

TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

ÜNİVERSİTE VE ÜZERİ SEVİYESİ SEVİYESİ FİKİR

KATEGORİSİ

TAKIM ADI

bioNNova

PROJE ADI

Biyodezenfektan

BAŞVURU ID

447578

İçindekiler

1. Proje Özeti (Proje Tanımı) (5 puan)

Hastane enfeksiyonları ile mücadele edebilmek için uygun sterilizasyon ve dezenfeksiyon uygulamaları zorunlu hale gelmiştir. Ancak kullanılan povidon iyodür, benzalkonyum klorür, glutraldehid ve sodyum hipoklorid gibi dezenfektanların sentetik ve toksik özelliklerinden dolayı son yıllarda daha doğa dostu ve ekonomik ürün arayışına başlanmıştır. Çalışmamızda tıbbi bitki olan *Echinacea purpurea* bitkisinden yeşil sentez yöntemi ile gümüş nanopartikülü sentezlenecektir. Elde edilen gümüş nanopartikülünün farklı konsantrasyonlarda sulu çözeltileri hazırlanarak hastane enfeksiyonuna neden mikroorganizmalar üzerinden antimikrobiyal aktivitesi belirlenecektir. Antimikrobiyal aktivitesi yüksek bulunan konsantrasyon için toksisite testleri yapılarak hastane dezenfektanı olarak ticari ürüne dönüştürülecektir.

Bu çalışmada, gümüş nanopartikülünün (AgNP), yeşil sentez yöntemi ile basit, uygun maliyetli ve çevre dostu olarak sentezlenmesine çalışılacaktır. Bunun için; bitkisel kaynak olarak *Echinacea purpurea* bitki ekstraktı, metal iyon kaynağı olarak da 0.1 M AgNO₃ çözeltisi kullanılacaktır. Elde edilen AgNP'lerin karakterizasyonu; X-ışını difraktometresi (XRD), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT- IR), Taramalı elektron mikroskobu (SEM), Enerji dağılımlı X-ışınının analizi (EDAX) ve Diferansiyel termal analiz (TGA/DTA) metotları ile yapısal analizleri ile yapılacaktır. Ayrıca, elde edilen tüm örneklerin antimikrobiyal, aktiviteleri çalışılarak sonuçlar ayrıntılı olarak tartışılacaktır.

2. Problem/Sorun (5 puan)

İçinde bulunduğumuz teknoloji çağı tıp, endüstri, sanayi ve sosyolojik alanlarda insan yaşamının kolaylaştırılmasına hizmet eden nanoteknoloji gibi önemli teknolojik yöntemlerin ortaya konduğu bir dönem olmuştur. Nanoteknoloji, bir milyon filmi alabilen DVD'lerin yapılabileceği, insan vücudunun içinde hastalıklı dokuyu bulup iyileştiren, ameliyat yapan nano robotlar bulunabileceği, insan beyninin kapasitesinin ek nano hafızalarla güçlendirilebileceği, kirliliği önleyen nanoparçacıklar sayesinde fabrikaların çevreyi çok daha az kirleteceği tarım alanında hastalıklarının önleneyeceği, mevcut hastalıkların hızlı bir şekilde yok edileceği, bitkilerin topraktan besin elementlerini emme yeteneğinin artırılacağı teknolojilerin kaynağı olacaktır. Tüm bu gelişmeler yaşanırken bu amaçla kullanılacak olan nanopartiküllerin neler olacağı ve bu partiküllerin üretiminde kullanılacak çevre dostu teknoloji gereksinimi de aynı ölçüde artacaktır. Metal oksit nanopartiküllerinin biyosentezi, dolgu malzemesi, opaklaştırıcılar, dezenfektanlar, antimikrobiyal ajanlar, katalizörler, ilaç dağıtım materyalleri gibi sektörlerde ve tıbbi alanlarda artan talep nedeniyle son yıllarda büyük ilgi görmeye başlamıştır. Bazı bitki ve meyve özlerinde bulunan bileşikler, metal nanoparçacıkların biyojenik sentezi için bir indirgeyici görevi görür. Gümüş nanoparçacıkları (AgNP), birçok ticari antimikrobiyal maddeye dirençli olan çeşitli patojenlere karşı biyosidal etki

göstermelerinin yanı sıra çok güçlü antibiyofilm, antioksidan, sitotoksik, antikanser vb. özellik gösteren maddelerdir (Dalabasmaz, 2013; Soldamli, 2016).

Tıp alanındaki gelişmeler ile birlikte hastane enfeksiyonları önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu sorun ile başa çıkabilmek için birçok hastane enfeksiyon kontrol birimleri kurarak enfeksiyon oranlarını takip ederek kendilerine ait istatistikleri oluşturmaktadır. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü verilerine göre dünya genelinde her yıl 1,5 milyon kişi hastane kaynaklı enfeksiyonlar nedeniyle yaşamını yitirmektedir. Gelişmiş ülkelerde hastane kaynaklı enfeksiyonların oranı %5-10 iken, gelişmekte olan ülkelerde bu oranın %25-30'a çıktığı bilinmektedir. İnsidansı, mortalitesi, yaşam kalitesi üzerine etkisi, maliyeti, antibiyotik direnci gelişimine katkısı ve getirdiği ek sağlık hizmeti yükü yanı sıra sağlık hizmetlerine toplumun güvenini olumsuz etkilemesi ve hukuksal boyutu ile de hastane enfeksiyonları önemli bir halk sağlığı sorunudur.

Antibiyotik kullanımının hastanelerde yaygın ve kontrolsüz olması nedeniyle antibiyotiklere dirençli mikroorganizmaların gelişmesi kaçınılmaz olmaktadır. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde görülen hastane enfeksiyonları, yüksek dozda ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı gerektirmesinden dolayı çoklu direnç bu ünitelerde daha önemli hale gelmektedir. Hastane kaynaklı enfeksiyonların önlenmesi için yüksek, orta ve düşük düzey dezenfeksiyon olmak üzere 3 farklı kategoride hastanelere dezenfeksiyon işlemleri uygulanmaktadır. Bu dezenfeksiyonlar hem çok fazla işlem basamağı olan hem de oldukça maliyetli uygulamalardır. Türkiye'de 2016 yılında tıbbi sarf malzemeye (sterilizasyon ve dezenfeksiyon ürünleri) ayrılan bütçenin yaklaşık 5 milyar dolar olduğu belirtilmiştir. Ek olarak temin edilen sarf malzemenin sadece %20'si yerli firmalardan oluşmaktadır. Enfeksiyona maruz kalan hastaların tedavilerinde kullanılan ilaçlar için harcanan tutar ise yaklaşık 23 milyar TL olarak açıklanmıştır. Sonuç olarak hem dezenfeksiyon uygulamalarının maliyetli olması hem de bu uygulamalarda kimyasal ürünler kullanılıyor olması hem bireyi hem de toplumu olumsuz etkilemektedir (Anonim, 2016).

3. Çözüm (20 puan)

Hastane enfeksiyonları ile mücadelede kullanılan dezenfektanlara karşı zamanla mikroorganizmaların direnç geliştirmesi ve bu dezenfektanların olumsuz etkilerinden dolayı daha az toksik ve organik dezenfektanlara yönelim gün geçtikçe artmaktadır. Bu çalışmamızda tıbbi bir bitki olan *Echinacea purpurea*'dan yeşil sentez yöntemi ile elde edilen gümüş nanopartikülünün sulu ekstraktlarının hastanede enfeksiyona neden olan mikroorganizmalar üzerindeki öldürücü etkilerinin belirlenmesi hedeflenmektedir. Kirpi otu olarak da bilinen ekinezya bitkisi antiviral, antioksidan, antimikrobiyal özelliklerinden dolayı geleneksel tıpta uzun yıllardır çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Soldamli, 2016). Ekinezya bitkisinin mevcut antimikrobiyal özelliği ve sekonder metabolitleri ile fenolik içeriği sayesinde zirai alanda zararlılarla mücadele, tarımsal kaliteyi artırma, aroma artırıcı; su ürünleri alanında sucul organizmaların karaciğer ve bağırsakları hastalıklarını tedavi; eczacılık alanında farmakognazik kullanılabilirliği üzerinde araştırmalar devam etmektedir (Gülpınar, 2009; Sati, 2012; Dalabasmaz, 2013).

Bitki materyalleri özellikle de tıbbi ve aromatik bitki materyallerinin bu alanda yeşil sentez mekanizmalarında kullanımı son yıllarda yüksek ivme kazanmış süreçlerdir. Bu durum,

ülkemiz açısından önemli ekonomik zenginliklerimizden olan bitkilerin, gümüş (Ag) gibi biyolojik aktiviteleri dolayısıyla tıbbi ve endüstriyel kullanımı yüksek kıymetli bir nanopartikülün üretiminde kullanımını da gerekli kılmıştır. Yapılması planlanan proje çalışması bu anlamda hem çay yapraklarının önemli bir katma değeri olan bir ürüne dönüştürülmesi hem de elde edilecek nanoteknolojik bir ürünün biyolojik aktivitelerinin ortaya konması açısından hem gerekli hem de önemli bir çalışma olacaktır.

4. Yöntem (20 puan)

Yeşil sentez yöntemi ile AgNP eldesi

AgNP sentezi için önceden hazırlanan 1mM 500 mL AgNO₃ sulu çözeltisi ile 125 mL Ekinezya bitkisinin özütü 1000 mL'lik bir erlen içerisinde oda sıcaklığında sabit koşullarda reaksiyona bırakılacaktır. Gümüş iyonlarının indirgenmesi ile oluşan koyu renkli solüsyon 10.000 rpm'de 5dk santrifüj edilerek üst sıvı faz uzaklaştırılacak ve kalan katı kısım birkaç kez saf su ile yıkama işlemine tabi tutulacaktır. Elde edilen katı kısım (AgNP) etüvde 65°C'de 48 saat kurumaya bırakılacaktır (Bayğu, 2020).

AgNP Tozunun Uygulamaya Hazırlanması

Gümüş nanopartikülünün tek başına etkisini araştırmak amacıyla AgNP tozu kıyaslamada kullanılacaktır. Toz halinde hazır olarak satın alınacak AgNP tozu (partikül boyutu, 48 nm-78 nm) (Nanografi, ABD), 10 mg tartılarak 20 mL saf suda çözdürülecek, böylece 500 µg/mL konsantrasyonunda uygulama çözeltisi elde edilecektir.

AgNP'nin morfolojik karakterizasyonu

Metalik nanopartiküllerinin toksisiteleri ve yapısal özellikleri; büyüklükleri, yükü, boyut yapıları ile kimyasal aktiviteleri gibi birçok özellikten etkilenebilmektedir (Umamaheswari vd., 2018). Bu sebeple, nanopartiküllerin karakterizasyonunun iyi belirlenmesi çalışmalarda doğru sonuçların alınabilmesi açısından oldukça önemlidir. Yeşil sentez ile elde edilmiş AgNP'lerin karakterizasyonu için gümüş nanopartiküllerinin sentezinin doğrulanabilmesi, boyut dağılımı profili ve yüzey morfolojisi hakkında fikir sahibi olabilmek ve gerçek parçacık boyutunu belirleyebilmek için çeşitli metodlar uygulanacaktır (Bayğu, 2020).

Yapılması planlanan bu proje çalışmasında sentezlenen AgNP'nin karakterizasyonu için temel teknikler olan TEM, SEM, UV-Vis, XRD, FTIR ve Zeta potansiyeli testleri kullanılacak ve bu teknikler için hizmet alımı yapılacaktır.

TEM analizi; TEM, nano boyuttaki malzemelerin morfolojisini ve kimyasal içeriğini ölçmek için kullanılmaktadır (Wang 2000; Brice-Profeta et al. 2005). Np'lerin görüntülenmesinin yanı sıra, Np'lerin toplanması, dağılması, büyüklüğü, yapısı ve şeklini belirlemek için başarıyla uygulanmaktadır (Farré et al. 2009; Ren et al. 2009). Numunenin boyutlarını karakterize etmek için numune farklı açılardan görüntülenecektir.

SEM analizi; SEM, nanopartiküllerin doğrudan görselleştirilmesiyle boyut, şekil ve yüzey morfolojisini belirler (Ali et al. 2016). İletken olmayan numuneler çok ince iletken malzemeyle kaplanarak incelenebilir hale getirilebilmektedir. Sentezlenen toz AgNP yaklaşık 3 Å/saniye ince bir tabaka Au ile kaplanacaktır. Bu ultra ince tabaka, parçacıkların moleküler seviyelerde net görüntülerinin elde edilmesine yardımcı olmaktadır. Numune Au ile kaplandıktan sonra cihaz ile görüntüleri elde edilecektir.

UV-Vis spektroskopisi; UV-Vis spektroskopisi, nanopartiküllerin yapısı, büyüklüğü, stabilitesi, konsantrasyonu ve toplanması hakkında bilgi vermektedir (Sapsford et al. 2011). 1 mg AgNp 3 mL deiyonize suda çözünecek ve Np'lerin suda iyi bir dağılım göstermeleri için numune belirli bir süre sonikasyona tabi tutulacaktır. Bu solüsyon daha sonra küvete yerleştirilecek ve Np'ler 200-875 nm arasındaki dalga boylarında UV-Vis spektrumları ölçülerek karakterize edilecektir.

Zeta potansiyeli; Kayma düzlemindeki elektrik potansiyeli olarak tanımlanmaktadır. Bu çalışmadaki Zeta Potansiyel analizleri (Malvern/Zetasizer, Nano ZSP) hizmet alımı şeklinde yaptırılacaktır.

FTIR analizi; FTIR, ışığın dalga boyuna göre nanopartiküller ile biyolojik ekstraktların ilişkili fonksiyonel grupların yapısını ve yapısal özelliklerini belirlemek için kullanılır (Sbobha et al. 2014). Np'ler iyi sinyal/gürültü oranı elde etmek için 50/4000 cm⁻¹ aralığında bir kızılötesi kaynağına maruz bırakılarak karakterize edilecektir.

XRD analizi; XRD, doğal ve yapay olarak imal edilen nanopartiküllerin kristalografik yapısı veya elemental bileşimi hakkında bilgi vermektedir (Yuan 2007). Sentezlenen AgNp'nin XRD paterni XRD cihazı ile 10° ile 90° arasında 2θ aralığında 0,02 adım büyüklüğü ile analiz edilecektir. UV-Vis spektrumları, FTIR ve XRD sonuçları OriginLab veri analizi programında değerlendirilerek grafikleri çizilecektir.

AgNP'lerinin antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi

Ag nanopartiküllerinin bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkisini belirlemek amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanılacaktır (Subhapriya ve Gomathipriya, 2018). Antimikrobiyal çalışmalarında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilecek olan *Escherichia coli* NRRL B-3704, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Enterobacter aerogenes*, *Acinetobacter baumannii* bakterileri ile *Candida albicans* ATCC 10231 maya kültürü olmak üzere toplam 8 adet mikroorganizma kullanılacaktır. Mueller Hinton Agar üzerine yapılan yayma işleminin ardından besiyerinin üzerine sterilize edilmiş diskler yerleştirilecek ve her bir diskin üzerine de önceden pH 9'da üretilip saflaştırılmış AgNP'lerinden 10 µL konulacaktır. 24 saat inkübasyonun ardından disklerin etrafında zon oluşumu incelenecektir.

AgNP'lerinin antioksidan etkisinin belirlenmesi

Bitki ekstraktlarının antioksidan aktivitesini belirlemek için Serbest Radikal Giderme Aktivitesi (DPPH) ve Cu(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Belirleme Tayini (CUPRAC) metotları kullanılacaktır. DPPH tayini için Blois (1958) tarafından geliştirilen metot, CUPRAC için ise Apak ve arkadaşları (2005) tarafından dizaynı yapılan metot kullanılacaktır. DPPH ve CUPRAC ölçümü için sırasıyla 517 nm ve 470 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçümler yapılacaktır.

Hazırlanan örneklerin oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika inkübasyondan sonra 517 nm'de absorbansları ölçülecektir. Elde edilen absorbans değerlerinden inkübasyon değerleri absorbans değerleri (A): % inhibisyon = (A kontrol-A örnek) / A kontrol x 100 göre hesaplanacaktır.

Standart olarak BHT kullanılacaktır. Tüm denemeler üç tekrarlı gerçekleştirilecek olup; DPPH sonuçlarının hesaplanmasında aşağıdaki formülden yararlanılacaktır.

$$\% \text{ inhibisyon} = (\text{Akontrol} - \text{Aörnek}) / \text{Akontrol} \times 100$$

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü (15 puan)

Nanopartikül terimi, boyutları 100 nm ve altında olan parçacıkları ifade etmektedir. Büyük yapıli maddelerin aksine nanopartiküller nano boyuttaki yapıları ile kendilerine özgü fiziksel, kimyasal, elektronik, mekanik, manyetik, termal, dielektrik, optik ve biyolojik özelliklere sahiptirler (Portakal, 2008; Durán ve ark., 2011). Metal nanopartiküller özgün yapılanmaları sayesinde elektronik ve malzeme endüstrisinde kullanım için yüksek işlev taşımakta ve antimikrobiyel maddelerin üretimi, ilaçların taşınımı, hastalıkların teşhis ve tedavisi gibi tıbbi uygulamalarda yeni yöntemlerin geliştirilmesine olanak sağlamaktadırlar (Gaikwad ve ark., 2013; Park ve ark., 2016; Singh ve ark., 2016; Składanowski ve ark., 2017).

Nanopartiküllerin bu özelliklerinden dolayı son yıllarda nanopartikül sentezlemek çok önemli bir boyut kazanmaktadır. Nanopartiküllerin üretiminde fiziksel ve kimyasal yöntemler uygulanmaktadır. Hidrotermal/solvotermal yöntem, sol-jel yöntemi, ultraviyole ışınlama tekniği, aerosol teknolojileri, litografi, lazer ablasyonu, ultrasonik uygulamalar, fotokimyasal indirgeme teknikleri, şablon yöntemi, mikrodalga yaklaşımı ve kimyasal buhar biriktirme bu yöntemlerden bazılarıdır. Kimyasal yöntemler yüksek enerjiye, indirgeyici/stabilize edici ajanlara ve toksik kimyasallara ihtiyaç duyan pahalı ve kararsız yöntemlerdir. Ayrıca, üretilen nanopartiküller biyolojik yan etkilere sahip olabilir (Jena ve ark., 2015; Bakhshi ve Hosseini, 2016; Park ve ark., 2016; Składanowski ve ark., 2017). Bundan dolayı nanopartikül üretiminde biyolojik toksik olmayan, çevre dostu, ekonomik sentezler daha ön plana çıkmaktadır. Nanopartikül sentezi için bitkiler, funguslar, aktinomistler ve bakteriler kullanılabilir. Bunlar altın, gümüş, platin, demir sülfür, kadmiyum sülfür, selenyum, çinko oksit, bakır gibi toksik olmayan metal nanopartiküller üretebilir (Zhang ve ark., 2016).

Ekinezyanın ekonomik olarak çiçeği, yaprakları, gövdesi ve kökü çay yapımında kullanılmaktadır. Yapraklarından ve çiçekli dallarından su buharı distilasyonu ile %0.05-1 arasında uçucu yağ elde edilmektedir. Uçucu yağ oranı %1'in üzerinde olan, bazen %2'ye yaklaşan ekotipler mevcuttur. (Baydar, 2013).

Echinacea türlerinin bağışıklık sistemini uyarıcı, iltihap giderici, antibakteriyel, antiviral, antifungal, antikanser ve yara iyileştirici etkilere sahip olduğunu, bu etkilerden sorumlu bileşiklerin polisakkaritler, glikoproteinler, alkilamitler ve kafeik asit türevleri (kikorik asit, ekinakosit) olduğu düşünülmektedir. Kaftarik ve kikorik asit, *E. purpurea*'nın içermiş olduğu önemli fenoliklerdendir ve bitkinin tüm kısımlarında bulunur (çiçek, yaprak, gövde, kök). *Echinacea* türleri uçucu yağ bileşiminin majör terpenik bileşikler olarak germakren D, βmirsen, α-pinen ve β-pinen öne çıkmaktadır. Bunun yanında karyofilen, karyofilen epoksit ve α-fellandren *Echinacea* türleri uçucu yağ bileşiminde bulunabilecek başlıca terpenik bileşiklerdir. *Echinacea* türleri üzerinde yapılmış olan birçok araştırma sonucunda, nonspesifik bağışıklık sistemi uyarıcı aktivitesi olduğunu, fagositozu uyararak ve doğal öldürücü lenfositlerin fonksiyonunu artırarak bu etkiyi sağladığını, üst solunum yolları enfeksiyonlarının önlenmesi ve tedavisinde tek başına etkili olmasa bile yardımcı ilaç olarak yararlanıldığını, topikal (bölgesel) olarak zor iyileşen yaralara etkili olduğunu, iyi tolere

edilebilen, ilaçlar ile etkileşimi olmayan, kısacası güvenli bir ilaç olduğunu söylemek mümkündür. Avrupa'da *Echinacea purpurea*'dan yapılmış 280 den fazla farklı ürün satılmaktadır. Merhem, tentür, losyon, krem, sıvı-kuru ekstrakt ve diğ macunları en çok kullanılan ürünlerdir. Birleşik devletlerde ise taze ve kuru köklerin infuzyonu, toz haline getirilmiş kökler ya da kapsüllenmiş kuru herba olarak daha çok içten kullanım yaygındır. Ekinezyanın giderek artan kullanımı doğal bitki popülasyonlarını tehdit etmiştir ve bazı eyaletler, *E. angustifolia*'nın doğadan sökümünü yasaklamış ya da kısıtlamıştır (Özcan, 2014).

Bitki ekstraktları serbest radikallerin etkili temizleme aktivitesine sahip epigallokateşin gallat (EGCG), epikateşin gallat (EKG), epigallokateşin (EGC) ve epikateşin (EC) gibi kimyasal bileşikler nedeniyle antioksidan olmaları nedeniyle birçok araştırmada, ekstraktlarda bulunan doğal antioksidanlara odaklanmıştır (Salah vd.,1995; Tijburg vd.1997). Ayrıca bitki ekstraktları içerdikleri polifenollerinin antikanserojenik, antimutajenik ve korumadan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Ekinezyadaki doğal antioksidanların, bütillenmiş hidroksianizol, bütillenmiş hidroksitoluen ve dl- α -tokoferol gibi sentetik antioksidanlardan daha güçlü antioksidan aktiviteye sahip olup daha az toksisiteye sahip olduğu gösterilmiştir.

Nanopartikül geleneksel ürün ve metallere kıyasla üstün yüksek dayanıklılık, iletkenlik, biyoyumluluk gibi fizikokimyasal özellikleri ve sentez işlemleri sonucunda çok az toksik yan ürün oluşturmaları veya hiç toksik ürün oluşturmamaları nedeniyle biyoteknoloji, tarım, tıp ve sağlık sektörü, elektronik ve enerji depolama, biyomedikal teknolojiler, malzeme ve imalat sanayisi, gıda endüstrisi gibi birçok sektörde potansiyel uygulamaları mevcuttur.

Nanoteknoloji, geniş uygulama alanına sahip yeni ve gelişmekte olan multidisipliner araştırma alanlarından. 1-100 nm aralığında boyutlardan birine sahip malzemelerin sentezini ve uygulanmasını içerir. Günümüzde nanoparçacıkların (NP'ler) sentezi için çok çeşitli fiziko-kimyasal yaklaşımlar kullanılmaktadır.

Nanomateriyal yukarıdan aşağıya veya aşağıdan yukarıya iki farklı yaklaşımla üretilmektedir. Yukarıdan aşağıya yöntemlerin kapsadığı öğütme, ezme, termal ablasyon vb. işlemler kullanılarak boyut küçültme yoluyla dökme malzemenin küçük parçacıklara ayrılmasını içerir. Aşağıdan yukarıya yaklaşım ise esas olarak atomları, molekülleri ve daha küçük parçacıkları birleştirmek gibi daha küçük yapılardan nanoparçacıkların (NP'ler) sentezlenmesini kapsamaktadır. Aşağıdan yukarıya yaklaşımlar çoğunlukla kimyasal ve biyolojik yöntemlere ilişkili olup, daha az hatayla ve daha homojen kimyasal bileşimli metalik NP'ler hazırlama olasılığının artmasında önemli bir avantaj sunar (Bhushan 2012).

Nanomalzemelerin kimyasal sentezi genellikle basittir, ortam sıcaklığında işleme koşulları gerektirir ve oluşan ürünler iyi homojenliğe ve dar boyut dağılımına sahiptir. NP'ler, oksidasyon-indirgeme reaksiyonları yoluyla veya sulu bir fazda metal iyon öncüllerinin çöktürülmesiyle üretilebilir. Ancak kimyasal yöntemlerin en zararlı dezavantajlarından biri, işlem sırasında toksik yan ürünlerin üretilmesidir. Büyük endüstriyel ölçekli üretim sırasında, bu tür atık maddeler sonunda birikecek ve bu da biyolojik birikime yol açacaktır. Bu durum insan sağlığı ve çevre için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır bu nedenle çevre dostu, toksik olmayan ve biyoyumlu sentez yöntemleri uygulanmaktadır. Bu nedenle son yıllarda NP üretimi için biyolojik sentez yöntemlerine odaklanılmış olup nanopartiküllerin elde edilmesinde kullanılan yeşil sentez yöntemine olan ilgi her geçen gün artmaktadır nanopartiküllerin (NP'ler), onları çeşitli uygulamalar için uygun kılan benzersiz fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptir.

(Faramazi vd., 2013). Metalik NP'lerin yapısal değişimi, farklı biyolojik fonksiyonlara yol açar, özellikle reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi için farklı potansiyellerle sonuçlanır (Hajipour ve ark., 2012; Roy vd., 2013). Geçmiş yıllardan beri geleneksel yöntemler kullanılmaktadır, ancak araştırmalar yeşil yöntemlerin daha az başarısızlık şansı, düşük maliyet ve karakterizasyon kolaylığı avantajı ile NP'lerin üretilmesi için daha etkili olduğunu kanıtlamıştır (Abdelghany vd., 2018). NP'lerin sentezlenmesine yönelik bu fiziksel ve kimyasal yaklaşımlar, toksik metabolitleri nedeniyle çevre üzerinde çeşitli stresler oluşturmaktadırlar. Buna karşın NP'lerin bitki bazlı sentezi kesinlikle zahmetli bir prosedür değildir, bitki özü ile bir metal tuzu sentezlenir ve yanıt tipik oda sıcaklığında dakikalar ile birkaç saat içinde tamamlanır. Bu strateji, özellikle diğer metalik NP'lerle karşılaştırıldığında daha güvenli olan gümüş (Ag) ve altın (Au) NP'ler için son on yılda çok daha fazla dikkat çekmiştir. (Hussain vd., 2016).

Bitkiler, çeşitli kısımlarında belirli miktarlarda ağır metal biriktirme potansiyeline sahiptir. Sonuç olarak, bitki özlerini kullanan biyosentez teknikleri, nanoparçacık üretimi için geleneksel hazırlama yöntemlerine mükemmel bir alternatif olduğu kadar basit, verimli, uygun maliyetli ve uygulanabilir yöntemler olarak artan bir ilgi görmüştür. "Tek kap" sentez sürecinde metalik nanoparçacıkları azaltmak ve stabilize etmek için kullanılabilir çeşitli bitkiler vardır. Birçok araştırmacı, çeşitli uygulamalarını daha fazla araştırmak için bitki yaprağı özleri yoluyla metal/metal oksit nanoparçacıklarının hazırlanması için yeşil sentez sürecini kullanmıştır.

Metal nanotanicikler sahip oldukları özellikler sayesinde günümüzde özellikle gümüş nanopartiküller elektronik, malzeme bilimi, nanotıp gibi yeni teknolojilerde geniş kullanım alanına sahip olmakta ve bilim adamlarının ilgisini çekmektedir (Bar, vd., 2009).

Gümüş Nanopartiküllerinin Antimikrobiyal Etkileri; son yıllarda çok sayıda mikroorganizmaların tekli ya da çoklu antibiyotik direnci geliştirmeleri ve sürdürülebilir sağlık koşullarının ekonomik olarak sağlanması amacıyla çok sayıda araştırmacı yeni ve etkili antimikrobiyal ajanlarına dayanıklılık geliştiremeyecek teknoloji arayışına girmiştir. Gümüş; antibakteriyel, antifungal ve antiviral özellikleri ile geniş spektrumlu bir antimikrobiyal madde olarak yüzyıllardır pek çok alanda güvenle kullanılmaktadır. Bakır, çinko, titanyum, altın gibi diğer metal iyonlarının da antimikrobiyal özellikte oldukları bilinmektedir. Bu yüzden bakterilere, virüslere vder ökaryotik mikroorganizmalara karşı en iyi etkinliği gümüş göstermektedir (Duncan, 2011; Salunke ve ark., 2016).

Gümüşün mikroorganizmaları öldürme mekanizması halen çok net açıklanamamaktadır. Metalik gümüşün, gümüş iyonlarının ve gümüş nano partiküllerinin bakteri hücresinde meydana getirdiği morfolojik ve yapısal değişiklikler incelenerek mekanizma daha net anlaşılmasına çalışılmaktadır. Bir teoriye göre; gümüşün bakteri hücre duvarına ve hücre zarına bağlandığı, tiol (-SH) gruplarındaki proteinlerle etkileşime girerek onları etkisiz hale getirdiği ve zar geçirgenliğini düşürerek hidrojen katyonuyla yer değiştirdiği böylece bakteri hücrelerinin ölümüne neden olduğu bildirilmektedir (Narayanan ve Sakthivel, 2010; Duncan, 2011).

Gümüş Nanopartiküller (AgNP) hem Gram pozitif hem de Gram negatif organizmalar ve çeşitli ilaca dirençli suşlar üzerinde geniş spektrumlu antibakteriyel etki göstermiştir. Antibakteriyel etki için çeşitli mekanizmalar önerilmiş olmasına rağmen, tam etki yöntemi tamamen anlaşılmamıştır. En yaygın etki yönteminin, ATP moleküllerini kesintiye uğratan ve AgNP'ler tarafından reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve DNA replikasyonunu önleyen ya da gümüş iyonları (Ag⁺) ile hücre zarında doğrudan hasara neden olan serbest gümüş iyonu alımı

olduğu düşünülmektedir (Jones ve Hoek, 2010; Rajeshkumar ve ark., 2016). AgNP formlarının, artan geçirgenliğe ve hücre ölümüne neden olarak gram negatif organizmalarının hücre duvarına yerleştiği kabul edilir. Genel olarak, AgNP'ler denatürasyona neden olur ve hücre yıkımı ile sonuçlanan hücre duvarını okside eder (Sondi and B. Salopek-Sondi, 2004; Lara vderleri, 2010) AgNP'ler aynı zamanda organizmaların sinyal iletimini kesintiye uğratan ve çoğaltmayı önleyen peptitlerin fosfotrosin profilini de değiştirmektedir (Shrivastava vderleri, 2009).

Bitki yaprağı ekstraktının aracılık ettiği nanopartikül sentezi için ekstrakt, farklı reaksiyon koşullarında metal öncü çözeltileri ile karıştırılır (Mittal vd., 2013; Forootanfar ve ark., 2014). Bitki yaprağı ekstraktının koşullarını belirleyen parametreler (fitokimyasalların türleri, fitokimyasal konsantrasyon, metal tuzu konsantrasyonu, pH ve sıcaklık gibi), nanoparçacık oluşum hızının yanı sıra verim ve stabiliteyi kontrol etmek için kabul edilir Bitki yaprağı ekstraktlarında bulunan fitokimyasallar, daha uzun inkübasyon süresi gerektiren mantar ve bakterilere kıyasla metal iyonlarını çok daha kısa sürede azaltmak için yüksek potansiyele sahiptir (Dwivedi vd., 2010). Bu nedenle, bitki yaprağı özleri, metal oksit nanoparçacık sentezi kadar metal için mükemmel ve iyi huylu bir kaynak olarak kabul edilir. Ek olarak, bitki yaprağı özütü, nanoparçacık sentezini kolaylaştırmak için nanoparçacık sentezi sürecinde hem indirgeyici hem de stabilize edici maddeler olarak görev yaparak ikili bir rol oynar (Malik vd., 2014). Bitki yaprağı ekstraktının bileşimi de nanoparçacık sentezinde önemli bir faktördür, farklı bitkiler farklı fitokimyasal seviyeleri içermektedir ve bitki yaprağı ekstraktının bu bileşimi nanopartikül sentezinde önemli faktördür. (Li vd., 2011, Mukunthan ve Balaji, 2012). Bitkilerde bulunan ana fitokimyasallar flavonlar, terpenoidler, şekerler, ketonlar, aldehytler, karboksilik asitler ve nanopartiküllerin biyolojik olarak indirgenmesinden sorumlu olan amidlerdir (Prathna vd., 2010). Bitkilerin gümüş nanopartiküllerin üretim düzeneği olarak kullanılması, hızlı, çevre dostu, patojenik olmayan, ekonomik protokolü ve biyosentetik işlemler için tek adımlı bir teknik sağlaması nedeniyle dikkat çekmektedir. Kumar vd. (2015), *Abutilon indicum* özütü kullanılarak stabil ve küresel morfolojiye sahip AgNp sentezlemiş ve bu nanopartiküllerin, *S. typhi*, *E. coli*, *S. aureus* ve *B. subtilis* mikroorganizmalarına karşı yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiğini tespit edilmişlerdir.

Bu araştırmanın öncelikli hedefi, daha önce nanopartikül üretiminde kullanılmış fakat sınırlı sayıda biyolojik aktivitesi ortaya konmuş *Echinacea purpurea* yapraklarıyla, patojenitesi ve biyofilm oluşturma kapasitesi yüksek mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri üzerindeki etkileri araştırılmasına çalışılacaktır. Bununla birlikte sentezi sağlanacak olan çevreye duyarlı AgNP ürünlerinin karakterizasyonları gerçekleştirilecektir. Birçok antimikrobiyale karşı mikroorganizmaların dirençlilik geliştirmesi ve yeni antibiyotiklerin piyasaya sürülmesindeki kısıtlayıcı koşullar, yeni ve ekonomik antimikrobiyal ajanların tasarlanması ve yeni antibiyofilm stratejilerini geliştirilmesini gerekli kılmaktadır. Dolayısıyla yapılacak bu çalışma yeni antimikrobiyal özellikte bir partikülün potansiyel biyodezenfektan olma özelliklerinin bu kapsamda ortaya konacağı ilk çalışma olacaktır.

Bu projenin çıkış noktasını; **“Ticari bir ürün olan *Echinacea purpurea* bitkisinin AgNp üretiminde kullanılabilme potansiyeli var mıdır? Eğer AgNp üretiyorsa, bu nanoteknolojik materyalin antimikrobiyal aktiviteleri nelerdir, ne oranda olacaktır ve bu partikül dezenfeksiyon işlemlerinde ne kadar etkili olabilir?”** sorularına yanıtlar elde edilmesini oluşturmaktadır.

8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar) (5 puan)

Echinacea türlerinden elde edilen ekstre ve preparatlar Avrupa ülkeleri ile birlikte ABD’de bitkisel ilaç pazarından yüksek bir paya sahiptir. Bu bitkilerin tüketimi Amerika, Avrupa ve diğer ülkelerde önemli derecede artmıştır. Bugün, *Echinacea* türlerinden elde edilen ekstre ve preparatlar Avrupa ülkeleri ile birlikte ABD’de bitkisel ilaç pazarından yüksek bir paya sahiptir. ABD’de *Echinacea* preparatlarının yıllık satışı 1997’de 365 milyon doları bulmuş, Avrupa’da ise 1998’deki *Echinacea* preparatlarının yıllık satışının 120 milyon dolar civarında olduğu bildirilmiştir. 1998’de tüm Batı Dünyası’nda *Echinacea* preparatlarının satışının 1 milyar dolara yakın olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca organik üretim yapılarak tüketiciye sunulan uluslararası piyasada son ürün fiyatları; yaklaşık 454 g ekinezya kök çayı 25 dolar, pudra haline getirilmiş 454 g ekinezya kökü 22 dolar, 113 g taze kök ekstraktı 30.50 dolar, kapsül halinde 100 adet (360 mg) 9.75 dolar, tohumluk olarak *E. angustifolia* için 100 adet tohum paketi 2.95 dolar ve *E. purpurea* için 200 adet tohum paketi 2.95’dir

Ülkemizde ve dünyada gün geçtikçe bitkiler ve bitkilerden hazırlanan ürünler çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. İlaç olarak kullanılan bu bitki ülkemizdeki bitkisel ilaç sanayiinde ham madde olarak değerlendirilmeli ve yerli kaynaktan temin edilmesi sağlanmalıdır. İlaç hammaddesi olarak üretilebileceğinin ortaya konması ve ülke ekonomisinde yeni bir sektör oluşturulması yapılacak agronomik çalışmalarla mümkün olacaktır. İnsan sağlığı açısından güvenli olan bu bitkinin yetiştirilmesi ülkemizde artık zorunlu hale gelmiştir (Özcan, 2014).

Projemizde hem ekonomik hem de tıbbi değeri bilinen ekinezya bitkisinden elde edilerek saflaştırılacak olan gümüş nanopartikülünün öncelikle dirençli mikroorganizmaların en fazla görüldüğü hastanelerde, sonrasında ise ev ve iş yerlerinde dezenfeksiyonda kullanılan ticari ürün üretilmesi hedeflenmektedir. Bu kapsamda hastaneler ve dezenfektan firmaları ile B2B ve B2C satışlar ile gelir elde edilmesi düşünülmektedir.

9. Riskler (10 puan)

Projemizin risklerinden bir tanesi; seçilen bitkiden yeterli miktarda gümüş nanopartikülü sentezinin gerçekleştirilememesidir. Böyle bir sorun ile karşılaşılması durumunda biyosentez basamaklarında modifikasyonların yapılması ve bitki miktarının artırılması düşünülmektedir. Bir başka risk faktörü gümüş nanopartikülünün yeşil sentezi kısmında optimizasyon ve karakterizasyon basamaklarında sıkıntı yaşanmasıdır. Bu durumda ise metot değişikliği ve karakterizasyonda çoklu denemelerin yapılması planlanmaktadır. Son olarak antimikrobiyal aktivitesinin düşük çıkması durumunda ise kullanılan miktarın optimizasyon çalışmalarının yapılması planlanmaktadır.

10. Kaynaklar (5 puan)

Akalın E, 2001. Kalite göstergesi olarak hastane infeksiyonları. Hastane İnfeksiyonları Dergisi, 5:169-171.

Apostolidis E, Kwon YI, Shetty K, 2007. Inhibitory potential of herbal, fruit, and fungal-

enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8(1): 46-54.

Atabek D, Alaçam A, Tüzüner E, Polat S, Sipahi AB, 2009. In-vivo evaluation of impression material disinfection with different disinfectant agents. *Clinical Dentistry and Research*, 33(2): 52-59.

Bakhshi M, Hosseini MR, 2016. Synthesis of cds nanoparticles from cadmium sulfate solutions using the extracellular polymeric substances of *B. licheniformis* as stabilizing agent. *Enzyme and Microbial Technology*, 95: 209-216.

Dalabasmaz S, 2013. *Echinacea purpurea* ekstraktı kullanımı ile fonksiyonel meyve suyu ve nektarlarının geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.

Du J, Yi TH, 2016. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Variovorax guangxiensis* THG-SQL3 and their antimicrobial potential. *Materials Letters*, 178: 75-78.

Durán N, Marcato PD, Durán M, Yadav A, Gade A, Rai M, 2011. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(5): 1609-1624.

Elgersma A, Søgaard K, Jensen SK, 2015. Interrelations between herbage yield, α -tocopherol, β -carotene, lutein, protein, and fiber in non-leguminous forbs, forage legumes, and a grass-clover mixture as affected by harvest date. *J Agric Food Chemistry*, 63(2):406–414.

Forootanfar H, Adeli-Sardou M, Nikkhoo M, Mehrabani M, Amir-Heidari B, Shahverdi AR, Shakibaie M, 2014. Antioxidant and cytotoxic effect of biologically synthesized selenium nanoparticles in comparison to selenium dioxide. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 28(1): 75-79.

Gaikwad S, Ingle A, Gade A, Rai M, Falanga A, Incoronato N, Galdiero M, 2013. Antiviral activity of mycosynthesized silver nanoparticles against herpes simplex virus and human parainfluenza virus type 3. *International Journal of Nanomedicine*, 8: 4303.

Guil-Guerrero JL, 2001. Nutritional composition of plantago species (*P. Major L.*, *P. Lanceolata L.*, and *P. Media L.*). *Ecol Food Nutr*, 40(5):481–495.

Gülpınar AR, 2009. Türkiye'de kültürü yapılan *E. purpurea* (L.) Moench ve *E. pallida* (Nutt.) Nutt türleri üzerinde farmakognozik araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.

Hajipour MJ, Fromm KM, Ashkarran AA, de Aberasturi DJ, de Larramendi IR, Rojo T, Mahmoudi M. 2012. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 30(10): 499-511.

He S, Guo Z, Zhang Y, Zhang S, Wang J, Gu N. 2007. Biosynthesis of gold nanoparticles using

the bacteria *Rhodopseudomonas capsulata*. Materials Letters, 61(18): 3984-3987.

Jena S, Das B, Bosu R, Suar M, Mandal D, 2015. Bacteria generated antibacterial gold nanoparticles and potential mechanistic insight. Journal of Cluster Science, 26(5): 1707-1721.

Jeong H-J, Koo H-N, Na H-J, Kim M-S, Hong S-H, Eom J-W, 2002. Inhibition of TNF-alpha and IL-6 production by aucubin through blockade of NF-kappaB activation RBL-2H3 Mast Cells. Cytokine, 18(5):252-259.

Karahocagil MK, Yaman G, Gökteş U, Sünnetçioğlu M, Çıkman A, Bilici A, Akdeniz H, 2011. Hastane enfeksiyon etkenlerinin ve direnç profillerinin belirlenmesi.

Laws D, Genever L, 2015. Using chicory and plantain in band sheep systems. better returns program. 1-26. www.eblex.org.uk

Mendes C, Kiffer C, Segura A, Ribiero J, Turner P, 2001. *K. pneumoniae* with multiple antimicrobial resistance. Braz J Infect Dis, 8(1): 1-5.

Mısırlı F, 2009. Gıda üretim tesislerindeki farklı yüzeylere uygulanan değişik içerikli dezenfektanların bazı patojen mikroorganizmalar üzerine etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.

Narayanan KB, Sakthivel N, 2010. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. advances in colloid and interface science, 156(1): 1-13.

Özcan İİ, 2014. Farklı kültürel uygulamaların ekinezya türlerinin (*Echinacea* spp.) bazı verim ve kalite özelliklerine etkisi. Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye.

Öztürk R, 2008. Hastane enfeksiyonları: sorunlar, yeni hedefler ve hukuki sorumluluk. Hastane Enfeksiyonları Korunma ve Kontrol Sempozyumu (Sempozyum Kitabı) İstanbul, 10-11.

Park TJ, Lee KG, Lee SY, 2016. Advances in microbial biosynthesis of metal nanoparticles. Applied Microbiology and Biotechnology, 100(2): 521-534.

Portakal O, 2008. Biyolojik ölçümler ve nanopartiküller. Türk Biyokimya Dergisi, 33(1): 35-38.

Rajeshkumar S, Malarkodi C, Vanaja M, Annadurai G, 2016. Anticancer and enhanced antimicrobial activity of biosynthesized silver nanoparticles against clinical pathogens. Journal of Molecular Structure, 1116: 165-173.

Salunke BK, Sawant SS, Lee SI, Kim BS, 2016. Microorganisms as efficient biosystem for the synthesis of metal nanoparticles: current scenario and future possibilities. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 32(5): 88.

Saraç S, 2009. Sanayide kullanılan dezenfektan ve antiseptik maddelerin antimikrobiyal

etkinliğinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.

Sati M, 2012. Farklı bitki sıklıklarının *Echinacea purpurea* L. bitkisinin bazı tarımsal ve kalite özelliklerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye.

Singh P, Kim YJ, Zhang D, Yang DC, 2016. Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. Trends in Biotechnology, 34(7): 588-599.

Składanowski M, Wypij M, Laskowski D, Golińska P, Dahm H, Rai M, 2017. Silver and gold nanoparticles synthesized from *Streptomyces* sp. isolated from acid forest soil with special reference to its antibacterial activity against pathogens. Journal of Cluster Science, 28(1): 59-79.

Soldamli RV, 2016. Farklı zamanlarda hasat edilen ekinezya (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) bitki ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Bozok Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yozgat, Türkiye.

Stewart A, 1996. Plantain (*Plantago lanceolata*)-a potential pasture species. Proc New Zeal Glas Assoc, 58:77-86.

Sundaram PA, Augustine R, Kannan M, 2012. Extracellular biosynthesis of iron oxide nanoparticles by *Bacillus subtilis* strains isolated from rhizosphere soil. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 17(4): 835-840.

Sweeney RY, Mao C, Gao X, Burt JL, Belcher AM, Georgiou G, Iverson BL, 2004. Bacterial biosynthesis of cadmium sulfide nanocrystals. Chemistry and Biology, 11(11): 1553-1559.

Şencan İ, 2003. Dezenfektanlara direnç sorunu ve pratik önemi. 3. Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon Kongresi Kitabı.

Tikariha S, Singh S, Banerjee S, Vidyarthi AS, 2012. Biosynthesis of gold nanoparticles, scope and application: a review. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 3(6): 1603.

Tiwari M, Jain P, Hariharapura RC, Narayanan K, Bhat U, Udupa N, Rao JV, 2016. Biosynthesis of copper nanoparticles using copper-resistant *Bacillus cereus*, a soil isolate. Process Biochemistry, 51(10): 1348-1356.

Tripathi RM, Bhadwal AS, Singh P, Shrivastav A, Singh MP, Shrivastav BR, 2014. Mechanistic aspects of biogenic synthesis of cds nanoparticles using *Bacillus licheniformis*. Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology, 5(2): 025006.

Wang C, Kim YJ, Singh P, Mathiyalagan R, Jin Y, Yang DC, 2016. Green synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus methylotrophicus*, and their antimicrobial activity. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 44(4): 1127-1132.

Wei X, Luo M, Li W, Yang L, Liang X, Xu L, Liu H, 2012. Synthesis of silver nanoparticles by solar irradiation of cell-free *Bacillus amyloliquefaciens* extracts and AgNO₃. *Bioresource Technology*, 103(1): 273-278.

