

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAKTERİYEL YOLLA
TİTANYUM DİOKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN
ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esin YILMAZ

Enstitü Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ
Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ayşe AVCI

Ağustos 2019

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAKTERİYEL YOLLA
TİTANYUM DİOKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN
ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esin YILMAZ

Enstitü Anabilim Dalı

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Bu tez 02.08.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

**Doç. Dr.
Serap C. AKDEMİR
Jüri Başkanı**



**Prof. Dr.
Sevgi E. KARATAY
Üye**



**Doç. Dr.
Ayşe AVCI
Üye**



BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Esin YILMAZ

01.08.2019

TEŞEKKÜR

Meşakkatli tez dönemimde karşılaştığım tüm zorluklarda bilgisi, deneyimi, isabetli öngörülerıyla bana önder olan, beni yönlendiren, engin tecrübelerini cömertçe paylaşan, laboratuvar çalışmalarında büyük bir sabırla bana destek veren, izinden yürümekten şeref duyduğum, kendisini gönülden sevdiğim, değerli danışman hocam Doç. Dr. Ayşe AVCI'ya ömrüm boyunca müteşekkirim.

Yüksek lisans laboratuvar çalışmalarında bilgisi ve tecrübeleriyle her zaman beni destekleyen, ne zaman ihtiyaç duysam yanımda olan, ilmi yaşayarak-yaşatarak aktaran, güzel insan Arş. Gör. F. Alev AKÇAY'a teşekkürlerimi sunarım.

Tekrar üniversite ortamına dönerek eğitime başlayıp bugün yüksek lisans tezimi tamamladığım bu süreçte bana cesaret veren, her zaman arkamda olan, maddi-manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen eşim Bülent Koray YILMAZ'a ve ablam Nuray YILMAZ'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca hep beraber öğrencilik yaptığımız, birlikte geçireceğimiz vakitlerimizden zaman zaman feragat ettiğimiz, büyük olgunluk göstererek bu süreçte beni anlayışla karşılayan kıymetli çocuklarım Rahmet Sare YILMAZ'a, Muhammed Yahya YILMAZ'a ve Meryem Serra YILMAZ'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	x
ÖZET.	xi
SUMMARY	xii
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2.	
LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. Nanoteknoloji	3
2.1.1. Nanoteknolojinin tanımı	3
2.1.2. Nano yapılar	4
2.1.3. Nanoteknolojinin endüstriyel uygulamaları	4
2.1.3.1. Gıda sanayinde nanoteknoloji uygulamaları	7
2.2. Nanopartiküller	10
2.2.1. Geçmişten günümüze nanopartiküller	10
2.2.2. Nanopartiküllerin üretimi	12
2.2.2.1. Nanopartiküllerin bakterilerle biyosentezi	14
2.2.2.2. Nanopartiküllerin sentez mekanizması	14
2.3. TiO ₂ ve TiO ₂ Nanopartikülleri	15
2.3.1. TiO ₂ ve TiO ₂ NP'lerinin özellikleri	15
2.3.2. TiO ₂ NP üretimi	16

2.3.3. Gıda endüstrisinde TiO ₂ NP'leri	18
2.4. <i>Acinetobacter</i> Cinsi Bakteriler	19
2.4.1. <i>Acinetobacter</i> cinsi bakterilerin genel özellikleri	19
2.4.2. <i>Acinetobacter</i> cinsi bakterilerle nanopartikül üretimi	20
 BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1. Materyal	22
3.1.1. Mikroorganizmalar	22
3.1.2. Araç-gereçler	23
3.1.3. Besiyerleri	24
3.1.4. Kimyasallar ve çözeltiler.	25
3.2. Yöntem	26
3.2.1. Mikroorganizmaların izolasyonu ve muhafazası	26
3.2.2. Mikroorganizmalardan TiO ₂ NP'lerini üretme yeteneğinde olanların seçimi.	27
3.2.3. TiO ₂ NP üretimi	27
3.2.4. TiO ₂ NP'lerinin biyosentez koşullarının optimizasyonu	28
3.2.4.1. NP'lerin biyosentezine TiO ₂ konsantrasyonunun etkisinin belirlenmesi.	28
3.2.4.2. TiO ₂ NP'lerinin biyosentezine pH'nın etkisinin belirlenmesi	29
3.2.4.3. TiO ₂ NP'lerinin biyosentezine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi	29
3.2.4.4. TiO ₂ NP'lerinin biyosentezine inkübasyon süresinin etkisinin belirlenmesi.	29
3.2.5. TiO ₂ NP'lerinin optimum koşullarda üretimi ve saflaştırılması	29
3.3. Analizler	30
3.3.1. <i>Acinetobacter</i> sp. MDA1 izolatının tanımlanması	30
3.3.2. TiO ₂ NP'lerinin karakterizasyonu	30

3.3.2.1. Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi analizi	30
3.3.2.2. Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu analizi	31
3.3.2.3. X-ışını kırınımı analizi.	31
3.3.3. TiO ₂ NP'lerinin antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi	32
3.3.4. TiO ₂ NP'lerinin anti- <i>Candida</i> aktivitesinin belirlenmesi . . .	32
3.3.5. TiO ₂ NP'lerinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi	33
 BÖLÜM 4.	
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	34
4.1. TiO ₂ NP Üretimi.	34
4.1.1. TiO ₂ 'e dirençli mikroorganizmaların tespiti	34
4.1.2. TiO ₂ NP'lerinin biyosentezi için yapılan ön çalışmalar	36
4.2. TiO ₂ NP'lerinin Biyosentezi için Yapılan Optimizasyon Çalışmaları	38
4.2.1. TiO ₂ NP'lerinin biyosentezine TiO ₂ konsantrasyonunun etkisi	38
4.2.2. TiO ₂ NP'lerinin biyosentezine pH'nın etkisi	41
4.2.3. TiO ₂ NP'lerinin biyosentezine reaksiyon sıcaklığının etkisi	44
4.2.4. TiO ₂ NP'lerinin biyosentezine inkübasyon süresinin etkisi . .	47
4.3. <i>Acinetobacter</i> sp. MDA1 İzolatının Tanımlanması	49
4.3.1. Gram boyama	49
4.3.2. Filogenetik analiz	49
4.4. TiO ₂ NP'lerine Ait Karakterizasyon Çalışmaları	50
4.4.1. EDX analizi	50
4.4.2. XRD analizi	51
4.5. TiO ₂ NP'lerinin Antimikrobiyal Aktivitesi	52
4.6. TiO ₂ NP'lerinin Antifungal Aktivitesi	54
4.7. TiO ₂ NP'lerinin Antioksidan Aktivitesi	55
 BÖLÜM 5.	
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	56

KAYNAKLAR.....	58
ÖZGEÇMİŞ.....	66



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AFM	: Atomik kuvvet mikroskobu
Ag	: Gümüş
AgNO ₃	: Gümüş nitrat
AgNP	: Gümüş nanopartikülleri
Au	: Altın
°C	: Santigrat derece
Cu	: Bakır
dk	: Dakika
DPPH	: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DSSCs	: Boyaya duyarlı güneş pilleri
EDX	: Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi
FAO	: Gıda ve tarım örgütü
FESEM	: Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu
g	: Gram
GTM	: Gıda ile temas eden madde
HCl	: Hidroklorik asit
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
M.Ö.	: Milattan önce
MRB	: İlaçlara direnç kazanmış bakteriler
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
NaOH	: Sodyum hidroksit
NA	: Nutrient Agar
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid(NAD ⁺)'in indirgenmiş hali

NB	: Nutrient Broth
NP	: Nanopartikül
nm	: Nanometre
pH	: Pondus hidrojeni
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PE	: Polietilen
PET	: Polietilen tereftalat
PtNP	: Platin nanopartikülü
QDSSCs	: Kuantum noktalara duyarlı güneş pilleri
RFID	: Radyo frekanslı tanımlama
rpm	: Bir dakikadaki devir sayısı
rDNA	: Ribozomal Deoksiribo Nükleik asit
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
SeNP	: Selenyum nanopartikülü
SiO ₂	: Silisyum dioksit
sp.	: Alt tür
STM	: Taramalı tünelleme mikroskobu
TEM	: Geçirimli elektron mikroskobu
TiO ₂	: Titanyum dioksit
TiO ₂ NP	: Titanyum dioksit nanopartikülü
TSA	: Tryptic Soy Agar
TSB	: Tryptic Soy Broth
UV-VIS	: Mor ötesi- görünür bölge
XRD	: X-ışını kırınımı
YPG	: Maya ekstraktı içeren peptonlu glukoz
YPR	: Yüzey Plazmon Rezonansı
WHO	: Dünya sağlık örgütü (World Health Organization)
Zn	: Çinko

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Yukarıdan aşağı ve aşağıdan yukarı yaklaşımlarda partiküller.	13
Şekil 4.1. TiO ₂ katkılı NA'da inkübe edilen örnekler	35
Şekil 4.2. <i>Acinetobacter</i> sp. MDA1 izolatının farklı besiyerlerindeki gelişimi a) Katkısız NA'da; b) TiO ₂ katkılı NA'da	35
Şekil 4.3. a) NB besiyeri; b) <i>Acinetobacter</i> sp. MDA1 inoküle edilmiş ve 24 saat sonunda gelişme görülen NB.	36
Şekil 4.4. a) Çalkalamalı su banyosundan (60°C; 30dk) çıkarılan örnekler; b) 144 sa inkübasyon sonrası örnekler	36
Şekil 4.5. 144 sa inkübasyon sonunda 341 nm dalga boyunda elde edilen spektrum	37
Şekil 4.6. 2,16 mM konsantrasyondaki TiO ₂ ile üretilen NP'ler.	38
Şekil 4.7. 144 saat sonunda farklı konsantrasyonlarda TiO ₂ içeren süpernatantların TiO ₂ NP üretimine bağlı olarak okunan absorbands değerleri.	39
Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda TiO ₂ 'den üretilen TiO ₂ NP'lerinin FESEM görüntüsü ve partikül boyut dağılımı histogramı	40
Şekil 4.9. Farklı pH değerlerindeki örneklerin 144 saatlik inkübasyonu sonrasında elde edilen spektrum grafiği.	41
Şekil 4.10. Farklı pH'larda üretilen TiO ₂ NP'lerinin % dağılımı	42
Şekil 4.11. Farklı pH değerlerinde üretilen TiO ₂ NP'lerine ait FESEM görüntüsü ve partikül boyut dağılımı histogramı.	42
Şekil 4.12. Farklı sıcaklık değerlerindeki örneklerin 144 saatlik inkübasyonu sonrasında elde edilen spektrum grafiği.	45
Şekil 4.13. TiO ₂ NP üretimi için farklı sıcaklıklarda inkübe edilen örneklerin 144 saat sonunda 341 nm'de okunan absorbands değerleri	45

Şekil 4.14. Farklı sıcaklıklarda üretilen TiO ₂ NP'lerine ait FESEM görüntüsü ve partikül boyut dağılımı histogramı	46
Şekil 4.15. TiO ₂ NP'lerinin zamana bağlı spektumları	48
Şekil 4.16. 15 mM TiO ₂ konsantrasyonunda, pH 8 ve 33°C'de inkübe edilen örneklerin zamana bağlı TiO ₂ NP üretiminin 341 nm'de ölçülen absorbans değerleri grafiği	48
Şekil 4.17. a) Tek koloniye düşürme, b) Gram boyama	49
Şekil 4.18. <i>Acinetobacter</i> sp. MDA1 bakterisine ait filogenetik ağaç	50
Şekil 4.19. TiO ₂ NP'lerine ait EDX spektrumu	50
Şekil 4.20. TiO ₂ NP'lerinin XRD kırınım deseni	51
Şekil 4.21. TiO ₂ NP'lerinin DPPH radikalini giderimi	55

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2.1. Bazı bakterilerin TiO_2NP 'leri üretimi	17
Tablo 3.1. <i>Acinetobacter</i> ve <i>Bacillus</i> cinsi izolatların elde edildikleri kaynaklar	22
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan araç-gereçler ve markaları	23
Tablo 4.1. Farklı konsantrasyonlarda üretilen NP'lerin boyut dağılımı	39
Tablo 4.2. TiO_2NP 'lerinin elementel kompozisyonu.	51

ÖZET

Anahtar Kelimeler: *Acinetobacter*, nanopartikül, biyosentez, titanyumdioksit

Bu çalışmada bazı toprak ve gıda örneklerinden izole edilen 59 adet bakterinin titanyum dioksit nanopartiküllerini (TiO_2NP) üretme yetenekleri araştırılarak en iyi üretici izolat seçilmiş ve bu izolatan nanopartikül (NP) üretim koşulları optimize edilmiştir. Üretilen TiO_2NP 'lerinin karakterizasyonu yapılmış, antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri incelenmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda daha önce izole edilmiş olan 32 adet izolattan bazılarının titanyum dioksit NP'lerini üretme yeteneğinde olmadığı, bazılarının da üretiminin yetersiz olduğu anlaşılmıştır. Çalışma kapsamında Sakarya ili Maden Deresi ve Konya Seydişehir bölgelerinden alınan toprak örneklerinden 27 izolasyon gerçekleştirilmiş ve bu izolatlardan 16S rDNA dizi analizine göre *Acinetobacter* cinsine ait olduğu belirlenen MDA1 suşunun, titanyum dioksit nanopartiküllerini ürettiği tespit edilmiştir. Bu nedenle çalışmaya MDA1 olarak kodlanan bu bakteri ile devam edilmiştir. Nanopartikül üretimine pH (6-10), sıcaklık (30-40°C), TiO_2 konsantrasyonu (3,75-20,0 mM) ve reaksiyon süresinin (0-144 saat) etkisi belirlenmiştir. Değiştirilen parametrelere bağlı olarak uygulamalarda TiO_2NP oluşumu sırasında nutrient broth sıvı besiyerinin renginin açık sarıdan beyaz tonlarına dönüştüğü gözlenmiş ve absorbans değerleri UV-VIS spektrofotometrede 341 nm dalga boyunda ölçülerek takip edilmiştir.

Spektrofotometrik ölçümler sonucunda en iyi üretimin 15 mM TiO_2 konsantrasyonuna sahip, pH 8 olan ortamda, 33°C'de ve 144 saatte olduğu tespit edilmiştir. Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FESEM) analizleri yapılarak üretim koşullarının NP boyutuna etkisi belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre artan sıcaklıkla birlikte partikül boyutunda da artış görülmüştür. pH'nın boyut üzerinde etkisi olduğu, pH 10'da aglomerasyonun gerçekleştiği gözlenmiştir. X-ışını kırınımı (XRD) spektroskopisi ile yapılan analiz sonucunda NP'lerin küre şeklinde ve rutil yapıda olduğu belirlenmiştir. Üretilen nanopartiküller antioksidan aktivite sergilemişler, az miktarda da antimikrobiyal özellik göstermişlerdir.

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES BY USING BACTERIAL ROUTE

SUMMARY

Keywords: *Acinetobacter*, nanoparticle, biosynthesis, titanium dioxide

In this study, the abilities of 59 bacteria isolated from soil and food samples to produce titanium dioxide nanoparticles were investigated. The best isolate was chosen and nanoparticle production conditions of this isolate were optimized. Characterization, antimicrobial and antioxidant activities of synthesized nanoparticles were analyzed.

A total of 32 isolates, that were previously isolated, were used at the beginning. It is exposed that some of them were not able to produce titanium dioxide nanoparticles and the others had less amount of production. Besides, 27 isolation was performed from the soil samples collected around Sakarya Maden Deresi and Konya Seydişehir province. According to these isolations and the 16S rDNA gene sequence analysis it was detected that a novel strain, *Acinetobacter* sp. MDA1 is able to produce titanium dioxide nanoparticles (TiO₂NP). For that reason, the study was continued by using this bacterium, encoded MDA1. The effects of pH (6-10), temperature (30-40°C), TiO₂ concentration (3,75-20,0 mM) and reaction time (0-144 hours) on the synthesis of NPs were determined. Among the differences made in applications, the formation of TiO₂NPs was inspected by observing the change in color from yellow to white by measuring the absorbance at 341 nm using UV-VIS spectrophotometer.

According to the spectrophotometric measurements, the best production was achieved in the medium contained 15 mM TiO₂ concentration at pH 8 and 33°C in 144 hours. Furthermore, the effects of production conditions on the size of NPs were determined by performing the field emission scanning electron microscopy (FESEM) analysis of NPs. According to the results of analysis, the increase in temperature caused increase in the size of NPs. In addition, it is determined that pH also has effect on the size of NPs and at pH 10 aggregation is occurred. X-ray diffractometer (XRD) analysis demonstrated that the NPs possess rutil phase and have spherical shape. The NPs indicated less amount of antimicrobial effect and antioxidant properties are observed.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Nanoteknoloji, boyut farklılığına bağlı olarak yapılarında şaşırtıcı elektriksel, optik, manyetik, termal özellikler sergileyen nanopartiküllerin kullanıldığı ve üzerinde çalışmaların devam ettiği, günümüzün ezberbozan teknolojisidir. Bu anlamda tarımdan enerjiye, uzay-havacılıktan tekstile, tıptan savunma sanayisine kadar akla gelen tüm alanlarda gün geçtikçe daha fazla araştırma konusu ortaya çıkmakta ve insanlık bugüne kadar gelen temel bilim kuramlarını tekrar gözden geçirmek durumunda kalmaktadır.

Nanoteknolojinin yapıtaşı olan nanopartiküllerin üretiminde kimyasal, fiziksel ve biyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Nanoteknoloji bağlamında son dönemlerde araştırmaların hızla artış gösterdiği, Yeşil Nanoteknoloji olarak adlandırılan yaklaşımda mikroorganizmalar ya da bitki ekstraktları özne olarak kullanılmakta ve çalışmalar multidisipliner bir sistemde yürütülmektedir (Saratale ve ark., 2018). Yeşil nanoteknoloji, diğer yöntemlerden farklı olarak, toksik maddelerin elimine edilebildiği, çevre dostu, ekonomik bir uygulamadır (Talebi ve ark., 2010).

Bitki ekstraktlarında bulunan biyomoleküller, metal iyonlarını tek basamakta nanopartiküle indirgeyebilmektedir. Bu proste indirgeme ajanı olarak suda çözünebilen alkoloidler, fenolik bileşikler, terpenoidler gibi çeşitli metabolitler ve ko-enzimler görev almaktadır. Bitki ekstraktlarının yanı sıra bazı canlı bitkilerin kendisi de nanopartikül üretiminde kullanılabilmektedir (Kumar ve ark., 2013). Mikrobiyel sentezin gerçekleşmesi için mikroorganizmalar bulundukları çevreden hedef iyonu yapılarına alırlar ve ürettikleri enzimlerle metal iyonu elementel forma indirgerler. Sentez, nanopartiküllerin oluştuğu lokasyona göre hücre içi ya da hücre dışı olarak iki şekilde gerçekleşebilmektedir (Li ve ark., 2011; Gopinath ve Velusamy, 2013). Tek hücreli organizmalar manyetik nanopartikülleri üretme

yeteneğinde olabildikleri gibi (Mukhopadhyay ve ark., 2006) diğer bakterilerden virüslerden, mantar ve mayalardan da altın, gümüş, selenyum, TiO_2 , SiO_2 gibi metal ve metaloksit nanopartiküllerini üretebilen birçok mikroorganizma mevcuttur (Talebi ve ark., 2010).

Anataz, rutil, brokit olmak üzere üç ayrı kristal yapıda bulunabilen ve farklı fizikokimyasal özelliklere sahip olan TiO_2NP 'lerinin (Matteis ve ark., 2016) tıp, eczacılık, biyomedikal, çevre ve enerji, elektronik, uzay ve havacılık, tekstil, boya, kozmetik, gıda ve tarım gibi geniş bir yelpazede ar-ge faaliyetleri ve uygulamaları devam etmektedir. İyi bilinen bir yarı iletken olan ve fotokatalitik özellik sergileyen TiO_2 , mikro formla karşılaştırıldığında nano boyutta daha fazla antimikrobiyal etki göstermektedir. 254 nm dalga boyundaki UV ışınım ile uyarıldığında fotokatalitik aktivite gösteren TiO_2NP 'lerinin, hücre membranında bulunan fosfolipitlerin peroksidasyonuna neden olması sonucu membran bütünlüğünün bozulması ile mikrobiyal hücre işlevini yitirmektedir (Mihindukulasuriya ve Lim, 2014). Özellikle gıda endüstrisinde katı, sıvı ve gaz sistemlerdeki antibakteriyel uygulamalarda TiO_2NP 'lerinin fotokatalitik özelliğini değerlendirmek üzere çalışmalar yapılmaktadır (Zhu ve ark., 2018).

Bu çalışmada farklı ortamlardan izole edilen mikroorganizmaların TiO_2NP 'lerini üretimleri araştırılmış ve bu izolatlardan *Acinetobacter* sp. uygun görülüp kullanılarak maliyeti düşük, çevre dostu, tekrarlanabilen üretim yöntemiyle TiO_2NP 'lerinin biyosentezi gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık, süre, pH, TiO_2 konsantrasyonu gibi parametrelerdeki değişikliklerin reaksiyona etkisi incelenmiş, üretilen TiO_2NP 'lerinin karakterizasyonu yapılmış, buna ilave olarak antimikrobiyel ve antioksidan özellikleri üzerinde de çalışılmıştır.

BÖLÜM 2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Nanoteknoloji

2.1.1. Nanoteknolojinin tanımı

Bilim ve teknoloji, insanlığın mirasçısı olduğu önceki medeniyetlerden elde edilen bilgilerin sonraki nesiller tarafından geliştirilerek ya da tekrar gözden geçirilip yeni kavramlar, kuramlar ortaya koyularak evrenin ve doğanın sistematik yapısı içerisinde bilginin hakikatine ulaşma sürecinde insanlık yararına kullanılabilecek yeni bilimsel amaçların, araçların ve ürünlerin üretilmesine olanak sağlamaktadır.

Nanoteknoloji, son yıllarda üzerinde derinlemesine çalışmaların yapıldığı, insan hayatını birçok alanda değiştirebilecek, anahtar teknoloji olarak nitelendirilen bilim dalıdır. Teknoloji; Yunanca “tekhne” (sanat, zanaat) ve “logos” (bilgi, söz, sözcük) kelimelerinin birleşmesiyle “bilgiden kaynaklanan sanat” anlamına gelir (Sağlam ve Emül, 2016). Nano kelimesi ise aynı dilde “nanos” (cüce) olarak ifade edilir. Bir örnek olan nano, Uluslararası Birimler Sisteminde milyarda bir (10^{-9}) büyüklüğü bildirir (Ersöz ve ark., 2018). Bir nanometre insanın saç telinin çapının $1/50,000$ ’ ine eşittir. Tipik bir bakteri hücresi 1000 nm ($1\ \mu\text{m}$)’dir ve el tırnağı her saniye 1 nm uzamaktadır (URL-1, 2019). Bir glukoz molekülünün 1 nm, karıncanın 1 mm olarak yaklaşık büyüklükleri verilmiştir. Üç atomun yanyana dizilmesiyle elde edilen uzunluğun 1 nm, bir DNA molekülünün 2-2,5 nm olduğu ifade edilmektedir (Ersöz ve ark., 2018).

Nanoteknoloji bilimi ile en az bir boyutu nanometre ölçekte olan materyal ve aletlerin tasarımı, sentezi, karakterize edilmesi ve uygulaması ile alakalı mühendislik çalışmaları yapılmaktadır (Duncan, 2011; Gilmartin ve O’Kennedy, 2012).

2.1.2. Nano yapılar

Nano yapılar nanotüpler, nanolifler ve nanokapsüller olarak üç sınıfta değerlendirilmektedir.

Nanokapsüller, büyüklüğü 10^{-3} mm olan içi boş ve ince kapsüllerdir. Bu boşluklara kozmetik ürün, ilaç ya da başka bir madde hapsedilerek taşınımı/kullanımı sağlanabilmektedir (Tüylek, 2017).

Nanotüpler, çapları nanometre boyutunda, uzunlukları birkaç mikrometre ya da milimetre olan içi boş yapılardır. Pirokarbon, siyah karbon gibi şekilsiz ya da grafit, elmas, karbon gibi kristal formda olabilirler. Karbonnanotüpler, yaklaşık 2-100 nm çapında (Tüylek, 2017), 5-500 nm boyunda karbon molekülünden oluşmuş tek ya da çok tabakalı, hekzagonal karbon atom ağı olarak bilinen grafen düzlemlerinin yuvarlatılmasıyla elde edilen silindirik yapılardır. Çelikten 6 kat daha hafif, 10 kat daha güçlü, 100 kat daha yüksek çekme kuvvetine sahiptirler. İnsan saçından 10000 kat daha ince olan bu yapılar elmas kadar yüksek mukavemettedirler. Elektrik alanına duyarlıdırlar; hem yarı iletken, hem metalik iletkenler (Zhang ve ark, 2002).

Nanolifler, çapı bir mikron ve altındaki lifler olarak tanımlanmaktadır. Elektrospinning yöntemi nanolifleri üretmek için geliştirilmiş son teknolojilerdendir. Bu yöntemde kullanılan polimer çeşidinin fazla olması sayesinde üretilen malzemeler de geniş yelpazededir. Nanolifler biyomedikal uygulamalarda, filtrasyonda, uzay araştırmalarında, elektrik-optik uygulamalarda, gıda ve tarım alanındaki çalışmalarda kullanılmaktadır (Şener, 2011).

2.1.3. Nanoteknolojinin endüstriyel uygulamaları

Nanoteknoloji ile nanometre ölçekli yapıların fiziksel ve kimyasal özelliklerinin anlaşılması, analizi, imalatı, cihazların geliştirilmesi hedeflenmektedir. 1982’de Taramalı Tünelleme Mikroskobu (STM)’nun icadı ile atomik boyutta ilk görüntüler

elde edilmiştir. STM ile sadece iletken örneklerde ölçüm yapılabilirken, 1986 yılında iletken olmayan örneklerden de görüntüleme yapabilen Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) geliştirilmiştir (Benli, 2009).

Malzeme ve İmalat Teknolojilerinde nanoteknoloji kullanılarak tasarlanan ürünler klasik ürünlere göre daha hafif, daha sağlam ve daha dayanıklıdır. Çamaşır makinelerinde ve havalandırma filtrelerinde NP'ler kullanılmakta böylece çamaşırlar bakterilerden korunabilmektedir. TiO_2 NP'leri ile yüzeye kaplama yapılarak su tutmayan, anti-bakteriyel, kendini temizleyen özelliklerde camlar üretilebilmektedir. Kendini onaran akıllı protezler üzerinde de çalışılmaktadır. Bu amaçla, kesildikten sonra parçaların birbirine hafifçe birleştirilmesiyle yarım saat içerisinde ilk haline dönebilen, dokunmaya duyarlı, nikel NP'leri kullanılarak elde edilen polimer kompozitlerin üretimi gerçekleştirilmiştir (Ersöz ve ark., 2018).

Günümüzde nanoteknoloji ile üzerinde en fazla çalışılan ve ilerleme kaydedilen alanlardan biri Elektronik ve Bilişim Teknolojileri'dir. Televizyon, akıllı cep telefonu, bilgisayar gibi tüm elektronik cihazların temelini oluşturan nano boyutta transistörler sayesinde daha büyük miktarda bilgi, daha hızlı bir şekilde depolanabilmekte ve yönetilebilmektedir. En küçük transistör 1 nm boyutundadır, üretiminde karbon nanotüpler ve molibden disülfid (MoS_2) kullanılmıştır (Ersöz ve ark., 2018).

Tıp alanında üzerinde çalışılan nano boyutta biyosensörler sayesinde Parkinson, Alzheimer, diyabet, kanser gibi hastalıklar erken teşhis edilebilecek, birçok hastalığın nanoparçacıklara yüklenmiş ve insan bedenine enjekte edilmiş ilaçlarla tedavisi sağlanabilecektir. Günümüzde demiroksit nano parçacıklarının manyetik özelliğinden faydalanılarak kanserli hücreler teşhis edilebilmektedir (Ersöz ve ark., 2018) .

Çevre ve Enerji Teknolojilerinde karbon nanotüpler, alümina fiberler, nano membranlar gibi malzemelerle su arıtımı gerçekleştirilmekte böylece suda bulunan bakteriler, virüsler, zehirli elementler (örn. arsenik), kimyasal atıklar, yağ gibi sıvı

kirlilikler nanofiltreler ile temizlenebilmektedir. Hidrojen enerjisi ile ilgili çalışmalar devam etmekte; güç kaynağı olarak ışığı kullanarak havayı temizleyen ve bu işlem sırasında hidrojen yakıtı üreten jeneratör, katalizöründe bulunan nanoparçacıklarla bu üretimi gerçekleştirmektedir. Elde edilen hidrojen gazı depolanabilmekte ve yakıt olarak kullanılabilir. Hidrojenli otobüsler bu uygulamaya örnektir (Ersöz ve ark., 2018). Órdenes-Aenishanslins ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2014) *Bacillus mycoides* kullanılarak TiO_2 NP'lerinin biyosentezi gerçekleştirilmiş ve bu NP'ler güneş pilleri için (QDSSC: Quantum dots sensitized solar cell) fotoanot imalatında yarı iletken olarak kullanılmıştır (Órdenes-Aenishanslins ve ark., 2014).

Tekstil sanayinde nanoteknoloji uygulamalarıyla çok fonksiyonlu ürünler üretilmektedir. Nanoparçacıkların kullanımıyla antibakteriyel, UV'ye karşı koruyan, koku tutmayan, kendi kendini temizleyebilen, su geçirmeyen, leke barındırmayan, antistatik özellikte kumaşlar son yıllarda geliştirilen malzemelerdendir. Patojen olan ya da olmayan bakteri ve mantarlar insanın derisinde, burun boşluklarında, genital bölgeleri dahil tüm vücudunda bulunabilmektedir. Yeşil nanobiyoteknolojik yöntemle, limon çimi bitkisi (*Cymbopogon sp.*) ekstraktı kullanılarak manyetik nanopartiküller üretilmiş ve üretilen bu NP'ler tekstil sektöründe antimikrobiyal özellik sergileyen pamuklu kumaş yapımında kullanılmıştır (Hiremath ve ark., 2018).

Gıda ürünlerine hammadde olması ve insan nüfusunda gerçekleşen hızlı artış dolayısıyla Tarım sektöründeki nanoteknolojik faaliyetler önem arz etmektedir. Kontrollü salınım için nano pestisitlerin nanomateriyallerde enkapsüle edilmesi, stabilizasyonu, nanomateriyallerle desteklenmiş gübreler, biyogübreler ve mikro besinler, biyoteknolojik yöntemlerle gerçekleştirilen genetik uygulamalar, toprağın muhafazası ve iyileştirilmesi, patojen ve pestisit tespiti için geliştirilen nanosensörler bu alanda yürütülen çalışmalardandır (Demirbilek, 2015).

Biyoteknolojik uygulamalarla bitkilerin hastalıklara, haşerelere karşı direnç kazanımı ve stresi tolere edebilmeleri öngörülmektedir (He ve ark., 2018). Ürünlerin topraktan maksimum verimle hasat edilebilmesi için pestisit ve suni gübre kullanımı yaygındır.

Bu avantajının yanı sıra pestisitler toksisitelerine, uygulanma miktarlarına ve ürünün pestisite maruz kalma süresine göre insanlar ve diğer canlılar üzerinde tehlike oluşturmaktadırlar (Oliveira ve ark., 2014). Ayrıca uygulama sırasında pestisitlerin %90'ı atmosfere ve çevreye karışmaktadır. Son yıllardaki çalışmalar az miktarda pestisit kullanımını mümkün kılan taşıyıcı sistemler üzerinde yoğunlaşmıştır. Ayrıca geliştirilen nanosensör sistemler sayesinde çevre koşulları, patojen ve bitki arasındaki etkileşim izlenebilmektedir (Ghormade ve ark., 2011). Nanomateriyaller ekstraksiyon sorbenti olarak kullanılarak bal, yağ, çay, pirinç, tahıl, tropikal bitkiler, sebze-meyveler ve bunların suları gibi birçok üründe bulunan pestisitler tespit edilebilmektedir (Socas-Rodríguez ve ark., 2017). Nanoteknolojinin tarımdaki uygulamaları minimum atık, düşük maliyet, az enerji ile üretim ve çok miktarda ürün eldesini içermektedir (Servin ve White, 2016).

Bazı metaloksit NP'ler ağır metallerin ve organik bileşenlerin bir kısmını uzaklaştırmak amacıyla kullanılmaktadır. Örneğin demiroksitler, redoks döngüleri, iyon değişimi, bulaşanlara karşı yüksek afiniteleri ve manyetik özellikleri sebebiyle potansiyel adsorban olmalarından dolayı tercih edilmektedirler (Iavicoli ve ark., 2017).

2.1.3.1. Gıda sanayinde nanoteknoloji uygulamaları

Gıda sanayinde nanoteknolojik çalışmalar gıdaların işlenmesi, fonksiyonel gıda üretimi, patojenlerin tespit edilmesi, ambalajlama, kalite kontrol, depolama, nutrasötiklerin taşınımı ve kontrollü salınımı gibi uygulamalar üzerinde devam etmektedir. Vitaminler, karotenoidler, probiyotik ve prebiyotikler, antioksidanlar, antimikrobiyaller, proteinler, peptitler, koruyucular, omega yağ asitleri, tatlandırıcılar, renklendiriciler gibi fonksiyonel katkılar üretim aşamalarında biyoyararlılıklarını büyük ölçüde yitirdikleri için nanoenkapsülasyon, nanoemülsiyon gibi uygulamalarla gıdanın bileşimine katılmaktadırlar (İlyasoğlu ve El, 2010; Dasgupta ve ark., 2015). Böylece ürünlerin muhteviyatına, tekstürüne ve aromasına istenilen özellikler kazandırılabilir. Pigment ve renk maddesi olarak

kullanılan titanyum dioksit ve demiroksitten başka hiçbir nanomateryal direkt bir gıda maddesine henüz ilave edilmemiştir (He ve ark., 2018).

Gıda sektöründe ambalajlama uygulamaları ürünlerin raf ömrü üzerinde etkilidir. Uygun ambalaj malzemesi kullanımıyla taze ürünlerin mümkün olduğunca tazeliğini koruması, işlenmiş ürünlerin de işlem sonrasında kalite kaybı olmadan muhafazası sağlanmalıdır (Sezer ve ark., 2017). Gıda maddeleri için üretilen ambalaj materyallerinin o gıdanın özelliklerini dikkate alarak tasarlanmış olması gerekmektedir. Her ambalaj materyali, ambalaj malzemesinin bileşiminde olan maddelerin bir kısmını ürüne, atmosfer gazlarını ve su buharını dış ortamdaki içeri, ambalajlanan ürünün bileşimindeki organik maddeleri de çevresine az ya da çok geçirmektedir. Bazı uygulamalarda migrasyon ve gaz difüzyonuna karşı yüksek bariyer özellik istenmez; örneğin taze meyve sebzelerde ambalaj içerisinde hücresel solunum devam ettiğinden dolayı ürünün raf ömrü ortama giren oksijenle üründen salınan karbondioksit ve etilen oranına bağlıdır. Buna karşın gazlı içecekler için kullanılan plastik kaplarda ise karbondioksit çıkışı olmaması için ambalaj materyalinin oksijen ve karbondioksite karşı yüksek bariyer özellik göstermesi beklenir (Duncan, 2011).

Nanoteknolojinin gıda ile temas eden maddelere (GTM) uygulanması dört ana başlıkta incelenmektedir:

1. GTM'lerin yapısına nanopartiküllerin ilavesi ile ambalaj özelliklerinin (gazlara karşı bariyer, mekanik özellikler, vb.) artırılması,
2. "Aktif" ambalajlamada NP'lerin kullanımıyla antimikrobiyal etki ya da oksijen tutma gibi özellikler kazandırılması,
3. "Akıllı" ambalajlamada nanosensörlerin kullanılması,
4. Biyopolimerlere nano yapıları dolgu maddelerinin ilavesiyle özellikleri geliştirilmiş GTM'ler eldesi.

Yenilenebilir kaynaklardan elde edilen biyobozunur polimerler geleceğin ambalaj materyalleri olarak görülmektedir. Doğal malzemelerden ekstrakte edilen nişasta, selüloz, kitosan, agar, aljinat gibi polisakkaritler; kolajen, kazein, jelatin ile mısırdan

elde edilen zein gibi proteinler; mikrobiyal fermentasyon ile elde edilen biyopolimerler (örn, laktik asit monomerlerinden polimerize edilen polilaktat) mevcuttur. Ambalaj malzemesi olarak kullanımında bu polimerlerin yapısını güçlendirmek için nanokiller, nanosilikatlar, selüloz yapılı nano boyutta destek malzemesi, silika (SiO_2), karbonnanotüpler, kitin-kitosan NP'leri kullanılmaktadır (Souza ve Fernando, 2016).

Nanomateriyallerin gıda sektöründe kullanımında aktif ve akıllı ambalaj sistemleri dikkat çekmektedir. Nano gümüş gibi antimikrobiyal özellikteki aktif maddelerin kontrollü salınımla gıdanın raf ömrünün uzatılması, nano titanyum dioksit kullanarak ambalaj materyalinin fiziksel özelliklerinden gerilme, dayanım ve termal olarak stabilitesinin sağlanması aktif ambalajlamaya örnektir (King ve ark., 2018). Akıllı ambalajlar sayesinde üretimden tüketiciye ulaşana kadarki süreçte gıdanın izlenebilirliği ve tüketicinin güvenilir gıda eldesi sağlanmaktadır. Radyo Frekanslı Tanımlama (RFID) etiketleri, sensörler, indikatörler bu amaç için kullanılmaktadır. RFID uygulaması Namibia'dan İngiltere'ye 2004 yılı Kasım ayında ithal edilen dondurulmuş etlerde gerçekleştirilmiştir. Etiketler sayesinde konteynerin konumu, yolculuk esnasında konteynerin açılıp açılmadığı, tanımlanmış güzergahta ne kadar süre kaldığı gibi bilgiler takip edilebilmiştir. Marketlerde kurulan RFID sistemi ile de herhangi bir üründen stokta ne kadar olduğu, raftaki adet sayısı, doğru sıcaklıkta depolanıp depolanmadığı, son kullanma tarihi yaklaşan ürünlerin hangileri olduğu gibi bilgilere otomatik ulaşılabilir (Kokangül ve Fenercioğlu, 2012).

Nanopartikül ve polimerlerin birleşmesiyle nanokompozitler oluşur (Hamad ve ark., 2018). Nanokompozit ambalajlarda malzeme polimer matriks yapıdadır. Bu yapıya nano tüpler, nanokiller, karbon nanotüpler, grafen, nişasta nanokristalleri, selüloz yapılı nanofiberler, nano boyutta metal/metaloksit ya da nanolifler dolgu maddesi olarak eklenir. Polimerik nanokompozitlerin, nano boyutta dolgu maddesi içermeyen polimerlere göre aleve dayanımı ve termal özellikleri daha iyidir (Duncan, 2011). Polietilen (PE) ve polietilen tereftalat (PET) polimerlerinin imalatında %1-5 oranında nano kil kullanılmış, mekanik dirençte %100, termal mukavemette %80 oranında artış kaydedilmiştir. Nanokompozit materyaller bira, süt ürünleri ve meyve suyu

şışelerinin yapısına oksijen bariyeri olarak ilave edilmektedir (Var ve Sağlam, 2015). Ayrıca karbonnanotüpler, kitin-kitosan nanopartikülleri ve nanokiller Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı bakteriyostatik ve bakterisidal etki göstermektedir. Bu da nano dolgu maddelerinin polimerin mekanik özelliklerini arttırmanın yanında mikrobiyal yapı üzerinde de etkisi olduğunu ispatlamaktadır. Fakat nanokompozitlerin bozunmasının ardından toprak ve su mikrobiyotası üzerinde antimikrobiyal etkinin nasıl işleyeceği henüz netlik kazanmamıştır (Souza ve Fernando, 2016).

Gıdaya bulaşan ya da gıdada bulunan patojenleri, oluşan toksinleri tespit edebilen nanosensörler ile üretim çiftliklerinde, mezbahada, proses aşamasında, ambalajlamada, depolamada, ulaşımda gıdanın kontrolü ve güvenliği sağlanabilmektedir. Gıdanın bozulmaya başladığı ya da kontaminasyon durumu ambalajda bulunan nanosensörün renk değiştirmesi ile tüketici tarafından direkt anlaşılmaktadır (Şener, 2011). Patojen bakterilerin tespiti için yapılan çalışmalarda metal yüzeye immobilize edilen biyomolekül ile analit arasındaki etkileşimden doğan yüzey plazmon rezonansının ölçümünü esas alan optik biyosensörlerle *Escherichia coli*, süperparamanyetik nanopartiküllerin kullanıldığı manyetik biyosensörlerle *E. coli* ve *Salmonella* varlığı belirlenmiş, lipozom kaplanmış karbonnanotüp yapıları elektrokimyasal biyosensörlerle kolera toksini 10^{-16} g gibi çok düşük seviyede tespit edilmiştir (Sanvicens ve ark., 2009).

2.2. Nanopartiküller

2.2.1. Geçmişten günümüze nanopartiküller

Nanopartiküllerin yüzey alanı/ hacim oranının yüksek olması dolayısıyla yüzeydeki atom sayısı fazladır. 30 nm boyutunda yüzey atomlarının oranı %5, 10 nm’de ise bu oran % 20’dir. Bu durum NP'lere sıra dışı fizikokimyasal özellikler kazandırır. Kimyasal yapıda herhangi bir değişim olmamakla birlikte makro boyutla kıyaslandığında mekanik, manyetik, optik, termal, elektronik, katalitik aktivite,

antibakteriyel özelliklerde üstün ya da farklı karakteristik sergilerler (Durairasu ve ark., 2017; Akçay ve Avcı, 2018).

Örneğin elektriği ileten bakır elementi nano boyutta bu özelliği göstermemekte, antibakteriyel özellik taşımayan gümüş nano boyuta ulaşıncı antibakteriyel davranış sergilemektedir. Gümüşün bu yapısından hareketle ilk yardım uygulamalarında kullanılmak üzere yara bandı üretilmiştir. Günümüzde hayata geçirilen bu bilgi aslında geçmişte Romalılar tarafından kullanılıyordu. Vücutlarının yaralanan bölgesine sardıkları sargı bezlerinde nano boyutta gümüş bulunuyordu (Baykara ve ark., 2010).

Nanopartiküllerin optik özellikleri boyut ve şekillerine bağlı olarak farklılık göstermektedir. Gümüş, 100 nm’de prizma şeklinde kırmızı renk verirken, küre şeklinde sarıdır; 80 nm’de küre şeklindeyse açık mavi, 40 nm’de küre şeklindeyse lacivettir. Benzer şekilde altın 100 nm’de küre iken turuncu, 50nm’de küre iken yeşil renk verir. Roma dönemi cam ustalarının 4.yy’da imal ettikleri ‘Lycurgus Cup’ı eşsiz kılan, ışık kaynağının kadehin içerisinde ya da dışarısında olmasıyla meydana gelen ve çıplak gözle görülebilen renk değişimdir. Eriyik haldeki cama ilave edilen nanopartiküller sayesinde bu renk değişimi sağlanmaktadır (Benli, 2009). 1959 yılında yapılan laboratuvar analizlerinde kupanın soda-kireç-kuvars camdan üretildiği ve yapısında %1’lik oranda altın ile gümüş ve %0,5’lik oranda da manganez içerdiği tespit edilmiştir. İleriki yıllarda yapılan araştırmalarda elektron mikroskopları da kullanılmış ve kupanın bu muhteşem renk özelliğinin 50-100 nm boyutlarındaki altın ve gümüşten kaynaklandığı, bu durumun ise yüzey plazmon rezonansı ile metal nanopartiküllerin elektronları uyarmasıyla gerçekleştiği açıklanmıştır. 6-15.YY’lar arasında cam ustaları ürettikleri vitraylarda altın klorür ve metal oksit nanoparçacıklarını kullanarak renkli görünüm elde etmişlerdir. 13. ve 18. yüzyıllarda keskinliği, esnekliği ve dayanıklılığıyla meşhur olan Dımışki kılıçlarının yapımında da karbon nanotüpleri ve çimentoit nanotelleri kullanılmıştır (Tolochko, 2009). Günümüzden 4000 yıl kadar önce antik Mısır’da dönemin popüler saç rengi siyahtı. Arkeolojik kazılarda elde edilen saç tellerinin TEM görüntüleri sonucunda saç tellerinin üzerinde 5 nm boyutunda galen (PbS) nanokristalleri tespit edilmiştir.

Saç boyasına bu nanopartiküller ilave edilerek saçın optik özellikleri iyileştirilmiştir. Galen kuantum dotlarının da bu boyutta sentezlenebilmesi ilgi çekicidir (Benli, 2009).

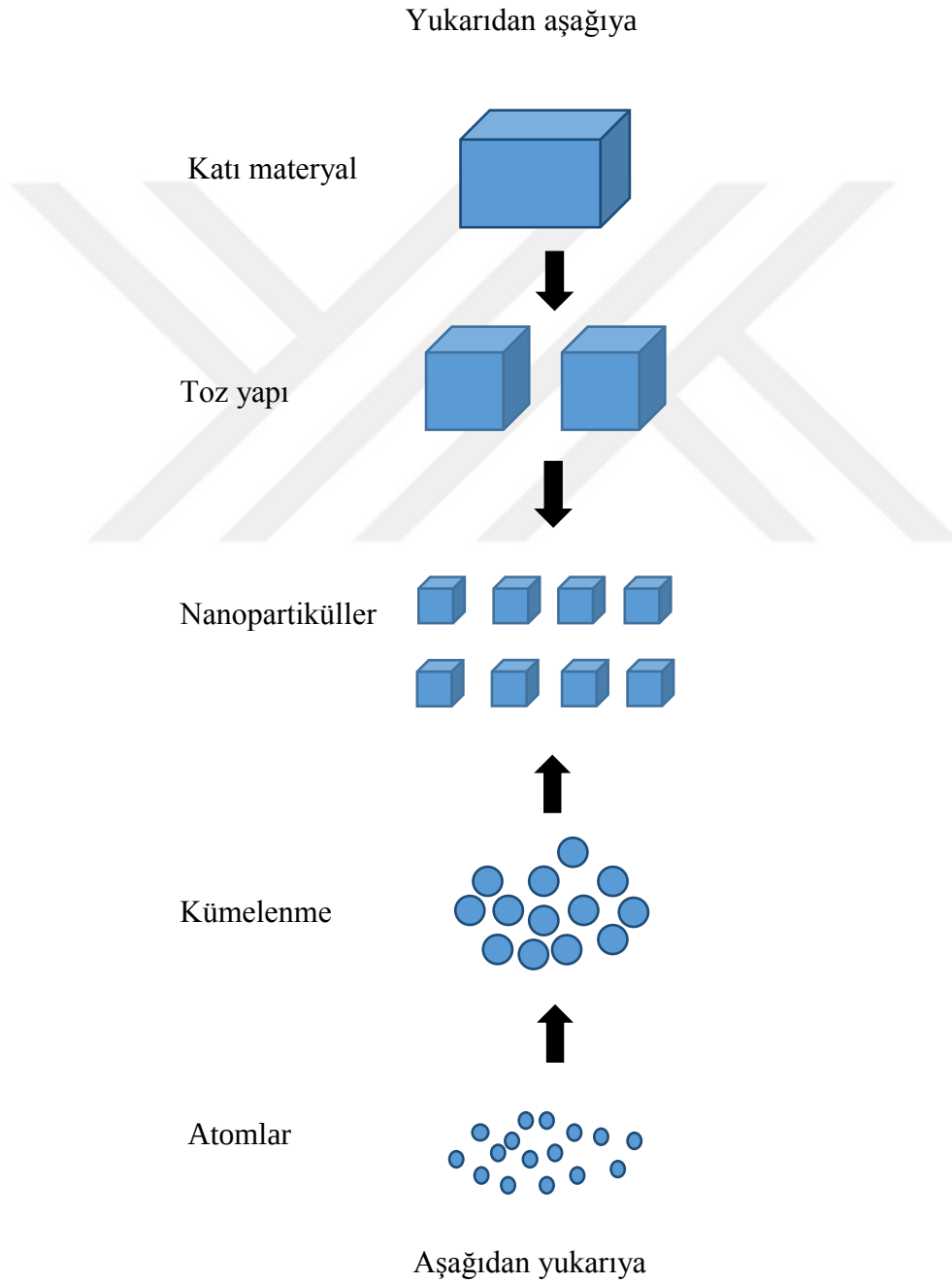
2.2.2. Nanopartiküllerin üretimi

Nanopartikül üretiminde temel olarak iki yaklaşım söz konusudur: Yukarıdan aşağı ve aşağıdan yukarı. Yukarıdan aşağı yaklaşımda büyük hacimdeki malzemeye kimyasal ya da mekanik işlemlerle dışarıdan enerji verilmekte ve malzeme nano boyutta elde edilmektedir. Mekanik öğütme ve aşındırma yöntemleri olan bu işlemler yüksek enerji gerektirdiğinden maliyetli olmasının yanında üretim sırasında atık oluşumu da mevcuttur. Yukarıdan aşağı yöntem uygulanan bir çalışmada yeşil çay yaprakları 1000 nm'ye kadar küçültülmüş, böylece yeşil çayın absorpsiyonu ve sindirimi kolaylaşmış, antioksidan etkisi artmıştır (Machado ve ark., 2013). Aşağıdan yukarı yaklaşımda ise kimyasal reaksiyonlar uygulanarak atomik ve moleküler boyuttaki yapılardan partikül oluşumu sağlanmaktadır. Sol-jel, buhar kaplama, sprey piroliz, kimyasal buhar yoğunlaştırma bu uygulamada en fazla kullanılan yöntemlerdendir (Gürmen ve Ebin, 2010; Francisco ve García-estepa, 2018).

Uygulanan metotlarla başarılı sentezler gerçekleştirilmesine rağmen yöntemlerin pahalı olması, kullanılan kimyasal maddelerin ve oluşan tehlikeli toksik atıkların hem insan sağlığı açısından hem de biyolojik ve çevresel açıdan risk oluşturması, üretilen toz partiküllerin termal stabilitesinin düşük olmasından dolayı ilave uygulamaya gerek duyulması ve istenilen kristal yapının her zaman elde edilememesi gibi birtakım dezavantajları mevcuttur (Francisco ve Garcia-Estepa, 2018).

Fiziksel ve kimyasal yöntemlerin yanı sıra üçüncü üretim metodu olarak biyolojik yapılar kullanılmaktadır. Biyolojik metotlar hem toksik kimyasal kullanımı gerektirmediğinden hem de uygulamalarda yüksek basınç, yüksek sıcaklık ve enerjiye ihtiyaç duyulmadığından avantaj teşkil etmektedir (Kumar ve ark., 2013). Biyoyoumlu, çevre dostu, ekonomik, biyomedikal ve farmakolojik çalışmalarda kullanılabilecek, ticari üretime elverişli bir yöntem olan Yeşil Nanoteknolojide

bakteri, küf, maya ve bitki ekstraktları biyolojik kaynaklar olarak kullanılmaktadır (Annadurai ve ark., 2013). Bitki ekstraktlarında metal iyonlarının metal nanopartiküllere indirgenmesinde ekstraktta bulunan fenoller, terpenoidler, polisakkaritler veya flavanoidler indirgeme ajanı olarak görev yapmaktadır (Hiremath ve ark., 2018).



Şekil 2.1. Yukarıdan aşağı ve aşağıdan yukarı yaklaşımlarda partiküller (Francisco ve Garcia-Esteva, 2018)

2.2.2.1. Nanopartiküllerin bakterilerle biyosentezi

Biyolojik varlıklar ve inorganik materyaller, yaşamın başlangıcından itibaren sürekli birbirleriyle etkileşim içindedirler. Bu olağan etkileşim sayesinde yeryüzünde hayat devam etmektedir. Nanopartiküllerin biyosentezinde bakterilerin tercih edilmesi bu canlıların değişen sıcaklık, pH ve basınç ortamına uyum sağlayıp hayatta kalabilmeleridir (Li ve ark., 2011).

Mağara, jeotermal ortam, sanayi bölgesi gibi metal bakımından zengin topraklardan izole edilen mikroorganizmaların metal direnci diğer ortam koşullarında gelişenlerden daha fazladır. Bu canlılar, içinde bulundukları ekstrem çevre koşullarında hayatta kalabilmek için çeşitli detoksifikasyon mekanizmalarını kullanmaktadırlar (Suriyaraj ve Selvakumar, 2014). Nanopartiküllerin bakteriler tarafından sentez mekanizması bugüne kadar tam anlamıyla deşifre edilememiştir. Bilim adamlarının yaptıkları araştırmalar göstermiştir ki farklı mikroorganizmalar farklı mekanizmalarla nanopartikül üretebilmekte ve bunun için birçok mikroorganizma hücre içi ya da hücre dışı yollar kullanmaktadır (Li ve ark., 2011; Gopinath ve Velusamy, 2013).

2.2.2.2. Nanopartiküllerin sentez mekanizması

Nanopartiküllerin hücre içi sentez mekanizmasında iki temel basamak mevcuttur: indirgenme ve sentez. Önce metal iyonları çekirdekleşir, sonrasında bakteri hücresi ve metal kümeleri arasındaki elektrostatik çekimin neticesi olarak nanokümeler oluşur. Hücre dışı sentez ise nitrat redüktaz enziminin metal iyonlarını hücrenin dış yüzeyinde yakalaması ve indirgemesi ile gerçekleşir (Ali ve ark., 2019).

Gümüş NP'lerinin sentezinde nitrat redüktaz enzimi nitrat iyonları tarafından uyarılır ve gümüş iyonlarını metalik gümüşe indirger. Bu işleme yol açan mekanizmanın 'Elektron taşıyıcısı enzimatik metal indirgeme prosesi' olduğu bildirilmiştir. NADH ve NADH-bağlı nitrat redüktaz enzimi metal nanopartiküllerin biyosentezinde önemli faktörlerdir. Yapılan bir çalışmada *B. licheniformis*'in kofaktör olarak NADH

ve NADH-bağlı enzimleri özellikle nitrat redüktazı salgılayarak Ag^+ iyonlarını elementel forma (Ag^0) indirgediği ve gümüş nanopartiküllerini oluşturduğu bildirilmiştir (Li ve ark., 2011). Bu indirgeme prosesinde başlangıç basamağı olarak NADH'ten bir elektron, NADH bağlı redüktaz enzimine (e^- taşıyıcısı) transfer edilir. İkinci basamak olarak bu elektronlar Ag^{+3} iyonlarına iletilir ve iyonlar elementel forma (Ag^0) AgNP'lerine indirgenirler (Ali ve ark., 2019).

Bazı bakteriler hücre ile substrat arasında elektron taşıyıcısı olarak görev yapan küçük, difüze olabilen redoks bileşenlerini üretip salgırlar ve bu bileşenler metaloksitleri indirgerler. Elektron taşıyıcıları ya da hidrokinonlar gibi indirgeme ajanları, iyonları nanopartikül forma indirgeme yeteneğine sahiptirler (Prakash ve ark., 2010).

DNA, protein kafesi, biyolipid silindirleri, viroid kapsüller, S-katmanları, çok hücreli süper yapılar gibi biyolojik materyaller inorganik NP'lerin sentezinde şablon olarak kullanılmaktadırlar (Prakash ve ark., 2010; Talebi ve ark., 2010).

2.3. TiO_2 ve TiO_2 Nanopartikülleri

2.3.1. TiO_2 ve TiO_2 NP'lerinin zellikleri

Titanyum dioksit anataz, brokit ve rutil olmak üzere üç formda bulunur (Sharfudeen ve ark., 2017). TiO_2 NP'leri sıcaklığa bağlı olarak bu üç forma dönüşebilmekte ve ilerinden anatazın diğerlerine göre olağanşt fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olduğu ifade edilmektedir (Abisharani ve ark., 2019). TiO_2 yarı iletken olarak geniş bir bant aralığında elektron iletebilmektedir. Bu özelliği dolayısıyla boya ve kuantum noktalara (quantum dot) duyarlı güneş pilinde fotoanot olarak kullanılmaktadır (DSSCs ve QDSSCs). Gerçekleştirilen bu uygulama ile azalmakta olan fosil yakıtlarının yerini alabilecek, küresel ihtiyaç haline gelen, yenilenebilir enerji olarak güneş pillerinin kullanımı sürdürülebilir ve verimli bir alternatiftir (rdenes-Aenishanslins ve ark., 2014).

Nano titanyum dioksit, fotokatalist ve UV koruyucu ajan olarak kullanılması, toksik olmaması, kimyasal olarak stabil, düşük maliyetli, hidrofobik ve biyouyumlu olması ayrıca UV absorbe edebilme kapasitesinden dolayı dikkat çekicidir (Singh, 2016). Titanyum dioksitin uygulama alanı oldukça geniştir: antibakteriyel kaplamalar, kendi kendini temizleyen yüzeyler, hava ve suyun arıtılması, organik kirliliklerin fotokatalitik degradasyonu (Li ve ark., 2016), güneş pili cihazlarının üretimi, gaz sensörleri, biyomedikal uygulamalar, eczacılık endüstrisi (Annadurai ve ark., 2013), cilt bakım ürünleri, güneş kremleri, plastik-boya-kağıt ürünlerinde opaklık, diş macunlarında, gıdalarda renklendirici (Santhoshkumar ve ark., 2014) olarak kullanımı bu uygulamalara örnektir.

Titanyum dioksit nanopartiküllerinin UV ışımasına maruz bırakılmasına bağlı olarak reaktif oksijen cisimcikleri üretimi, özellikle hidroksil serbest radikali ve peroksit oluşumu antibakteriyel aktivite açısından önemlidir. Yapılan bir çalışmada yapısına TiO_2NP 'leri ilave edilerek polietilen film üretilmiş, hidrojen peroksit oluşumu sonucu bakteriler yok edilmiştir (Santhoshkumar ve ark., 2014).

2.3.2. TiO_2NP üretimi

Titanyum dioksit nanopartiküllerinin üretiminde kimyasal metotlardan farklı olarak biyolojik yapıların esas alındığı yöntemlerde bitki ekstraktları ya da mikroorganizmalar kullanılmaktadır. *Psidium guajava* bitkisinin yaprakları toplanarak hazırlanan ekstraktın kullanıldığı bir çalışmada yaprakların yapısındaki alkoller, primer aminler, alifatik aminler ve aromatik bileşenlerin $\text{TiO}(\text{OH})_2$ 'yi indirgeyerek TiO_2NP oluşumuna sebep olduğu tespit edilmiştir (Santhoshkumar ve ark., 2014).

Titanyum dioksit nanopartiküllerinin mikrobiyal sentezinde ekstraselüler oksidaz enzimlerinin rol aldığı ve NP'lerin hücre duvarının yüzeyinde oluştuğu tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada asidik pH'da oksidoredüktaz enzimlerinin *Lactobacillus*'un membranına bağlandığı ve nano titanyum dioksitin biyosentezinden sorumlu olduğunu belirlenmiştir (Suriyaraj ve Selvakumar, 2014). *Lactobacillus*'un

sahip olduğu negatif elektro-kinetik potansiyel, katyonları kolayca çekeabilmekte ve bu durum da biyosentezin temelini oluşturmaktadır (Jha ve ark., 2009). Tablo 2.1.'de çeşitli mikroorganizmalar ile üretilen TiO₂NP'leri ve özellikleri verilmiştir.

Tablo 2.1. Bazı bakterilerin TiO₂NP'leri üretimi

Bakteri	Sıcaklık(°C)	Büyüklik(nm)/ kristal yapı	Şekil	Max. absorbans	Lokasyon	Referans
<i>Aeromonas hydrophila</i>	30(°C)	28-54nm rutil	küre		Hücre dışı	(Jayaseelan ve ark., 2013)
<i>Bacillus cereus</i>	Oda sıcaklığı	69-140nm anataz	küre		Hücre dışı	(Sunkar ve ark., 2014)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Oda sıcaklığı	anataz	küre	610 nm	Hücre dışı	(Suriyaraj ve Selvakumar, 2014)
<i>Bacillus subtilis</i>	Oda sıcaklığı	30-40 nm anataz	küre	366 nm	Hücre dışı	(Singh, 2016)
<i>Lactobacillus</i> sp.	Oda sıcaklığı	8-35nm anataz/rutil	küre		Hücre dışı	(Jha ve ark., 2009)
<i>Planomicrobium</i> sp.	Oda sıcaklığı	100-500 nm rutil	Çoğu düzensiz, azı küre	400 nm Rutil	Hücre dışı	(Annadurai ve ark., 2013)

Kontamine olmuş dondurmada izole edilen *Planomicrobium* sp. kullanılarak oda sıcaklığında TiO₂NP'leri üretilmiştir. SEM görüntülerinden elde edilen sonuçlara göre NP'ler 100-500 nm arası boyutlarda, aglomere olmuş durumdadırlar ve düzensiz bir görünüm sergilemişlerdir. Çalışma, aynı koşullarda *Lactobacillus* sp. ile tekrarlanmış ve benzer sonuçlar alınmıştır (Annadurai ve ark., 2013).

Yapılan bir çalışmada *Bacillus subtilis* ile oda sıcaklığında, 30-40 nm boyutlarında, küre şeklinde TiO₂NP'leri üretilmiştir. Nanopartiküllerin antibakteriyel etkisi *Escherichia coli* üzerinde test edilmiş ve olumlu sonuç alınmıştır (Singh, 2016).

Ekstremofil bir bakteri olan *Bacillus licheniformis*'le başlangıç maddesi olarak 0,1 M

titanyum hidroksit $[Ti(OH)_4]$ kullanılarak TiO_2NP 'leri üretilmiştir. Ayrıca ortama % 1'lik Kovaks Oksidaz Ayracı ilave edilmiş ve oksidaz enzimine bağlı olarak renkte değişim gerçekleşip gerçekleşmeyeceği incelenmiştir. İnkübasyonun 6. saatinde renk dönüşümü başlamış ve 24. saatte salgılanan ekstraselüler oksidaz enzimi maksimuma ulaştığında ortamda koyu ve keskin mor renk gözlenmiştir (Suriyaraj ve Selvakumar., 2014).

Justicia beddomei bitkisinden dokularının arasında barınan endofit bakteri *Bacillus cereus* izole edilmiş, bulk materyal olarak 0,025 M TiO_2 kullanılarak TiO_2NP 'leri üretilmiştir. Hem bulk TiO_2 'in, hem de TiO_2NP 'lerinin normal hücreler üzerindeki sitotoksik özellikleri incelenmiş ve TiO_2NP 'lerinin daha az toksik olduğu tespit edilmiştir (Sunkar ve ark., 2014).

Aeromonas hydrophila ile başlangıç maddesi olarak $TiO(OH)_2$ kullanılarak 30°C'de NP üretilmiş ve kuyu difüzyon yöntemi uygulanarak antibakteriyel etkisi incelenmiştir. Hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriler üzerinde bu etki gözlenmiştir (Jayaseelan ve ark., 2013).

2.3.3. Gıda endüstrisinde TiO_2NP 'leri

Titanyum dioksit nanopartikülleri gıda endüstrisinde renklendirici olarak (He ve Hwang, 2016), ürünlerin kalite özelliklerini korumak ve raf ömrünü arttırmak amacıyla ambalaj uygulamalarında, gıdaların mikroorganizmalara karşı korunması gibi farklı işlevlerde kullanılabilmektedirler.

Soyafasulyesi polisakkariti, pektine benzer yapısıyla, suda çözünebilen, şeffaf, renksiz ve yenilebilir film üretiminde kullanılabilecek polimerik polisakkarit yapısına örnektir. Fakat birçok biyobozunur polimer gibi yüksek su-nem absorpsiyonu ve gaz geçirgenliği ile zayıf mekanik dayanımı mevcuttur. Bu problemleri bertaraf edebilmek için polimerik yapıya TiO_2NP 'leri ilave edilmiş böylece çekme kuvveti ve ısı direnci geliştirilmiş ayrıca gaz ve su buharı geçirgenliği düşürülmüştür (Gaidhani ve ark., 2014).

Titanyum dioksit nanopartikülleri bakırla zenginleştirilerek atık su uygulamalarında kullanılmakta ve görünür ışık altında *E.coli* ve *S. aureus*'a karşı etkili olmaktadır (King ve ark., 2018). Çiğ ve tüketime hazır et ürünlerinde risk oluşturan patojen bakteriler *Salmonella typhimurium* ve *Listeria monocytogenes*'i inaktif etmek ve gıda güvenliğini sağlamak için TiO₂NP'lerinin ilavesiyle polimer bazlı nanokompozit materyal üretilmiş ve ambalaj malzemesi olarak kullanılmıştır. Long ve arkadaşlarının (2014) yaptıkları çalışmada nano titanyum dioksinin fotokatalitik özelliği sayesinde hem Gram pozitif, hem de Gram negatif bakterilere karşı etkili olduğu tespit edilmiştir (Zhu ve ark., 2018).

2.4. *Acinetobacter* Cinsi Bakteriler

2.4.1. *Acinetobacter* cinsi bakterilerin genel özellikleri

Acinetobacter ilk defa 1911 yılında Beijerinck tarafından *Micrococcus calco-acetius* olarak tanımlanmıştır. *Acinetobacter* ismi ise 'hareket edemeyen' anlamına gelen Yunanca 'akinetos' kelimesinden türetilmiştir. Günümüzde *Acinetobacter* cinsi *Moraxellaceae* familyası dahilinde sınıflandırılmaktadır ve Gram negatif, kokobasil, hareketsiz bakterilerden oluşmaktadır. *Acinetobacter* 'ler aerobik, katalaz-pozitif, indol-negatif, oksidaz negatif, fermentatif olmayan, 0,9-1,6 µm çapında, 1,5-2,5 µm uzunluğunda çubuk görünümünde, genelde çiftler halinde ya da uzun zincir şeklinde bakterilerdir (Manchanda., 2010). Toprakta, suda, çevrede çokça bulundukları gibi laboratuvar ortamında da gelişebilirler. Farklı sıcaklıklarda ve pH'da canlı kalabilir, çeşitli enerji ve karbon kaynaklarını kullanabilirler (Neethu ve ark., 2018).

Acinetobacter cinsi bakteriler hastanelerin özellikle yoğun bakım ünitelerinde ve diğer birimlerinde bulunan, ciddi infeksiyonlara sebep olan fırsatçı patojenlerdir. Bu anlamda *Acinetobacter baumannii* hastane kaynaklı infeksiyonların baş aktörüdür. İzole edilen diğer türler ise *A. johnsonii*, *A. lwoffii*, *A. radioresistens*, *A. haemolyticus*, genomik tür 6 ve 3'tür. Bunlardan *A. johnsonii*, *A. radioresistens* ve *A. lwoffii* doğal olarak insan derisinde bulunur. İsimlendirilen bazı genomik türler:

Genomik tür (DNA) 1: *A. calcoaceticus*

Genomik tür (DNA) 2: *A. baumannii*
 Genomik tür (DNA) 4: *A. haemolyticus*
 Genomik tür (DNA) 5: *A. junii*
 Genomik tür (DNA) 7: *A. johnsonii*
 Genomik tür (DNA) 8: *A. lwoffii*
 Genomik tür (DNA) 12: *A. radioresistens*
 Diğer türlerin birçoğu isimlendirilmemiştir.

Acinetobacter'lerin aynı zamanda karbonhidratları ayrıştırma yeteneklerine göre sakkarolitik ve sakkarolitik olmayan olarak da ayırımı yapılmıştır. Örneğin *A. lwoffii* ve *A. johnsonii* sakkarolitik değildirler. Fakat *A. johnsonii*'yi diğer türlerden ayıran özelliği 37°C'de üreyememesidir. *Acinetobacter* türlerinin kuru ve cansız yüzeylerde yaşayabilme süreleri 3 gün ile 5 ay arasında değişmektedir. Bu durum salgın hastalıkların oluşmasına neden olmaktadır (Çalışkan, 2008).

2.4.2. *Acinetobacter* cinsi bakterilerle nanopartikül üretimi

Literatürde *Acinetobacter* cinsi mikroorganizmalarla TiO₂NP üretimi çalışmalarına rastlanmamıştır. Bununla birlikte gümüş, altın selenyum ve platin NP'lerinin üretildiği bir takım çalışmalar mevcuttur. *Acinetobacter baumannii* ile nanogümüş partikülleri sentezlemek amacıyla yapılan bir çalışmada bakteriyel enzim ve metabolitler sayesinde gümüş iyonları hızlı bir şekilde elementel forma dönüştürülmüş ve elde edilen AgNP'lerinin kendi karakteristik büyüklük, şekil ve morfolojisinde olduğu tespit edilmiştir (Shaker and Shaaban, 2017).

Wadhwani ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri ve literatürde bir ilk olan çalışmada *Acinetobacter sp.* SW30'un hücresel süspansiyonundan, kromatografik yöntemlerle lignin peroksidaz enzimi saflaştırılmış, sonrasında altın ve selenyum nanopartikülleri sentezlemek üzere kullanılmıştır. Optimum üretim koşulları pH 2 ve 40°C olarak belirlenmiş, sentezlenen AuNP'lerinin (10±2 nm) kristalin yapıda ve küre şeklinde, SeNP'lerinin (100±10 nm) ise amorf yapıda olduğu tespit edilmiştir (Wadhwani ve ark., 2018a). Başka bir çalışmada *Acinetobacter calcoaceticus* kullanılarak 30°C'de,

pH 7’de, 72 saat inkübasyon sonucu PtNP’leri sentezlenmiştir (Gaidhani ve ark., 2014).



BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1 Mikroorganizmalar

Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Biyoteknolojisi Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan, önceki çalışmalarda kullanılmak üzere izole edilmiş, Cu ve Zn metallerine direnç kazandırılmış 32 adet *Bacillus* izolatu bu çalışma kapsamında da kullanılmıştır. Bu örneklerle ilave olarak Sakarya ili Maden Deresi ve Konya Seydişehir civarından alınan 9 toprak örneğinden de 27 izolasyon gerçekleştirilmiş ve toplamda 59 izolat üzerinde çalışılmıştır. İzolatlar ve elde edildiği kaynaklar Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. *Acinetobacter* ve *Bacillus* cinsi izolatların elde edildikleri kaynaklar

<u>İzolatlar</u>	<u>Elde edildiği kaynak</u>
<i>Acinetobacter</i> sp. MDA 1	Maden deresi bölgesi toprak örneği
<i>Bacillus</i> sp. AKS	Konya Seydişehir bölgesi toprak örneği
<i>Bacillus</i> sp. BAST 2	Ev yapımı salatalık turşusu
<i>Bacillus</i> sp. BAT 3	Toprak örneği
<i>Bacillus</i> sp. BMZE 4, 2	Ev yapımı sofralık zeytin
<i>Bacillus</i> sp. EBTA 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	Toprak örneği
<i>Bacillus</i> sp. EKS 4	Toprak örneği
<i>Bacillus</i> sp. EKT 1, 4	Sanayi bölgesi toprak örneği
<i>Bacillus</i> sp. GİT 2	Toprak örneği
<i>Bacillus</i> sp. HAT 1, 2	Toprak örneği
<i>Bacillus</i> sp. MDB 1, 2,	Maden deresi bölgesi toprak örneği
<i>Bacillus</i> sp. MDC 1, 2,	Maden deresi bölgesi toprak örneği
<i>Bacillus</i> sp. MDD 1, 2, 3, 4,	Maden deresi bölgesi toprak örneği
<i>Bacillus</i> sp. MDF 1, 2, 3, 4	Maden deresi bölgesi toprak örneği

Tablo 3.1. (Devamı)

<u>İzolatlar</u>	<u>Elde edildiği kaynak</u>
<i>Bacillus</i> sp. MDG 1, 2, 3	Maden deresi bölgesi toprak örneği
<i>Bacillus</i> sp. MDH 1, 2, 3, 4,	Maden deresi bölgesi toprak örneği
<i>Bacillus</i> sp. MDİ 1, 2, 3, 4, 5, 6	Maden deresi bölgesi toprak örneği
<i>Bacillus</i> sp. SBT 1, 3, 4, 5, 6 7, 8, 9, 10, 12	Toprak örneği
<i>Bacillus</i> sp. ZBP 4	Patates tarlasından toprak örneği
<i>Bacillus</i> sp. ZGT 1, 5, 9	Toprak örneği

Elde edilen NP'lerin antibakteriyel etkisini test etmek için kullanılan *Bacillus cereus* (*B. Cereus*), *Eschericia coli* O157:H7 (*E. coli* O157:H7), *E. coli* tip-1, *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) Doç. Dr. Serap Coşansu Akdemir (Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü)'den, antifungal duyarlılık testi için kullanılan *Candida albicans* (*C. albicans*) ise Doç. Dr. Gülnur Arabacı (Sakarya Üniversitesi Kimya Bölümü)'dan temin edilmiştir.

3.1.2. Araç-gereçler

Yapılan çalışmada kullanılan araç-gereçler ve markaları Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan araç-gereçler ve markaları

<u>ARAÇ- GEREÇLER</u>	<u>MARKA</u>
Hassas terazî	Radwag AS 220.R2
Su banyosu	WiseBath WSB-30
pH metre	Mettler-Toledo Seven Compact S210
Etüv	Microtest min
Çalkalamalı inkübatör	Benchmark Incu-Shaker Mini
UV-VIS spektrofotometre	Shimadzu UVmini-1240
Vorteks	VELP Scientifica ZX3
Masaüstü santrifüj	Hettich Universal 320 R
Otomatik pipet serisi	Hamilton
Otoklav	WiseClave WAC-80
Isıticılı manyetik karıştırıcı	IKA C-MAG HS 7
Damıtık su cihazı	Nüve ND8
-65°C dondurucu	NUVE DF 590

3.1.3. Besiyerleri

Kullanılan besiyerleri ve hazırlanma şekilleri aşağıda belirtilmiştir.

Nutrient Broth (NB): Mikroorganizmaların geliştirilmesi ve devamında nanopartikül üretimi için kullanılmıştır. Dehidre formda NB'dan (Merck, Darmstadt, Almanya) 8 g tartılarak 1000 mL damıtık su içerisinde manyetik karıştırıcı üzerinde çözündürülmüş, ardından otoklavda, 121°C'de, 15 dakika sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Nutrient Agar (NA): Mikroorganizmaların aktifleştirilmesinde ve izolasyonunda kullanılmıştır. NA, izolasyon sırasında koloni oluşumu ve uygun koloni seçimi için önemlidir. Dehidre formdaki NA'dan (Merck, Darmstadt, Almanya) 20 g tartılarak 1000 mL damıtık su içerisinde, manyetik karıştırıcı üzerinde kaynatılarak çözündürülmüş ve sonrasında otoklavda, 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyon işlemi sonlanınca, 45-50°C'ye ısıtılmış su banyosuna konulmuş, besiyerinin sıcaklığı su banyosunun sıcaklık değerine düşünce steril petri kaplarına 15-20 mL kadar dağıtılarak soğuması ve katılaşması sağlanmıştır.

Tryptic Soy Broth (TSB): Antimikrobiyel aktivite testi için gerekli olan TSB, mikroorganizmaların geliştirilmesi için kullanılmıştır. Dehidre formdaki TSB'dan (Merck, Darmstadt, Almanya) 30 g tartılarak 1000 mL damıtık su içerisinde çözündürüldükten sonra 9'ar mL olacak şekilde deney tüplerine aktarılmış ve 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

Tryptic Soy Agar (TSA): Antimikrobiyal aktivite tayininde kullanılmıştır. 40 g dehidre formdaki TSA'dan (Merck, Darmstadt, Almanya) tartılarak damıtık su içerisinde, manyetik karıştırıcı üzerinde kaynatılarak çözündürülmüş ve sonrasında 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyon işlemi sonlanınca, 45-50°C'ye ısıtılmış su banyosuna konulmuş, besiyerinin sıcaklığı su banyosunun sıcaklığına düşünce steril petri kaplarına 15-20 mL kadar dağıtılarak soğuması ve katılaşması sağlanmıştır.

Titanyum dioksit (TiO_2) katkılı Nutrient Agar: *Bacillus* ve *Acinetobacter* cinsi mikroorganizmaların titanyum dioksit nanopartiküllerini üretme yeteneğinde olan suşlarını izole etmek için kullanılmıştır. Dehidre formdaki NA'dan 10 g, TiO_2 'den 0,04 g (1mM) tartılarak 500 mL damıtık su içerisinde, manyetik karıştırıcı üzerinde kaynatılarak çözündürülmüştür. Çözünme sonrası 121°C 'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyon işlemi sonlanınca, $45\text{-}50^\circ\text{C}$ 'ye ısıtılmış su banyosuna konulmuş, besiyerinin sıcaklığı banyosunun sıcaklığına düşünce steril petri kaplarına 15-20 mL kadar dağıtılarak soğuması ve katılaşması sağlanmıştır.

Yeast Ekstrakt Pepton Glukoz (YPG) Broth: Antifungal aktivitenin tayini için *Candida albicans*'ın geliştirilmesinde kullanılmıştır. 10 g maya ekstraktı, 20 g glukoz, 20 g pepton (dehidre formda)'un tamamı 1000 mL damıtık su içerisinde çözündürülmüş, ardından 121°C 'de 15 dakika sterilizasyon uygulandıktan sonra kullanılmıştır.

Yeast Ekstrakt Pepton Glukoz (YPG) Agar: Antifungal aktivite tayininde kullanılmıştır. 20 g glukoz (Merck, Darmstadt, Almanya), dehidre formda 20 g et peptonu (Merck, Darmstadt, Almanya), 10 g agar agar (Merck, Darmstadt, Almanya), 10 g yeast ekstrakt (Merck, Darmstadt, Almanya)'nın tamamı 1000 mL damıtık su içinde kaynatılarak çözündürülmüş, 121°C 'de 15 dakika sterilizasyon gerçekleştirilmiştir. Ardından su banyosunda $45\text{-}50^\circ\text{C}$ 'ye soğutularak steril petrilere yaklaşık 15-20 mL hacimde paylaştırılmış ve soğumaya/katılaşmaya bırakılmıştır.

3.1.4. Kimyasallar ve çözeltiler

Kullanılan kimyasallar ve kullanım amaçları aşağıda belirtilmiştir.

50 mM TiO_2 çözeltisi: Titanyum dioksit nanopartiküllerinin üretiminde kullanılmıştır. 4 g TiO_2 (Tekkim Kimya San. Ltd. Şti., Bursa/Türkiye) tartılarak 1000 mL'lik balon joje içerisine konmuş ve damıtık su ile çizgisine tamamlanmıştır.

2 N NaOH: pH ayarlanmasında kullanılmıştır. 8 g NaOH (Merck, Almanya) tartılarak damıtık su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

2 N HCl: pH ayarlama da kullanılmıştır. Yoğunluğu 1,18 g/cm³ olan %37'lik HCl'den (Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya) 16,7 mL alınmış ve damıtık su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

0,15 mM DPPH çözeltisi: Antioksidan aktivitenin belirlenmesinde kullanılmıştır. 1,47 mg DPPH (Sigma-Aldrich, Amerika) tartılarak 25 mL'lik balon jojeye aktarılmış ve balon joje metanol ile (Merck, Almanya) çizgisine kadar tamamlanmıştır.

% 0,85'lik FTS çözeltisi: Mikroorganizmaların izolasyonunda kullanılmıştır. 1000 mL damıtık su içerisinde 8,5 g NaCl çözündürülerek hazırlanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Mikroorganizmaların izolasyonu ve muhafazası

Sakarya ili Maden Deresi ve Konya Seydişehir bölgesinden alınan toprak örneklerinden *Bacillus* ve *Acinetobacter* cinsi mikroorganizmaların izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon için 9 toprak örneğinden 5'er g tartılarak önceden steril edilmiş 45 mL fizyolojik tuzlu su (FTS) içeren Erlenmayerler içerisinde karıştırılıp süspanse edilmiştir. Süspansiyonlar 80°C'deki su banyosunda 15 dakika bekletilmiştir (Santana ve ark., 2008). Su banyosundan çıkarılıp soğutulan örneklerden 1'er mL alınarak 9 mL steril FTS içeren deney tüplerine aktararak seri dilüsyonlar hazırlanmış ve her dilüsyondan 100 µL alınarak hem NA'a hem de Ti katkılı NA'a yayma yöntemiyle ayrı ayrı ekim yapılarak 33°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon tamamlanınca yeterli gelişme görülen petrilere uygun görülen koloniler seçilerek özdeş yeni petrilere çizgi ekimle ekilmiş ve tekrar 33°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Aynı şekilde birbiri ardınca 5 kez ekim yapılmış ve bu işlemlerle karışık floradan tek koloni elde

edilmesi ve elde edilen bu koloninin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Besiyerinde gelişen kolonilerden seçilen izolatlar öze kullanılarak alınıp 5 mL NB içeren deney tüplerine aktararak çalkalamalı inkübatörde 33°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve sıvı besiyerinde gelişmiş olan kültürler %50 gliserol (Merck, Darmstadt, Almanya) içeren Eppendorf tüplerine aktarıldıktan sonra -65°C’de dondurularak muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Mikroorganizmalardan TiO₂NP’lerini üretme yeteneğinde olanların seçimi

Titanyum dioksit nanopartiküllerini üretme yeteneğinde olan mikroorganizmaları belirleyebilmek için ilk olarak 1 mM TiO₂ katkılı NA besiyeri hazırlanmış, kültür koleksiyonundaki *Bacillus* ve *Acinetobacter* cinsine ait bakteriler bu besiyerine çizme yöntemi ile ekilmiş ve 33°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Katkılı besiyerinde gelişebilen bakterilerin TiO₂’e karşı direnç gösterebildikleri düşünülmüştür.

Titanyum dioksite direnç gösterdiği tespit edilen mikroorganizmaların bu strese dayanımlarını arttırmak için aynı koşullarda (besiyeri, ekim yöntemi, inkübasyon koşulları) ekim işlemi beş kez tekrarlanmıştır. Gelişen mikroorganizmaların NB’ta inkübasyonu sonrasında %50 gliserol içeren Eppendorf tüplerine aktarılması ve -65°C’de muhafazası gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. TiO₂NP üretimi

Yapılan ön çalışmalar sonucunda kullanılan izolatların çoğu TiO₂ katkılı besiyerinde gelişme gösterdiği için tüm bakterilerle NB’ta nanopartikül üretimi yapılarak en iyi üretici suş seçilmiştir. Bunun için, izolatlar, NA besiyerine sürme yöntemiyle ekilmiş, 33°C’de 24 saat inkübe edilmiş ve gelişme gösteren kolonilerden öze ile alınarak 30 mL NB içeren 100 mL’lik erlenlere aktarılmıştır. Erlenler 33°C’deki çalkalamalı inkübatörde 24 saat, 120 rpm çalkalanarak inkübe edilmiş ve ardından 4°C’de 9000 devir/dk olacak şekilde 15 dakika santrifüj edilerek mikrobiyal pelet

çöktürülmüştür (Akçay, 2017). Üstteki sıvı kısım (süpernatant) 100 mL'lik steril erlenlere aktararak üzerine önceden hazırlanan 50 mM'lık TiO_2 çözeltisinden son konsantrasyon 2,16 mM olacak şekilde ilave edilmiştir. pH'da herhangi bir ayarlama yapılmamış, örneklerin kendi pH'sındaki durum (değişim olup olmadığı) gözlenmiştir. Kontrol olarak 100 mL'lik erlene 30 mL damıtık su konmuş, üzerine örneklerle eş miktarda olacak şekilde TiO_2 ilave edilmiştir. Örnekler ve kontrol öncelikle çalkalamalı su banyosunda (60°C ; 30dk) bekletilmiş, ardından 33°C 'de 120 rpm çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir (Yurtluk, 2018). İnkübasyonun 48. ve 144. saatlerinde spektrofotometrik analiz yapılmıştır. Analiz öncesinde örnekler 1/5 oranında seyreltilmiş ve UV-VIS spektrofotometrede 200-900 nm dalga boyu aralığında spektrum taraması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda Sakarya ili Maden Deresi mevkiinden alınan toprak örneklerinden izole edilen *Acinetobacter* sp.MDA1 bakterisinin TiO_2NP üretimi için uygun olduğuna karar verilmiştir.

3.2.4. TiO_2NP 'lerinin biyosentez koşullarının optimizasyonu

Titanyum dioksit nanopartiküllerinin biyosentezinde ortam pH'sı, TiO_2 çözeltisinin konsantrasyonu, inkübasyon süresi ve sıcaklık parametrelerinin optimizasyonu yapılarak en verimli üretim koşulları tespit edilmiştir. Uygulamaların tümünde üç paralelli çalışma gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.1. NP'lerin biyosentezine TiO_2 konsantrasyonunun etkisinin belirlenmesi

Titanyum dioksit nanopartikülleri üretiminde ideal konsantrasyon değerinin belirlenmesi amacıyla önceden hazırlanmış 50 mM'lık TiO_2 çözeltisinden, Bölüm 3.2.2.3'de belirtildiği şekilde elde edilen süpernatanta 2,25; 4,5; 9,0; 12,0 mL eklenmiş ve son konsantrasyon sırasıyla 3,75; 7,5; 15,0; 20,0 mM olarak elde edilmiştir. Çalkalamalı inkübatörde (120 rpm) 33°C 'de 144 saat inkübasyon sonunda örnekler damıtık su ile 1/5 oranında seyreltilmiş ve UV-VIS spektrofotometrede 341 nm dalga boyunda absorban ölçümü yapılmıştır.

3.2.4.2. TiO₂NP'lerinin biyosentezine pH'nın etkisinin belirlenmesi

Hazırlanan 50 mM'lık TiO₂ çözeltisinden süpernatanta 11,53 mM ilave edilmiş, 2 N HCl veya 2 N NaOH ile pH değerleri sırasıyla 6, 7, 8, 9 ve 10'a ayarlanmıştır. İnkübasyon, çalkalamalı inkübatörde 33°C'de, 120 rpm'de, 144 saat devam etmiştir. İnkübasyon sonunda alınan örnekler damıtık su ile 1/5 oranında seyreltilerek UV-VIS spektrofotometrede 341 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır. Absorbans değerinin en yüksek okunduğu örneğe ait pH değeri optimum pH olarak belirlenmiştir.

3.2.4.3. TiO₂NP'lerinin biyosentezine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi

Optimum konsantrasyon ve pH değerinde hazırlanmış örnekler çalkalamalı inkübatörde (120 rpm) 30°C, 33°C, 37°C ve 40°C olmak üzere dört farklı sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Alınan örnekler damıtık su kullanılarak 1/5 oranında seyreltilmiş, UV-VIS spektrofotometrede 341 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür. Absorbans değerinin en yüksek olduğu örneğe ait sıcaklık değeri optimum sıcaklık olarak belirlenmiştir.

3.2.4.4. TiO₂NP'lerinin biyosentezine inkübasyon süresinin etkisinin belirlenmesi

Titanyum dioksit nanopartikül üretiminin inkübasyon süresinden nasıl etkilendiğini belirlemek amacıyla örnekler ideal olduğu düşünülen koşullarda 144 saat inkübe edilmiş, ilk 5 saat boyunca her saatte bir, daha sonra da 24 saat aralıkla 1'er mL örnek alınarak damıtık su ile 5 mL'ye tamamlanmış ve UV-VIS spektrofotometrede 341 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır.

3.2.5. TiO₂NP'lerinin optimum koşullarda üretimi ve saflaştırılması

Titanyum dioksit nanopartiküllerinin optimum koşullarda üretilip saflaştırılmasının ardından karakterizasyonu yapılabilmekte ve yapısı, boyutları gibi bir takım özellikleri belirlenebilmektedir. Saflaştırma işlemi için üretilen NP'ler santrifüj

tüpüne aktarılmış ve 4°C’de 9000 devir/dk’da, 15 dakika süresince santrifüj işlemi gerçekleştirilmiş, işlem tamamlanınca üst kısmı oluşturan süpernatant dökülmüş ve dökülen süpernatanta eş miktarda damıtık su dibe çöken NP’lerin üzerine ilave edilmiştir. Sonrasında vortekslenip santrifüj edilmiş (9000 devir/dk, 4°C, 12 dakika) ve bu yıkama işlemi üç kez tekrarlanmıştır. Yıkamadan sonra TiO₂NP’leri inkübatörde 33°C’de kurutulmuştur.

3.3. Analizler

3.3.1. *Acinetobacter* sp. MDA1 izolatının tanımlanması

MDA1 izolatının morfolojik ve bazı biyokimyasal özelliklerini belirlemek için Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology’de açıklandığı şekilde Gram boyama ve Spor boyama yapılarak hücreler ışık mikroskopunda incelenmiştir (Holt ve ark. 1994). Bakterinin moleküler tanımlanmasında 16S rDNA dizi analizinden yararlanılmıştır. DNA izolasyonu, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve dizi analizi Sentegen Biyoteknoloji (Ankara, Türkiye) firmasında yapılmıştır. 16S rDNA geninin PCR’da çoğaltılmasında universal primer (Forward 5’-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3’) kullanılmıştır. PCR ile çoğaltılan ürünün dizi analizi Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) ile yapılmıştır. Yapılan çalışmada MDA1 izolatının genomunun 16S rDNA gen bölgesinden 921 adet baz dizisi belirlenmiştir. Elde edilen DNA dizisi Genbank veritabanında bulunan bütün DNA dizileri ile Blastn programı yardımı ile karşılaştırılmış ve kendisine en yakın olan mikroorganizmalar ile filogenetik dendogramı oluşturulmuştur (Liu ve ark., 2015; URL-2, 2019).

3.3.2. TiO₂NP’lerinin karakterizasyonu

3.3.2.1. Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopi analizi

Titanyum dioksit nanopartiküllerinin enerji dağılımlı X-ışını spektroskopi (EDX) analizi Sakarya Üniversitesi Araştırma-Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi

(SARGEM) laboratuvarında yaptırılmış, analizde EDX spektrometresi (EDAX, Octane Plus) kullanılmıştır. TiO_2NP 'leri bölüm 3.2.4'te anlatıldığı şekilde saf halde elde edilmiş ve 15,00 kV'ta elementel düzeyde tanımlanmıştır.

3.3.2.2. Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu analizi

Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (Field Emission Scanning Electron Microscopy; FESEM) kullanılarak yapılan görüntülemelerde TiO_2NP 'lerinin şekil ve büyüklükleri belirlenmiştir. Analiz için Sakarya Üniversitesi Araştırma-Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (SARGEM) laboratuvarında bulunan FESEM (FEI Quanta, FEG 450) cihazı kullanılmış, Bölüm 3.2.4'de anlatıldığı şekilde elde edilen TiO_2NP 'leri 15,00 kV'ta, 50.000 kat büyüme oranında görüntülenmiştir.

3.3.2.3. X-ışını kırınımı analizi

X-ışını kırınımı analizi (XRD) Sakarya Üniversitesi Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü laboratuvarında yaptırılmış, analizde X-ışını difraktometresi (Rigaku, SA-HF3 D/max-2200/PC) kullanılmıştır. Bu analiz, NP'lerin kristal yapısının belirlenmesi amacıyla, bölüm 3.2.4'te açıklandığı şekilde saf olarak elde edilen TiO_2NP 'leri ile gerçekleştirilmiştir. Ölçümler 2θ temelinde ve Cu anotu kullanılarak (40 kV, 30mA) $K\alpha$ ışınımında ($\lambda = 1,5405 \text{ \AA}$) yapılmıştır. X-ışınlarının geliş açısı $10-90^\circ$ arasında değişmekle birlikte dakikada 3° artmıştır.

X-ışını kırınımı analizi, kompleks, mikrofaz ve tek faz materyallerin mikroyapısının karakterize edilmesinde büyük öneme sahiptir (Sharfudeen ve ark., 2017). Sentezlenen NP'lerin kristal yapısını tespit etmek için kullanılır (Annadurai ve ark., 2013). XRD ile yapıdaki kimyasal bağlar, atomların üç boyutlu koordinasyonları, elektron yoğunluk değeri gibi veriler ve moleküller arasındaki etkileşim hakkında bilgi sahibi olmak mümkündür. Bu yöntemle ayrıca örneğin yapısı, hangi fazda olduğu, partikül büyüklüğü belirlenebilmektedir. Elde edilen en güçlü kırınım piki kullanılarak nanomateriyalin partikül büyüklüğü Scherrer Eşitliği (Denklem 3.1.) kullanarak hesaplanabilmektedir (Vishnu Kirthi ve ark., 2011; Sunkar ve ark., 2014).

$$d = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (3.1)$$

d = nanopartikülün ortalama çap büyüklüğü,

k = 0,89 sabiti

λ = X ışınlarının dalga boyu

β = yarı max. yükseklik çizgisinin genişliği

θ = kırınım açısı

3.3.3. TiO₂NP'lerinin antimikrobiyel etkisinin belirlenmesi

Titanyum dioksit nanopartiküllerinin bakteriler üzerindeki antimikrobiyal etkisini belirlemek amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır (Subhapriya ve Gomathipriya, 2018). -65°C'de, %50 gliserol içerisinde stoklanan *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*'nin aktifleştirilme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için patojenlerden öze ucu ile alınarak içerisinde 9 mL TSB bulunan ve önceden steril edilmiş deney tüplerine aktarılmıştır. *L. monocytogenes* 30°C'de, diğer patojenler ise 37°C'de 24 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda aktifleşen örneklerden 100 µL hacminde alınarak TSA besiyerine yayılmıştır. Yayma işleminin ardından besiyerinin üzerine sterilize edilmiş diskler yerleştirilmiş ve her bir diskin üzerine de önceden pH 9'da üretilip saflaştırılmış TiO₂NP'lerinden 10 µL konulmuştur. 24 saat inkübasyonun ardından disklerin etrafında zon oluşumu incelenmiştir.

3.3.4. TiO₂NP'lerinin anti-*Candida* aktivitesinin belirlenmesi

Titanyum dioksit nanopartiküllerinin *Candida albicans* üzerindeki antifungal etkisinin belirlenmesi amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. -65°C'de, %50 gliserol içerisinde stoklanan *C. albicans*'ın aktifleştirilme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için mayadan öze ucu ile alınarak içerisinde 9 mL YPG sıvı besiyeri bulunan ve önceden sterilize edilmiş deney tüpüne aktarılmıştır. 30°C'de 24 saat inkübasyon sonunda aktifleşen örnekten 100 µL hacminde alınarak YPG agar içeren petriye yayılmıştır. Yayma işleminin ardından besiyerinin üzerine çapı 6 mm olan

steril diskler yerleştirilmiş ve her bir diskin üzerine de önceden üretilip saflaştırılmış TiO₂NP'lerinden 20 µL inoküle edilmiştir. 30°C'de 24 saat inkübasyonun ardından disklerin etrafında zon oluşumu incelenmiştir.

3.3.5. TiO₂NP'lerinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi

Titanyum dioksit nanopartiküllerinin antioksidan aktivitesini belirlemek amacıyla DPPH (α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) radikalini indirgeme yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntem, DPPH'in antioksidan tarafından yakalanması temeline dayanır ve ortam antioksidanlarının DPPH radikalini indirgeme yeteneğini ölçer. Bu indirgeme reaksiyonunda mor renkli DPPH metanol çözeltisinin rengi sarıya dönmektedir (Forootanfar ve ark., 2014). Analizin yapılışında farklı konsantrasyonlarda (53,125-106,250- 212,500 mg/ml) TiO₂NP'leri hazırlanarak her birinden 1 mL alınmış ve üzerlerine metanolle hazırlanmış 0,15 mM konsantrasyondaki DPPH çözeltisinden 1'er mL ilave edilmiştir. 3'er mL metanol de eklendikten sonra numuneler yarım saat oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletilmiştir. Süre sonunda saf metanole karşı sıfırlanmış UV-VIS spektrofotometrede 517 nm dalga boyunda absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Kontrol örneği olarak TiO₂NP'lerinin yerine eş miktarda damıtık su ilave edilmiştir. Yüzde giderim oranı (Denklem 3.2.) aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\text{DPPH radikalinin giderim oranı (\%)}: \left[1 - \left[\frac{Aa - Ab}{Ac} \right] \right] \times 100 \quad (3.2)$$

Aa: DPPH çözeltisi eklenmiş örneğin absorbansı,

Ab: DPPH çözeltisi eklenmemiş örneğin absorbansı,

Ac: Kontrol çözeltisinin absorbansı,

olarak ifade edilmektedir.

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. TiO₂NP Üretimi

4.1.1. TiO₂'e dirençli mikroorganizmaların tespiti

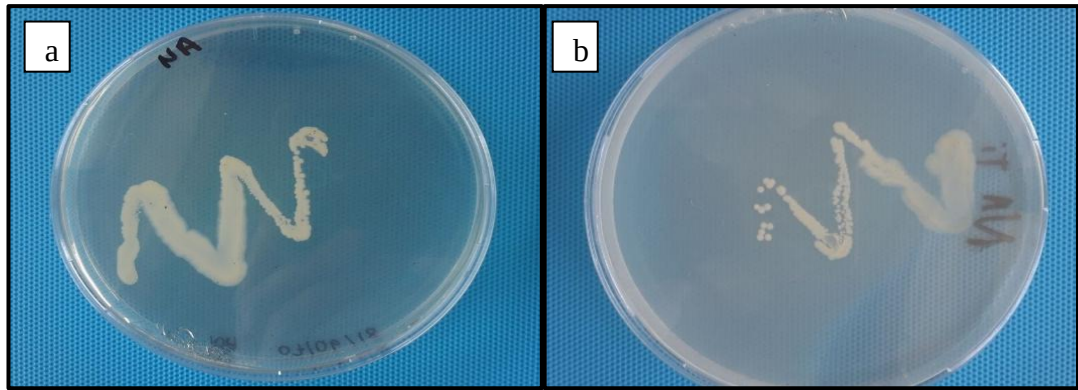
Nanopartikül üretim çalışmalarına başlamadan önce Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Gıda Biyoteknolojisi Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan ve daha önceki çalışmalarda farklı metallere dirençli olduğu tespit edilen mikroorganizmaların TiO₂'ye karşı da direnç gösterip göstermeyecekleri test edilmiştir. Bu amaçla stok gliserol çözeltisinde muhafaza edilen 32 izolat öncelikle NA'da ve ardından 4,3 mM TiO₂ ilave edilmiş NB'da geliştirilmiştir. 32 adet bakteri örneğinin 2'si hariç (*Bacillus* sp. SBT5 ve *Bacillus* sp. ZGT1), 30'unun TiO₂'ye direnç gösterdikleri tespit edilmiştir.

Kültür koleksiyonunda bulunan izolatlara ilave olarak Sakarya ili Maden Deresi ve Konya Seydişehir bölgelerinden temin edilen 9 toprak örneğinden toplam 27 izolasyon yapılmıştır. İzole edilen bakteriler 1 mM TiO₂ katkılı NA'da çizme yöntemiyle ekilerek geliştirilmiş ve bakterilerin direnç kazanması için ekim işlemi 5 kez tekrarlanmıştır (Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.). MDG1 izolatu hariç diğer izolatlarda gelişme gözlenmiş, bu örneklerin inkübasyonu 4,3 mM TiO₂ ilave edilmiş NB'da 24 saat devam ettirilmiştir. İnkübasyon süresi tamamlandığında MDİ6'da gelişme olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. TiO_2 katkılı NA'da inkübe edilen örnekler

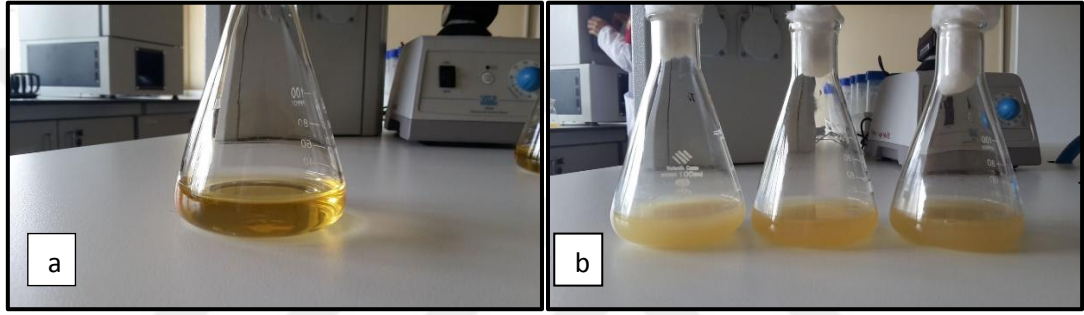
Mikroorganizmaların çoğu TiO_2 katkılı nutrient agarda gelişme gösterdiğinden nanopartikül üreticisi izolatın belirlenmesi için mikroorganizmalar nutrient broth içerisinde geliştirildikten sonra santrifüj yardımıyla elde edilen hücresiz sıvıda nanopartikül üretimi gerçekleştirilmiş ve üretim UV-VIS spektrofotometre ile spektrum taraması yapılarak yüzey plazmon rezonansı oluşumu kontrol edilmiştir. Yüzey plazmon rezonansı (YPR), metal nanopartiküllerin karakteristik bir özelliğidir. Nanopartiküllere elektromanyetik ışık uygulandığında spesifik bir dalga boyunda partikülün iç kısmında elektronlar uyarılarak nanopartikülün dış yüzeyinde salınırlar. Bu durumda iç kısımda protonlar fazla olacağı için iki kutuplu (dipol) bir yapı oluşur. Yüzey plazmon rezonansı olarak bilinen bu olayda, yüzeyde salınan elektronlar, salınma neden olan dalga boyundaki ışığı absorbe eder. Absorbe edilen ışığın miktarı nanopartikülün miktarı ile orantılıdır (Garcia, 2011). Yapılan bu çalışma sonunda MDA1 suşunun 341 nm dalga boyunda YPR'na sahip olduğu anlaşılmış ve bu mikroorganizma ile çalışmaya devam edilmiştir.



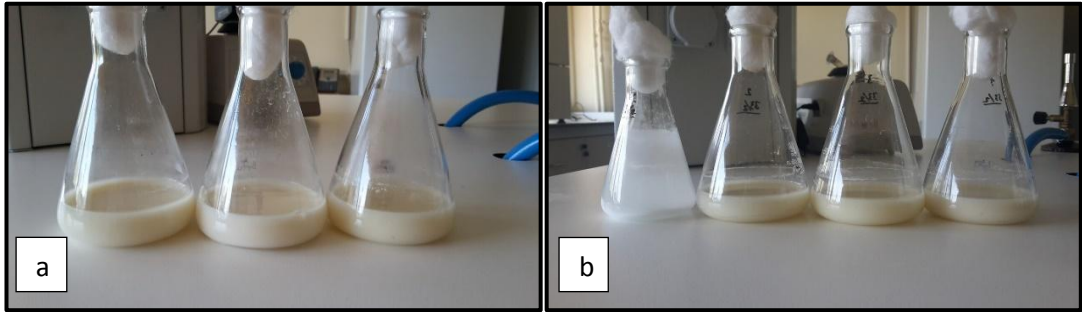
Şekil 4.2. *Acinetobacter* sp. MDA1 izolatının farklı besiyerlerindeki gelişimi a) Katkısız NA'da; b) TiO_2 katkılı NA'da

4.1.2. TiO₂NP'lerinin biyosentezi için yapılan ön çalışmalar

Acinetobacter sp. MDA1 izolatu ile TiO₂NP üretiminin optimizasyon çalışmaları öncesinde Bölüm 3.2.3'de açıklandığı şekilde ön hazırlık yapılmıştır. *Acinetobacter* sp. MDA1, NB'da geliştirilmiş, hücresiz sıvı kısım alınarak TiO₂ eklenmiş, 144 saat inkübasyon sonunda UV-VIS spektrofotometrede 200-900 nm dalga boyunda spektrum taraması yapılmıştır. TiO₂NP biyosentezinin aşamalarına ait fotoğraflar Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.3. a) NB besiyeri; b) *Acinetobacter* sp. MDA1 inoküle edilmiş ve 24 saat sonunda gelişme görülen NB



Şekil 4.4 a) Çalkalamalı su banyosundan (60°C; 30dk) çıkarılan örnekler; b) 144 sa inkübasyon sonrası örnekler

Spektrum taraması sonucu 341 nm dalga boyunda TiO₂NP'lerinin yüzey plazmon rezonansına karşılık gelen absorpsiyon piki verildiği tespit edilmiştir (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. 144 sa inkübasyon sonunda 341 nm dalga boyunda elde edilen spektrum

Titanyum dioksit nanopartiküllerinin üretimi için yapılan çalışmalar incelendiğinde, biyosentezi gerçekleştiren mikroorganizma ve başlangıç maddelerine bağlı olarak yüzey plazmon rezonansından kaynaklanan absorpsiyon pikinin farklı dalga boyunda oluşabileceği görülmüştür. Prachi'nin 2016'da yaptığı çalışmada *Bacillus subtilis*'in 0,025 M $\text{TiO}(\text{OH})_2$ başlangıç maddesi ile gerçekleştirdiği biyosentezde NP'lerin spektrum okuması 366 nm'de gerçekleştirilmiştir (Singh, 2016). Aynı mikroorganizma ve aynı başlangıç malzemesi ile Kirthi ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada da 366 nm'de spektrum okuması yapılmış (Vishnu Kirthi ve ark., 2011) fakat öncü madde olarak potasyum hekzaflorotitanat (K_2TiF_6) kullanan Dhandapani ve arkadaşlarının (2012) *Bacillus subtilis* ile yaptığı çalışmada absorbans piki 379 nm'de tespit edilmiştir.

Acinetobacter ile AgNO_3 kullanılarak AgNP üretilmiş ve 390 nm'de yüzey plazmon rezonansına bağlı absorpsiyon piki elde edilmiştir (Shaker ve Shaaban, 2017). İnci darısından izole edilen *Acinetobacter calcoaceticus* ile yapılan iki farklı çalışmadan birincisinde öncü madde olarak hekzakloroplatinik asit (H_2PtCl_6) kullanılarak PtNP'leri üretilmiş ve UV-VIS spektrofotometrede 300 nm'de keskin pik görülmüştür (Gaidhani ve ark., 2014). İkinci çalışmada ise AgNO_3 kullanılmış ve elde edilen keskin pik 420 nm'de kaydedilmiştir (Gaidhani ve ark., 2013).

Titanyum dioksit nanopartikül üretiminin doğrulanması amacıyla 2,16 mM konsantrasyonundaki örnek Bölüm 3.2.4'de açıklandığı şekilde saflaştırıldıktan sonra

NP'ler FESEM ile görüntülenmiştir (Şekil 4.6.). Görüntüleme sonucu *Acinetobacter* sp. MDA1 izolatının ekstraselüler enzimleri ile TiO_2NP 'lerini üretebildiği fakat miktarının az olduğu belirlenmiştir. Bu tespitten sonra optimizasyon çalışmalarına başlanmıştır.

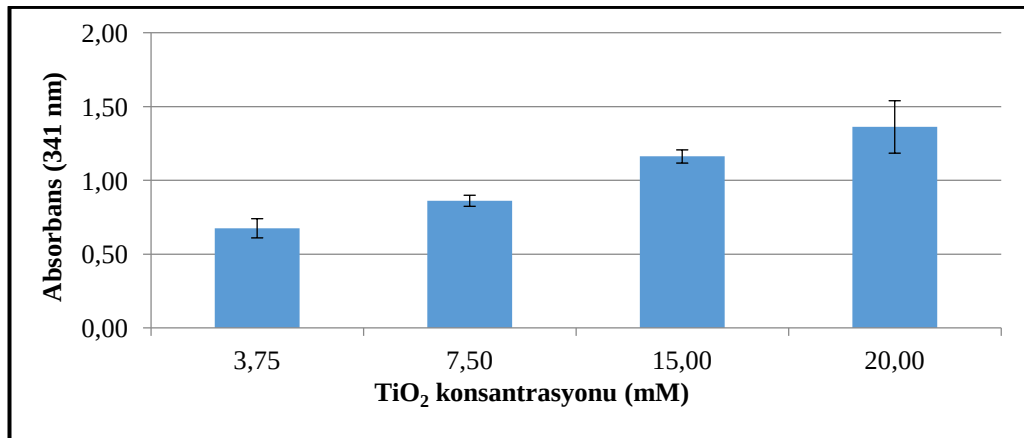


Şekil 4.6. 2,16 mM konsantrasyondaki TiO_2 ile üretilen nanopartiküller

4.2. TiO_2NP 'lerinin Biyosentezi için Yapılan Optimizasyon Çalışmaları

4.2.1. TiO_2NP 'lerinin biyosentezine TiO_2 konsantrasyonunun etkisi

341 nm'de gerçekleştirilen spektrofotometrik analiz sonuçlarına göre artan TiO_2 konsantrasyonuna bağlı olarak absorbansın da arttığı ve en yüksek absorbansın 20 mM TiO_2 konsantrasyonunda olduğu görülmüştür (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. 144 saat sonunda farklı konsantrasyonlarda TiO_2 içeren süpernatantların TiO_2NP üretimine bağlı olarak ölçülen absorbans değerleri

Farklı konsantrasyonlarda üretilen NP'ler, bölüm 3.2.4'de anlatıldığı yöntemle saflaştırılmıştır. Saflaştırma işleminden sonra FESEM cihazında büyütme oranı 50.000 kat olacak şekilde NP'lerin boyut ve şekilleri incelenmiştir. Yapılan morfolojik karakterizasyona göre analiz edilen NP'lerin düzensiz, küre şeklinde olduğu gözlenmiştir. TiO_2 NP'lerinin FESEM görüntüsü ve partikül boyut dağılımı histogramı Şekil 4.8.'de verilmiştir.

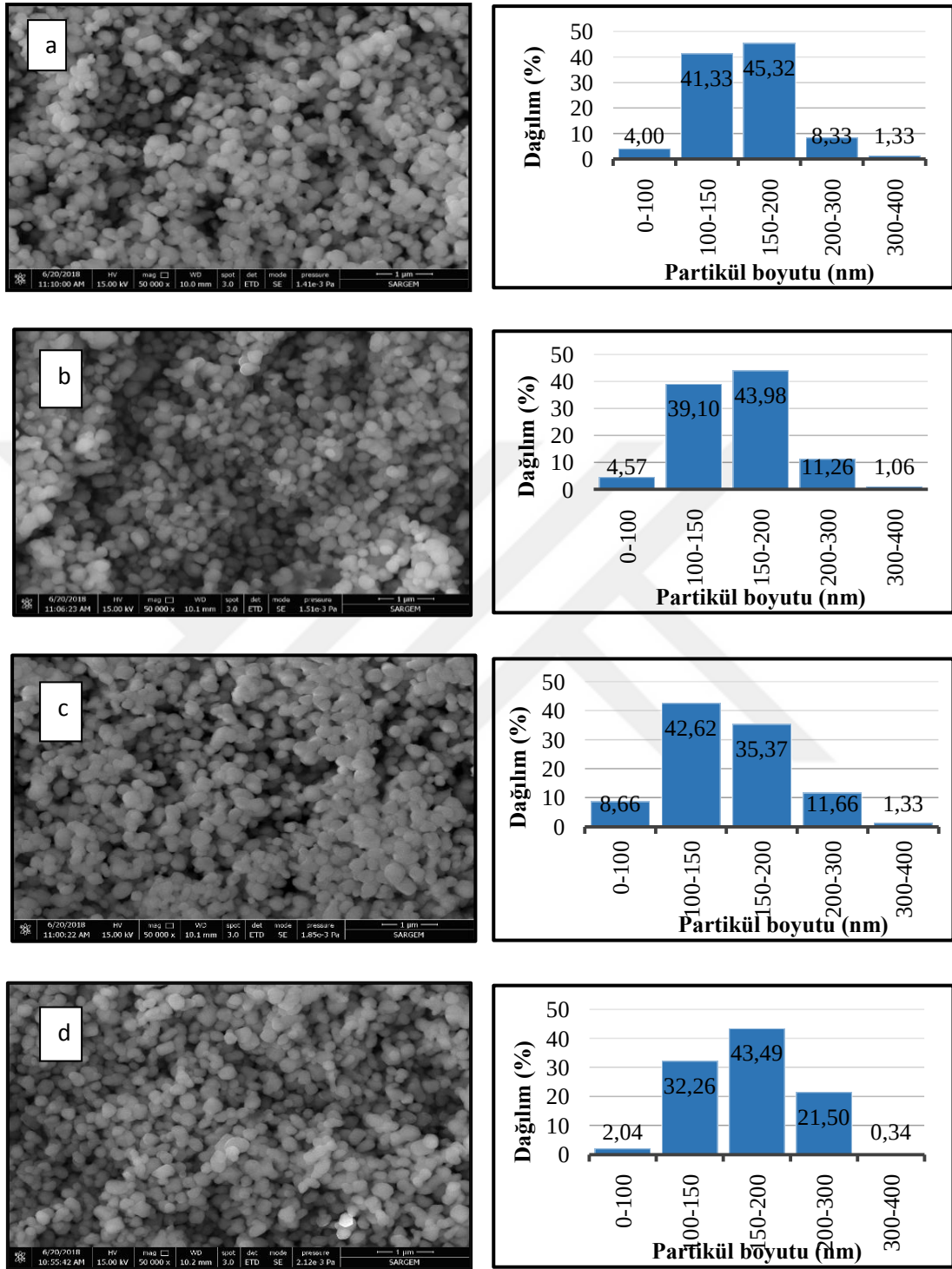
Her bir örnek için ortalama partikül büyüklüğü ve bu büyüklüğün % dağılımı belirlenmiştir. Bu tespit için FESEM analizi esnasında örneklerin farklı bölgelerinden alınan görüntülerde yer alan partiküllerin (270-350 adet) çap uzunlukları ImageJ programı ile ölçülmüştür (Siritantikorn ve ark., 2012). Ortalama partikül büyüklüğü görüntü alınan bölgedeki partiküllerin toplam çap uzunluğunun aynı bölgedeki toplam partikül sayısına bölünmesi ile belirlenmiştir. Partiküllerin FESEM görüntülerine bağlı boyut ve dağılım yüzdeleri Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Farklı konsantrasyonlarda üretilen NP'lerin boyut dağılımı (%)

NP'lerin partikül boyutu dağılımı (%)					
Konsantrasyon	0-100nm	100-150 nm	150-200nm	200-300nm	300-400nm
3,75 mM TiO_2	4,00	41,33	45,32	8,33	1,33
7,50 mM TiO_2	4,57	39,10	43,98	11,26	1,06
15,0 mM TiO_2	8,66	42,62	35,37	11,66	1,33
20,0 mM TiO_2	2,04	32,26	43,49	21,50	0,34

TiO_2 'nin farklı konsantrasyonları ile yapılan çalışmada üretilen TiO_2 NP'lerinin homojen dağılım sergilemediği tespit edilmiştir. 3,75 mM ile 7,50 mM'lık örneklerden gerçekleşen üretimlerin birbirine yakın seyrettiği görülmüştür. Tüm konsantrasyonlarda en fazla üretim ağırlıklı olarak 100-200 nm aralığındadır.

Yapılan spektrofotometrik analiz sonuçlarına göre artan TiO_2 konsantrasyonuna bağlı olarak absorbansın da artış gösterdiği bilinmektedir. Fakat 0-150 nm aralığında toplamda en iyi sonucun 15 mM ile elde edilmesinden dolayı çalışmanın bu konsantrasyonla devam edilmesine karar verilmiştir.



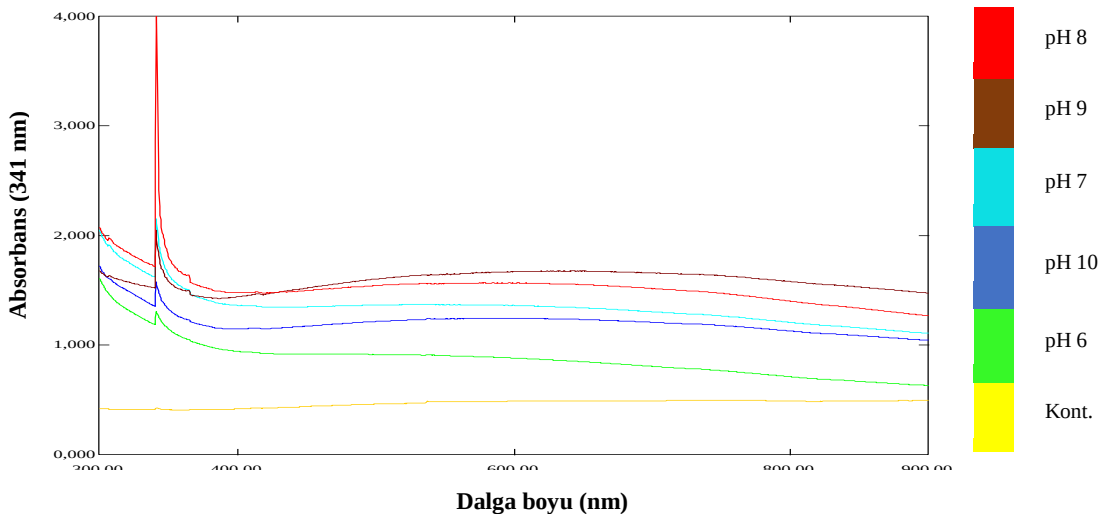
Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda TiO_2 'den üretilen TiO_2NP 'lerinin FESEM görüntüsü ve partikül boyut dağılımı histogramı a) 3,75 mM; b) 7,5 mM; c) 15,0 mM; d) 20,0 mM

Acinetobacter calcoaceticus ile yapılan bir çalışmada AgNO_3 konsantrasyonunun optimizasyonu için 10-50 mM arası beş farklı değerde analizler gerçekleştirilmiş en

iyi sonuç 40 mM'da elde edilmiştir (Gaidhani ve ark., 2013). Annadurai ve arkadaşlarının (2013) yaptıkları çalışmada kullanılan TiO_2 konsantrasyonu 15 mM ve elde edilen TiO_2NP büyüklüğü ortalaması yaklaşık 100-500 nm aralığındadır (Annadurai ve ark., 2013). Prachi'nin (2016) yaptığı çalışmada 25 mM $\text{TiO}(\text{OH})_2$ kullanılarak 30-40 nm büyüklüğünde TiO_2NP 'leri sentezlenmiştir (Singh, 2016).

4.2.2. TiO_2NP 'lerinin biyosentezine pH'nın etkisi

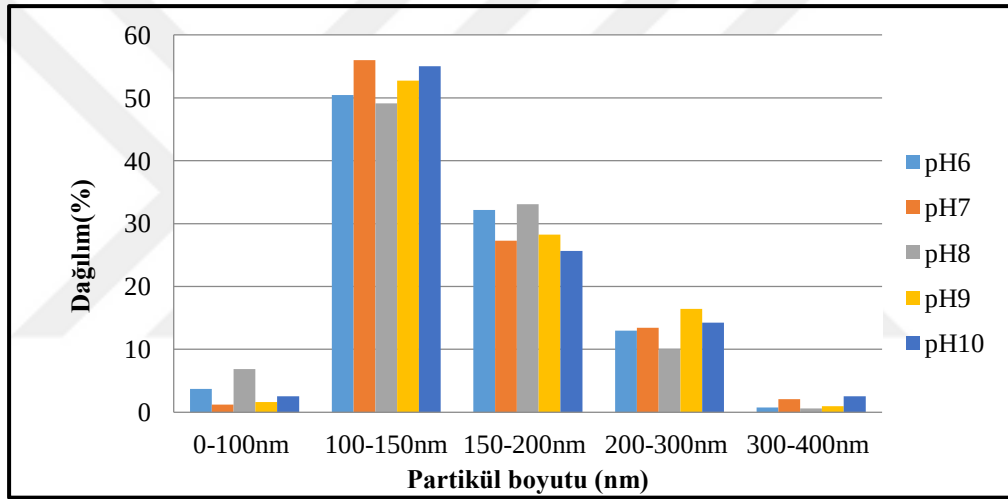
pH'ları beş farklı değer için (pH 6, 7, 8, 9, 10) ayarlanmış 15 mM TiO_2 konsantrasyonundaki süpernatantlar NP üretimleri için test edilmiş ve TiO_2 ilavesiyle örneklerin renginin sarıdan beyaza döndüğü gözlemlenmiştir. Örneklerin tümünün 144 saat sonunda, 341 nm dalga boyunda gerçekleştirilen spektrum taramasında en düşük (pH 6) ve en yüksek (pH 10) pH değerlerinde inkübe edilen örneklere ait absorbans eğrilerinin kontrolden yüksek fakat diğer pH değerlerine göre düşük seviyede olduğu görülmüş ve bu durum, asidik ve bazik pH değerlerinde NP üretiminin daha az gerçekleştiği şeklinde yorumlanmıştır. En iyi sonuç, örneğin kendi pH'sı olan pH 8'de elde edilmiştir. Bu sebeple pH 8 optimum olarak değerlendirilmiş, ayarlama yapmaya gerek kalmaksızın sonraki NP çalışmaları bu pH'da gerçekleştirilmiştir. Örneklerle ait spektrum Şekil 4.9.'da verilmiştir.



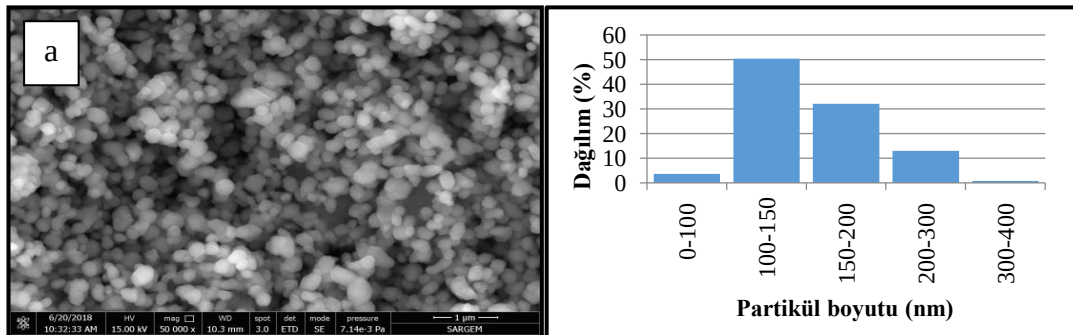
Şekil 4.9. Farklı pH değerlerindeki örneklerin 144 saatlik inkübasyonu sonrasında elde edilen spektrum grafiği

Üretilen nanopartiküllerin boyutlarına göre yüzde dağılımı Şekil 4.10'da, FESEM'de

elde edilen görüntüleri Şekil 4.11.'de verilmiştir. En küçük boyutlu nanopartiküller pH 8'de elde edilmiş olup nanopartiküllerin % 6,9'unun çapı 100 nm'nin altında bulunmuştur. Artan pH'larda ise nanopartikül çapında artış olduğu gözlenmiştir. pH 9 ve pH 10'da gerçekleştirilen üretimlerde 200 nm'den küçük nanopartiküllerin oranları sırasıyla % 82,6 ve % 83,2 olarak belirlenmiştir. pH 8'de gerçekleştirilen üretimde ise bu oran % 89,1 olmuştur. Yurtluk ve arkadaşları (2018) yaptıkları çalışmada beş farklı pH'nın NP üretimine etkisini incelemişler ve artan pH değerine bağlı olarak oluşan nanopartikül boyutlarında da artış tespit etmişlerdir (Yurtluk ve ark., 2018). Bu çalışmada da 300-400 nm boyutunda en fazla üretim pH 10'da elde edilmiş ve NP'lerin büyük oranda aglomere oldukları belirlenmiştir.

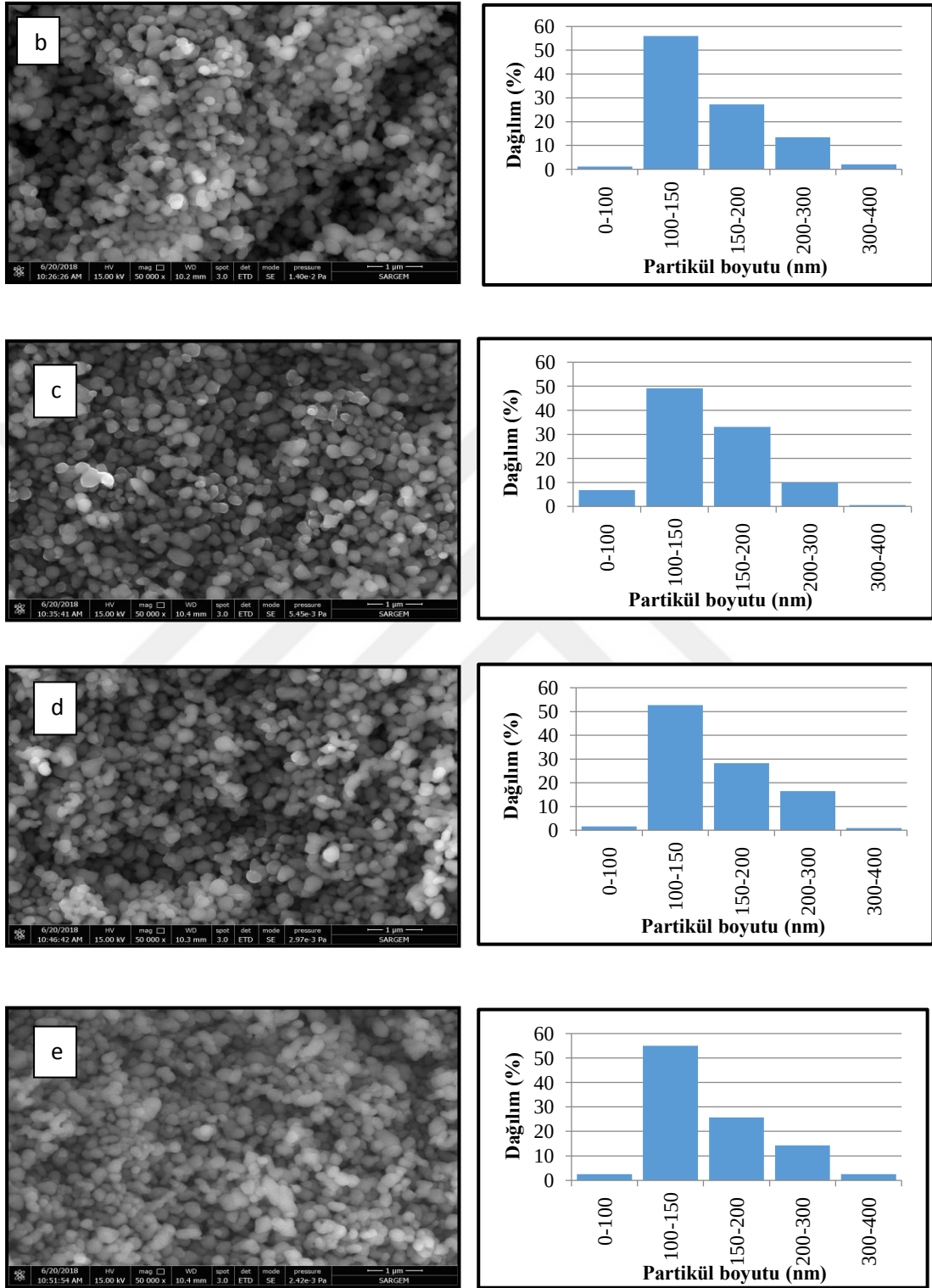


Şekil 4.10. Farklı pH'larda üretilen TiO₂NP'lerinin % dağılımı



Şekil 4.11. Farklı pH değerlerinde üretilen TiO₂NP'lerine ait FESEM görüntüsü ve partikül boyut dağılımı histogramı a) pH 6; b) pH 7; c) pH 8; d) pH 9; e) pH 10

Şekil 4.11. (Devamı)



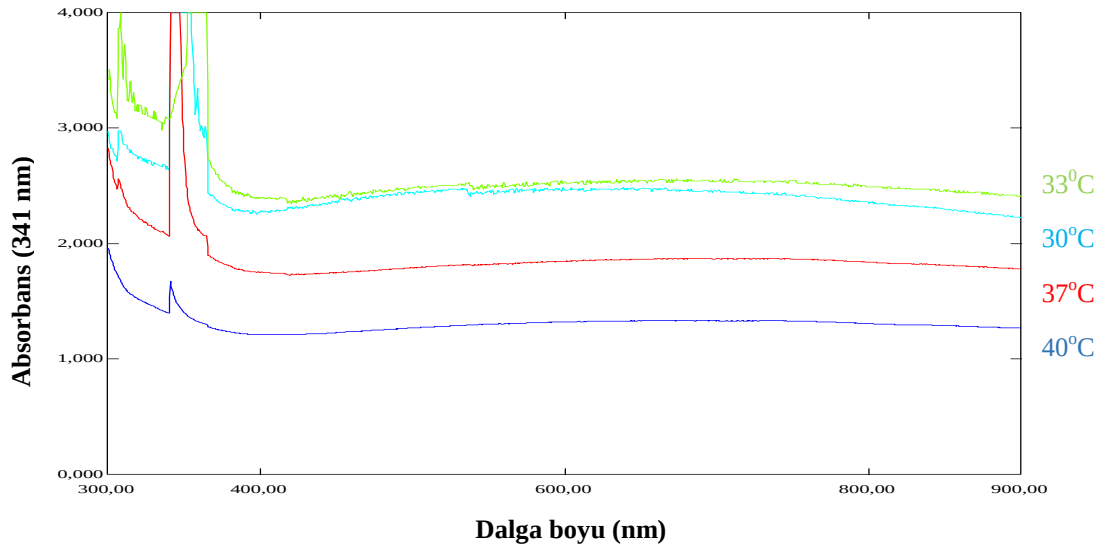
Acinetobacter calcoaceticus ile AgNP üretimi için yapılan çalışmada ortam pH'sı 5 olarak ayarlanmış ve hücre dışı gerçekleşen sentezde 4-40 nm büyüklüğünde NP'ler

elde edilmiştir (Gaidhani ve ark., 2013). *Pennisetum glaucum* bitkisinin rizosfer tabakasından izole edilen *Acinetobacter calcoaceticus* ile PtNP'leri intraselüler olarak pH 7'de üretilmiştir (Gaidhani ve ark., 2014). Başka bir çalışmada *Acinetobacter SW30* ile pH 9'da AuNP'leri üretilmiştir (Wadhwani ve ark., 2018b).

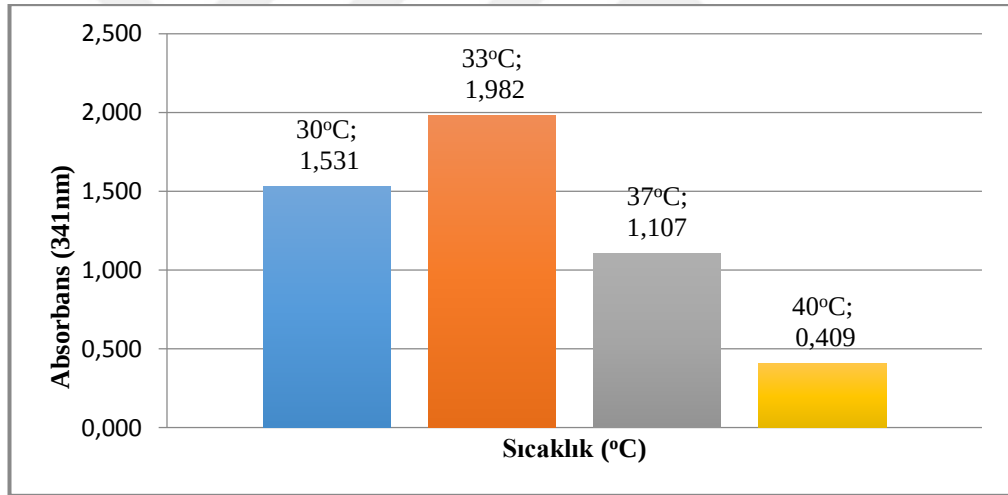
Lactobacillus sp. ve *Sachharomyces cerevisiae* ile tüm koşullar (pH, sıcaklık, süre, öncü madde, konsantrasyon) birbirinin aynı olacak şekilde hazırlanan iki ortamda TiO_2 NP'lerinin biyosentezi gerçekleştirilmiş olmasına rağmen *Lactobacillus* sp.'nin sentezlediği NP'ler ortalama 30 nm boyutunda iken, *Sachharomyces cerevisiae*'nin sentezlediği NP'ler ortalama 18 nm'dir (Jha ve ark., 2009). Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, kullanılan mikroorganizma başta olmak üzere değiştirilen her bir parametre ile elde edilen sonuçlar farklılık göstermektedir. Yurtluk ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada alkali pH'da gerçekleştirilen NP üretiminde nitrat redüktaz enziminin daha aktif çalıştığını ve pH 9'da sentezlenen NP'lerin partikül boyutunun pH 5'te sentezlenenlere göre daha küçük olduğunu bildirmişlerdir (Yurtluk, 2018).

4.2.3. TiO_2 NP'lerinin biyosentezine reaksiyon sıcaklığının etkisi

Reaksiyon sıcaklığının NP üretimine etkisinin belirlenmesi amacıyla dört farklı ortam sıcaklığında (30, 33, 37, 40°C) çalışılmıştır. 341 nm'de ölçülen absorbans değerleri arasında en yüksek sonuç 33°C'de inkübe edilen örnekte görülmüştür. Sıcaklık arttıkça üretim azalmış, 40°C'deki üretim oldukça düşük bulunmuştur. (Şekil 4.12.) Bu durumun NP'lerin indirgenmesinden sorumlu redüktaz enzimlerinin yüksek sıcaklıklarda etkinliğinin azalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Biyolojik yollarla gerçekleştirilen TiO_2 NP biyosentezinde 2009 yılında yapılan bir çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* ile 60°C'de (Jha ve ark., 2009), Malarkodi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise *Planomicrobium* sp. ile 50°C'de üretim gerçekleştirilmiştir (Annadurai ve ark., 2013). *Aeromonas hydrophila* kullanılarak gerçekleştirilen biyosentezde sıcaklık 30°C iken (Jayaseelan ve ark., 2013), *Aspergillus flavus* ile 37°C'de üretim gerçekleştirilmiştir (Rajakumar ve ark., 2012a).



Şekil 4.12. Farklı sıcaklık değerlerindeki örneklerin 144 saatlik inkübasyonu sonrasında elde edilen spektrum grafiği

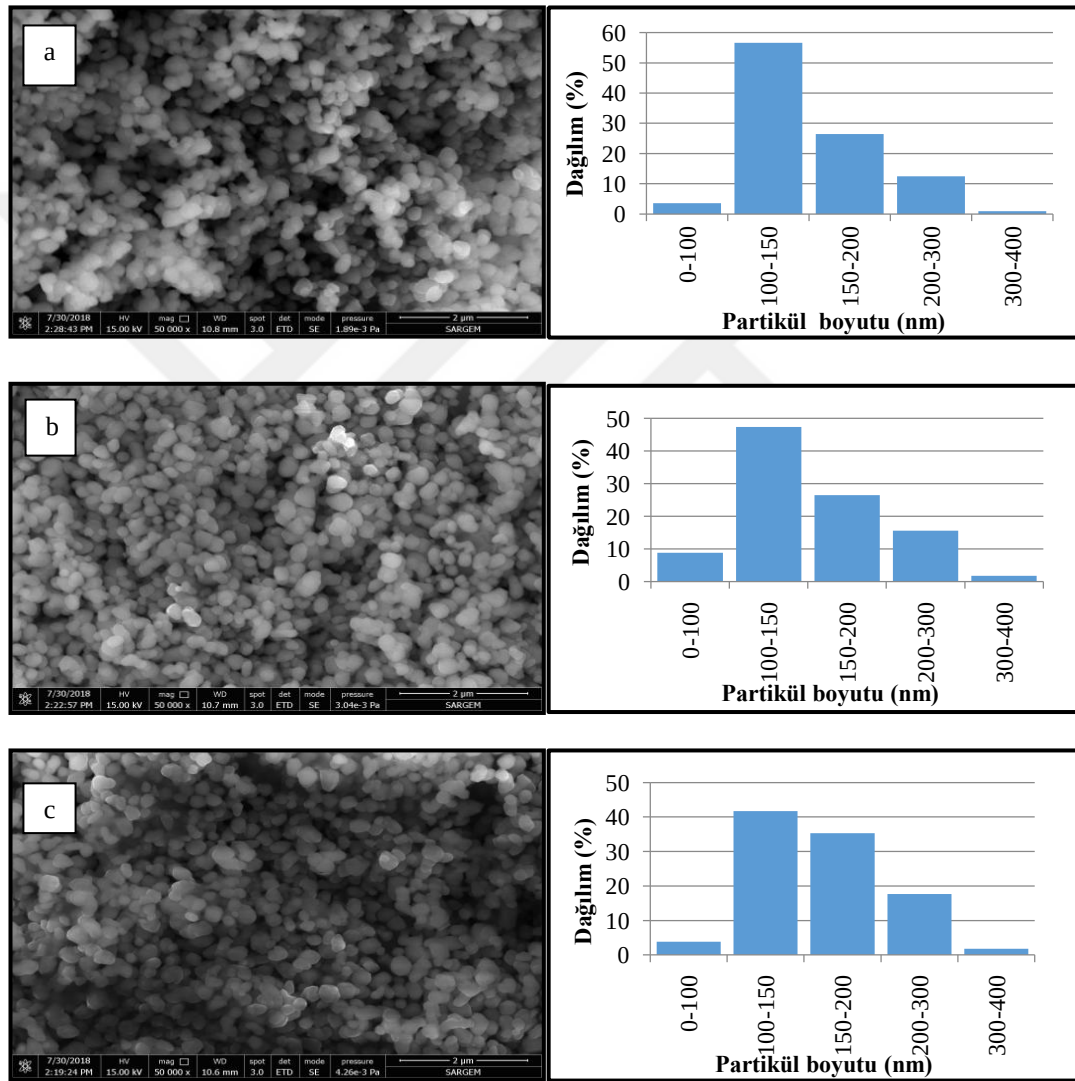


Şekil 4.13. TiO_2NP üretimi için farklı sıcaklıklarda inkübe edilen örneklerin 144 saat sonunda 341 nm’de okunan absorbans değerleri

Farklı sıcaklıklarda üretilen partiküllerin 144 saat sonunda okunan absorbans değerleri Şekil 4.13’de, FESEM görüntüleri ve boyut dağılımları Şekil 4.14.’te verilmiştir. 0-100 nm aralığındaki dağılım yüzdeleri incelendiğinde en fazla üretimin (% 8,8), 33°C’de gerçekleştiği görülmektedir. Tüm sıcaklıklarda en yüksek üretim 100-150 nm boyutundadır. 30, 33, 37 ve 40°C sıcaklıklarda elde edilen 150 nm’den küçük boyuttaki nanopartiküllerin toplam oranı ise sırası ile %60,2; %56,2; %45,6 ve %49,1 olarak belirlenmiş olup, küçük boyutlu nanopartikül eldesi için düşük

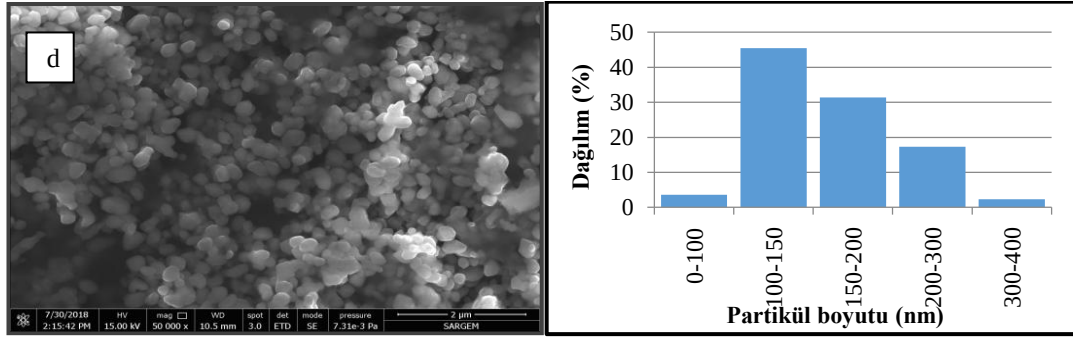
sıcaklıkların daha uygun olduğu anlaşılmıştır. Bu durum FESEM sonuçlarında görülen, artan sıcaklıkla ortaya çıkan aglomerasyonu açıklamaktadır.

Gaidhani ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *Acinetobacter calcoaceticus* ile AgNP üretiminde 25, 30, 37, 42°C olmak üzere dört farklı sıcaklıkta çalışılmış ve optimum olarak 42°C tespit edilmiştir (Gaidhani ve ark., 2013).



Şekil 4.14. Farklı sıcaklıklarda üretilen TiO₂NP'lerine ait FESEM görüntüsü ve partikül boyut dağılımı histogramı a) 30°C; b) 33°C; c) 37°C; d) 40°C

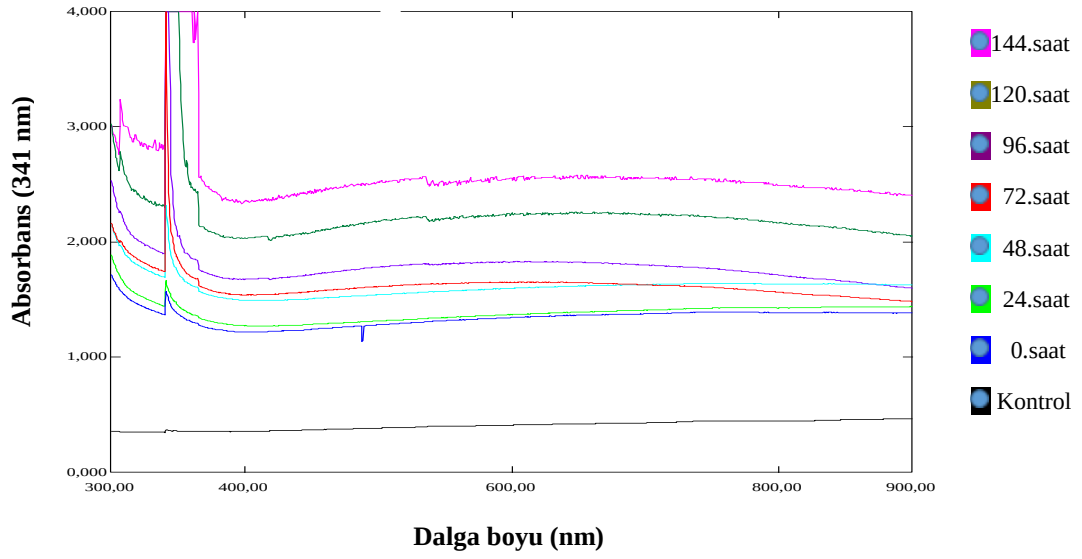
Şekil 4.14. (Devamı)



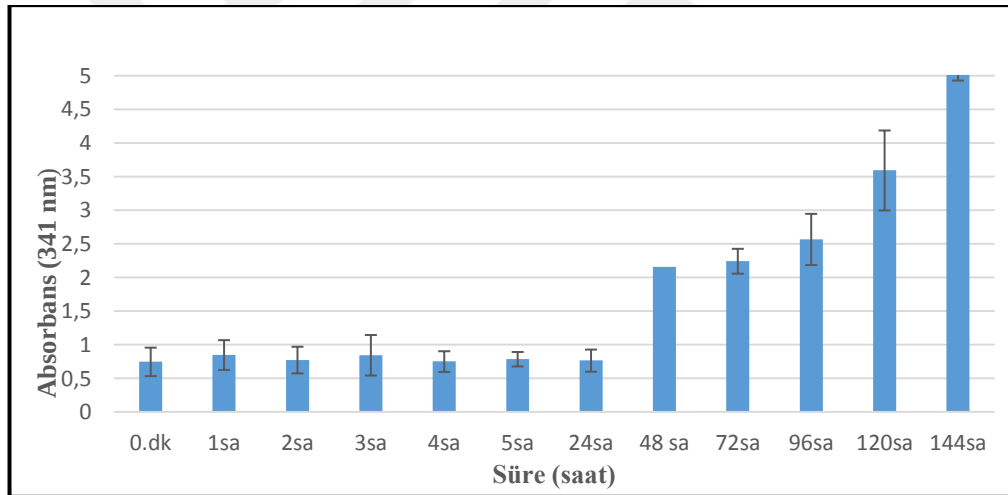
4.2.4. TiO₂NP'lerinin biyosentezine inkübasyon süresinin etkisi

İnkübasyon süresinin nanopartikül oluşumundaki etkisini belirlemek amacıyla, 15 mM TiO₂ konsantrasyonu, 33°C sıcaklık ve pH 8 parametrelerinde çalışılmış, biyosentezin başlangıcında ilk 5 saatte her saat başı, sonrasında her 24 saatte 0,5 mL örnek alınıp damıtık su ile 7,5 mL'ye tamamlanarak spektrofotometrik analizi yapılmış ve TiO₂NP üretiminin zamana bağlı değişimi gözlenmiştir. İnkübasyonun başlangıcında ortamdan alınıp seyreltilen örnek 0. saat kabul edilmiş ve NP üretimi 144 saat süreyle izlenmiştir. Kontrol olarak süpernatanta eş hacimde damıtık suya örneklerin konsantrasyonuna eş miktarda TiO₂ ilave edilmiştir.

Spektruma göre kontrolle karşılaştırıldığında 0. saatte bir miktar üretim gerçekleşmiş ve bu durum yaklaşık 24 saat devam etmiştir. Şekil 4.15.'deki ortalama absorbans değerleri grafiği de bu durumu desteklemektedir. 48, 72, 96 ve 120. saatlerde NP üretimi artmış, 144. saatte en yüksek absorbans değerine ulaşmıştır.



Şekil 4.15. TiO_2NP 'lerinin zamana bağlı spektumları



Şekil 4.16. 15 mM TiO_2 konsantrasyonunda, pH 8 ve 33°C 'de inkübe edilen örneklerin zamana bağlı TiO_2NP üretiminin 341 nm'de ölçülen absorbans değerleri grafiği

Şekil 4.16.'da, 341 nm'de ölçülen absorbans değerleri grafiğinde 48. saatte görülen belirgin yükselme, NP'lerin elementel forma indirgenme işleminin bu saate ciddi artış gösterdiği şeklinde yorumlanmaktadır.

Farklı mikroorganizmalarla yapılan çalışmalar incelendiğinde inkübasyon süresi olarak genellikle 48. saatin tercih edildiği görülmektedir (Vishnu Kirthi ve ark., 2011; Annadurai ve ark., 2013; Gaidhani ve ark., 2013; Durairasu ve ark., 2017;

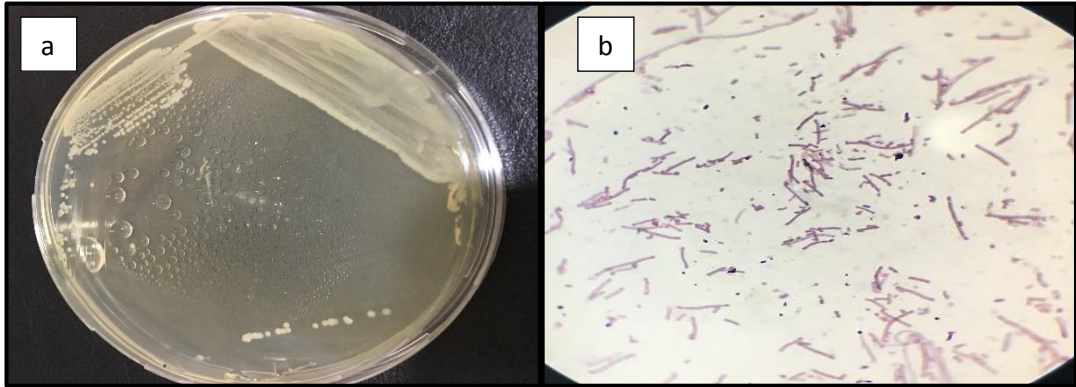
Purohit ve ark., 2017). Biyosentezlerin endüstriyel ölçekte olmamasından dolayı bu tercihin yapıldığı düşünülmektedir.

4.3. *Acinetobacter* sp. MDA1 İzolatının Tanımlanması

4.3.1. Gram Boyama

MDA1 izolatının morfolojik ve bazı biyokimyasal özelliklerini belirlemek için Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de açıklandığı şekilde Gram boyama ve Spor boyama yapılarak (Şekil 4.17.) hücreler ışık mikroskobunda incelenmiştir (Holt ve ark., 1994).

Yapılan 16S rDNA dizi analizine göre MDA1 olarak kodlanan bakterinin, Genbank veri tabanında bulunan DNA dizileri ile karşılaştırılması sonucu, *Acinetobacter* türü ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu tür, Gram negatif, spor oluşturmeyen, fermantatif olmayan, hareketsiz, genelde çiftler halinde ya da uzun zincir şeklinde bulunan kokobasillerdir (Çalışkan, 2008). Yapılan analizde spor oluşumu gözlenmemiştir. Bu özellik *Acinetobacter*'lerin karakteristiğinde mevcuttur.

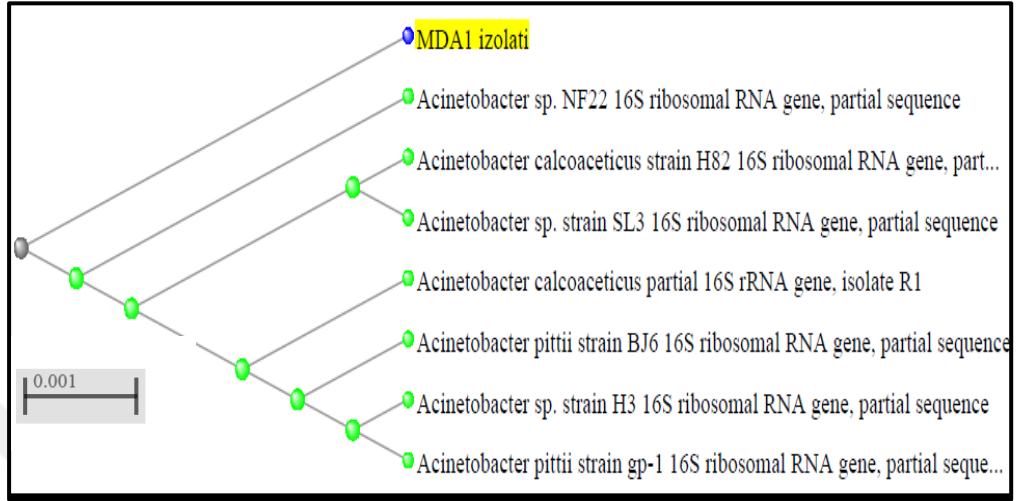


Şekil 4.17. a) Tek koloniye düşürme, b) Gram boyama

4.3.2. Filogenetik analiz

Bakterinin moleküler tanımlanmasında 16S rDNA dizi analizinden yararlanılmıştır. Yapılan çalışmada MDA1 izolatının genomunun 16S rDNA gen bölgesinden 921 adet baz dizisi belirlenmiştir. Elde edilen DNA dizisi Genbank veritabanında bulunan bütün DNA dizileri ile Blastn programı yardımı ile karşılaştırılmış, kendisine en

yakın genetik komşuları olan mikroorganizmalardan *Acinetobacter calcoaceticus* ve *Acinetobacter pittii* ile %96 oranında benzer bulunmuş ve Şekil 4.18.'de verilen filogenetik dendogramı oluşturulmuştur (Liu ve ark., 2015; URL-2, 2019).

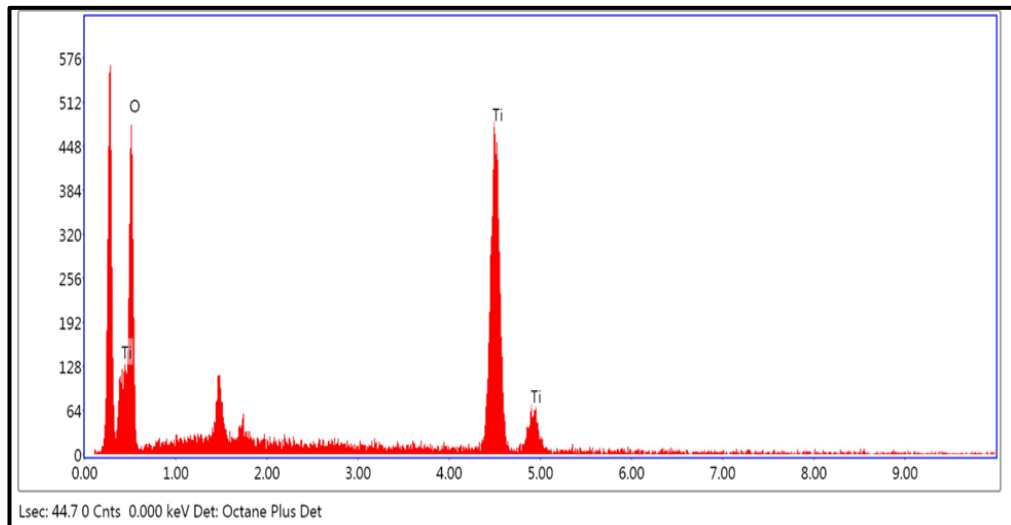


Şekil 4.18 *Acinetobacter* MDA1 bakterisine ait filogenetik ağaç

4.4. TiO₂NP'lerine Ait Karakterizasyon Çalışmaları

4.4.1. EDX analizi

EDX analizi numunenin kimyasal kompozisyonu ve saflığı hakkında bilgi vermektedir. TiO₂NP'lerine ait EDX spektrumu Şekil 4.19.'da verilmiştir.



Şekil 4.19. TiO₂NP'lerine ait EDX spektrumu

Kırınım deseninde görülen keskin pikler, yüksek saflıkta kristal yapıya işaret etmektedir (Sunkar ve ark., 2014). Bu bilgiye göre elde edilen sonuç *Acinetobacter* MDA1 bakterisinin ürettiği nanopartiküllerin saf kristal yapıda olduğunu göstermektedir. 27°'de görülen pik TiO₂'in rutil yapısıyla % 100 benzerdir.

Analizde elde edilen verilerin tümünde nanopartiküllerin rutil formda olduğu bildirilmiştir. Sonuçlar 98-000-0090 veri tabanıyla örtüşmektedir. Vishnu Kirthi ve arkadaşlarının (2011) yaptıkları çalışmada, *Bacillus subtilis*'in sentezlediği TiO₂NP'lerine ait XRD kırınım deseninde hem rutil, hem anataz yapı tespit edilmiştir. Rutil formda raporlanan 27° ve 41°'deki pikler bu çalışmayı desteklemektedir. Suriyaraj ve Selvakumar'ın (2014) yaptıkları çalışmada *Bacillus licheniformis*'in hücre dışı sentezlediği, 900°C'de kalsine edilmiş ve rutil yapıda olduğu belirlenmiş TiO₂NP'leri ile bu çalışmada biyosentezi gerçekleştirilen NP'ler kırınım deseninde aynı derecelerde pik vermiştir.

2013 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada *Aeromonas hydrophila* ile öncü madde olarak 5mM TiO(OH)₂ kullanılmış, 30°C'de 24 saat inkübasyon sonunda rutil yapıda TiO₂NP'ler elde edilmiştir (Jayaseelan ve ark., 2013). XRD kırınım deseninde elde edilen pikler bu çalışma ile örtüşmektedir.

Eclipta prostrata yapraklarından elde edilen ekstrakt kullanılarak biyosentezi gerçekleştirilen TiO₂NP'lerinin XRD sonuçları incelendiğinde NP'lerin tümünün rutil yapıda oldukları ve bu çalışmada da bulunan aynı açılarda pikler elde edildiği görülmüştür (Rajakumar ve ark., 2012b).

4.5. TiO₂NP'lerinin Antimikrobiyel Aktivitesi

Acinetobacter'in hücre dışı enzimleri ile nano boyuta indirgenen TiO₂ partikülleri farklı konsantrasyonlarda kullanılarak, Gram pozitif ve Gram negatif bazı bakteriler üzerinde antimikrobiyal etki oluşturup oluşturmadığını belirlemek amacıyla agar disk difüzyon ve kuyu yöntemleri uygulanmıştır. 3.3.3.'de açıklanan işlem sonrasında *S. aureus* ve *Salmonella* Typhimurium 'da zon görülmemiştir.

Titanyum dioksit nanopartiküllerinin bakteriler üzerindeki fotokatalitik aktivitesinde NP'lerin kristal yapısı, konsantrasyonu, bakterinin türü ve başlangıç popülasyonu, materyalin hazırlanma koşulları, sıcaklık, pH, TiO_2NP 'leri ile mikroorganizma arasındaki mesafe ve gelişme ortamındaki TiO_2NP 'lerinin homojen dağılımı gibi faktörler etkilidir (Long ve ark., 2014).

Titanyum dioksitin antibakteriyel etkisinin TiO_2 yüzeyi ile su molekülü arasında gerçekleşen reaksiyon sonucu olduğu tespit edilmiştir. TiO_2 ultraviyole ışıma maruz bırakıldığında $\text{OH}^\cdot$, $\text{O}_2^\cdot$, $\text{HO}_2^\cdot$ ve H_2O_2 gibi serbest radikaller meydana gelir. Bu radikallerin sebep olduğu oksidasyondan dolayı bakteri canlılığını yitirmektedir (Jayaseelan ve ark., 2013). Jiang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (2009) TiO_2NP 'nin karanlık bir ortamda inkübe edilen bakterilere karşı antibakteriyel özellik göstermediği, bunun sebebinin de ışık olmadığında reaktif oksijen cisimcikleri üretilmediği için NP'lerin toksik etkide bulunamaması olarak ifade edilmiştir (Jiang ve ark., 2009). Bu çalışmada kullanılan inkübatörler dolayısıyla inkübasyonlar karanlık ortamda gerçekleştirildiğinden, antimikrobiyal etki görülmemiş olması olasıdır.

Farklı pH'larda (5,5; 7,0 ve 9,5) sentezlenen TiO_2NP 'lerinin *E. coli* üzerindeki toksik etkisini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada pH 5,5'te canlı hücre sayısı % 0,1-1 iken, pH 7'de bu oran % 60-70 seviyesinde tespit edilmiş, pH 9,5'te ise % 97-100'e ulaşmıştır. Çalışmada kullanılan ve % 76 anataz, %11 rutil, % 13 amorf yapı gösteren nanopartiküllerin izoelektrik noktası pH 7 civarındadır. pH 5,5'in altında ve 9,5'in üzerinde olduğunda NP'ler net pozitif ve negatif yük sergilemektedirler. Ayrıca aralarındaki yüksek elektrostatik çekimden dolayı stabil bir yapı göstermektedirler. pH 5,5'te tamamen pozitif yüklü NP'ler bakterinin yüzeyi tarafından çekilmekte, yapışıp membran yüzeyinde birikmekte ve bakteride toksik etki göstermektedir. Diğer taraftan pH 9,5'te NP'ler negatif yüklüdür ve bakteri yüzeyi tarafından itilmektedirler, hücre duvarına tutunamamaları sebebiyle de toksik etki gösterememektedirler. İsoelektrik noktaya eşit pH'da ise düşük seviyede fakat belirgin toksik etki görülmektedir. NP'ler nötr durumda iken bakterinin yüzey yapısındaki bileşenlerle zayıf etkileşim gösterirler daha çok birbirleriyle aglomere

olma eğilimindedirler. Bu durumda yapılan ölçümler NP yüzeyinin yükü ile toksik etkisi arasında yakın bir korelasyon olduğunu ispatlamıştır (Pagnout ve ark., 2012). Pagnout'un yaptığı çalışmadan (2012) farklı olarak bu çalışmada elde edilen TiO₂NP'leri % 100 rutil yapıda ve kimyasal yöntemlerle değil biyolojik olarak sentezlenmiştir. Fakat izoelektrik nokta tespit edilerek farklı pH'da elde edilecek NP'ler ile antimikrobiyal testler tekrarlanabilir.

4.6. TiO₂NP'lerinin Antifungal Aktivitesi

Agar disk difüzyon yöntemi kullanılarak TiO₂NP'lerinin antifungal etkisi incelenmiştir. İnkübasyon sonlandırıldığında TiO₂NP'leri inoküle edilmiş disklerin etrafında zon oluşmadığı görülmüştür.

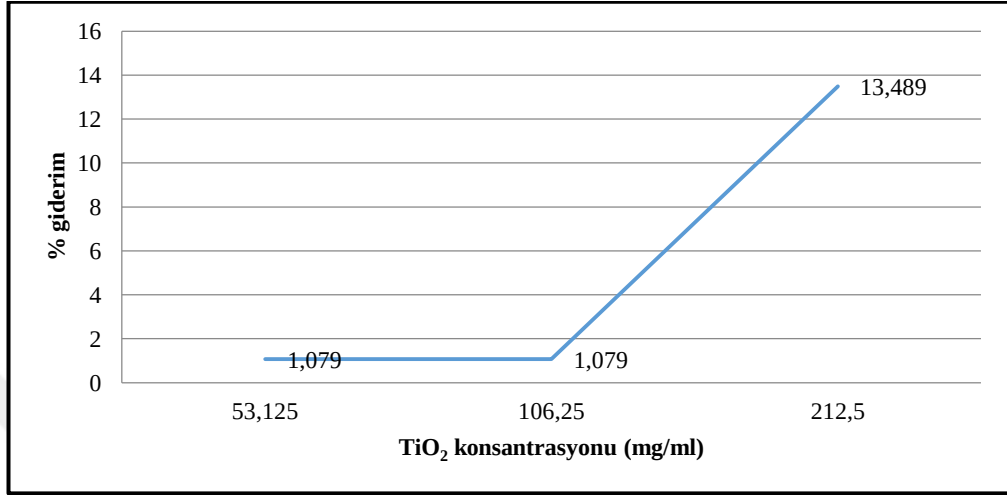
Planomicrobium sp. tarafından biyosentezi gerçekleştirilen TiO₂NP'lerinin farklı konsantrasyonları (100 µl, 200 µl, 300 µl, 400 µl) Rose Bengal agarın bileşimine katılarak besiyerleri hazırlanmış, üzerlerine *Aspergillus niger* inoküle edilerek 48 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda artan NP konsantrasyonuna bağlı olarak *A. niger* gelişiminin daha az olduğu belirlenmiştir (Annadurai ve ark., 2013).

Morinda citrifolia yaprakları ile hazırlanan ekstrakt kullanılarak üretilen TiO₂NP'lerinin *Candida albicans* ve *Aspergillus niger*' e karşı antifungal etkisi agar kuyucuk difüzyon metoduyla incelenmiş ve artan NP konsantrasyonuna paralel olarak kuyucukların etrafında oluşan halkanın çapının da arttığı belirlenmiştir (Sundrarajan ve ark., 2017).

4.7. TiO₂NP'lerinin Antioksidan Aktivitesi

Titanyum dioksit nanopartiküllerinin antioksidan aktivitesi, DPPH radikalini yakalama kapasitesinin belirlenmesine dayanmaktadır. DPPH, koyu renkli, kararlı yapıda serbest radikal molekülleri içeren, toz formda, antioksidan analizlerinde kullanılan kimyasal bir maddedir (Gu ve ark., 2018).

Şekil 4.21.'de verilen grafikte çalışmaya dayalı analiz sonucuna göre TiO_2NP 'lerinin 212,5 mg/mL konsantrasyonda % 13,49 oranda antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.21. TiO_2NP 'lerinin DPPH radikalini giderimi

Santhoshkumar ve arkadaşlarının da DPPH yöntemiyle yaptıkları çalışmada (2014) TiO_2NP 'lerinin antioksidan aktivitesinin NP konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak yükseliş gösterdiği doğrulanmıştır (Santhoshkumar ve ark., 2014).

BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yeşil teknoloji olarak adlandırılan nanobiyoteknoloji ile sergilenen yeni bakış açısı ve uygulamalar sayesinde biyolojik yapıların optimum koşulları oluşturularak elde edilen nano boyutta metalik materyaller; nanopartiküller, nano taşıyıcılar ile bakterilerle, biofilm oluşumuyla, enfektif patojenlerle başedebilmek için kimyasal maddelerden uzak, ekolojik bir alternatif gündeme gelmiştir.

Bu çalışmada Sakarya ili Maden Deresi civarından alınan toprak örneğinden izole edilen *Acinetobacter* sp. MDA1 bakterisinin TiO_2NP 'lerinin biyosentezini gerçekleştirebildiği belirlenmiştir. Sentez, süpernatant kullanılarak hücre dışı enzim faaliyetleri sonucu meydana gelmiştir. Başlangıçta bulanık sarı renğinde olan süpernatant, reaksiyon sonunda bulanık beyaz renk almıştır.

Biyosentezi gerçekleştirecek mikroorganizma başta olmak üzere kullanılan başlangıç malzemesi ve konsantrasyonu, ortam pH'sı, reaksiyon sıcaklığı ve süresi gibi parametreler hem nanopartikül üretiminde hem de üretilen nanopartiküllerin boyutları ve şekilleri üzerinde etkilidirler.

Çalışmada optimum üretim koşullarını belirlemek amacıyla farklı konsantrasyon, pH, sıcaklık, inkübasyon süresi parametreleri için paralelli çalışmalar yapılmış ve UV-VIS spektrofotometrede 200-900 nm dalga boyunda gerçekleştirilen spektrum taraması sonuçları da gözönünde bulundurularak 15 mM TiO_2 konsantrasyonunda, 33°C sıcaklıkta ve pH 8'de 144 saat inkübasyon ideal kabul edilmiştir.

Optimum koşullarda sentezlenen NP'lerin FESEM analizi yapılarak partikül boyutlarının ağırlıklı olarak 100-200 nm aralığında ve küre şeklinde olduğu tespit edilmiştir. XRD spektroskopisi ile NP'lerin kristal yapısı belirlenmiştir. Analiz

verilerine göre elde edilen NP'ler %100 rutil yapıdadır. Bu yapının kimyasal kompozisyonu ve saflığı EDX spektroskopisi ile açıklanmıştır. EDX sonuçları elementel titanyum varlığını ve yapıda başka herhangi bir safsızlık unsuru olmadığını doğrulamaktadır.

Titanyum dioksit nanopartiküllerinin bazı bakteriler ve *Candida albicans* üzerindeki antimikrobiyal etkisi incelenmiştir. Nanopartiküllerin özellikle patojen bakteriler üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla geniş çaplı araştırmalar yapılmaktadır. Nanopartiküllerin bakterisidal aktivitesi, geliştikleri besi ortamındaki konsantrasyonlarına, stabilitelere ve büyüklüklerine bağlıdır. Genellikle bakteri hücresi mikrometre büyüklüğünde, dış membrandaki porlar ise nanometre düzeyindedir. Nanopartiküllerin boyutunun porlarınkiden daha küçük olması durumunda hücre zarından kolaylıkla geçebilmektedirler. Bu durumda üretilen NP'lerin ve metaloksit nanomateriyallerin stabilitesi önemlidir. Çalışmada *S. aureus* ve *S. Typhimurium* üzerinde görülen antibakteriyel etki yeterli bulunmamıştır. Antifungal etki ise tespit edilememiştir. Bu duruma ortalama partikül büyüklüğünün yüksek olmasının sebep olabileceği kanısına varılmıştır. Ayrıca bu çalışma kapsamında NP'lerin antioksidan etkisinin olduğu da belirlenmiştir.

Araştırmalar esnasında *Acinetobacter* türleri ile TiO_2NP biyosentezi çalışmasına rastlanmamasından dolayı bu tez literatürde bir ilk olacaktır. Bu mikroorganizmanın biyosentezi ile elde edilen NP'lerin antioksidan ve antibakteriyel aktivitesi için daha detaylı analizler yapılması, partikül boyutunun küçültülmesi, NP'lerin stabilizasyonu, farklı ışımalarda (Görünür - UV) uyarılmış TiO_2NP 'lerinin hücrelerin canlılığı üzerindeki etkisi, zeta potansiyel ölçümleri ile aglomerasyona ait daha detaylı veriler elde edilerek çalışmanın genişletilebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abisharani, J. M., Devikala, S., Kumar, R. D., Arthanareeswari, M., Kamaraj, P. 2019. Green synthesis of TiO₂ Nanoparticles using Cucurbita pepo seeds extract. Materials Today: Proceedings. Elsevier Ltd, 14: 302–307.
- Akçay, F. A. 2017. Bazı *Bacillus* suşlarının bakır, çinko ve selenyum nanopartikül üretimlerinin araştırılması. Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, Yüksek Lisans Tezi.
- Akçay, F.A., Avcı, A. 2018. Bakteriyel Yollarla Metal Nanopartiküllerin Sentezi. Türk Tarım - Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 6(7): 840–849.
- Ali, J., Ali, N., Wang, L., Waseem, H., Pan, G. 2019. Revisiting the mechanistic pathways for bacterial mediated synthesis of noble metal nanoparticles. Journal of Microbiological Methods. Elsevier, 159(February): 18–25.
- Annadurai, G., Malarkodi, C., Chitra, K., Rajeskumar, S., Gnanajobitha, G., Paulkumar, K., Vanaja, M. 2013. Novel eco-friendly synthesis of titanium oxide nanoparticles by using *Planomicrobium* sp. and its antimicrobial evaluation. Der Pharmacia Sinica. Pelagia Research Library , 4(3): 59–66.
- Baykara, T., Günay, V., Musluoğlu, E. (2010). Nanoteknoloji ve nano-malzeme süreçleri. Tübitak MAM.
- Benli, B. 2009. Nanoteknoloji ve antik çağlara uzanan killi nanoyapılar, Kil Bilimi ve Teknolojisi Dergisi, 1(3): 143–162.
- Çalışkan, A. 2008. *Acinetobacter*’lerde direnç ve klonal ilişkinin araştırılması. İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi.
- Dasgupta, N., Ranjan, S., Mundekkad, D., Ramalingam, C., Shanker, R., Kumar, A. 2015. Nanotechnology in agro-food: From field to plate. Food Research International. Elsevier Ltd, 69: 381–400.
- Demirbilek Erol, M. 2015. Tarımda ve gıdada nanoteknoloji. Gıda ve Yem Bilimi - Teknolojisi Dergisi. 15: 46-53.

- Dhandapani P, Maruthamuthu S, Rajagopal G. 2012. Bio-Mediated Synthesis of TiO₂ Nanoparticles and its Photocatalytic Effect on Aquatic Biofilm. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 110: 43-49. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.03.003>.
- Duncan, T. V. 2011. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science*. Elsevier Inc., 363(1): 1–24.
- Durairasu, M., Arunagirinathan, N., Hemapriya, J., Vijayanand, S. 2017. Antagonistic activity of biogenic TiO₂ nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. 6(3): 2485–2495.
- Ersöz, Mustafa., Işıtan, A., Balaban. M. 2018. Nanoteknoloji 1, Nanoteknolojinin temelleri. BilalOfset Basım-Yayın ve Matbaacılık, 1-274.
- Forootanfar, H., Adeli-Sardou, M., Nikkhoo, M., Mehrabani, M., Amir-Heidari, B., Shahverdi, A. R., 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*. Elsevier GmbH., 28(1), pp. 75–79.
- Francisco, E. V., García-Estapa, R. M. 2018. Nanotechnology in the agrofood industry. *Journal of Food Engineering*. Elsevier, 238(May): 1–11.
- Gaidhani, S., Singh, R., Singh, D., Patel, U., Shevade, K., Yeshvekar, R., Chopade, B. A. 2013. Biofilm disruption activity of silver nanoparticles synthesized by *Acinetobacter calcoaceticus* PUCM 1005. *Materials Letters*. Elsevier, 108: 324–327.
- Gaidhani, S. V., Yeshevekar, R. K., Shedbalkar, U.U., Bellare, J.H., Chopade, B.A. 2014. Bio-reduction of hexachloroplatinic acid to platinum nanoparticles employing *Acinetobacter calcoaceticus*. *Process Biochemistry*. Elsevier Ltd, 49(12): 2313–2319.
- Garcia, M. A. Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications. *Journal of Physics D: Applied Physics*, IOP Publishing, 2011, 44 (28), pp.283001.
- Ghormade, V., Deshpande, M. V., Paknikar, K. M. 2011. Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc., 29(6): 792–803.
- Gilmartin, N., O’Kennedy, R. 2012. Nanobiotechnologies for the detection and reduction of pathogens. *Enzyme and Microbial Technology*. Elsevier Inc., 50(2): 87–95.
- Gopinath, V., Velusamy, P. 2013. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Bacillus sp* . GP-23 and evaluation of their antifungal activity towards *Fusarium oxysporum*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 106:170–174.

- Gu, H., Chen, X., Chen, F., Zhou, X., Parsaee, Z. 2018. Ultrasound-assisted biosynthesis of CuO-NPs using brown alga *Cystoseira trinodis*: Characterization , photocatalytic AOP , DPPH scavenging and antibacterial investigations. *Ultrasonics - Sonochemistry*. Elsevier, 41(July 2017): 109–119.
- Gürmen, S., Ebin, B. 2010. Nanopartiküller ve Üretim Yöntemleri - 1. TMMOB Metalurji Mühendisleri Odası, pp. 31–38.
- Hamad, A. F., Han, J. H., Kim, B. C., Rather, I. A. 2018. The intertwine of nanotechnology with the food industry. *Saudi Journal of Biological Sciences*. King Saud University, 25(1): 27–30.
- He, X., Deng, H., Hwang, H. 2018. The current application of nanotechnology in food and agriculture. *Journal of Food and Drug Analysis*. Elsevier Ltd, 27(1): 1–21.
- He, X., Hwang, H. M. 2016. Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment. *Journal of Food and Drug Analysis*. Elsevier Ltd, 24(4): 671–681.
- Hiremath, L., Kumar S, N., Sukanya, P. 2018. Development of Antimicrobial Smart Textiles Fabricated with Magnetite Nano Particles Obtained Through Green Synthesis. *Materials Today: Proceedings*. Elsevier Ltd, 5(10): 21030–21039.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T., Gram-negative aerobic/microaerophilic rods and cocci, in: W.R. Hensyl (Ed.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Baltimore, 1994, pp. 71-174. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.12.002>.
- Iavicoli, I., Leso, V., Beezhold, D. H., Shvedova, A. A. 2017. Nanotechnology in agriculture: Opportunities , toxicological implications , and occupational risks. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Elsevier Inc., 329: 96–111.
- İlyasoğlu H., El S. N. 2010. Nanoemülsiyonlar: Oluşumları, yapıları ve kolloidal salınım sistemleri olarak gıda sektöründe kullanım alanları. *GIDA*, 35(2): 143-150.
- Jayaseelan, C., Abdul Rahuman, A., Roopan, S. M., Vishnu Kirthi, A., Venkatesan, J., Kim, S., Iyappan, M., Siva, C. 2013. Biological approach to synthesize TiO₂ nanoparticles using *Aeromonas hydrophila* and its antibacterial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 107: 82–89.
- Jha, A. K., Prasad, K., Kulkarni, A. R. 2009. Synthesis of TiO₂ nanoparticles by using microorganisms. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* 71: 226–229.
- Jiang, W., Mashayekhi, H. and Xing, B. 2009. Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles. *Environmental Pollution*. Elsevier Ltd, 157(5): 1619–1625.

- King, T., Osmond-McLeod, M. J., Duffy, L. L. 2018. Nanotechnology in the food sector and potential applications for the poultry industry. *Trends in Food Science and Technology*, 72(November 2017): 62–73.
- Kokangül, G., Fenercioğlu, H. 2012. Gıda Endüstrisinde Akıllı Ambalaj Kullanımı. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 7(2): 31–43.
- Kumar, A., Chisti, Y., Chand, U. 2013. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc., 31(2): 346–356.
- Li, L., Ma, W., Cheng, X., Ren, X., Xie, Z., Liang, J. 2016. Synthesis and characterization of biocompatible antimicrobial N-halamine-functionalized titanium dioxide core-shell nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Elsevier B.V., 148: 511–517.
- Li, X., Xu, H., Chen, Z., Chen, G. 2011. Biosynthesis of Nanoparticles by Microorganisms and Their Applications. *Journal of Nanomaterials*.
- Liu, H., He, J., Zhao, R., Chi, C., Bao, Y. 2015. A novel biomarker for marine environmental pollution of pi-class glutathione S-transferase from *Mytilus coruscus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Elsevier, 118: 47–54.
- Long, M., Wang, J., Zhuang, H., Zhang, Y., Wu, H., Zhang, J. 2014. Performance and mechanism of standard nano-TiO₂ (P-25) in photocatalytic disinfection of foodborne microorganisms *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. Elsevier Ltd, 39: 68–74.
- Machado, S., Pinto, S. L., Grosso, J. P., Nouws, H. P. A., Albergaria, J. T., Delerue-Matos, C. 2013. Green production of zero-valent iron nanoparticles using tree leaf extracts', *Science of the Total Environment*, The. Elsevier B.V., 445–446: 1–8.
- Manchanda, V., Sanchaita, S., Singh, N. P. 2010. Multidrug resistant *Acinetobacter*. *Journal of Global Infectious Diseases*. 2(3): 291–304.
- Matteis, V. D., Cascione, M., Brunetti, V., Toma, C. C., Rinaldi, R. 2016. Toxicity assessment of anatase and rutile titanium dioxide nanoparticles: The role of degradation in different pH conditions and light exposure. *Toxicology in Vitro*. Elsevier B.V., 37: 201–210.
- Mihindukulasuriya, S. D. F., Lim, L. T. 2014. Nanotechnology development in food packaging: A review. *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd, 40(2): 149–167.
- Mukhopadhyay, D., Sarkar, G., Mukherjee, P., Mandal, D., Bolander, M. E. 2006. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. *Microbial Biotechnology*. 69: 485–492.
- Neethu, S., Midhun, S. J., Radhakrishnan, E. K., Jyothis, M. 2018. Green synthesized silver nanoparticles by marine endophytic fungus *Penicillium polonicum* and its antibacterial efficacy against biofilm forming , multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microbial Pathogenesis*. Elsevier Ltd, 116(November 2017): 263–272.

- Oliveira, J. L., Campos R, E.V., Bakshi, M., Abhilash, P. C., Fraceto, L. F. 2014. Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises. *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc., 32(8): 1550–1561.
- Órdenes-Aenishanslins, N. A., Saona, L. A., Duran-Toro, V. M., Monras, J. P., Bravo, D. M., Perez-Donoso, J. M. 2014. Use of titanium dioxide nanoparticles biosynthesized by *Bacillus mycoides* in quantum dot sensitized solar cells. *Microbial Cell Factories*, 13(1): 1–10.
- Pagnout, C., Jomini, S., Dadhwal, M., Caillet, C., Thomas, F., Bauda, P. 2012. Role of electrostatic interactions in the toxicity of titanium dioxide nanoparticles toward *Escherichia coli*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Elsevier B.V., 92(2012): 315–321.
- Prakash, A., Sharma, S., Ahmad, N., Ghosh, A., Sinha, P. 2010. Bacteria mediated extracellular synthesis of metallic nanoparticles. *International Research Journal of Biotechnology*. 1(5): 071-079.
- Purohit, A., Rai, S. K., Chownk, M., Sangwan, R. S., Clea, M. 2017. Xylanase from *Acinetobacter pittii* MASK 25 and developed magnetic cross-linked xylanase aggregate produce predominantly xylopentose and xylohexose from agro biomass. *Bioresource Technology*. Elsevier, 244(August): 793–799.
- Rajakumar G, Rahuman AA, Roopan SM, Khanna VG, Elango G, Kamaraj C, Zahir AA, Velayutham K: 2012a. Fungus-mediated biosynthesis and characterization of TiO₂ nanoparticles and their activity against pathogenic bacteria. *Spectrochim Acta Part A*, 91:23–29.
- Rajakumar, G., Rahuman, A., Priyamvada, B., Khanna, V., Kumar, D., Sujin, P. 2012b. *Eclipta prostrata* leaf aqueous extract mediated synthesis of titanium dioxide nanoparticles. *Materials Letters*. Elsevier B.V., 68: 115–117.
- Sağlam, N., Emül, E. 2016. Bilimlerin Buluşma Noktası : Nanoteknolojiye Kısa Bir Bakış. *YENİ TÜRKİYE*. 88/2016 : 1–4.
- Santana, M. A., Moccia-V, C. C., Gillis, A. E. 2008. *Bacillus thuringiensis* improved isolation methodology from soil samples. *Journal of Microbiological Methods*, 75: 357–358
- Santhoshkumar, T., Abdulrahuman, A., Jayaseelan, C., Rajakumar, G., Marimuthu, S., Kirthi, A. V., Velayutham, K., Thomas, J., Venkatesan, J., Kim, S. 2014. Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Psidium guajava* extract and its antibacterial and antioxidant properties. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. Hainan Medical College, 7(12): 968–976.
- Sanvicens, N., Pastells, C., Pascual, N., Marco, M. P. 2009. Nanoparticle-based biosensors for detection of pathogenic bacteria. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier Ltd, 28(11): 1243–1252.

- Saratale G. R., Karuppusamy I., Saratale, G.D., Pugazhendhi. A., Kumar, G., Park, Y., Ghodake, G. S., Bharagava, R. N., Banu, J. R., Shin, H. S. 2018. A comprehensive review on green nanomaterials using biological systems: Recent perception and their future applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Elsevier, 170(December 2017): 20–35.
- Servin, A. D., White, J. C. 2016. Nanotechnology in agriculture: Next steps for understanding engineered nanoparticle exposure and risk. *NanoImpact*. Elsevier B.V., 1: 9–12.
- Sezer, E., Ayhan, Z., Çelikkol, T., Güner, F., 2017. Zeolit Katkılı Aktif Polietilen Ambalaj Malzemesinin Kivi Meyvesinin Kalite Özellikleri Ve Raf Ömrüne Etkisi. *Gıda / The Journal of Food*, 42(3): 277–286.
- Shaker, M. A., Shaaban, M. I. 2017. Synthesis of silver nanoparticles with antimicrobial and anti-adherence activities against multidrug-resistant isolates from *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Taibah University Medical Sciences*. Elsevier Ltd, 12(4): 291–297.
- Sharfudeen M, B.F.J., Latheer A, A.F., Ambrose, R.V. 2017. Synthesis and characterization of TiO₂ nanoparticles and Investigation of Antimicrobial Activities against Human Pathogens. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 9(9): 1604–1608.
- Singh, P. 2016. Biosynthesis of Titanium Dioxide Nanoparticles and Their Antibacterial Property. *International Journal of Chemical and Molecular Engineering*. 10(2): 275–278.
- Siritantikorn, S., Jintaworn, S., Noisakran, S., Suputtamongkol, Y., Paris, D. H., Blacksell, S. D. 2012. Application of ImageJ program to the enumeration of *Orientia tsutsugamushi* organisms cultured in vitro. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106(10): 632–635.
- Socas-Rodríguez, B., Gonzales-Salamo, J., Hernandez-Borges, J., Rodriguez-Delgado, M. A. 2017. Recent applications of nanomaterials in food safety. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 96: 172–200.
- Souza, V. G. L., Fernando, A. L. 2016. Nanoparticles in food packaging: Biodegradability and potential migration to food. *Food Packaging and Shelf Life*. Elsevier Ltd, 8: 63–70.
- Subhapriya S., Gomathipriya P. 2018. Green synthesis of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles by *Trigonella foenum-graecum* extract and its antimicrobial properties. *Microbial Pathogenesis*, 116: 215–220.
- Sundrarajan, M., Bama, K., Bhavani, M., Jegatheeswaran, S., Ambika, S., Sangili, A., Nithya, P., Sumathi, R. 2017. Obtaining titanium dioxide nanoparticles with spherical shape and antimicrobial properties using *M. citrifolia* leaves extract by hydrothermal method. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*. Elsevier, 171(May): 117–124.

- Sunkar, S., Nachiyar, C. V., Lerensha, R., Renugadevi, K. 2014. Biogenesis of TiO₂ nanoparticles using endophytic *Bacillus cereus*. Journal of Nanoparticle Research, 16(11): 2681.
- Suriyaraj, S. P., Selvakumar, R. 2014. Room temperature biosynthesis of crystalline TiO₂ nanoparticles using *Bacillus licheniformis* and studies on the effect of calcination on phase structure and optical properties. RSC Adv. Royal Society of Chemistry, 4(75): 39619.
- Şener, A. G. 2011. Elektro Üretim Yöntemiyle Sodyum Aljinat ve Mısır Nişastası İçeren Nanolif Eldesine Etki Eden Faktörlerin İncelenmesi. İstanbul Teknik Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Gıda Mühendisliği Bölümü. Yüksek Lisans Tezi.
- Talebi, S., Ramezani, F., Ramezani, M. 2010. Biosynthesis of Metal Nanoparticles by Microorganisms. 12. - 14. 10. Olomouc, Czech Republic, EU.
- Tolochko, N. K. 2009. History of nanotechnology. (1-6). Nanoscience and Nanotechnologies. Belarus State Agrarian Technical University, Belarus
- Tüylek, Z. 2017. İlaç taşıyıcı sistemler ve nanoteknolojik etkileşim. Bozok Tıp Dergisi. 7(3): 89–98.
- URL-1, <https://nifa.usda.gov/topic/nanotechnology>, Erişim Tarihi: 27.06.2019.
- URL-2 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>, Erişim Tarihi: 24.06.2019.
- Var, I., Sağlam, S. 2015. Gıda Endüstrisinde Nanoteknoloji Uygulamaları. GIDA, 40(2): 101–108.
- Vishnu Kirthi, A., Abdul Rahuman, A., Rajakumar, G., Marimuthu, S., Santhoshkumar, T., Jayaseelan, C., Elango, G., Abduz Zahir, A., Kamaraj, C., Bagavan, A. 2011. Biosynthesis of titanium dioxide nanoparticles using bacterium *Bacillus subtilis*. Materials Letters. Elsevier B.V., 65(17–18): 2745–2747.
- Wadhwani, S. A., Shedbalkar, U. U., Singh, R., Chopade, B. A. 2018a. Biosynthesis of gold and selenium nanoparticles by purified protein from *Acinetobacter* sp. SW30. Enzyme and Microbial Technology. Elsevier, 111(June 2017): 81–86.
- Wadhwani, S. A., Shedbalkar, U. U., Nadhe, S., Singh, R., Chopade, B. A. 2018b. Decolorization of textile dyes by combination of gold nanocatalysts obtained from *Acinetobacter* sp. SW30 and NaBH₄. Environmental Technology & Innovation, 9: 186–197.
- Yurtluk, T., Akçay, F. A., Avcı, A. 2018. Biosynthesis of silver nanoparticles using novel *Bacillus* sp. SBT8. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 1532–2297
- Zhang, R. Q., Lee, S.T., Law, C., Li, W., Teo, B. K. 2002. Silicon nanotubes : Why not ?. Chemical Physics Letters. 364(October): 251–258.

Zhu, Z., Cai, H., Sun, D. 2018. Titanium dioxide (TiO₂) photocatalysis technology for nonthermal inactivation of microorganisms in foods. *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier, 75(November 2017): 23–35.



ÖZGEÇMİŞ

Esin YILMAZ 14.04.1977'de Gölcük/Kocaeli'de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Kocaeli'de tamamladı. 1994 yılında girdiği Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünden aynı yıl ayrılıp, 2012'de 6353 sayılı Af Kanunu'ndan faydalanarak Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünde lisans eğitime tekrar başladı. 2016 yılında lisans mezuniyetinden sonra 2017 yılında Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümde yüksek lisans eğitime başladı. Üç çocuk annesidir. İki yıldır özel sektörde çalışmaktadır.

