

Biyosentetik gümüş nanopartiküllerinin *Pyracantha coccinea* bitkisinin gövde eksplantlarının yüzey sterilizasyonunda kullanımı

Use of biosynthetic silver nanoparticles in the surface sterilization of *Pyracantha coccinea* stem explants

Pınar NARTOP^{1*}

¹Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Çorlu Mühendislik Fakültesi, Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ, Türkiye.
pinarnartop@gmail.com

Geliş Tarihi/Received: 05.08.2016, Kabul Tarihi/Accepted: 14.11.2016
* Yazışılan yazar/Corresponding author

doi: 10.5505/pajes.2016.04809
Araştırma Makalesi/Research Article

Öz

Nanoteknoloji günümüzde birçok alanda etkili olarak kullanılmaktadır. Gümüş nanopartiküllerin de antibakteriyel ve antiseptik uygulamalarda sıklıkla kullanıldığı görülmektedir. Gümüş nanopartiküllerin biyosentezi (yeşil sentez), fiziksel ve kimyasal sentezlere alternatif olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışmada, *Alkanna tinctoria* (havaciva) rizomlarının sulu ekstraktları gümüş nanopartikül biyosentezinde kullanılmıştır. Kolloidal gümüş nanopartikül çözeltisi, *Pyracantha coccinea* (ateş diken) bitkisinin gövde eksplantlarının yüzey sterilizasyonunda kullanılmış ve *in vitro* koşullardaki sterilizasyon başarısı incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, yüzey sterilizasyon başarısında %10'luk NaOCl ve kolloidal gümüş nanopartikül çözeltisi uygulamalarında istatistiksel olarak fark görülmemiştir. 20 dk. lık sterilan uygulamasında ise gümüş nanopartiküller NaOCl ile aynı yüzey sterilizasyon etkinliğini (%53.70) göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Yeşil sentez, Gümüş nanopartiküller, Bitki eksplantlarının yüzey sterilizasyonu

Abstract

Nanotechnology is being used effectively in many areas contemporarily. Silver nanoparticles are one of the most used materials in antibacterial and antiseptic practices. Biosynthesis of silver nanoparticles (green synthesis) is an alternative way to physical and chemical synthesis. In this study, water extracts of *Alkanna tinctoria* (alkanet) rhizomes were used for silver nanoparticle biosynthesis. Obtained colloidal silver nanoparticle solution was applied to *Pyracantha coccinea* (scarlet firethorn) stem explants for surface sterilization and the sterilization ratios in *in vitro* conditions were inspected. With respect to data, difference between 10% NaOCl and colloidal silver nanoparticle solution applications for surface sterilization of the stems were not found statistically significant. Moreover, in the application of sterilants for 20 minutes, silver nanoparticles showed the same surface sterilization activity (53.70%) as NaOCl.

Keywords: Green synthesis, Silver nanoparticles, Surface sterilization of plant explants

1 Giriş

Boyutu 100 nanometrenin altında olan nanopartiküller, hacimsel yapı malzemelerden çok daha farklı ve üstün olarak kabul edilen özellikler sergilemelerinden dolayı, günümüzde tıp, biyoteknoloji, biyomedikal, kozmetoloji ve kimya sektörleri başta olmak üzere birçok alanda etkili olarak kullanılmaktadırlar. Gümüşün antibakteriyel özelliğine sahip olduğu yüzlerce senedir bilinmektedir. Yaklaşık 650 farklı hastalığa neden olan mikroorganizmaların gümüş ve gümüş nanopartiküller (AgNP) ile etkisiz hale getirilebildiği bildirilmiştir [1].

Gümüş iyonları, literatürde bilinen tüm mikroorganizma çeşitleri üzerine en geniş oranda etkili olan antimikrobiyal ve antibakteriyel maddelerdir. Mikroorganizmalara karşı üstün etkilerinin yanı sıra, insan vücuduna zararlı etkileri yoktur ve çevre dostudurlar. AgNP'ler kozmetik ve deterjan sektöründe de yer almaktadır. Gümüş iyonu içeren cilt ürünleri hem cildi tazelemekte hem de cilt yüzeyinde antimikrobiyal bir yüzey oluşturmaktadır. Ayrıca deterjanlarda da gümüş iyonları kullanılarak hijyen konusunda alternatif ürünler geliştirilmektedir [2]. Nanopartiküllerin biyosentezi (yeşil sentez), fiziksel ve kimyasal senteze alternatif olarak nanopartikül eldesinde kullanılan ve nanoteknoloji ile biyoteknolojiyi birbirine bağlayan bir yaklaşımdır [3]. Bu konuda yapılan çalışmalarla ilgili makalelere son yıllarda sıklıkla rastlanmaktadır.

Yüzey sterilizasyonu doku kültürlerindeki en önemli konulardan biridir. Yüzey sterilizasyon aşamasında başarı elde edilmeden, ilerleyen aşamalara geçmek mümkün olmamaktadır. Bu sebeple, bitkilerden alınan parçaların (eksplant) yüzey sterilizasyonu kültür başarısını etkileyen en önemli faktördür. Eksplantların yüzey sterilizasyonunda sodyum hipoklorit, etanol, kalsiyum hipoklorit, hidrojen peroksit, civa klorit, çeşitli surfaktanlar (örneğin Tween 20) ve bitki koruyucu karışımlar gibi sterilanlar sıklıkla kullanılmaktadır. Bu sterilanlar genelde toksik etkilidirler; *in vitro* koşullardaki büyüme ve gelişmeyi engellerler ve kararmalara sebep olmaktadır [4]-[6].

Bu çalışmada, AgNP'ler bitkisel özüt (*Alkanna tinctoria* rizomu sulu ekstresi) kullanılarak biyolojik olarak sentezlenmiş ve elde edilen kolloidal çözelti *Pyracantha coccinea* (ateş diken) bitkisinin gövde eksplantlarının yüzey sterilizasyonunda kullanılmıştır.

2 Materyal ve metod

2.1 Havaciva sulu ekstresinin hazırlanması

Alkanna tinctoria L. (havaciva) bitkisinin kurutulmuş rizomları (Şekil 1) çeşme suyu ile iyice yıkandıktan sonra filtre kâğıdı ile kurulanmıştır. Küçük parçalara ayrılan rizomlar havanda dövülerek toz haline getirilmiştir. Elde edilen bitkisel tozun 5 g 100 ml distile su içerisine karıştırılmıştır ve 80 °C'de su banyosunda bir sa. bekletilerek ekstraksiyon uygulanmıştır. Elde edilen havaciva sulu ekstresi (Şekil 2) kaba filtre

kâğıdından süzülerek stok olarak kullanılmak üzere koyu renkli cam şişe içerisinde buzdolabında +4 °C'de saklanmıştır.



Şekil 1: *Alkanna tinctoria* (havaciva) bitkisinin kurutulmuş rizomları.



Şekil 2: *Pyracantha coccinea* (ateş diken) bitkisi.

2.2 Gümüş nanopartiküllerin sentezlenmesi

95 ml 1 mM gümüş nitrat çözeltisine 5 ml havaciva ekstresi ilave edilmiş ve erlen içerisinde karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 24 sa. bekletilerek nanopartikül oluşumunun bir göstergesi olan renk değişimi takip edilmiştir.

2.3 UV-vis spektrofotometrik analiz

24 sa. sonunda koloidal gümüş nanopartikül çözeltisinden alınan 5 ml'lik örnek 320-500 nm aralığındaki dalga boylarında UV-visible spektrofotometrede incelenmiştir.

2.4 pH analizi

Gümüş nanopartiküllerin oluşumu sırasında çözelti içerisinde pH değişimi gözlenmektedir. Bu sebeple, havaciva sulu ekstresi ile gümüş nitrat çözeltisi karışımının pH değerleri dijital pH-metre kullanılarak ilk karışım anında ve 24 sa. sonra kaydedilmiştir.

2.5 Yüzeysel sterilizasyon uygulamaları

Yüzeysel sterilizasyon uygulaması için *Pyracantha coccinea* (ateş diken) (Şekil 2) bitkisinin gövde eksplantları kullanılmıştır. Eksplantlar tozlarından arındırılmak için çesme suyu altında 10 dk. yıkandıktan sonra, yüzey sterilizasyonu için 3 farklı yöntem kullanılmıştır. İlk yöntemde havaciva sulu ekstresi, ikinci yöntemde %10'luk NaOCl çözeltisi, üçüncü yöntemde ise AgNP koloidal çözeltisi kullanılmıştır. Üç yöntemde de gövde eksplantları 20 dk. ve 40 dk. süreyle sterilizasyona maruz bırakılmış, akabinde üç kez steril distile su ile yıkanarak %3 sukroz ve %0.7 agar içeren MS [7] besin ortamına 0.5-1 cm boyunda kesilerek aktarılmışlardır.

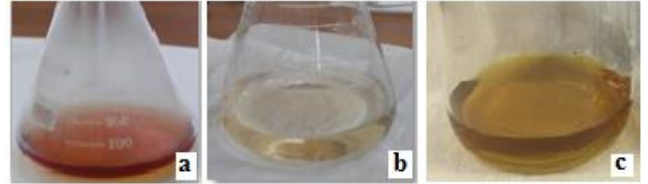
Hazırlanan kültürler gün ışığı özellikli florasan lambalar ile aydınlatılan raf sistemine yerleştirilmiş ve üç hafta boyunca 16 sa. aydınlık/8 sa. karanlık koşullarda 20 ± 2 °C'de kültive edilmiştir. Üç hafta sonunda kültürlerde gözlenen kontaminasyon oranları belirlenmiştir.

2.6 İstatistiksel değerlendirme

Denemeler üç tekerrürlü olarak kurulmuş ve her denemede 18 eksplant kullanılmıştır. Veriler tek yönlü ANOVA testi ile değerlendirilmiş ve ortalamaların karşılaştırılması LSD testi ile yapılmıştır.

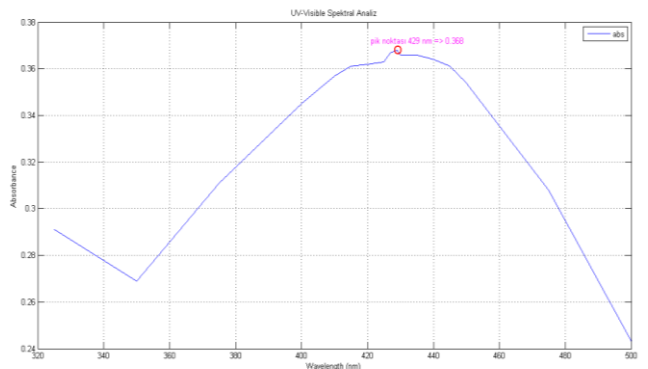
3 Sonuçlar ve tartışma

Havaciva sulu ekstresinin gümüş nitrat çözeltisi ile karıştırılmasından hemen sonra renk açık sarıdan açık kahverengiye doğru koyulaşan bir değişim göstermiştir ve çözelti koloidal bir yapı kazanmıştır. Yirmidört sa. süresince izlenen renk değişimi Şekil 3'te verilmiştir.



Şekil 3: (a): Havaciva sulu ekstresi, (b): Gümüş nitrat çözeltisi ile havaciva ekstresi ilk karıştırıldığında gözlenen açık sarı renkli çözelti, (c): 24 sa. sonra AgNP'lerin oluşumu ile elde edilen açık kahverengili koloidal çözelti.

Gözlenen renk değişimi gümüş nanopartiküllerinin oluştuğunun bir göstergesidir ve nanopartiküllerin yüzeysel plazmon vibrasyonlarından kaynaklandığı bilinmektedir. Bu sebeple, gümüş iyonlarının indirgenerek gümüş nanopartiküllerinin oluşması, renk değişimi takibi ve UV-Vis spektroskopisi ile belirlenebilmektedir. 320-500 nm aralığındaki dalga boylarında yapılan ölçümlerde, karışım 429 nm'de 0.368 absorbans ile pik değeri göstermiştir (Şekil 4). Bitki ekstraktları kullanarak elde edilen gümüş nanopartikül içeren koloidal çözeltilerin maksimum absorbanslarının 425-439 nm aralığında değiştiği ve bu değerlerin UV-vis spektrumunda metalik gümüşün karakteristikleriyle örtüştüğünü belirtmektedir [8],[9].



Şekil 4: Gümüş nanopartiküllerin UV-Visible absorpsiyon spektrumu.

Gümüş nanopartiküllerin oluşumu sırasında karışımın pH değerlerinde de değişiklikler görülmektedir. Havaciva sulu ekstresinin ve gümüş nitrat çözeltisinin pH değerleri sırasıyla

7.05 ve 6.34 olarak belirlenmiştir. İki çözelti karıştırıldıktan sonra ilk anda ölçülen pH değeri 6.50 iken, 24 sa. sonundaki pH değeri düşüş göstererek 6.11'e inmiştir. Puišo ve diğ. (2014)'nın bitki ekstratlarından gümüş nanopartikül biyosentezinin gerçekleştirildiği çalışmada da, benzer şekilde, gümüş iyonlarının indirgenmesinden sonra gümüş nanopartiküllerinin koloidal çözeltilerinin oluştuğu ve indirgenme sırasında çözeltilerin pH değerlerinde düşüş gözlemlendiği bildirilmiştir [10].

428 nm'de pik veren ve pH değeri 6.11 olan koloidal AgNP çözeltisi ateş bitkisi gövde eksplantlarına direkt olarak uygulanmıştır ve elde edilen sonuçlar Tablo 1'de verilmiştir. Havaciva sulu ekstresi uygulaması ile yapılan yüzeysel sterilizasyonda, gövde eksplantlarının hepsinde üçüncü günden itibaren kontaminasyon gözlenmiştir. Bu sebeple, 1 numaralı uygulama istatistiksel değerlendirmeye katılmamıştır.

Tablo 1: Sterilizasyon uygulamaları sonucunda elde edilen steril eksplant yüzdeleri.

Uygulama	Uygulama Süresi (dk.)	Ort. ± Std. hata*
2 (NaOCl)	20 dk.	53.70±3.70 b
	40 dk.	81.48±10.32 a
3 (AgNP)	20 dk.	53.70±4.90 b
	40 dk.	62.96±6.68 a

* Yanında aynı küçük harf ile işaretlenmiş olan ortalamalar istatistiksel olarak aynı grupta yer almaktadırlar. p<0.05; F= 7.273; LSD = 15.842.

NaOCl ve AgNP ile yapılan yüzeysel sterilizasyonlarda istatistiksel olarak bir fark görülmemektedir. Ancak, beklenildiği üzere, 20 ve 40 dk.'lık uygulamalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. Her iki sterilanda da 40 dk.'lık uygulama süresi (%72.22) kontaminasyonun engellenmesinde 20 dk.'lık uygulamaya (%53.70) göre daha etkili bulunmuştur. 20 dk.'lık uygulamada AgNP'nin sterilizasyon etkinliği (%53.70) %10'luk NaOCl'ye eşit bulunmuştur. NaOCl ile steril edilen eksplantlarda 3 gün sonra tüm eksplantlarda kararırma gözlenirken, AgNP çalışmasında sadece eksplantların bistori ile kesilen kısmında kararırma gözlenmiştir. Bu durum AgNP uygulamasının bitkisel dokuya zarar vermediğini göstermektedir. Biberiye gövde eksplantlarının AgNP'lerle yüzey sterilizasyonunun yapıldığı daha önceki çalışmada [6], 15, 30 ve 60 dk. süreyle yapılan üç sterilizasyon uygulamasında en iyi sonuç 60 dk. lık uygulamada (%83.33) elde edilmiştir ve steril olan tüm eksplantların yeşil kaldığı ve hepsinde kallus oluşumu gözlemlendiği bildirilmiştir.

AgNP'ler tıp, ziraat, kozmetik, kişisel bakım ürünlerinden nanokablo üretimine kadar birçok farklı alanda kullanılan ve başarılı olarak etkinlik gösteren malzemelerdir [11]-[13]. Bu çalışmada, havaciva sulu ekstresi kullanılarak gümüş iyonları indirgenmiş ve spektrofotometrik ve pH analizleri yapıldıktan sonra ateş dikenin gövdesinin yüzey sterilizasyonunda kullanılmışlardır. Elde edilen veriler, bitki biyoteknolojisinde önemli bir sorun teşkil eden bitkisel materyalin yüzeysel sterilizasyonu ve eksplant kararırması problemlerine yeni bir bakış açısı getirmektedir ve nanoteknolojinin bitki biyoteknolojisi alanında da kullanılabilirliğinin bir göstergesidir. Bu sayede, toksik özellikteki sodyum hipoklorit, etanol, kalsiyum hipoklorit, hidrojen peroksit, civa klorit ve surfaktanların kullanımı en aza indirgenerek çevre kirliliği ve insan sağlığı açısından daha ekolojik biyoteknolojik uygulamalar gerçekleştirilebilecektir. Bu çalışma, nanoteknoloji ve biyoteknolojiyi bağdaştıracak başka

çalışmaların yapılmasını teşvik edecek sonuçlar sunmaktadır; taşıyıcısı su olan, antibakteriyel etki gösteren, kolay uygulanabilen, maliyeti düşük ve çevre dostu yeni nesil bir koloidal yüzey sterilanının bitki biyoteknolojisi alanında kullanılabilirliğini gösteren öncül bir çalışmadır.

4 Kaynaklar

- [1] Singh M, Singh S, Prasad S, Gambhir S. "Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles". *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 3(3), 115-122, 2008.
- [2] Yer M. Gümüş Nanopartiküllerin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya, Türkiye, 2012.
- [3] Ahmad N, Sharma S. "Green synthesis of silver nanoparticles using extracts of *Ananas comosus*". *Green and Sustainable Chemistry*, 2(4), 141-147, 2012.
- [4] Çölgeçen H, Koca U, Toker G. "Influence of different sterilization methods on callus initiation and production of pigmented callus in *Arnebia densiflora* Ledeb". *Turkish Journal of Biology*, 35, 513-520, 2011.
- [5] Mbah El, Wakil SM. "Elimination of bacteria from in vitro yam tissue cultures using antibiotics". *Journal of Plant Pathology*, 94(1), 53-58, 2012.
- [6] Nartop P. "Green sterilization of *Rosmarinus officinalis* L. stem surfaces with silver nanoparticles synthesized using *Rubia tinctorum* L. cell culture extracts". *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science, (in press)*. DOI 10.1007/s40995-016-0065-0, 2017.
- [7] Murashige T, Skoog F. "A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures". *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497, 1962.
- [8] Sinha SN, Paul D. "Eco-friendly Green Synthesis and Spectrophotometric Characterization of Silver Nanoparticles Synthesized using Some Common Indian Spices". *International Journal of Green and Herbal Chemistry*, 3(2), 401-408, 2014.
- [9] Forough M, Farhadi K. "Biological and green synthesis of silver nanoparticles". *Turkish Journal of Engineering & Environmental Sciences*, 34, 281-287, 2010.
- [10] Puišo J, Mačionienė I, Jonkuvienė D, Šalomskienė J. "Antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized using plant extracts". *Veterinarija Ir Zootechnika (Vet Med Zoot)*, 65(87), 61-67, 2014.
- [11] Özkaleli M, Erdem A "Nanowastes and environment: A new approach in waste management". *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 22(3), 183-188, 2016.
- [12] Xiong ZC, Zhu YJ, Chen FF, Sun TW, Shen YO. "One-step synthesis of silver nanoparticle-decorated hydroxyapatite nanowires for the construction of highly flexible free-standing paper with high antibacterial activity". *Chemistry –A European Journal*, 22(32), 11224-11231, 2016.
- [13] Liang J, Tong K, Pei Q. "A water-based silver-nanowire screen-print ink for the fabrication of stretchable conductors and wearable thin-film transistors". *Advanced Materials*, 28(28), 5986-5996.