

**DNA SEQUENCE ANALYSIS OF NATIVE *TRICHODERMA LONGIBRACHIATUM* AND
PRODUCTION OF BIOTECHNOLOGICAL FUNGAL SILVER NANOPARTICLE
(AGNP)**

Tuğba KAHRAMAN

Uşak University, Faculty of Sciences and Arts, Department of Molecular Biology and Genetics,
Uşak, Turkey

Arzu ÜNAL

Iğdır University, Faculty of Agriculture, Department of Agricultural Biotechnology, Iğdır, Turkey

İjlal OCAK

Afyon Kocatepe University, Faculty of Education, Department of Mathematics and Science
Education, Division of Science Education, Afyon, Turkey

Safiye Elif KORCAN

Uşak University, Vocational School of Health Services, Medical Laboratory Techniques Program,
Uşak, Turkey

88

Corresponding Author: Arzu Ünal

ABSTRACT

Nanoparticles, which are known as nanotechnological materials, are also considered as biotechnological products. Biological methods are more economic compare to chemical and physical methods in R&D studies. Production of nanoparticles (AgNPs) by biotechnological processes are faster than other processes.

Trichoderma sp. produces a wide variety of extracellular industrial enzymes and metabolites. In the present research we report our optimisation experimental study of the extracellular synthesis of silver nanoparticles using *Trichoderma longibrachiatum*. Biological silver nanoparticle was synthesized extracellularly by using the fungus.

This study contains macroscopic, microscopic and molecular characterization of *Trichoderma sp.* Molecular identification of 18s rDNA and ITS regions by PCR amplification was provided by using Fungus-specific primers.

The most suitable temperature for AgNP biosynthesis was 55 °C, substrate concentration was 1:100 and pH was 12. Antibacterial effect of AgNPs was determined by agar diffusion method. At the end of the experiments, it was determined that the biosynthesis of AgNP showed antimicrobial activity against *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*.

Antibacterial effect of AgNPs was determined by agar diffusion method. At the end of the experiments, it was determined that the biosynthesis of AgNP showed antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*.

Keywords: *Trichoderma longibrachiatum*, DNA Sequence Analysis, Silver Nanoparticle, Antimicrobial activity.

YERLİ *TRICHODERMA LONGIBRACHIATUM*'UN DNA DİZİ ANALİZİ VE BİYOTEKNOLOJİK FUNGAL GÜMÜŞ NANOPARTİKÜL (AGNP) ELDESİ

ÖZET

Nanoteknolojik materyaller olarak bilinen nanopartiküller biyoteknolojik ürün olarak değerlendirilmektedir. Biyoteknolojik süreçlerle nanopartikül üretimine yönelik yapılan Ar-Ge çalışmalarında biyolojik yöntemler kimyasal ve fiziksel yöntemlere kıyasla daha ekonomik olup, çalışmalar daha kısa sürede gerçekleşmektedir.

Trichoderma sp. fungusu çok çeşitli hücre dışı endüstriyel enzimler ve metabolitler üretir. Bu araştırmada *Trichoderma longibrachiatum fungusu* kullanılarak biyoteknolojik ürün gümüş nanopartiküllerin (AgNP) biyolojik süreçlerle ilk kez hücre dışı sentezi gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma *Trichoderma sp.*'ye ait makroskobik, mikroskobik ve moleküler karakterizasyon çalışmalarını içermektedir. Fungus spesifik primerleri kullanılarak 18S rDNA ve ITS bölgeleri PCR amplifikasyonu ile moleküler tanımlama yapılmıştır.

Gümüş nanopartiküllerin hücre dışı sentezinin optimizasyonunda biyosentez için en uygun sıcaklığın 55 °C, substrat konsantrasyonunun 1:100 ve pH'nın 12 olduğu saptanmıştır. AgNP'lerin antibakteriyel etkisi agar difüzyon metodu ile belirlenmiştir. Deneyler sonunda AgNP'lerin biyosentezinin, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*'e karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Trichoderma longibrachiatum*, DNA dizi analizi, Gümüş nanopartikül, Antimikrobiyal aktivite.

GİRİŞ

Nanopartiküller (NPs) nanoteknolojik materyallerin ana malzemeleridir (Saravanan ve ark., 2011). Nanopartiküllerin sentezlenme yöntemleri kimyasal, fiziksel ve biyolojik yöntemleri içerir. Temel olarak, fiziksel yöntemlerde verim düşüken, kimyasal yöntemler kullanılarak elde edilen nanopartiküllerin toksik çözücülerin kullanımı ve tehlikeli yan ürünlerin oluşumu nedeniyle çevre üzerinde zararlı etkilere neden olduğu literatürde bildirilmiştir (Wang ve ark., 2007). Buna karşın biyolojik yöntemler kullanarak daha ucuza, istenilen boyutta, stabil ve toksik olmayan özellikte nanopartiküller üretilebilir (Guo ve ark., 2015). Gümüş nanopartiküllerin iyi iletkenlik, kimyasal stabilite, katalitik ve antibakteriyel etkilerinin yanı sıra kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki sergiledikleri gösterilmiştir. İndirgeyici ve stabilize edici maddeler içeren sıvı ortam, genellikle nanopartikülleri sentezlemek için kullanılır. Bu şartlar altında Ag⁺'nin azalması Ag atomlarının oluşumuna yol açar. Oluşan Ag oligomerik kümeler aglomera eder (bağlanır) ve sonunda AgNP oluşumu gerçekleşir (Burda ve ark., 2005).

Gümüş nanopartiküllerin (AgNP) biyolojik sistemler kullanılarak elde edilmesi yeşil sentez olarak bilinir. Bakteri, fungus (maya ve küf) gibi mikroorganizmalar kullanılarak hücre dışı yeşil

biyosentez günümüzde araştırmacıların ilgi odağı olmuştur (Alani ve ark., 2012). Metal nanopartiküllerin bir fungus tarafından biyosentezinde, miselyum, metal tuzu çözeltisine maruz bırakılır, bu sayede fungusun kendi hayatta kalması için enzimleri ve metabolitleri üretmesi sağlanır. Bu süreçte, metal iyonları, hücre dışı enzimin ve fungusun metabolitlerinin katalitik etkisi ile metalik katı nanopartiküller indirgenir (Vahabi ve ark., 2011). Biyosentezi gerçekleştirilmiş nanopartiküller evre dostu, güvenilir, biyoyumlu ve düşük maliyetlidir (Emeka ve ark., 2014).

Bugüne kadar, farklı fungusların nanopartikülleri sentezlediği bulunmuştur (Salunke ve ark., 2016). AgNPs, *Fusarium oxysporum* (Mukherjee ve ark., 2008), *Phanerochaete chrysosporium* (Vigneshwaran ve ark., 2006), *Fusarium solani* (Ingle ve ark., 2009), *Aspergillus niger* (Gade ve ark., 2008), *Phoma glomerata* (Birla ve ark., 2009), *Cladosporium cladosporioides* (Balaji ve ark., 2009), *Penicillium fellutanum* (Kathiresan ve ark., 2009), *Phoma sp.3.2883* (Chen ve ark., 2003), *Aspergillus flavus* (Vigneshwaran ve ark., 2007), *Epicoccum nigrum* (Sheikhloo ve ark., 2011) ve *Phoma macrostoma* (Sheikhloo ve Salouti, 2012) tarafından sentezlenebilir.

Trichoderma cinsi funguslar çevrede önemli bir rol oynayan ve temel olarak enzim, antibiyotik ve diğer metabolitlerin üretiminde çeşitli endüstri dallarında kullanılan çok büyük bir mikrobiyal gruptur (Fayaz ve ark., 2010). *Trichoderma* türlerinin, antimikrobiyal, antikanser ve biyokatalizörler gibi önemli biyolojik özellikleri olan gümüş nano partüül sentezlediği bilinmektedir (Fayaz ve ark., 2010, Saravanakumar ve ark., 2015). İncelenen tüm *Trichoderma* türlerinin, özellikle de *Trichoderma viride*, *T. harzianum* ve *T. asperellum*'un nano-Ag üretiminde etkili olduğunu bildirilmiştir (Zhao ve ark., 2017).

Bu çalışmanın amacı yerel olarak Uşak ili Organize Sanayi Bölgesinden alınan seramik atıklarından izole edilen ve moleküler karakterizasyonu yapılan *Trichoderma longibrachiatum* kullanılarak AgNP sentezi için optimum koşulların belirlenmesi ve antimikrobiyal aktivite saptanması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan fungus *T. longibrachiatum* Uşak ilinden seramik fabrikası atığından izole edilmiştir.

Trichoderma sp. makroskobik ve mikroskobik tanımlanma için Malt Extract Agar (MEA) besiyerinde kültüre alınmıştır. Makroskobik tanımlamada koloni büyüme şekli, koku, renk ve sporlanma şekli gözlenmiştir. Mikroskopik incelemede konidiyofor ve konidi ölçümleri laktofenolanilin mavisi ile boyanarak slayt preparatları hazırlanmıştır. *Trichoderma sp.*'nin mikroskobik incelenmesinde konidiyoforların dallanma şekli, fiyalidlerin şekli ve ortaya ıkışları, konidilerin şekli, rengi ve çeper özellikleri temel alınarak tanımlamalar yapılmıştır (Hasenekoğlu, 1991; Gams, Bisset & Malik, 1998; Jaklitsch ve ark., 2006; Bisset, 1991; Mukherjee ve ark, 2013).

Moleküler karakterizasyon çalışmalarında DNA izolasyonu için EurX GeneMATRIX Plant & Fungi DNA izolasyon kiti (Polonya) kullanılmıştır. DNA izolasyonundan sonra elde edilen DNA'ların miktar ve saflığının kontrolü için Thermo Scientific Nanodrop 2000 (USA) cihazında spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirilmiştir. PCR çalışmasında universal primer olarak ITS1-ITS4, tayini için hedeflenen gen bölgeleri çoğaltılmıştır. ITS1 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' ve ITS4 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3' primerleri kullanılmıştır. 500 ve 700 baz arası değişen hedef bölgeleri çoğaltmak için tek aşamalı PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu Solis Biodyne (Estonya) FIREPol® DNA Polymerase Taq polimeraz enzimiyle gerçekleştirilmiştir. PCR sonrasında agaroz jelde tek bant elde edilerek, PCR işleminin başarılı olduğu gözlemlenmiştir. PCR ürünü saflaştırma aşamasında, elde edilen tek bant örnekler için "ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent" (ThermoFisher Scientific, USA) saflaştırma enzimi kullanılıp, kit prosedürlerine uygun olarak saflaştırılmıştır. Sanger Dizileme örnekleri için, Macrogen Hollanda laboratuvarında, ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti kullanılmıştır (Applied Biosystems, Foster City, CA). ITS1 ve NL1

primerleriyle elde edilen okumalar, bir konsensus dizi oluşturmak ve dizi hizalamak amacıyla kontig (genomik kütüphane) haline getirilmiştir. Bu işlemin gerçekleştirilmesinde BioEdit yazılımı içinde CAP contig assembly algoritması kullanılmıştır.

Fungal biyomasın elde edilmesi için izolat Yeast Ekstrakt 0.025 g/L, CaCl₂H₂O 0.012g/L, MgSO₄7H₂O 0.05 g/L, NH₄H₂PO₄ 1 g/L ve glukoz 10 g/L içeren besiyerinde aerobik koşullar altında 110 rpm' de 25 °C' de 7 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası biyomas besiyerinden Whatman filtre kâğıdından süzülerek ayrılmıştır. Fungal biyomas 3 defa deiyonize su ile yıkanarak filtrasyon işlemleri tekrarlanmıştır. Yıkama işleminin ardından 150 ml deiyonize suya fungal biyomasdan 2'şer gram tartılarak inoküle edildikten sonra 72 saat 110 rpm' de inkübe edilmiştir.

AgNP'lerin biyosentezi için öncelikle 72 saat 150 ml deiyonize su içinde tutulan fungal biyomas Whatman filtre kâğıdından geçirilerek hücre içeren filtrat ve hücre içermeyen filtrat birbirinden ayrılmıştır. 100 ml lik erlenlere hücre içermeyen filtrat ve deiyonize su ile hazırlanan 0.03 M' lık gümüş nitrat (AgNO₃) 1:10 oranında tartılarak eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak hücre içermeyen filtrat, negatif kontrol olarak 0.03 M AgNO₃ kullanılmıştır. İnkübasyon 25 °C' de 110 rpm' de aydınlıkta gerçekleştirilmiştir. Renk değişimi AgNP sentezinin gerçekleştiğini göstermiştir (Hamedi ve ark., 2014).

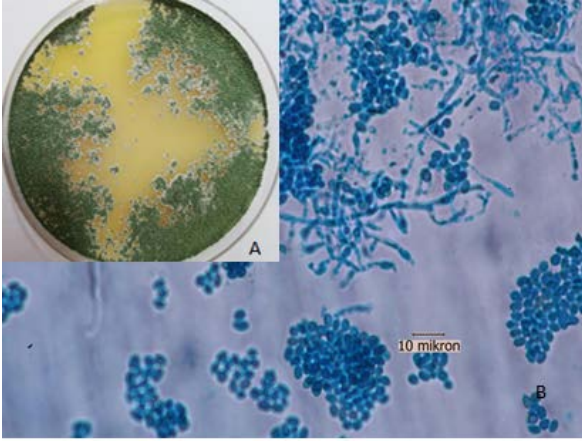
Reaksiyon karışımının renk değişimi AgNP oluşumu için kanıt olarak kullanılmıştır. Hücre içermeyen filtrata AgNO₃ eklendikten sonra bir hafta boyunca her 24 saatte bir renk değişimi gözlemlenen filtratın çift ışınlı UV-VIS spektrofotometrede (Shimadzu UV 1800), 200-800 nm aralığında absorbans değerleri ölçülmüştür (Hamedi ve ark., 2014).

AgNP biyosentezinin optimizasyonu için substrat konsantrasyonu, reaksiyon pH'sı ve reaksiyon sıcaklığı olmak üzere 3 parametre seçilmiştir. Her bir değişken tek seferde sadece bir parametrenin değiştirilmesiyle optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmaları için substrat konsantrasyonu 1:10, 1:25, 1:50, 1:75 ve 1:100 oranlarında, reaksiyon pH'sı 2.0, 4.0, 7.0, 9.0 ve 12.0 aralıklarında, reaksiyon sıcaklığı 25°C, 35°C, 45°C ve 55°C sıcaklıklarda denenmiştir. Elde edilen numunelerin absorbansı 442 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür (Xue ve ark., 2016).

AgNP'lerin gram pozitif bakterilerden *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*'a; gram negatif bakterilerden ise *Escherichia coli*' ye karşı antimikrobiyal aktivitesi agar difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Bakteriler Nutrient Broth sıvı besiyerinden 0.5 McFarland yoğunlukta alınarak Müeller Hinton Agar'a (MHA) yayılarak inoküle edilmiştir. Deneyde biyosentezi gerçekleştirilen AgNP'lerin 10000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek dibe çöken süpernatantı kullanılmıştır. Petrilerde açılan 6 mm'lik kuyucuklardan her birine 20 µl AgNP'ü ve kontrol grubu olarak da 0,03 M AgNO₃ eklenerek 37 °C' de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra inhibisyon zonu ölçülmüştür.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmada *Trichoderma sp.* kolonilerinin Malt Extract Agar (MEA) ve Potato Dextrose Agar (PDA)'da 20 °C'de 4 günde petri kabını dolduracak şekilde geliştiği, önce düz daha sonra havai hiflerin gelişmesinden dolayı tüylü görünümde ve beyazımsı renkte, ilerleyen süreçte konidilerin geliştiği alanların koyu yeşil renkte olduğu görülmüştür (Şekil 1A). Koloni altının renksiz, yaşlı kültürlerde Hindistan cevizi kokusunun bulunduğu gözlemlenmiştir. Hiflerin düz çeperli, çok dallı, 1.5-12 mikrometre eninde, konidioforların çok dallı, ana dalın 4.5-5 mikrometre çapında genel görünümünün düzensiz olduğu, birçok yan dal oluşturduğu ve bütün yan dalların geniş açılarla geliştiği, fiyalidlerin terminal fiyalidlerin altında halka gruplar şeklinde geliştiği, her grupta 2,3 fiyalidin tek veya karşılıklı çiftler halinde, tabanda dar, ortada hafif geniş, uca doğru uzun bir boyna sahip olduğu saptanmıştır. Terminal fiyalidlerin daha uzun (8-10 x 2.5-3 mikrometre çapında), konidilerin daha kısa 4-4.5 x 3.5-4 mikrometre çapında) obovoid, hafif pürüzlü olduğu görülmüştür. (Şekil 1B).



Şekil 1. *Trichoderma sp.* makroskobik **A:** Koloni morfolojisi ve **B:** Mikroskobik morfoloji: mikroskop görüntüleri

Trichoderma sp. için yapılan moleküler karakterizasyon çalışmaları sonucunda S1-1 – ITS1: *Trichoderma longibrachiatum* MK910052.1 izolatu için:

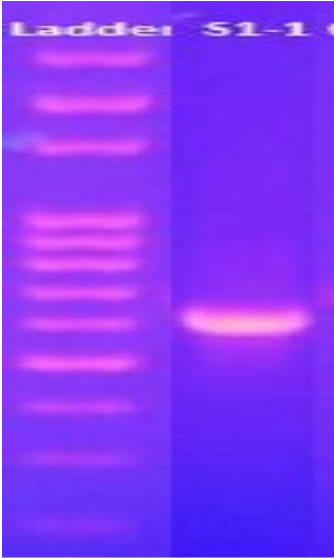
Toplam Baz Sayısı: 589

Benzerlik Skoru: 1088

Dizi Eşleşme Oranı: %100

Benzerlik Oranı: %100

olduğu saptanmıştır (Şekil 2).



S1-1 – ITS1: *Trichoderma longibrachiatum* MK910052.1

```

ACCCAATGTGAACGTTACCAATCTGTTGCCTCGGCGGGATTCTCTTGCCCCGGGCGCGTCGCAGCCCCGG
ATCCCATGGCGCCCGCCGGAGGACCAACTCCAACCTCTTTTTTCTCTCCGTTCGCGGCTCCCGTTCGCGGCTC
TGTTTTATTTTTGCTCTGAGCCTTTCTCGGCGACCCTAGCGGGCGTCTCGAAAATGAATCAAACTTTCAA
CAACGGATCCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT
TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGC
GTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTTCGGCGTTGGGGATCGGCCCTCACCGGGCCGCCCCGA
AATACAGTGGCGGTCTCGCCGAGCCTCTCATGCGCAGTAGTTTGCACACTCGCACCGGGAGCGCGGCGC
GGCCACAGCCGTAAAACACCCCAAATTTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAA
CTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

```

Şekil 2. *Trichoderma longibrachiatum* Moleküler karakterizasyon çalışması

Çalışmalar sonucunda fungusların metal nanopartiküllerin sentezi açısından son derece iyi adaylar olduğu anlaşılmıştır. *Trichoderma* türleri, enzimleri ve sekonder metabolitleri ürettiği bilinen (Ünal ve ark., 2019) fungusların nanopartiküllerin (NP'lerin) sentezinde katalizör olarak kullanılan bir fungus grubudur. Bu sebeple renk değişimi ve spektrofotometrik ölçümlerle doğrulanmış AgNP'ü sentezi için bu çalışmada *Trichoderma longibrachiatum* kullanılmıştır. Hücre içermeyen filtrat ve AgNO₃ karışımından oluşan solüsyonun rengi açık sarıdan kahverengiye dönerek AgNP'ü oluşumunu göstermektedir. (Şekil 3). Kültür filtratının renk yoğunluğundaki artış, sulu çözeltide bulunan gümüş iyonlarının indirgenmesiyle oluşan nanopartiküllerin sayısındaki artıştan kaynaklanmaktadır (Elamawi ve ark., 2018).



Şekil 3. *Trichoderma longibrachiatum* kullanılarak Gümüş Nanopartikül (AgNP) Üretimi

Nanopartiküllerde bulunan serbest elektronlar yüzey plazmon rezonansına (SPR) neden olduğu için gümüş nanopartiküllerin oluşumu renk değişiminin yanı sıra UV/VIS analizi ile doğrulanabilir (Noginov ve ark., 2006). Çalışmamızda renk değişimi gözlemlendiğimiz çözelti (Şekil 3) UV/VIS spektrofotometrede 200-800 nm dalga boyları arasında taranmış ve 442 nm dalga boyunda pik verdiği belirlenmiştir. Bu nedenle optimizasyon çalışmalarında UV/VIS spektrofotometre ölçümleri 442 nm dalga boyunda yapılmıştır.

Yapılan çalışmalarda *Trichoderma longibrachiatum* için bu değer 385nm (Elamawi ve ark., 2018) *T. harzianum* ve *T. viride* için 430 nm (Fayaz ve ark., 2010; Singh and Balaji, 2011) olduğu bildirilmiştir. Partikül büyüklüğü ile UV'de belirlenen pik arasında bir ilişki vardır. Pik daha uzun dalga boylarına geçtiğinde partiküller büyür, 384–414 dalga boylarında AgNP boyutunu 10-14 nm büyüklüğüne sahip olduğu belirtilmiştir (Solomon ve ark., 2007). Bir diğer çalışmada ise 438 nm dalga boyunda UV spektrumunun 60-80 nm partikül boyutlarını verdiğini ortaya koyulmuştur (Nair ve Pradeep 2003).

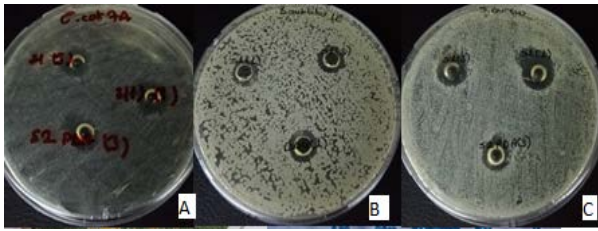
AgNP'lerin bakteri hücre duvarına tutturulabildiği ve sonuç olarak hücre içine sızabileceği rapor edilmiştir. Bu etki, bakteri zarından hücre içine içeriğin sızmasına ve bakteri ölümüne yol açabilecek zar hasarı gibi fiziksel değişikliklere neden olmaktadır. AgNP'lerin Gram-negatif ve Gram pozitif bakteriler üzerindeki antibakteriyel etkisinin olduğu gösterilmiştir.. Bakterilerin hücresel zarı karboksil, fosfat ve amino gruplarının varlığına bağlı olarak negatif bir yüke sahiptir. Pozitif yüklü AgNP'ler arasındaki elektrostatik çekim ile hücre membranlarına AgNP bağlanır. Daha güçlü çekici bir kuvvet elde etmek için AgNP'lerin yüzey yükünü değiştirilebilir (Yun'an Qing ve ark., 2018).

Çalışmamızda AgNP'lerin antibakteriyel etki analizi agar difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Yapılan deneylerin sonunda biyosentezi gerçekleştirilen AgNP'ün *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*'e karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 1). AgNP en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi *S. aureus*'a karşı gösterirken (21 mm) en düşük antimikrobiyal aktiviteyi *B. subtilis*'e (12 mm) karşı göstermiştir (Şekil 4).

Çizelge 1. Agar difüzyon testi sonuçları (mm)

Mikroorganizmalar	Pozitif Kontrol					AgNP	Negatif Kontrol
	Va(30)	P(10)	C(30)	E(15)	Te(30)		Distile su
<i>E. coli</i> ATCC (25922)	25	33	30	26	12	18	-
<i>S. aureus</i> ATCC(25923)	21	40	27	30	30	21	-
<i>B. subtilis</i>	22	31	36	29	16	12	-

Va:Vankomisin, P:Penisilin G, C:Kloromfenikol, E:Eritromisin, Te:Tetrasiklin



Şekil 4. Gümüş Nanopartiküllerin (AgNP) bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi

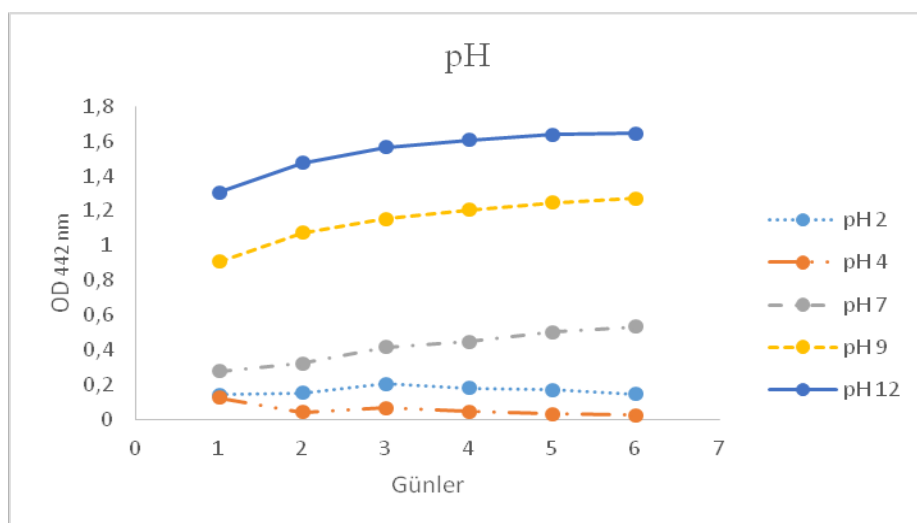
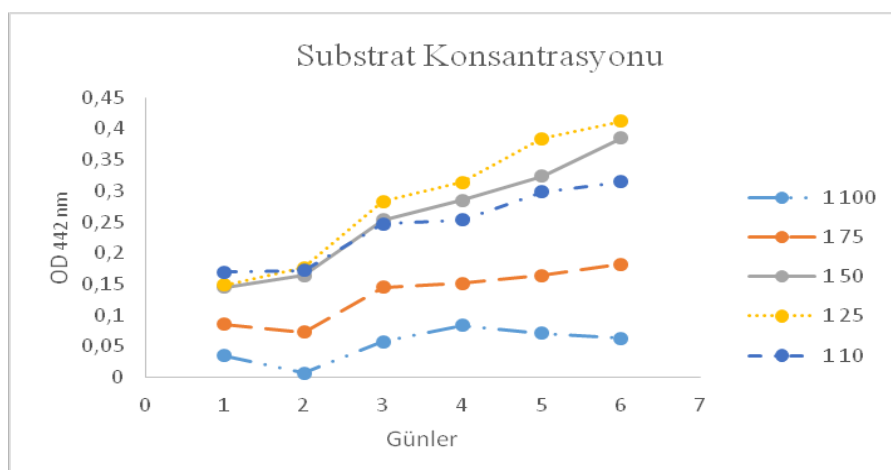
A) *E. coli*, B) *B. subtilis*, C) *S. aureus*

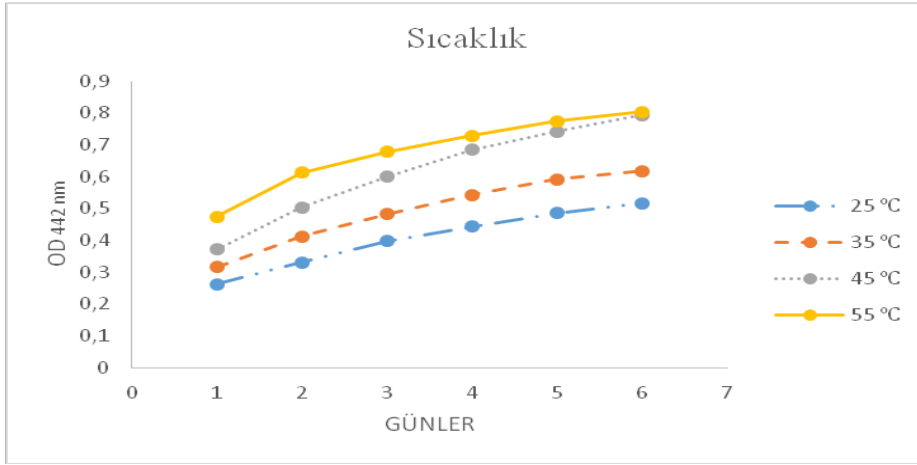
AgNP'lerinin optimizasyonu üç ana parametre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çizelge 2'de 442 nm dalga boyunda UV/VIS spektrofotometre ölçümleri verilmiştir. Substrat konsantrasyonunun AgNP'lerin biyosentezi üzerinde dikkat çekici bir etki gösterdiği ve 1:25 oranının optimum konsantrasyon olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4). 1:100 oranında AgNP sentezi en düşüktür, renk değişimi en az olan konsantrasyondur. AgNP sentezi için optimal pH koşullarını belirlemek amacıyla 2-12 pH aralığı seçilmiştir. Absorbans değerleri pH'ın artmasıyla artış göstererek alkali ortamın AgNP sentezi için daha uygun olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte pH 4'te AgNP biyosentezi indirgenmiş ve dipte agregalar (taneli yapılar) ve çökeltiler gözlemlenmiştir. AgNP biyosentezi için en uygun sıcaklığın 55 °C, Substrat konsantrasyonunun 1:100, pH'ın 12 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2). *T. longibrachiatum*'da AgNP üretimi için optimum 28 °C olduğu bildirilmiştir (EL Emavi ve ark., 2018). *T. longibrachiatum* için reaksiyon sıcaklığının enzim aktivitesinde önemli bir rolü olduğu ve nanopartikül boyutunu etkilediği bilinmektedir. 27 °C'de nanopartikül boyutu 10-40 nm arasında iken sıcaklık 10 °C düşürüldüğünde partikül boyutu 80-100 nm'ye çıkmaktadır. Sıcaklıktaki düşüş partikül boyutunda artışa yol açmaktadır (Fayaz ve ark.,2009).

Çizelge 2. AgNP'ün optimizasyon çalışmaları

	SÜRE					
	1.Gün	2.Gün	3.Gün	4.Gün	5.Gün	6.Gün
Substrat Konsantrasyonu						
1:10	0.169	0.172	0.247	0.253	0.298	0.315
1:25	0.149	0.177	0.283	0.314	0.384	0.412
1:50	0.145	0.164	0.253	0.285	0.324	0.385
1:75	0.086	0.073	0.145	0.151	0.164	0.182

1:100	0.035	0.007	0.058	0.084	0.071	0.063
pH						
2	0.140	0.152	0.204	0.181	0.169	0.145
4	0.123	0.041	0.066	0.043	0.031	0.024
7	0.275	0.322	0.415	0.445	0.502	0.533
9	0.906	1.073	1.154	1.204	1.245	1.272
12	1.306	1.473	1.565	1.605	1.637	1.644
Sıcaklık						
25 °C	0.262	0.331	0.397	0.444	0.485	0.517
35 °C	0.316	0.413	0.482	0.543	0.592	0.618
45 °C	0.372	0.504	0.600	0.684	0.742	0.794
55 °C	0.475	0.613	0.678	0.790	0.775	0.803





Şekil 5. Biyosentezi gerçekleştirilen AgNP'ün optimizasyonu (Substrat konsantrasyonu, pH ve Sıcaklık)

SONUÇ

Bu araştırmada biyoteknolojik süreçlerle gümüş nanopartiküllerin (AgNP) üretimi için ekonomik olarak uygun, çevresel açıdan sürdürülebilir biyolojik yöntem ile *T. longibrachiatum* kullanılarak antimikrobiyal aktivite gösteren AgNP'ler başarıyla sentezlenmiştir. AgNP biyosentezi için en uygun sıcaklığın 55 °C, substrat konsantrasyonunun 1:100, pH'ın 12 olduğu belirlenmiştir. AgNP biyosentezi işlemi sırasında herhangi bir toksik kimyasal madde veya organik çözücü kullanılmaması nedeniyle bu yöntem çevre dostu olarak kabul edilebilir.

Çalışmamızda *Trichoderma longibrachiatum fungusu* kullanılarak biyoteknolojik ürün olan gümüş nanopartiküllerin (AgNP) biyolojik süreçlerle ilk kez hücre dışı sentezi gerçekleştirilmiştir.

Bundan sonraki çalışmaların elde edilen biyoteknolojik fungal gümüş nanopartikülün (AgNP) karakterizasyonu üzerine yapılması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abid M, Hassan A, Ghafoor A, Javed K, 2003. Brackish Water for Irrigation: I. Effects on Yield of Wheat and Sorghum in Wheat-Sorghum Crop Rotation and Properties of The Rasulpur Soil Series. International Journal of Agriculture and Biology, 5(3): 367-376.
- Alani F, Moo-Young M, Anderson W, 2012. Biosynthesis of silver nanoparticles by a new strain of *Streptomyces* sp. compared with *Aspergillus fumigatus*. World J Microbiol Biotechnol 28:1081–1086.
- Balaji DS, Basavaraja S, Deshpande R, 2009. Extracellular biosynthesis of functionalized silver nanoparticles by strains of *cladosporium cladosporioides* fungus. Colloid Surf B, 68:88–92.
- Birla SS, Tiwari VV, Gade AK, et al, 2009. Fabrication of silver nanoparticles by *Phoma glomerata* and its combined effect against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Lett Appl Microbiol, 48:173–179.
- Bissett J, 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. Canadian journal of botany, 69(11), 2357-2372.
- Burda C, Chen XB, Narayanan R, El-Sayed MA, 2005. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. Chem Rev., 105:1025–1102.

- Chen JC, Lin ZH, Ma XX, 2003. Evidence of the production of silver nanoparticles via pretreatment of *Phoma sp.*3.2883 with silver nitrate. *Lett Appl Microbiol.*, 2003;37:105–108.
- Elamawi RM, Al-Harbi RE, Hendi AA, 2018. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Trichoderma longibrachiatum* and their effect on phytopathogenic fungi. *Egyptian Journal of Biological Pest Control.*, 28:28.
- Emeka EE, Ojiefoh OC, Aleruchi C, 2014. Evaluation of antibacterial activities of silver nanoparticles green-synthesized using pineapple leaf (*Ananas comosus*). *Micron* 57:1–5.
- Fayaz M, Balaji K, Girilal M, Yadav R, Kalaichelvan PT, Venkatesan R, 2010 Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine*, 6:103–109.
- Fayaz M, Balaji K, Kalaichelvan PT, Venkatesan R, 2009. Fungal based synthesis of silver nanoparticles—an effect of temperature on the size of particles. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 74:123–126.
- Fayaz M, Tiwary CS, Kalaichelvan PT, Venkatesan R, 2010. Blue orange light emission from biogenic synthesized silver nanoparticles using *Trichoderma viride*, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 75 (1):175–178.
- Gade AK, Bonde P, Ingle AP, 2008. Exploitation of *Aspergillus niger* for synthesis of silver nanoparticles. *J Biobased Mater Bioenergy*. 2008;2:243–247.
- Gams W, Bissett J, 1998. Morphology and Identification of *Trichoderma*. In: *Trichoderma and Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and Genetics*, Harman, G.E. and C.P. Kubicek (Eds.). Vol. 1, pp: 3-34, Taylor and Francis, London, UK.
- Guo M, Li W, Yang F, Liu H, 2015. Controllable biosynthesis of gold nanoparticles from a *Eucommia ulmoides* bark aqueous extract. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.*, 2015;142:73–79.
- Hamedi S, Shojaosadati SA, Shokrollahzadeh S, Najafabadi SH, 2014, “Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using a novel and non-pathogenic fungus, *Neurospora intermedia*: controlled synthesis and anticancer activity.” *World J Microbial Biotechnol* 30:693-704.
- Hasenekoğlu İ, 1991. *Toprak Mikrofungusları*, Cilt VII. Atatürk Üniversitesi Yayınları No: 689, Erzurum.
- Ingle A, Rai M, Gade A, et al, 2009. *Fusarium solani*: a novel biological agent for the extracellular synthesis of silver nanoparticles. *J Nanopart Res.*, 2009;11: 2079–2085.
- Kathiresan K, Manivannan S, Nabeel MA, et al, 2009. Studies on silver nanoparticles synthesized by a marine fungus, *Penicillium fellutanum* isolated from coastal mangrove sediment. *Colloid Surf B.*, 2009;71:133–137.
- Mukherjee P, Roy M, Mandal BP, et al, 2008. Green synthesis of highly stabilized nanocrystalline silver particles by a non-pathogenic and agriculturally important fungus *T-asperellum*. *Nanotechnology.*, 2008;19; 075103.
- Mukherjee PK, Horwitz BA, Singh US, Mukherjee M, Schmoll M, 2013. *Trichoderma: biology and applications*. CAB International, Oxfordshire, United Kingdom.
- Nair AS, Pradeep T, 2003. Halocarbon mineralization and catalytic destruction by metal nanoparticles. *Curr Sci*, 84:1560–1564.
- Noginov M.A, Zhu G, Bahoura M, Adegoke J, Small C, Ritzo BA, Drachev VP, Shalaev VM, 2006. The effect of gain and absorption on surface plasmon in metal nanoparticles, *Appl. Phys. B*, 86 (3):455-460.

- Salunke BK, Sawant SS, Lee SI, et al, 2016. Microorganisms as efficient biosystem for the synthesis of metal nanoparticles: current scenario and future possibilities. *World J Microbiol Biotechnol.*, 2016;32:88.
- Saravana Kumar K., et al, 2015. Biogenic Metallic Nanoparticles as Catalyst for Bioelectricity Production: a Novel 4 Approach in Microbial Fuel Cells vol. 203, 27-34.(2015).
- Saravanan M, Vemu AK, Barik SK, 2011. Rapid biosynthesis of silver nanoparticles from *Bacillus megaterium* (NCIM 2326) and their antibacterial activity on multi drug resistant clinical pathogens.. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 88:325–331.
- Sheikhloo Z, Salouti M, 2012. Intracellular biosynthesis of gold nanoparticles by fungus *Phoma macrostoma*. *Synth React Inorg Met*, 2012;42:65–67.
- Sheikhloo Z, Salouti M, Katirae F., 2011. Biological synthesis of gold nanoparticles by fungus *Epicoccum nigrum*. *J Clust Sci.*, 2011;22:661–665.
- Singh P, Balaji RB, 2011. Biological synthesis and characterization of silver nanoparticles using the fungus *Trichoderma harzianum*. *Asian J Exp Biol Sci*, 2:600–605.
- Solomon SD, Bahadory M, Jeyarajasingam AV, Rutkowsky SA, Boritz C, 2007. Synthesis and study of silver nanoparticles. *J Chem Educ*, 84:322–325.
- Ünal A, Korcan SE., Ocak İ, Malkoç S, 2019. Amilaz Enziminin Yerli Üretim Potansiyelinin Artırılmasına Yönelik Bir Araştırma EJONS International Refereed & Indexed Journal on Mathematic, Engineering And Natural Sciences ISSN 2602 – 4136, 3 (9): 58-65.
- Vahabi K, Mansoori GA, Karimi S, 2011. Biosynthesis of silver nanoparticles by fungus *Trichoderma reesei* (a route for large-scale production of AgNPs). *Insciences J*, 1(1):65–79.
- Vigneshwaran N, Ashtaputre NM, Varadarajan PV, et al, 2007. Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. *Mater Lett.*, 2007;61:1413–1418.
- Vigneshwaran N, Kathe AA, Varadarajan PV, et al, 2006. Biomimetics of silver nanoparticles by white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *Colloid Surf B.*, 2006;53:55–59.
- Wang Z, Chen J, Yang P, Yang W, 2007. Biomimetic synthesis of gold nanoparticles and their aggregates using a polypeptide sequence.. *Appl Organomet Chem*, 21(8):645–651.
- Xue B, He D, Gao S, Wang D, Yokoyama K, Wang L, 2016. “Biosynthesis of silver nanoparticles by the fungus *Arthroderma fulvum* and its antifungal activity against genera of *Candida*, *Aspergillus* and *Fusarium*.” *International Journal of Nanomedicine*, 11: 1899–1906.2016.
- Yun’an Qing LC, Li R, Liu G, Zhang Y, Tang X, Wang J, Liu H, Qin Y, 2018. Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. *Int J Nanomed* 13:3311.
- Zhao X, Zhou L, Rajoka MSR, Yan L, Jiang C, Shao D, Zhu J, Huang Q, Yang H and Jin M, 2017 “Fungal silver nanoparticles: synthesis, application and challenges” *Critical Reviews in Biotechnology*, 38:6, 817-835.