparticles using brown marine algae *Cystophora moniliformis* and their characterisation. *Journal of applied phycology*, 25(1), 177-182. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9851-z>
- [21] Khatami, M., Mortazavi, S. M., Kishani-Farahani, Z., Amini, A., Amini, E., & Heli, H. (2017). Biosynthesis of silver nanoparticles using pine pollen and evaluation of the antifungal efficiency. *Iranian journal of biotechnology*, 15(2), 95 <https://doi.org/10.15171/ijb.1436>
- [22] Vanaja, M., Gnanajobitha, G., Paulkumar, K., Rajeshkumar, S., Malarkodi, C., & Annadurai, G. (2013). Phytosynthesis of silver nanoparticles by *Cissus quadrangularis*: influence of physicochemical factors. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 3(1), 17. <https://doi.org/10.1186/2193-8865-3-17>
- [23] Raghunandan, D., Bedre, M. D., Basavaraja, S., Sawle, B., Manjunath, S. Y., & Venkataraman, A. (2010). Rapid biosynthesis of irregular shaped gold nanoparticles from macerated aqueous extracellular dried clove buds (*Syzygium aromaticum*) solution. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79(1), 235-240. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.04.003>
- [24] Giordano, M., Kansiz, M., Heraud, P., Beardall, J., Wood, B., & McNaughton, D. (2001). Fourier transform infrared spectroscopy as a novel tool to investigate changes in intracellular macromolecular pools in the marine microalga *Chaetoceros muellerii* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 37(2), 271-279. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.037002271.x>
- [25] Ajitha, B., Reddy, Y. A. K., & Reddy, P. S. (2014). Biogenic nano-scale silver particles by *Tephrosia purpurea* leaf extract and their inborn antimicrobial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 121, 164-172. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.10.077>
- [26] Öztürk, B. Y. (2019). Intracellular and extracellular green synthesis of silver nanoparticles using *Desmodium* sp.: their Antibacterial and antifungal effects. *Caryologia. International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics*, 72(1), 29-43.
- [27] Uddin, A. R., Siddique, M. A. B., Rahman, F., Ullah, A. A., & Khan, R. (2020). *Cocos nucifera* Leaf Extract Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles for Enhanced Antibacterial Activity. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 1-12.
- [28] Hsueh, Y. H., Lin, K. S., Ke, W. J., Hsieh, C. T., Chiang, C. L., Tzou, D. Y., & Liu, S. T. (2015). The antimicrobial properties of silver nanoparticles in *Bacillus subtilis* are mediated by released Ag<sup>+</sup> ions. *PLoS one*, 10(12), e0144306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144306>
- [29] Öztürk, B. Y., Gürsu, B. Y., & Dağ, İ. (2020). Antibiofilm and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles using marine red algae *Gelidium corneum*. *Process Biochemistry*, 89, 208-219. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.10.027>
- [30] Gole, A., Dash, C., Ramakrishnan, V., Sainkar, S. R., Mandale, A. B., Rao, M., & Sastry, M. (2001). Pepsin– gold colloid conjugates: preparation, characterization, and enzymatic activity. *Langmuir*, 17(5), 1674-1679. <https://doi.org/10.1021/la001164w>
- [31] Jaidev, L. R., & Narasimha, G. (2010). Fungal mediated biosynthesis of silver nanoparticles, characterization and antimicrobial activity. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 81(2), 430-433. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.07.033>
- [32] Ghojavand, S., Madani, M., & Karimi, J. (2020). Green synthesis, characterization and antifungal activity of silver nanoparticles using stems and flowers of felted germander. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s10904-020-01449-1>