

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI *BACİLLUS* SUŞLARININ BAKIR,
ÇİNKO VE SELENYUM NANOPARTİKÜL
ÜRETİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fikriye Alev AKÇAY

Enstitü Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Ayşe AVCI

Aralık 2017

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI *BACILLUS* SUŞLARININ BAKIR,
ÇİNKO VE SELENYUM NANOPARTİKÜL
ÜRETİMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fikriye Alev AKÇAY

Enstitü Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Bu tez 22.12.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr.
Filiz ÖZÇELİK
Jüri Başkanı


Doç. Dr.
Serap C. AKDEMİR
Üye


Yrd. 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.

Fikriye Alev AKÇAY

22.12.2017

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca hiçbir koşulda benden bilgisini ve desteğini esirgemeyen, araştırma ve laboratuvar çalışmalarında beni yalnız bırakmayan, teşvik eden ve yönlendiren değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Ayşe AVCI'ya emekleri için çok teşekkür ederim. Ayrıca yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Doç. Dr. Dilek ANGIN'a da teşekkürlerimi sunarım.

Yaşadığım her an maddi ve manevi desteklerini hep üzerimde hissettiğim; eğitim hayatım süresince karşılaştığım her zorlukta ve güzellikte benimle birlikte olan başta annem Pembe AKÇAY olmak üzere, babam Ali AKÇAY ve ablam Ayça AKÇAY'a çok teşekkür ederim.

Mesai arkadaşlarım Eda KILIÇ KANAK, Elif SEZER ve Haitce SIÇRAMAZ'a; kadim arkadaşım Selin TARAKÇI ile kuzenim Fehmi YILDIZ'a çalışmalarım boyunca verdikleri manevi desteklerden ve yardımlarından ötürü çok teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarında FTIR spektroskopi analizi için Yrd. Doç. Dr. Esra ALTINTIĞ'a; FESEM analizi için Prof. Dr. Hatem AKBULUT ve Uzm. Erdem KILIÇASLAN'a; XRD spektroskopi analizi için Uzm. Fuat KAYIŞ'a; laboratuvardaki yardımları için ise stajyer öğrencimiz Betül ÖZDEMİR'e teşekkür ederim.

Ayrıca bu çalışmanın maddi açıdan desteklenmesine olanak sağlayan Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyon Başkanlığına (Proje No: 2017-50-01-013) 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 ve tarihçesi	3
2.1.2. Nanoteknolojinin kullanım alanları	5
2.1.2.1. Nanoteknolojinin gıda endüstrisinde kullanımı.....	6
2.1.3. Nanopartiküller ve üretim yöntemleri	7
2.1.4. Nanopartiküllerin mikrobiyel sentezi.....	10
2.1.4.1. Nanopartiküllerin mikrobiyel sentez mekanizması.....	11
2.1.4.2. Bakteriyel yollarla metal nanopartiküllerinin üretimi...	13
2.1.5. Selenyum ve selenyum nanopartikülleri.....	14
2.1.5.1. Selenyum nanopartiküllerinin bakteriler aracılığı ile biyosentezi üzerine yapılan çalışmalar.....	17
2.2. <i>Bacillus</i> Cinsi Bakteriler.....	18
2.2.1. <i>Bacillus</i> cinsi bakterilerin genel özellikleri.....	18

2.2.2. <i>Bacillus</i> cinsi bakterilerle yapılan nanopartikül üretim çalışmaları.....	19
--	----

BÖLÜM 3.

MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1. Materyal	21
3.1.1 Kullanılan mikroorganizmalar.....	21
3.1.2. Kullanılan araç-gereçler.....	22
3.1.3. Kullanılan besiyerleri.....	22
3.1.4. Kullanılan kimyasallar ve çözeltiler.....	24
3.2. Yöntem	25
3.2.1. Mikroorganizmaların izolasyonu ve muhafazası.....	25
3.2.2. Cu ve ZnNP üretim çalışmaları.....	26
3.2.2.1. Cu ve Zn NP üretme yeteneğinde olan mikroorganizmaların seçimi.....	26
3.2.2.2. Mikroorganizmaların metal dayanımlarının artırılması ve muhafazası.....	26
3.2.2.3. Cu ve ZnNP üretim çalışması.....	27
3.2.3. SeNP üretim çalışmaları.....	27
3.2.3.1. SeNP üretme yeteneğinde olan mikroorganizmaların seçimi.....	27
3.2.3.2. SeNP üretimi için yapılan ön çalışmalar.....	27
3.2.4. SeNP üretimi.....	29
3.2.4.1. İnokulümün optik yoğunluğun ayarlanması	29
3.2.5. SeNP'lerinin üretim koşullarının optimizasyonu.....	29
3.2.5.1. SeO ₂ konsantrasyonunun SeNP üretimine etkisinin belirlenmesi.....	29
3.2.5.2. pH'nın SeNP üretimine etkisinin belirlenmesi.....	30
3.2.5.3. Sıcaklığın SeNP üretimine etkisinin belirlenmesi.....	30
3.2.5.4. Inkübasyon süresinin SeNP üretimine etkisinin belirlenmesi.....	30
3.2.6. SeNP'lerinin optimum koşullarda üretimi ve saflaştırılması..	30

3.3. Laboratuvar analizleri.....	31
3.3.1. <i>Bacillus</i> sp. EKT1 izolatının tanımlanması için yapılan analizler.....	31
3.3.2. SeNP'lerinin karakterizasyonu.....	32
3.3.2.1. FESEM analizi.....	32
3.3.2.2. EDX spektroskopi analizi.....	32
3.3.2.3. FTIR spektroskopi analizi.....	32
3.3.2.4. XRD analizi.....	33
3.3.3. SeNP'lerinin antimikrobiyel aktivitesinin belirlenmesi.....	34
3.3.4. SeNP'lerinin anti- <i>Candida</i> aktivitesinin belirlenmesi.....	35
3.3.5. SeNP'lerinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi.....	35
 BÖLÜM 4.	
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	37
4.1. Cu ve ZnNP Üretimi.....	37
4.1.1. Cu ve Zn metallerine dirençli mikroorganizmalar.....	37
4.1.2. Cu ve ZnNP üretim çalışması bulguları.....	39
4.2. SeNP Üretim Çalışmaları.....	40
4.2.1. <i>Bacillus</i> izolatının seçimi.....	40
4.2.2. SeNP üretimi için yapılan ön çalışmalar.....	40
4.3. SeNP Üretimi için Yapılan Optimizasyon Çalışmaları.....	44
4.3.1. SeO ₂ konsantrasyonunun SeNP üretimine etkisi.....	44
4.3.2. pH'nın SeNP üretimine etkisi.....	49
4.3.3. Reaksiyon sıcaklığının SeNP üretimine etkisi.....	53
4.3.4. İnkübasyon süresinin SeNP üretimine etkisi.....	54
4.4. <i>Bacillus</i> sp. EKT1 İzolatının Tanımlanması.....	56
4.5. Üretilen SeNP'leri için Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları.....	59
4.5.1. EDX analizi.....	59
4.5.2. FTIR analizi.....	60
4.5.3. XRD analizi.....	62
4.6. SeNP'lerinin Antimikrobiyel Aktivitesi.....	64
4.7. SeNP'lerinin Antifungal Aktivitesi.....	65

4.8. SeNP'lerinin Antioksidan Aktivitesi.....	66
4.9. SeNP'lerinin Stabilitesi.....	67

BÖLÜM 5.

SONUÇ VE ÖNERİLER.....	69
------------------------	----

KAYNAKLAR	71
-----------------	----

ÖZGEÇMİŞ	80
----------------	----



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Au	: Altın
°C	: Santigrat derece
Cr	: Krom
Cu	: Bakır
CuNP	: Bakır nanopartikülü
dk	: Dakika
DPPH	: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
EDX	: Enerji dağılımlı X-ışını
Fe	: Demir
FESEM	: Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi ışın
g	: Gram
HCl	: Hidroklorik asit
L	: Litre
mg	: Miligram
MIK	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
M. Ö.	: Milattan önce
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
N	: Normal/Normalite
NaOH	: Sodyum hidroksit
NA	: Nutrient agar
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NB	: Nutrient broth

NP	: Nanopartikül
nm	: Nanometre
OD	: Optik yoğunluk
pH	: Pondus hidrojeni
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
rDNA	: Ribozomal deoksiribo nükleik asit
Se	: Selenyum
SeNP	: Selenyum nanopartikülü
sp.	: Alt tür
Ti	: Titanyum
TSA	: Tyriptic soy agar
TSB	: Tyriptic soy broth
UV-VIS	: Morötesi-görünür bölge
XRD	: X-ışını kırınımı
YPG	: Maya ekstraktlı peptonlu glukoz
YPR	: Yüzey plazmon rezonansı
Zn	: Çinko
ZnNP	: Çinko nanopartikülü

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Nanopartiküllerin oluşum mekanizması	9
Şekil 2.2. Nanopartiküllerin hücre içi üretiminin şematik gösterimi	12
Şekil 2.3. Altın NP'lerinin <i>R. capsulata</i> tarafından hücre dışı sentezi	13
Şekil 4.1. <i>Bacillus</i> sp. EKT1 izolatının farklı besiyeri ortamlarındaki gelişimi a) Katkısız NA'da; b) SeO ₂ katkılı NA'da	40
Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonda SeO ₂ katkılı süpernatantlar için gözlenen zamana bağlı renk değişim görüntüsü	41
Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonda SeO ₂ içeren süpernatantların 72 saatlik inkübasyon sonundaki spektrum grafiği	42
Şekil 4.4. 5,6 mM SeO ₂ konsantrasyonundaki süpernatantın 96 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen spektrum grafiği	43
Şekil 4.5. <i>Bacillus</i> sp. EKT1 izolatı aracılığıyla 5,6 mM SeO ₂ içeren süpernatanttan üretilen SeNP'lerinin FESEM görüntüsü	43
Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda SeO ₂ içeren süpernatantlardan SeNP'lerinin üretimi sonrası (96 saat) okunan absorbans değerleri	44
Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda SeO ₂ 'ten üretilen SeNP'lerinin FESEM görüntüsü ve partikül boyut dağılımı histogramı a) 3,8 mM; b) 4,7 mM; c) 5,6 mM; d) 6,5 mM; e) 7,4 mM; f) 8,2 mM; g) 9,0 mM	47
Şekil 4.8. Farklı SeO ₂ konsantrasyonlarında üretilen SeNP'lerinin ortalama partikül büyüklüğü	48
Şekil 4.9. Farklı SeO ₂ konsantrasyonlarında üretilen SeNP'lerinin % dağılımı	48
Şekil 4.10. Farklı pH değerlerindeki SeNP üretim ortamlarının 96 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen spektrum grafiği	50
Şekil 4.11. Farklı pH değerlerinde üretilen SeNP'lerine ait FESEM görüntüsü ve partikül boyut dağılımı histogramı a) pH 7; b) pH 9	51

Şekil 4.12. Farklı sıcaklıklarda (30°C, 33°C, 40°C, 45°C) 96 saat inkübe edilen SeNP üretim ortamlarının 568 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri grafiği	53
Şekil 4.13. Farklı sıcaklıklarda üretilen SeNP'lere ait FESEM görüntüsü ve partikül boyut dağılımı histogramı a) 30°C; b) 33°C; c) 40°C	54
Şekil 4.14. SeNP'lerinin zamana bağlı spektrumları	55
Şekil 4.15. <i>Bacillus</i> sp. EKT1 izolatına ait 100 x objektifle elde edilen mikroskop görüntüsü	56
Şekil 4.16. <i>Bacillus</i> EKT-1 bakterisine ait 16S rDNA gen dizi analiziyle elde edilen filogenetik ağaç	57
Şekil 4.17. SeNP'lerine ait EDX spektrumu	60
Şekil 4.18. Farklı pH'larda üretilen SeNP'lerinin Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektrumu	61
Şekil 4.19. Biyosentezlenmiş SeNP'lerinin XRD kırınım deseni	63
Şekil 4.20. SeNP ve SeO ₂ 'in DPPH radikalini giderim etkinliği	67
Şekil 4.21. Üretilen SeNP'lerinin 3 ay sonraki FESEM görüntüsü (Üretim koşulları: pH 7, 6,5 mM SeO ₂ , 30°C, 96 saat)	68

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2.1. Bazı bakterilerin ürettiği metal NP'leri	13
Tablo 2.2. SeNP'lerini sentezleyen bazı bakteriler	18
Tablo 2.3. Bazı <i>Bacillus</i> cinsi bakteriler aracılığı ile üretilen metal NP'leri	19
Tablo 3.1. Farklı kaynaklardan elde edilmiş <i>Bacillus</i> cinsine ait izolatlar	21
Tablo 4.1. Bakır sülfat ve çinko sülfat katkılı (1 mM) NA besiyerinde gelişme gösteren <i>Bacillus</i> cinsine ait izolatlar	38
Tablo 4.2. EKT1 izolatının <i>Bacillus</i> sp. türleri ile 16s rDNA benzerlik oranı	57
Tablo 4.3. <i>Bacillus</i> sp. EKT1 izolatının farklı antibiyotik ilaçlara karşı antimikrobiyel duyarlılığı	58
Tablo 4.4. Üretilen SeNP'lerinin elementel kompozisyonu	60

ÖZET

Anahtar Kelimeler: *Bacillus*, nanopartikül, biyosentez, selenyum

Bu çalışmada, bazı toprak ve gıda örneklerinden izole edilen *Bacillus* suşlarının bakır, çinko ve selenyum nanopartiküllerini üretim yetenekleri araştırılmıştır. Nanopartikül (NP) üretimi, bakterilerin nutrient broth besiyerinde geliştirilmesinin ardından santrifüj ile ayrılmaları sonucu elde edilen hücresiz sıvının kullanımı ile gerçekleştirilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda kullanılan 34 adet izolatın bakır ve çinko NP'lerini üretme yeteneğinde olmadığı anlaşılmıştır. Bunun yanında, çalışma kapsamında Kocaeli ilinden alınan bir toprak örneğinden izole edilen *Bacillus* sp. EKT1 suşunun selenyum nanopartiküllerini (SeNP) ürettiği belirlenmiştir. Bu nedenle, çalışmaya bu bakteri tarafından SeNP üretimi ile devam edilmiş; NP üretimine pH (3-11), sıcaklık (30-45°C), SeO₂ konsantrasyonu (3,5-9,0 mM) ve reaksiyon süresinin (0-96 saat) etkisi belirlenmiştir. SeNP oluşumu rengin açık sarıdan kiremit kırmızısına dönüşmesi ile ve oluşan rengin absorbansının UV-VIS spektrofotometrede 568 nm dalga boyunda ölçülmesi ile takip edilmiştir.

Çalışılan pH aralığında sadece pH 7 ve 9'da SeNP üretimi gerçekleşmiştir. Spektrofotometrik ölçümlere göre en iyi üretim 6,5 mM SeO₂ konsantrasyonuna sahip, pH'sı 9,0 olan ortamda, 33°C'de ve 96 saatte gözlenmiştir. Ayrıca, üretim koşullarının oluşan NP boyutuna etkisi NP'lerin alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FESEM) analizi yapılarak belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre, üretilen NP'lerin ortalama boyutunun 50-150 nm olduğu belirlenmiştir. En küçük partikül boyutu 5,6 mM SeO₂ konsantrasyonuna sahip ortamda elde edilirken, artan SeO₂ konsantrasyonlarının ise NP boyutunun artmasına yol açtığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, pH 9,0'da da NP boyutunun arttığı ve yine bu pH'da agregasyonun gerçekleştiği gözlenmiştir. 33°C'de en küçük boyutlu NP'ler sentezlenmiş, artan ve azalan sıcaklıklarda ise NP boyutu artmıştır. NP'lerin Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ile analizi yapılmış ve biyolojik moleküllerin NP'lere kaplama ajanı görevi yaptığı ortaya konmuştur. X-ışını kırınımı (XRD) spektroskopisi ile yapılan analiz sonucunda oluşan NP'lerin amorf yapıda olduğu saptanmıştır. SeNP'lerinin antimikrobiyel ve antifungal özelliğe sahip olmadığı; ancak antioksidan aktivitesinin bulunduğu saptanmıştır.

INVESTIGATION OF THE PRODUCTIONS OF COPPER, ZINC, AND SELENIUM NANOPARTICLES BY SOME *BACILLUS* STRAINS

SUMMARY

Keywords: *Bacillus*, nanoparticle, biosynthesis, selenium

In this study, the abilities of *Bacillus* strains isolated from some soil and food samples to produce copper, zinc, and selenium nanoparticles were investigated. Nanoparticle (NP) production was performed using cell-free extract obtained after centrifugation of the bacteria that were grown on nutrient broth medium.

A total of 34 isolates were used in the study and none of them were able to produce copper and zinc NPs. Besides, a novel strain that was isolated from a soil sample collected from Kocaeli province has produced selenium nanoparticles (SeNPs). For that reason, the study was continued by using this bacterium for SeNPs production. The effects of pH (3-11), temperature (30-45°C), SeO₂ concentration (3.5-9.0 mM) and reaction time (0-96 hours) on the synthesis of NPs were determined. The formation of SeNPs was inspected by observing the color change from light yellow to brick-red and by measuring the absorbance at 568 nm using a UV-VIS spectrophotometer.

SeNPs production was realized only at pH 7 and 9 in the pH range studied. According to spectrophotometric measurements, the best production was achieved in the medium contained 6.5 mM SeO₂ concentration at pH 9.0 and 33°C in 96 hours. Furthermore, the effects of the 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 the analysis, it was determined that the average sizes of NPs synthesized were between 50 and 150 nm. The smallest sizes of NPs were obtained in the medium having 5.6 mM SeO₂, on the other hand increased SeO₂ concentrations led to an increase in the size of NPs. In addition, the size of NPs also increased at pH 9, and this pH caused the aggregation of NPs. The smallest NPs were synthesized at 33°C and the sizes increased at temperatures below and over 33°C. NPs were analyzed by Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy and it was revealed that the biological molecules served as the capping agents for the NPs. X-ray diffractometer (XRD) analysis indicated that the NPs were amorphous. SeNPs did not have antimicrobial and antifungal properties; however antioxidant activity was detected.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Nanomalzemelerin temel özelliklerini inceleyen bir bilim dalı olan nanoteknoloji, geniş uygulama yelpazesi ile son yıllarda ilgiyi üzerine çekmektedir. Nanoteknoloji genel bir ifade ile, materyali en az bir boyutu 1 ile 100 nm arasında olacak şekilde manüpile etme işlemidir. Sağlık, enerji, elektronik ve uzay endüstrisi gibi alanlarda yapılan nanoteknoloji araştırmaları her geçen gün artmaktadır. Farklı uygulamalar için nanopartikül, nanotüp ve nanoteller gibi farklı nanomalzemeler kullanılmaktadır. Nanopartiküller kristal, küresel, amorf vb. farklı şekil ve boyutlarda bulunabilmektedir. Yığınsal (hacimsel) hallerinden farklı fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler sergileyen nanopartiküllerin özellikleri boyut ve şekillerine bağlı olarak değişmektedir. Nanopartiküllerin üretimi genel olarak fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere üç şekilde gerçekleşmektedir. Bazı kimyasal moleküller biyoaktiviteleri ve nano malzeme olarak kullanım potansiyelleri için test edilse de kimyasal sentez yöntemleri toksik kimyasalların kullanımını gerektirmektedir (Salunke ve ark., 2016).

Kimyasal yöntemlerde kullanılan tehlikeli kimyasallar ve oluşan toksik yan ürünlerle birlikte, fiziksel yöntemler de yüksek enerji gerektiren pahalı yöntemlerdir. Bu sebeple çevre dostu ve daha ekonomik yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bakteri, alg, maya, fungus ve bitki gibi biyolojik sistemlerin kullanıldığı biyolojik üretim yöntemleri çevre dostu ve güvenli olmalarının yanı sıra, kolay uygulanmaları ve ekonomik olmaları sebebiyle diğer yöntemlere alternatif konumdadır. Biyolojik sentez yöntemlerinde mikrobiyel hücreler ya da bitkilerin ekstraktları kullanılmakta, tehlikeli kimyasallara ihtiyaç duyulmamaktadır. Biyosentez işleminde bitki ekstraktında ya da mikroorganizma hücresinde bulunan karbonil gruplar, terpenoidler, fenolikler, flavonlar, aminler, amidler, proteinler, pigmentler ve alkaloidler gibi moleküller ile nanopartiküllerin sentezi gerçekleşmektedir (Mol ve ark., 2015).

Mikrobiyel sentezde metal ya da metal oksit nanopartiküllerinin üretimi hücrenin içinde ya da dışında gerçekleşmektedir (Pereira ve ark., 2015). *Rhodococcus* sp. gibi *Actinomyces* bakterileri, *Pseudomonas* cinsi bazı bakteriler, *Aspergillus flavus* ve *Fusarium oxysporum* fungusları, *Schizosaccharomyces pombe* ve *Saccharomyces cerevisiae* mayaları, bakteriyofajlar ve bazı algler metal NP'lerini başarıyla üreten mikroorganizmalardan bazılarıdır (Shah ve ark., 2015). Yüksek iyonik konsantrasyona dayanıklı olan *Bacillus* cinsi bakteriler doğada toprak ve suda yaygın bulunmaları ve birkaç tür hariç zararsız olmaları sebebiyle kolayca izole edilebilir ve nanopartikül uygulamalarında kullanılabilirler (Karkaj ve ark., 2013).

Bu çalışmada, çeşitli toprak ve gıdalardan izole edilmiş olan ve bu çalışma kapsamında izole edilen toplam 34 adet *Bacillus* izolatının bakır, çinko ve selenyum nanopartiküllerini üretim yetenekleri araştırılmıştır. Selenyum nanopartiküllerini üretme yeteneğinde olduğu belirlenen bir *Bacillus* izolatı (*Bacillus* sp. EKT1) ile nanopartikül üretimi gerçekleştirilmiş, bazı reaksiyon koşullarının (SeO_2 konsantrasyonu, pH, sıcaklık, süre) üretime olan etkisi belirlenmiştir. Ayrıca, üretilen nanopartiküllerin karakterizasyonu yapılarak antimikrobiyel, antifungal ve antioksidan özellikleri belirlenmiştir.

BÖLÜM 2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Nanoteknoloji

2.1.1. Nanoteknolojinin tanımı ve tarihçesi

“Nano” Yunancada cüce anlamına gelen *nanos* sözcüğünden türemiş olup fiziksel bir büyüklüğün 10^{-9} katını belirten bir ön addır. Bir nanometre metrenin 10^{-9} katına, diğer bir deyiş ile milyarda birine denktir. Bir nanometrelik uzunluk içine yan yana 2-3 atom ancak sığarken; yaklaşık 100-1000 adet atomun bir araya gelmesiyle nano yapılar oluşmaktadır. DNA molekülü 2,5 nm genişliğindeyken bir protein 50 nm uzunluğunda, grip virüsü yaklaşık 100 nm boyutunda ve insan saçı yaklaşık 10.000 nm kalınlığındadır. Nanoteknoloji ise genel bir ifade ile, boyutları 1-100 nm aralığında olan canlı/cansız her türlü yapının karakterizasyonunu, yapımını ve işlenmesini ele alan bir bilim dalıdır (Kim, 2008; İlyasoğlu ve El, 2010; Hulkoti ve Taranath, 2014).

Tarihsel açıdan incelendiğinde nanoteknolojinin hangi zaman aralığında doğduğuna dair kesin bir görüş yoktur. Ancak bilinmektedir ki “Nano Çağı”ndan çok öncelerde dahi, insanlar nano ölçekte nesnelere rastlamış ve bu nesneleri kullanmışlardır. M. Ö. yaşamış insanlar binlerce yıl keten, pamuk, yün ve ipeği kumaş yapımında kullanmışlardır. Dokunan bu kumaşları özel kılansa 1-20 nm boyutlarındaki gelişmiş gözenek ağları, diğer bir deyişle nano gözenekli yapılarıdır. Bu doğal kumaşlar nano gözenekli yapıları sayesinde teri iyi emmekte ve çabuk kurumaktadırlar. Nano seviyede kritik fermentasyon işlemlerinin gerçekleştiği ekmek, şarap, bira, peynir gibi gıdaların üretimi de eski çağlara kadar uzanmaktadır. Antik Mısır’da saçların siyaha boyanmasının yaygın olduğu bilinmektedir. Uzun bir süre boyunca bilim insanları boyaların kına gibi doğal bitkisel ürünlerden elde edildiğini düşünmüştür. Ancak mezar sitelerinden alınıp incelenen saç örnekleri göstermiştir ki bu boyalar kireç, kurşun oksit ve az miktarda suyun karışımından oluşmaktadır. Hazırlanan karışım boyama işlemi esnasında saç keratinindeki sülfür ile tepkimeye girmekte ve birkaç

nanometrelik galena (galenit/kurşun sülfür) partiküllerine dönüşmektedir. Bu partiküller, düzgün ve kalıcı bir boyama gerçekleştiren boyanın kendisidir. Nanoteknolojik uygulamalar eski çağlardan beri insanların yaşamında yer bulsa da “nano” kavramı ve “nano üretim” bilinci insanlığın son bir asırdır gündemindedir. Bazı maddelerin parçacık boyutlarının küçülmesiyle farklı özellikler kazandığı fark edilse de bu durumun temel mekanizması yıllarca anlaşılamamıştır. Özetle, nano üretim uygulamaları bilinçli şekilde gerçekleştirilmese de nesilden nesile binlerce yıl aktararak günümüze kadar ulaşmıştır (Tolochko, 2009).

Nanometre kavramının ilk kez ortaya atılışı 1925’te, kimya dalında Nobel Ödülü sahibi Richard Zsigmondy tarafından olmuştur. Zsigmondy, parçacıkların boyutunu ifade etmek için “nanometre” terimini kullanan ilk kişidir (Hulla ve ark., 2015). Günümüz modern nanoteknolojisinin doğması ise fizik dalında Nobel Ödülü sahibi Richard Feynman sayesinde olmuştur. Feynman 1959 yılında Amerikan Fizik Derneği’nde yaptığı “Aşağıda Yeterince Yer Var.” adlı konuşmasında, atomlardan nanoboyutta ürünler tasarlanabileceği ve maddelerin atomik seviyede işlenebileceği/düzenlenebileceği fikrini ortaya sürmüştür. Klasik düşünce tarzının ötesine geçen ve doğruluğu ispatlanan görüşleri sebebiyle Feynman, modern nanoteknolojinin babası olarak görülmektedir. Feynman’ın yaptığı konuşmadan yaklaşık on beş yıl sonra, 1974’te, Japon bilim insanı Norio Taniguchi, “nanoteknoloji” terimini ilk kez bilim camiasına sunmuştur. Taniguchi nanoteknolojiyi, maddelerin nanometre hassasiyetinde işlenmesi ve nanoboyutta mekanizmaların oluşturulması olarak tanımlamıştır (Tolochko, 2009; Hullu ve ark., 2015).

1980’lere gelindiğinde nanoteknolojinin altın çağı başlamıştır. 1981 yılında IBM Zurich Araştırma Laboratuarı’nda çalışan Gerd Binnig ve Heinrich Rohrer, onlara daha sonra fizik dalında Nobel Ödülü de kazandıracak çalışma olan taramalı tünelleme mikroskopunu keşfetmiştir. Nanoteknoloji için büyük bir atılım olan bu keşif sayesinde atomlar ve bağlar daha önce benzeri görülmemiş şekilde görüntülenebilmiştir (Sekhsaria, 2013).

1985 yılında Kroto, Smalley ve Curl tarafından fulleren keşfedilmiştir. 1986 yılında, Massachusetts Teknoloji Enstitüsü'nden Eric Drexler, Feynman'ın konuşmasında ortaya sürdüğü fikirleri ve Taniguchi'nin "nanoteknoloji" terimini "Yaratılış Motorları: Nanoteknolojinin Gelişen Dönemi" isimli kitabında yayınlayarak, kendisini ya da karmaşık yapıdaki diğer maddeleri kopyalayabilen nano ölçekli bir makinenin üretilebileceğini iddia etmiştir. Drexler'in nanoteknoloji görüşü genellikle "moleküler nanoteknoloji" ifadesiyle kabul görmektedir (Hulla ve ark., 2015).

Özetle, 1980'lerin ikinci yarısından 1990'ların ilk yıllarına kadar geçen süreçte, nanoteknolojinin gelecekteki konumunun da şekillenmesinde büyük etkiler bırakacak pek çok gelişme yaşanmıştır. 1991 yılındaki karbon nanotüplerin keşfinden günümüze dek pek çok ülkede nanoteknoloji üzerine yapılan araştırmalar ve tasarımlar hızlanarak devam etmiş, nanoteknoloji alanındaki yayın sayısı ve projelere ayrılan finans desteği önemli ölçüde artış göstermiş ve nanoteknolojik uygulamalar günlük hayatta daha sık yer bulmuştur (Tolochko, 2009).

2.1.2. Nanoteknolojinin kullanım alanları

Nanoteknoloji uygulamaları, nanopartiküller sahip oldukları üstün özellikleri sayesinde tıp, elektrik-elektronik, kimya, biyoteknoloji, bilişim, farmakoloji, gıda, savunma, tekstil ve otomotiv sanayi gibi birçok farklı alanda her geçen gün daha fazla yer almaktadır (Özdoğan ve ark., 2006).

Nanoteknolojinin yer aldığı başlıca uygulamalara kimya endüstrisinde kir tutmaz boya ve kaplama malzemesi üretimi; tekstil endüstrisinde kir tutmaz ve buruşmaz kumaş üretimi, kozmetik endüstrisinde güneş kremlerinin üretimi; dental uygulamalarda çürümeyi önleyici dental kompozitlerin ve protez, ağız gargarası ve diş macunlarının üretimi örnek verilebilir (Özdoğan ve ark., 2006; Oyar, 2014).

Nanopartiküler sahip oldukları antimikrobiyel özelliklerin yanı sıra üretim şekillerine bağlı olarak taşıdıkları üstün özelliklerle medikal uygulamalarda umut vaat eden uygulamalara sahiptir. Nanoteknolojinin yer aldığı bazı medikal uygulamalar aşağıda belirtildiği gibidir:

- Floresan etiket üretimi,
- İlaç ve gen taşınımı,
- Patojenlerin biyotespiti,
- Proteinlerin tespiti,
- DNA yapısının incelenmesi,
- Doku mühendisliği,
- Tümörlerin iyileştirilmesi,
- Biyolojik moleküllerin ve hücrelerin ayrımı ve saflaştırılması (Salata, 2004).

2.1.2.1. Nanoteknolojinin gıda endüstrisinde kullanımı

Partiküllerin oldukça küçük boyutları ve boyutlarına bağlı olarak değişen özellikleri gıda endüstrisinde gelişmiş özelliklere sahip malzeme ve ürünlerin üretilmesine, gıdaları işleme, muhafaza etme ve paketlenme tekniklerinin geliştirilmesine olanak tanımaktadır. Örneğin, depoda ve taşıma sırasında monitörden takip edilebilen akıllı ambalajlarda; kontamine olmuş ve son kullanma tarihi dolmuş gıdalarda bakterilerce üretilen gazların tespiti ile renk değiştiren sensörlere sahip ambalajlarda nanoteknolojik uygulamalardan yararlanılmaktadır (URL-1, 2017).

Ayrıca, ambalaj malzemelerinin gümüş, titanyum oksit gibi nano katkıları ile modifiye edilmesiyle elde edilen aktif ambalajlarda ambalaj materyalinin gıda ile temas eden yüzeyinin oksijeni absorbe edecek biçimde modifiye edilmesi yaratılan anaerobik ortam sebebiyle ortamın antibakteriyel ve antifungal özellik kazanmasını sağlamaktadır. Böylece bozunma reaksiyonlarının azalması sonucu gıdanın raf ömrü uzamaktadır. Etilen tutucu, nem tutucu, tat-koku tutucu özelliklerdeki nano yapıları malzemelerle modifiye edilen aktif ambalajlar pek çok meyve ve sebzede, et ve süt ürünlerinde, kek, pasta gibi unlu mamullerin paketlenmesinde başarıyla kullanılmaktadır (Sürengil ve Kılınç, 2011).

İçecek şişelerinde kullanılan bariyer teknolojisinde nanokompozitlerden yararlanılmaktadır. Örneğin, bira şişelerinin üretiminde plastik malzeme kil NP'leri ile doldurulduğunda cam kadar sert fakat camdan çok daha sağlam olan, böylece kolay kırılıp parçalanmayan şişeler üretilmektedir. Aynı zamanda nanopartiküllerin şişeden

karbon dioksit çıkışı ve şişeye oksijen girişini engelleyecek biçimde tasarlanmış olması biranın tazeliğini ve raf ömrünü arttırmaktadır (Hays ve ark., 2013). Yapılan bir çalışmada kâğıt üzerine kaplanan koloit gümüş NP'lerinin *Escherichia coli* (*E. coli*) ve *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) gibi patojen bakteriler üzerinde sergilediği antibakteriyel özellikler sebebiyle gıda ürünlerinin ambalajlanmasında ve gıdanın raf ömrünün uzatılmasında kullanılabileceği belirtilmektedir (Gottesman ve ark., 2011).

Polifenol, mikrobesein, enzim, antioksidan, nutrasötik gibi biyoaktif bileşikler çevresel etkilerden korumak ve hedef bölgelerde kontrollü salınımını sağlamak amacıyla gıda bileşenlerine uygulanan nanoenkapsülasyon tekniği ve enkapsülasyonların sıvı ortamlardaki nanoemülsiyonları gıda endüstrisinde uygulamalara sahiptir (Ezhilarasi ve ark., 2013). Nanoenkapsülasyon tekniği ile fonksiyonel gıdalara istenilen tat-aroma ve antioksidan özelliklerin kazandırılmasında nanokompozitlerden yararlanılmaktadır (Var ve Sağlam, 2015).

Nanoboyutlu malzemeler aynı zamanda biyoalgılamada kullanılacak şekilde sentezlenip karakterize edildiğinde hedef bakteri ile seçici olarak etkileşeceği için gıda patojenlerinin hızlı ve güvenli şekilde tanımlanmasını sağlayan immünosensörlerin üretiminde kullanılabilmektedir (Yeğenoğlu ve ark., 2013).

Gıda, süt ürünleri ve içeceklerden tuzun uzaklaştırılmasında, peynir altı suyunun desalinasyonunda, gıda ürünlerindeki renk maddelerinin indirgenerek giderilmesinde ve gıdaların konsantre edilmesi işlemlerinde nanofiltrasyon teknikleri başarıyla uygulanmaktadır. Özetle, hedefe yönelik tasarlanabilen nanopartiküller nanoteknolojinin gıda endüstrisinde başarıyla uygulanmasını sağlamaktadır (Süfer ve Karakaya, 2011).

2.1.3. Nanopartiküller ve üretim yöntemleri

Bir partikülün nano ölçekte olduğunun söylenebilmesi için en az bir boyutunun 100 nm'den küçük olması gerektiği bildirilmiştir (Gürmen ve Ebin, 2008; Dikensoy, 2010). Nanopartiküller genel olarak organik ve inorganik olarak iki grupta sınıflandırılmaktadır. Organik nanopartiküller karbondan oluşurken; inorganik

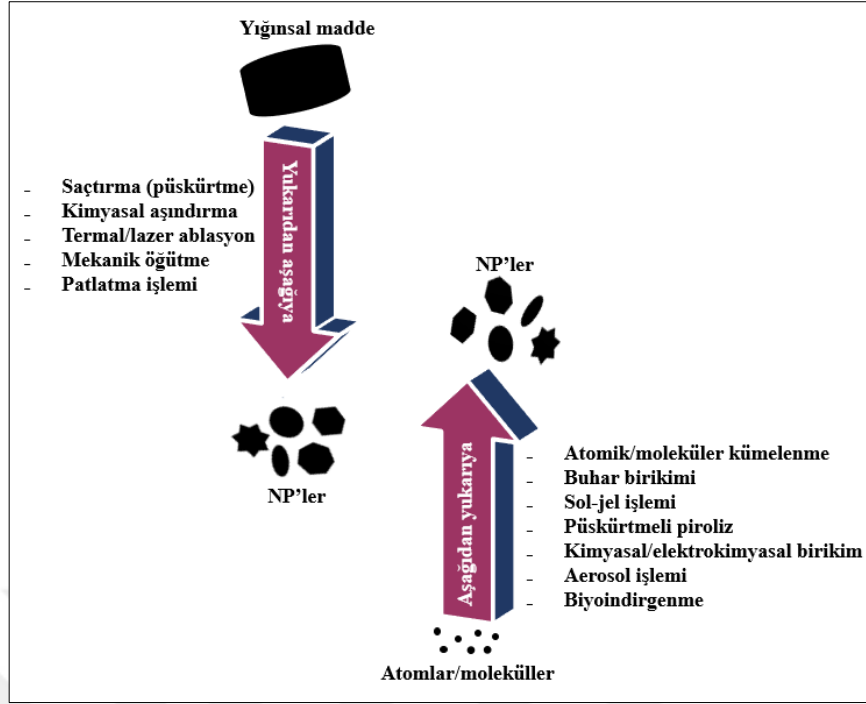
nanopartiküller manyetik, altın ve gümüş gibi soy metal ve titanyum oksit ve çinko oksit gibi yarı iletken elementlerden oluşmaktadır (Moghaddam ve ark., 2015).

Nanopartiküller şekil ve yapıları itibarıyla nanoçubuk, nanokristal, nanotel, nanofilm, nanotüp, çekirdek-kabuk, katkılı, sandviç, boşluklu ve çok yüzlü gibi farklı morfolojilerde bulunabilmektedir. Maddeyi oluşturan yığınsal (hacimsel) partiküller nano ölçekli forma geçtiğinde maddenin sahip olduğu bazı özelliklerin değiştiği ve geliştiği fark edilmiştir (Gürmen ve Ebin, 2008). Partiküller nanoboyutta benzersiz fizikokimyasal, optik, elektronik, katalitik ve manyetik özellikler kazanmaktadır. Bu benzersiz özellikler;

- Partiküllerin kuantum boyut etkisi,
- Boyuta bağlı elektronik enerji seviyesinin ayarlanabilmesi,
- Yüzey alanı/kütle oranının artması; buna bağlı olarak partikülün yüzeyindeki atomların içindeki atomlara göre baskınlık elde etmesi sonucu kazanılmaktadır (Gericke ve Pinches, 2006; Gürmen ve Ebin, 2008).

Nanopartiküllerin benzersiz fizikokimyasal özellikleri küçük boyutlarına (<100 nm), yüzey yapısı ve reaktivitesine, yüzeye bağlı gruplara ve kaplamaya, kimyasal kompozisyonun saflığına ve kristallik düzeyine bağlıyken; elektronik özellikleri ise çözünübilirliğe, yüzey morfolojisine, adsorbe edilen kimyasalların etkilerine, şekle ve agregasyona bağlıdır (Hulkoti ve Taranath, 2014).

Partiküllerin şekil, boyut ve kristalitelerini belirleyen ana etmenler nanopartikül üretimindeki başlangıç materyalinin türü ve uygulanan üretim yöntemi ile yakından ilişkilidir. Nanopartiküllerin oluşum mekanizması temel olarak “aşağıdan yukarıya (bottom up)” ve “yukarıdan aşağıya (top down)” olmak üzere iki şekildedir. Aşağıdan yukarıya yaklaşımında atomlar ya da moleküller nanoyapıda moleküller oluşturacak şekilde birleşirken; yukarıdan aşağıya yaklaşımında maddeler zamanla nanoboyuta indirgenmektedir. Aşağıdan yukarıya yaklaşımı genellikle nanopartiküllerin kimyasal ve biyolojik sentezinde görülen yaklaşımdır (Şekil 2.1.) (Narayanan ve Sakthivel, 2010).



Şekil 2.1. Nanopartiküllerin oluşum mekanizması (Ovais ve ark., 2017)

Nanopartiküllerin aşağıdan yukarıya ve yukarıdan aşağıya yaklaşımlarıyla oluşumunda çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler uygulanmaktadır (Ovais ve ark., 2017). Kimyasal buhar yoğunlaştırma yöntemi, hidrojen redüksiyonu yöntemi, asal gaz yoğunlaştırma yöntemi, mikroheterojen sistemlerden nanopartikül üretimi, alev sentezi yöntemi, mekanik aşındırma yöntemi ve ultrasonik sprey piroliz yöntemi uygulanan fiziksel ve kimyasal yöntemlerden bazılarıdır (Gürmen ve Ebin, 2008). Kimyasal yöntemler, üretimde yüksek toksisitedeki kimyasalların kullanımını gerektirmeleri ve tehlikeli yan ürünlerin oluşumu sebebiyle çok avantajlı yöntemler değildir. Benzer şekilde, fiziksel yöntemler de yüksek enerji gerektiren pahalı yöntemler olmaları sebebiyle avantajlı sayılmazlar. Tüm bunlara karşın bitki, fungus, bakteri ve alg gibi biyolojik kaynakların kullanımı ile gerçekleştirilen ve yeşil teknoloji olarak da adlandırılan biyolojik yöntemler çevre dostu, güvenli, basit, düşük enerji-yüksek verim ve tek adımda üretim ilkesiyle çalışan biyoyoumlu yöntemler olarak fiziksel ve kimyasal yöntemlere alternatif konumdadır (Ovais ve ark., 2017).

2.1.4. Nanopartiküllerin mikrobiyel sentezi

Nanopartiküllerin mikrobiyel yollarla üretimi nanoteknoloji ve mikrobiyel biyoteknolojiyi birbirine bağlayan yeşil teknoloji yaklaşımının bir örneğidir. Nanopartiküllerin optoelektronik, fizikokimyasal ve elektronik özellikleri şekil, boyut ve kristalitelerine bağlı olarak değişmektedir. Bu yüzden farklı boyut ve şekillerdeki monodispers nanopartiküllerin üretimi nanoteknoloji uygulamaları için oldukça önem arz etmektedir (Narayanan ve Sakthivel, 2010).

Nanopartikül üretiminde bazı fiziksel ve kimyasal yöntemler başarıyla uygulansa da bu yöntemler pahalı olmak ve tehlikeli kimyasalların kullanımını gerektirmek gibi dezavantajlara sahiptir. Nanopartikül yüzeylerindeki toksik kimyasallar ve sentez sırasında apolar çözügenlerin kullanımı bu partiküllerin klinik sahadaki uygulamalarını da kısıtlamaktadır. Bu sebeple çevre dostu, tehlikesiz, biyouyumlu ve sürdürülebilir yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda nanopartikül sentezinde çeşitli biyomimetik yaklaşımların gelişimine öncülük eden biyolojik sistemlerin kullamına artan bir ilgi vardır (Narayanan ve Sakthivel, 2010; Thakkar ve ark., 2010).

Biyolojik yöntemler güvenli, ekonomik, sürdürülebilir ve çevre dostu olsa da mikroorganizmaların kültür ortamında gelişmesinin zaman alması ve üretilen nanopartiküllerin boyut, şekil ve kristal yapılarının dağılımında tam bir kontrol sahibi olunamaması yöntemin olumsuz taraflarıdır. Aynı zamanda monodispers bir üretim gerçekleştirmek zordur ve NP'lerin üretim oranı düşüktür; ancak mikrobiyel türün seçimi, pH, inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon süresi, metal iyonunun konsantrasyonu ve biyolojik materyalin miktarı gibi parametrelerin optimize edilmesi biyolojik yöntemlerin geniş bir alanda ve ticari uygulamalarda yer bulması hususunda umut vaat etmektedir. Ayrıca, mikroorganizmaların genetik yapısının bazı spesifik indirgeyici maddeleri salgılayacak şekilde değiştirilebilir olması, üretilcek partiküllerin şekil ve boyutlarında kontrol sağlanmasını kolaylaştıracığı bildirilmiştir (Narayanan ve Sakthivel, 2010).

Partiküllerin şekil, boyut ve kompozisyonlarında sıkı kontrol uygulayarak, kimyasal yöntemlerle sentezlenmiş partiküllerle benzer özellikte nanoyapıda mineral kristalleri

ve metal nanopartiküllerini sentezleyebilen mikroorganizmalar mevcuttur. Manyetik nanopartiküllerin oluşumunu sağlayan magnetotaktik bakteriler, farklı şekil ve boyutlarda altın NP'lerini sentezleyen *Verticillium* ve *Fusarium* fungusları, *Pseudomonas stutzeri*'nin periplazmik boşluğunda sentezlenen gümüş NP'leri, yarı iletken CdS kristallerini sentezleyen *Schizosaccharomyces pombe* mayası ve elektron donörü varlığında paladyum NP'lerini üreten sülfat indirgeyici bakteriler bu mikroorganizmalara örnektir (Gericke ve Pinches, 2006).

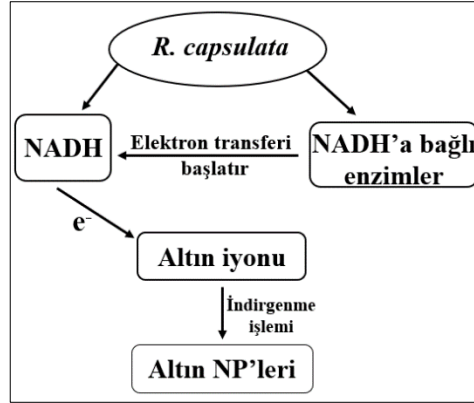
Nanopartiküllerin mikroorganizmalarca sentezlenmesi aşağıda verilen nedenlere dayanmaktadır:

- Kemolitotrofi (Kimyasal bileşiklerden enerji elde etme) eğilimi,
- Partiküllerin özel işlevler için kullanılması,
- Toksik ortamda hayatta kalabilmek için geliştirilen detoksifikasyon mekanizması (Krumov ve ark., 2009).

2.1.4.1. Nanopartiküllerin mikrobiyel sentez mekanizması

Nanopartikül oluşumunda biyolojik ajanların metal iyonları ile farklı şekillerde reaksiyona girmesi, nanopartiküllerin biyolojik sistemlerdeki sentez mekanizmasının anlaşılmasını güçleştirmektedir. Pek çok mikroorganizmanın inorganik maddeleri hücre içi ya da hücre dışı şekilde ürettiği bilinmektedir; ancak NP'lerin hücre içi ve hücre dışı sentez mekanizması farklı biyolojik ajanlar için farklılık göstermektedir (Hulkoti ve Taranath, 2014). Sentez temel olarak metalik tuzlardan hazırlanan çözeltideki metal iyonlarının bazı organik gruplar tarafından indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Üretim işlemi iyonların yakalanması, indirgenmesi ve çevrelerinin kaplanması olmak üzere üç basamakta gerçekleşmektedir. Hücre içi üretimde iyon transferi yani indirgenme işlemi hücrenin içinde gerçekleşirken; hücre dışı üretimde hücre dışına salgılanan enzim vb. biyolojik yapılar iyon transferi gerçekleştirmekte ve metal iyonları elementel yapıya indirgenmektedir (Shah ve ark., 2015).

Verticillium sp. ile yapılan bir çalışmada, metal iyonlarının mikroorganizma yüzeyine temas etmesiyle gerçekleşen elektrostatik etkileşim sonucu hücrenin iyonları yakaladığı bildirilmektedir (Şekil 2.2.). Hücre duvarındaki enzimler metal iyonlarını



Şekil 2.3. Altın NP'lerinin *R. capsulata* tarafından hücre dışı sentezi (He ve ark., 2007)

2.1.4.2. Bakteriyel yollarla metal nanopartiküllerinin üretimi

Bakteriler uygulama kolaylıkları ve genetik modifikasyonlara uygunlukları sebebiyle mikroorganizmalar arasında NP üretimi için önem kazanmaktadır (Gericke ve Pinches, 2006). Metal iyonlarının çoğu bakteriler için toksiktir. Doğadaki mineral döngüsünde önemli işlev gören bazı bakteriler savunma mekanizmaları gereği bu toksisitenin üstesinden gelmek için iyonları indirger ya da suda çözünmeyecek kompleksler oluşturacak şekilde yapılandırır (Sastry ve ark., 2003). Metal iyonlarının elektron yüklerinin değiştirilmesi ile toksik etkileri azaltılır veya tamamen giderilir. Tüm bunların sonucunda bakteriler aracılığıyla nano ölçekte partiküller elde edilir (Thakkar ve ark., 2010). Co, Cu, Hg, Li, Ni, Pb, Pd, Pt, Rh, Se, Te, CuO, CdS, PbS, ZnS, Fe₃S₄, Fe₃O₄ ve Co₃O₄ bakteriler aracılığıyla sentezlendiği bildirilen inorganik NP'lerdir (Park ve ark., 2016). Bazı bakterilerin sentezlediği NP'ler ve bu NP'lerin uygulama alanları Tablo 2.1.'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Bazı bakterilerin ürettiği metal NP'leri

Bakteri	NP	Üretim şekli	NP boyut ve şekli	Aktif bileşen	Uygulamalar	Kaynak
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	TiO ₂	Hücre içi	Küresel 22-97 nm	Alfa amilaz	Tekstil boyalarının degradasyonu	Khan ve Fulekar, 2016
<i>Desulfovibrio caledoniensis</i>	CdS	Hücre içi ve hücre dışı	Küresel 40-50 nm	Sülfat redüktaz	Sülfat indirgeyici bakterilerin floresan tespiti	Qi ve ark., 2016

Tablo 2.1. (Devamı)

Bakteri	NP	Üretim şekli	NP boyut ve şekli	Aktif bileşen	Uygulamalar	Kaynak
<i>Streptomyces</i> sp.	Au	Hücre dışı	Küresel 4-13 nm	NAD	Kumaş yüzeyi modifikasyonu	Ibrahim ve ark., 2016
<i>Bacillus niabensis</i>	Au	Hücre dışı	Küresel 10-20 nm	Peptid	Antibiyofilm	Li ve ark., 2016
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cu	Hücre dışı	Küresel 50-300 nm	Nitrat redüktaz	Yara iyileştirme	Tiwari ve ark., 2014

2.1.5. Selenyum ve selenyum nanopartikülleri

Selenyum elementi 1817 yılında Jöns Jacob Berzelius tarafından sülfirik asit üretiminin yan ürünü olarak keşfedilmiş ve adlandırılmıştır. Berzelius görünümü sebebiyle selenyum için metal nitelendirmesini yapsa da günümüzde metaloit olarak kabul görmektedir (Thornton ve Burdette, 2013).

Selenyumun bazı organizmalarca iz miktarda kullanımı elzemdir ve uzun süren eksikliğinde hücre yapısının bozulması sonucu yapısal düzensizlikler görülmektedir (Yalçinkaya ve ark., 2010). İz miktardaki alımı elzem olsa da selenyumun yüksek konsantrasyonlarda toksik etkisi bulunmaktadır (Hnain ve ark., 2013). Bu sebeple selenyumun içme sularındaki içeriği dünyada ve ülkemizde yasalarca sınırlandırılmıştır. İnsani Tüketim Amaçlı Sular Hakkında Yönetmelik'e göre ülkemizdeki içme sularındaki kabul edilebilir selenyum düzeyi 10 µg/L'dir (Temamoğulları ve Dinçoğlu, 2010).

Selenyumun kabul edilen alınabilir en düşük dozu ile toksisitesi arasında çok ince bir çizgi vardır (Dhanjal ve Cameotra, 2010). Toksik etkisi sudaki çözünürlük derecesine ve buna bağlı olarak biyo-kullanılabilirliğine göre değişmektedir. Selenius asit (H_2SeO_3) ve selenyum oksit gibi kimyasal formlarında selenyumun toksik etkisi ciddi oranda artmaktadır. Toksik formda bulunan selenyumun bazı hayvan deneyi çalışmalarında karaciğeri hedef aldığı belirlenmiştir (Diskin ve ark., 1979; Shakibaie

ve ark., 2013). ALT, AST ve ALP gibi enzimlerin serum seviyelerinin yükselmesi sonucu karaciğerin yapısal bütünlüğünün zarar gördüğü bildirilmektedir (Shakibaie ve ark., 2013).

Biyolojik sistemlerde mikronutrient (mikrobesin) olarak görev almasının yanı sıra antioksidan, bağışıklık düzenleyici, kanser önleyici etkisi ve antiviral aktivitesi ile geniş bir alanda fonksiyon görmektedir; ayrıca sahip olduğu fotoelektrik ve yarı iletken özellikleri sayesinde güneş pili, rektifer (doğrultucu), pozometre (ışıkölçer), elektrostatik baskı ve kimyasal sensör yapımında kullanılmaktadır (Beck ve ark., 2003; Zhang ve ark., 2004a; Hoffmann ve Berry, 2008; Zeng ve Combs, 2008; Dhanjal ve Cameotra, 2010; Hnain ve ark., 2013; Shakibaie ve ark., 2013).

Selenyum, atom değerliğinin +6 olduğu selenat (SeO_4^{2-}) ve +4 olduğu selenit (SeO_3^{2-}) oksiiyonları ile elementel selenyum (Se^0) ve selenid (Se^{2-}) gibi farklı oksidasyon seviyelerinde bulunabilmektedir. Yaygın olarak suda iyi çözünen selenat ve selenit ile, gaz haldeki selenid formlarında bulunmaktadır (Schrauzer ve Surai, 2009; Shakibaie ve ark., 2013).

Selenat ve selenitin aksine sıfır değerlikli selenyum elementi suda çözünmez ve biyolojik olarak inerttir. Yapılan bazı in vivo ve in vitro araştırmalar selenyumun elementel formdayken toksik etkisinin çok daha düşük düzeyde olduğunu göstermektedir (Zhang ve ark., 2001; Zhang ve ark., 2005; Shakibaie ve ark., 2013). Laboratuvar fareleri üzerinde yapılan bir araştırmada selenyum nanopartiküllerinin akut toksisitesinin (LD_{50}) (92,1 mg Se/kg) selenit (15 mg/kg), selenometiyonin (25,6 mg Se/kg) ve Se metilselenosistein (15 mg Se/kg) ile kıyaslandığında anlamlı ölçüde daha düşük olduğu rapor edilmiştir (Mennini, 2012).

Bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda, selenat ve selenit iyonlarının taşıdıkları yüksek toksisite sebebiyle selenyumun elementel formu olan selenyum nanopartikülü yapısına (SeNP) indirgenmesi (aerobik ve anaerobik koşullarda) önem arz etmektedir (Dhanjal ve Cameotra, 2010). SeNP'lerinin toksisitesinin belirlenmesi amacıyla yapılmış pek çok çalışma vardır. Bu çalışmalardan birinde, SeNP'lerinin glutatyon

peroksidaz ve tiyoredoksin redüktaz enzimlerinin aktivitesini en az selenyum kadar yükselttiği rapor edilmiştir (Ip, 2006).

Selenyum nanopartikülleri benzersiz fotoelektrik özelliklere, yarı iletken yapıya ve X-ışınlarını algılayıcı özelliğe sahiptir. Bu sayede pek çok tıbbi ve endüstriyel uygulamada kullanılmaktadır. Serbest radikalleri yakalama yeteneğindedir ve antikanser ve antioksidan özellikleri sayesinde ilaç yapımında, vitamin, gıda takviyesi, antibiyotik kaplama ajanı ve kimyasal koruyucu eldesinde, proteinlerin NH, C=O, COO⁻ ve C-N grupları ile arasındaki etkileşim sebebiyle sahip oldukları biyolojik aktivite ve yüksek adsorptivite ile tıbbi tanı uygulamalarının geliştirilmesinde ve biyogörüntüleme için floresan boya yapımında kullanılmaktadır. İlave olarak, gözlük camları ve optik lensler için kaplama materyali olarak kullanılmaktadır (Yost ve ark., 1990; Zhang ve ark., 2004a; Dhanjal ve Cameotra, 2010; Hnain ve ark., 2013; Shakibaie ve ark., 2013).

Yukarıdaki bilgiler ışığında, toksik selenyum iyonlarının nano ölçekteki ve toksik olmayan elementel selenyuma indirgenmesi önem taşımaktadır. İndirgenme işlemi sayesinde, biyoremediasyon ile atık suların toksisitesinin azaltılmasının yanı sıra selenyum nanopartiküllerinin üretimi sağlanmış olmaktadır. Toksik formdaki selenyum iyonlarının gideriminde kimyasal çöktürme, katalitik redüksiyon ve adsorpsiyon/iyon değişimi, gama ışınımı ve lazer ablasyon gibi farklı fizikokimyasal yöntemler sıklıkla uygulanmaktadır (Shin ve ark., 2007; Mishra ve ark., 2011).

Fizikokimyasal yöntemlere alternatif olan mikrobiyel yöntemlerle SeNP'lerinin üretimi ise, son yıllarda üzerinde yapılan çalışmaların önem kazanarak arttığı bir araştırma alanı doğurmuştur (Mishra ve ark., 2011). NP'lerin bakteri gibi biyolojik organizmalar aracılığı ile sentezlenmesi toksik kimyasalların kullanımını gerektirmemesi ve çevre dostu olması sebebiyle diğer metotlara alternatif konumdadır (Shakibaie, 2013).

2.1.5.1. Selenyum nanopartiküllerinin bakteriler aracılığı ile biyosentezi üzerine yapılan çalışmalar

Yapılan araştırmalarda toprak ve su kaynakları gibi geniş bir yaşam alanında bulunan pek çok bakterinin selenyum iyonlarını indirgeme yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir (Kessi ve ark., 1999; Yee ve ark., 2007; Dhanjal ve Cameotra, 2010; Shakibaie ve ark., 2013). SeNP'lerinin mikrobiyel yollarla sentezlendiğinde toksik etkisinin sentetik yollarla sentezlenmiş NP'lere göre daha düşük olduğu bildirilmektedir. Bu durumun temel sebebi tam olarak bilinmese de mikrobiyel yollarla sentezlenen metal NP'lerin fizikokimyasal stabilitesinin daha yüksek olması ile ilişkilendirilmektedir (Shakibaie ve ark., 2013).

Bu bağlamda, selenyum iyonlarını indirgeme yeteneğindeki bakterilerin tespiti ve belirlenen bu bakteriler ile SeNP'lerinin üretimi üzerine yapılan çalışmalar literatürde her geçen gün biraz daha fazla yer bulmaktadır. Dhanjal ve Cameotra (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, kömür madeninden izole edilen ve *Bacillus cereus* olduğu belirlenen bakterinin toksik selenit anyonunu (SeO_3^{2-}) aerobik koşullarda elementel formdaki kırmızı renkli selenyuma (Se^0) indirgeme yeteneği belirlenmiştir. Bakterinin tolere edebileceği selenit seviyesi, bakterinin farklı konsantrasyonlardaki sodyum selenit (0,5 mM-10 mM) ile muamele edilmesi sonucu belirlenmiştir. Sıvı kültür ortamına selenit iyonlarının eklenmesinin ardından renk değişiminin 2-3 saat içinde başladığı bildirilirken, ESEM, AFM ve SEM analizleri küresel SeNP üretiminin gerçekleştiğini ve üretilen NP'lerin bakteri biyokütlesine yapışık olduğunu göstermiştir. TEM analizi ile NP'lerin boyutları 150-200 nm olarak ölçülmüş ve NP'lerin hücre içi ve hücre dışı depozit halinde biriktikleri görülmüştür. EDX analizi bu depozitlerin elementel selenyum olduğunu doğrulamıştır. Başka bir çalışmada yerel bir krom madeninden izole edilen ve *Enterobacter* cinsine ait olduğu belirlenen bir bakteri türüne ait hücresiz süpernatant kullanılarak Se^{+4} iyonlarından SeNP'lerinin üretimi gerçekleştirilmiştir. NP'lerin morfolojik olarak çubuk şeklinde olduğu belirtilmiştir. SEM, EDX, XRD ve UV-VIS spektrofotometre ile yapılan karakterizasyon analizlerinin sonuçlarına göre partiküllerin ortalama 108 nm olmak üzere 90-120 nm aralığında olduğu görülmüştür. Üretilen NP'lerin kayda değer bir kümeleşme görülmeden iki aydan uzun süre korunduğu ve bu stabilizasyonu

bakteriyel proteinlerin sağladığı belirtilmiştir (Mollania ve ark., 2016). SeNP'lerini sentezleme yeteneğinde olan bazı bakteriler Tablo 2.2.'de verilmiştir.

Tablo 2.2. SeNP'lerini sentezleyen bazı bakteriler

Bakteri türü	Kullanılan çözelti	Üretim şekli	NP boyutu (nm)	NP şekli	Kaynak
<i>Bacillus</i> sp.	SeO ₂	Hücre içi	105-130	Küresel	Shakibaie ve ark., 2013
<i>Citrobacter freundii</i>	H ₂ SeO ₃	Hücre içi	200-800	Amorf	Wang ve ark., 2017
<i>Bacillus cereus</i>	Na ₂ SeO ₃	Hücre içi Hücre dışı	150-200	Küresel	Dhanjal ve Cameotra, 2010
<i>Enterobacter</i> sp.	Na ₂ SeO ₃	Hücre dışı	90-120	Amorf	Mollania ve ark., 2016
<i>Streptomyces bikiniensis</i>	SeO ₂	Hücre içi	50-100	Küresel	Ahmad ve ark., 2015
<i>Bacillus licheniformis</i>	SeO ₂	Hücre dışı	10-50	Küresel	Khiralla ve El-Deeb, 2015
<i>Idiomarina</i> sp.	Na ₂ SeO ₃	Hücre dışı	150-350	Küresel	Srivastava ve Kowshik, 2016
<i>Streptomyces minutiscleroticus</i>	Na ₂ SeO ₃	Hücre dışı	10-250	Küresel	Ramya ve ark., 2015

2.2. *Bacillus* Cinsi Bakteriler

2.2.1. *Bacillus* cinsi bakterilerin genel özellikleri

Bacillaceae familyasında yer alan *Bacillus* cinsine ait bakteriler gram pozitif, endospor oluşturan, aerob özellikte, oldukça kalın çubuk şeklinde (en: 1,2-1,5 µm; boy: 5 µm) bakterilerdir (Şekil 2.4.). Endospor hücre içinde hücre merkezinde ya da uçta bulunabilmektedir. Bu cinse ait bakteriler çok az hava varlığında da gelişme gösterebilmektedir. Kültür ortamında genellikle zincir oluştururlar. Çoğunlukla mezofilik karakterde olsalar da psikrofilik ve termofilik türleri de mevcuttur. Şekeri

gaz oluşumu görülmeksizin asit üreterek fermente ederler ve proteinleri amonyak oluşturarak parçaladıklarından kokuşmaya neden olurlar. Doğada yaygın olarak bulunan *Bacillus* cinsi bakteriler elliye yakın tür içermektedir. Bu türler zararsız olup, sadece *B. anthracis*, *B. subtilis* ve *B. cereus* türleri insan ve hayvanda hastalık etmenidir (Sevim ve ark., 2006; Çon ve Gökalp, 2011).

Fermentasyon teknolojisinin gelişiminden beri mikrobiyel ürünler pek çok uygulamada yer almaktadır. *Bacillus* cinsi bakteriler basit kültür koşullarında kısa süren kültivasyonları, protein yapılarını korumadaki başarıları, güvenli ve çevre dostu oluşları sebebiyle endüstriyel ve ticari uygulamalarda kullanım avantajına sahiptir. İçerdikleri proteaz, amilaz ve selüloz enzimleri ile doğal organik atıkların temizlenmesinde görev almalarının yanı sıra, biyolojik kontrol ajanı konumundaki türlerin ürettikleri antimikrobiyel maddeler sebebiyle de önem teşkil etmektedirler (Karkaj ve ark., 2013; Mu ve ark., 2015).

2.2.2. *Bacillus* cinsi bakterilerle yapılan nanopartikül üretim çalışmaları

Bacillus cinsi bakteriler iyonik strese ve yüksek tuz konsantrasyonuna gösterdikleri tolerans sebebiyle nanopartikül üretimi gibi yüksek iyon toleransı gerektiren biyoteknolojik uygulamalarda diğer bakterilere göre daha fazla kullanım potansiyeline sahiptir. Bu sebeple, bazı metal NP'lerin üretiminde *Bacillus* cinsi bakterilerden sıklıkla yararlanılmaktadır (Mishra ve ark., 2011). Tablo 2.3.'te bazı *Bacillus* cinsi bakteriler ve bu bakterilerin ürettiği metal NP'leri verilmiştir.

Tablo 2.3. Bazı *Bacillus* cinsi bakteriler aracılığı ile üretilen metal NP'leri

<i>Bacillus</i> türü	Üretilen NP	Kaynak
<i>Bacillus licheniformis</i>	Ag	Kalishwaralal ve ark. 2008
<i>Bacillus flexus</i>	Ag	Priyadarshini ve ark., 2013
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Ag	Wei ve ark., 2012
<i>Bacillus cereus</i>	Ag	Babu ve Gunasekaran, 2009

Tablo 2.3. (Devamı)

<i>Bacillus</i> türü	Üretilen NP	Kaynak
<i>Bacillus megaterium</i>	Ag	Karkaj ve ark., 2013
<i>Bacillus subtilis</i>	Ag	Reddy ve ark., 2010
<i>Bacillus thuringiensis</i>	ZnO	Malaikozhundan ve ark., 2017
<i>Bacillus cereus</i>	Cu	Tiwari ve ark., 2016
<i>Bacillus</i> sp. FU4	CuO	Taran ve ark., 2017
<i>Bacillus niabensis</i> 45	Au	Li ve ark., 2016
<i>Bacillus</i> sp. SDNS	Au	Abouelkheir ve ark., 2016
<i>Bacillus subtilis</i>	Au	Thirumurugan ve ark., 2012
<i>Bacillus licheniformis</i>	Au	Kalishwaralal ve ark., 2009
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	TiO ₂	Khan ve Fulekar, 2016
<i>Bacillus mycoides</i>	TiO ₂	Órdenes-Aenishanslins ve ark., 2014
<i>Bacillus cereus</i>	Cr ₂ O ₃	Dong ve ark., 2013
<i>Bacillus subtilis</i>	Cr ₂ O ₃	Kanakalakshmi ve ark., 2017
<i>Bacillus subtilis</i>	Fe ₃ O ₄	Sundaram ve ark., 2012
<i>Bacillus licheniformis</i> JS2	Se	Sonkusre ve Cameotra, 2015
<i>Bacillus megaterium</i>	Se	Mishra ve ark., 2011
<i>Bacillus subtilis</i>	Se	Wang ve ark., 2010
<i>Bacillus cereus</i>	Se	Dhanjal ve Cameotra, 2010

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1 Kullanılan mikroorganizmalar

Bu çalışmada, daha önceden izole edilmiş olan ve Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonunda bulunan 32 adet *Bacillus* izolatı kullanılmıştır. Ayrıca, Kocaeli ilinden alınan bazı toprak örneklerinden de 2 yeni *Bacillus* suşunun izole edilmesi ile 34 adet izolat çalışmalarda kullanılmıştır. İzolatlar Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Farklı kaynaklardan elde edilmiş *Bacillus* cinsine ait izolatlar

<i>Bacillus</i> sp. izolatı	Elde edildiği kaynak
<i>Bacillus</i> sp. EBTA 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	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, 10	Patates tarlasına ait toprak örneği
<i>Bacillus</i> sp. HTA 1, 2	Toprak örneği
<i>Bacillus</i> sp. BAST 2	Ev yapımı salatalık turşusu
<i>Bacillus</i> sp. BMZE 2, 3, 4	Ev yapımı sofralık zeytin
<i>Bacillus</i> sp. ZGT 1, 3, 5, 9	Toprak örneği
<i>Bacillus</i> sp. BAT 3	Toprak örneği
<i>Bacillus</i> sp. GİT 2	Toprak örneği
<i>Bacillus</i> sp. EKT 1, 2	Sanayi bölgesinden toprak örneği

Antimikrobiyel duyarlılık testi için kullanılan *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Bacillus cereus* (*B. cereus*), *Escherichia coli* O157:H7 (*E. coli* O157:H7), *E. coli* tip-1, *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) ve *Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis*) Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Serap C. AKDEMİR'den temin edilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN'dan; antifungal duyarlılık testi için kullanılan *Candida albicans* (*C. albicans*) Sakarya Üniversitesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Gülnur ARABACI'dan temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan araç-gereçler

Bu çalışmada UV-VIS spektrofotometre (Shimadzu UVmini-1240), masaüstü santrifüj (Hettich Universal 320 R), otoklav (WiseClave WAC-80), distile su cihazı (Nüve ND8), su banyosu (WiseBath WSB-30), çalkalamalı inkübatör (Benchmark Incu-Shaker Mini), ışık mikroskobu (Soif, BS203), hassas terazi (Radwag AS 220.R2), pH metre (Mettler-Toledo SevenCompact S210), ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (IKA C-MAG HS 7), etüv (Microtest min), vorteks (VELP Scientifica ZX3), otomatik pipet serisi (Hamilton) kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan besiyerleri

Çalışmada kullanılan besiyerleri aşağıda açıklandığı şekilde hazırlanmıştır.

Nutrient agar (NA): Mikroorganizmaların izolasyonunda ve aktiveleştirilmesinde kullanılmıştır. Dehidre formdaki 20 g NA (Merck, Darmstadt, Almanya) 1000 ml damıtık su içerisinde kaynatılarak çözündürüldükten sonra 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyon işleminden sonra su banyosunda 45-50°C'ye soğutulan besiyeri, steril Petri kaplarına 15-20 mL hacminde dağıtılarak katılaşmaya bırakılmıştır.

Nutrient broth (NB): Mikroorganizmaların geliştirilmesinde ve nanopartikül üretiminde kullanılmıştır. Dehidre formdaki 8 g NB (Merck, Darmstadt, Almanya)

1000 mL damıtık su içerisinde çözündürülmüş ve 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

Tryptic soy agar (TSA): Antimikrobiyel aktivite testlerinde kullanılmıştır. Dehidre formdaki TSA'dan (Merck, Darmstadt, Almanya) 40 g tartılarak 1000 mL damıtık su içerisinde kaynatılarak çözündürülmüş ve 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyondan sonra su banyosunda 45-50°C'ye soğutulan besiyeri, steril Petri kaplarına 15-20 mL hacminde dağıtılarak katılaşmaya bırakılmıştır.

Tryptic soy broth (TSB): Antimikrobiyel aktivite tayininde kullanılan test mikroorganizmaların geliştirilmesinde kullanılmıştır. Dehidre formdaki 30 g TSB (Merck, Darmstadt, Almanya) 1000 mL damıtık su içerisinde çözündürülmüş ve deney tüplerine 9'ar mL olarak dağıtıldıktan sonra 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

Yeast extract peptone glukoz (YPG) agar: Antifungal aktivite tayininde kullanılan test mikroorganizmaların geliştirilmesinde kullanılmıştır. Dehidre formdaki 20 g pepton (peptone from meat) (Merck, Darmstadt, Almanya), 10 g yeast extract (Merck, Darmstadt, Almanya), 20 g glukoz (Merck, Darmstadt, Almanya) ve 10 g agar agar (Merck, Darmstadt, Almanya) 1000 mL damıtık su içerisinde kaynatılarak çözündürülmüş ve 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyondan sonra su banyosunda 45-50°C'ye soğutulan besiyeri, steril Petri kaplarına 15-20 mL hacminde dağıtılarak katılaşmaya bırakılmıştır.

Yeast extract peptone glukoz (YPG) broth: Antifungal aktivite tayininde kullanılan test mikroorganizmaların geliştirilmesinde kullanılmıştır. Dehidre formdaki 20 g pepton, 10 g yeast extract ve 20 g glukoz 1000 mL damıtık su içerisinde çözündürülmüş ve 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

Bakır sülfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) katkılı NA: Bakır nanopartiküllerini üretme yeteneğinde olan *Bacillus* cinsi mikroorganizmaların izolasyonunda kullanılmıştır. Dehidre formdaki 20 g NA 1000 mL damıtık su içerisinde kaynatılarak çözündürüldükten sonra 100 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya) çözeltisinden son konsantrasyon 1 mM ve 10 mM olacak şekilde belirli hacimlerde

eklenmiştir. 121°C’de 15 dakika steril edilen katkılı besiyerleri su banyosunda 45-50°C’ye soğutulmuş ve ardından steril Petri kaplarına 15-20 mL hacminde dağıtılarak katılaşmaya bırakılmıştır. Katılaşmanın gerçekleşmesi için yeterli süre geçtikten sonra sadece 1 mM konsantrasyonundaki besiyerinin katılaştığı tespit edilmiş ve analizlerde bu besiyeri kullanılmıştır.

Çinko sülfat heptahidrat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) katkılı NA: Çinko nanopartiküllerini üretme yeteneğinde olan *Bacillus* cinsi mikroorganizmaların izolasyonunda kullanılmıştır. Dehidre formdaki 20 g NA 1000 mL damıtık su içerisinde kaynatılarak çözündürüldükten sonra 100 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Almanya) çözeltisinden son konsantrasyon 1 mM ve 10 mM olacak şekilde belirli hacimlerde eklenmiştir. 121°C’de 15 dakika steril edilen katkılı besiyerleri su banyosunda 45-50°C’ye soğutulduktan sonra, steril Petri kaplarına 15-20 mL hacminde dağıtılarak katılaşmaya bırakılmıştır. Ancak 10 mM konsantrasyonunda hazırlanan besiyerinde katılaşma olmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle bu konsantrasyonda çalışma yapılamamış, çalışmalarda 1 mM konsantrasyonundaki besiyeri kullanılmıştır.

Selenyum dioksit (SeO_2) katkılı NA: Selenyum nanopartiküllerini üretme yeteneğinde olan *Bacillus* cinsi mikroorganizmaların izolasyonunda kullanılmıştır. Dehidre formdaki 20 g NA 1000 mL damıtık su içerisinde kaynatılarak çözündürüldükten sonra 100 mL’lik erlenlere 30’ar mL hacminde dağıtılmıştır. Ardından her bir erlene 100 mM SeO_2 (Merck, Darmstadt, Almanya) çözeltisinden farklı hacimlerde eklenerek son konsantrasyonun 1,9; 2,9; 3,8; 4,7; 5,6; 6,5; 7,4; 8,2; 9,0; 9,9; 10,7 ve 11,5 mM olması sağlanmıştır. 121°C’de 15 dakika steril edilen SeO_2 katkılı besiyerleri su banyosunda 45-50°C’ye soğutulduktan sonra, steril Petri kaplarına 15-20 mL hacminde dağıtılarak katılaşmaya bırakılmıştır. Katılaşmanın gerçekleşmesi için yeterli süre geçtikten sonra sadece 1,9; 2,9 ve 3,8 mM konsantrasyonundaki besiyerinin katılaştığı tespit edilmiş ve analizlerde bu konsantrasyonlardaki besiyeri kullanılmıştır.

3.1.4. Kullanılan kimyasallar ve çözeltiler

Çalışmada kullanılan kimyasalların hepsi analitik saflıktadır. Çözeltiler aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

100 mM SeO_2 çözeltisi: Selenyum nanopartiküllerinin üretiminde kullanılmıştır. 7,896 g SeO_2 tartılarak 1000 mL'lik balon jodede damıtık su ile çizgisine kadar tamamlanmıştır.

100 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi: Bakır nanopartiküllerinin üretim çalışmalarında kullanılmıştır. 24,969 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ tartılarak 1000 mL'lik balon jodede damıtık su ile çizgisine kadar tamamlanmıştır.

100 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi: Çinko nanopartiküllerinin üretim çalışmalarında kullanılmıştır. 28,754 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ tartılarak 1000 mL'lik balon jodede damıtık su ile çizgisine kadar tamamlanmıştır.

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

2 N HCl: pH ayarlamada kullanılmıştır. Yoğunluğu $1,18 \text{ g/cm}^3$ olan %37'lik HCl'den (Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya) 16,7 mL alınarak damıtık su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

0,15 mM DPPH çözeltisi: Antioksidan aktivite tayininde kullanılmıştır. 2,95 mg DPPH (Sigma-Aldrich, Amerika) tartılarak 50 mL'lik balon jodeye aktarılmış ve balon joje metanol ile (Merck, Almanya) çizgisine kadar tamamlanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Mikroorganizmaların izolasyonu ve muhafazası

Kocaeli iline ait sanayi bölgesinden alınan toprak örneklerinden *Bacillus* cinsi mikroorganizmaların izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla 10 g toprak örneği alınarak daha önceden steril edilmiş 90 mL fizyolojik tuzlu su (FTS) içerisinde karıştırılıp süspansiyon haline getirilmiş ve 80°C 'lik su banyosunda 15 dakika bekletilerek ısı şoku ile sporsuz bakterilerin inhibisyonu sağlanmıştır (Beefa ve ark., 1996). Ardından soğutulan örnekten 1 mL alınarak 9 mL steril FTS içeren deney tüpüne aktarılmış ve

10^{-1} konsantrasyonunda dilüsyon elde edilmiştir. 10^{-5} konsantrasyonunda dilüsyon elde edilene kadar seri seyreltme işlemine devam edilmiş ve tüm dilüsyonlardan 100 μ L alınarak NA'a yayma yöntemiyle ekim yapılmıştır. 33°C'de 24 saatlik inkübasyonun ardından gelişme gösteren tipik izolatlar seçilerek NP üretimleri araştırılmıştır.

İzolatları muhafaza etmek amacıyla farklı kolonilerden bir öze yardımıyla alınmış ve 5 mL NB içeren deney tüplerine aktarılmıştır. Çalkalamalı inkübatörde 33°C'de 24 saat inkübe edilerek geliştirilen damıtık kültürler %50 gliserol (Merck, Darmstadt, Almanya) içeren mikrotüplere aktararak -65°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Cu ve ZnNP üretim çalışmaları

3.2.2.1. Cu ve ZnNP üretme yeteneğinde olan mikroorganizmaların seçimi

Cu ve Zn nanopartiküllerini üretme yeteneğinde olan mikroorganizmaların seçimi için öncelikle bu metallerin bulunduğu ortamda gelişebilen mikroorganizmalar belirlenmiştir. Bu amaçla kültür koleksiyonundaki ve sonradan izole edilen *Bacillus* cinsine ait bakteriler 1 mM Cu ve 1 mM Zn katkılı NA üzerine çizme yöntemiyle ekilmiş ve 33°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Söz konusu ortamlarda gelişme gösteren bakterilerin bakır ve çinko metallerine dirençli oldukları kanısına varılmıştır.

3.2.2.2. Mikroorganizmaların metal dayanımlarının arttırılması ve muhafazası

Dirence sahip oldukları belirlenen mikroorganizmaların metalik strese dayanımlarını daha da arttırmak adına, gelişme gösteren mikroorganizmalar öze yardımıyla alınıp aynı miktarda katkılanmış başka bir taze besiyerine ekilmiş ve aynı koşullarda inkübe edilmiştir. Bu işlemin aynı şekilde üç kez tekrarlanmasının ardından gelişen mikroorganizmalar NB'ta inkübe edildikten sonra %50 gliserol içeren mikrotüplere aktararak -65°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.3. Cu ve ZnNP üretim çalışması

Direnç kazandırılan mikroorganizmalar ayrı ayrı Cu ve ZnNP üretim çalışmalarında kullanılmıştır. Bu amaçla her bir stoktan alınan bakteriler bir öze yardımıyla katkılı NA'lara çizilerek 33°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Gelişen hücreler öze yardımıyla alınarak 30 mL NB içeren 100 mL'lik erlenlere aktarılmıştır. Çalkalamalı inkübatörde (120 rpm) 33°C'de 24 saat inkübe edilen örnekler santrifüj edilmiş (4°C, 9000 devir/dk, 20 dakika) ve üstte kalan hücresiz sıvı kısım 100 mL'lik steril erlenlere aktarılmıştır. Üzerine 100 mM konsantrasyonundaki bakır sülfat ve çinko sülfat çözeltilerinden 4'er mL eklendikten sonra (son konsantrasyon sırasıyla 11,7 mM ve 11,4 mM) erlenler çalkalamalı inkübatörde aynı koşullarda 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası bakterilerin CuNP ve ZnNP üretimleri örneklerdeki renk değişimi ve UV-VIS spektrofotometrede 250-750 nm dalga boyu aralığında yapılan spektrum taraması ile gözlenmiştir.

3.2.3. SeNP üretim çalışmaları

3.2.3.1. SeNP üretme yeteneğinde olan mikroorganizmaların seçimi

Se nanopartiküllerini üretme yeteneğinde olan mikroorganizmaların seçimi için öncelikle bu elementin bulunduğu ortamda gelişebilen mikroorganizmalar belirlenmiştir. Bu amaçla Bölüm 3.2.2.2'de anlatıldığı şekilde metalik direnç kazandırılmış mikroorganizmalar 1,9, 2,9 ve 3,8 mM SeO₂ çözeltisiyle katkılanmış taze NA üzerine çizme yöntemiyle ekilmiş ve 33°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Söz konusu ortamda kiremit kırmızısı renginde koloniler oluşturarak gelişme gösteren bakterilerin selenyuma dirençli olduğu kanısına varılmıştır.

3.2.3.2. SeNP üretimi için yapılan ön çalışmalar

Selenyum nanopartikülleri üretim çalışmalarında selenyuma dirençli olduğu belirlenen *Bacillus* sp. EKT1 bakterisi kullanılmıştır. SeNP üretme yeteneğinde olup olmadığını anlamak adına bakteri farklı konsantrasyonlardaki SeO₂ çözeltisi ile muamele edilmiş ve Se⁺⁴ iyonunu Se⁰ formuna indirgeme potansiyeli belirlenmiştir. Bu amaçla bakteri

NA'a sürme yöntemiyle ekilmiş ve 33°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Gelişme gösteren kolonilerden bir öze dolusu toplanmış ve 100 mL NB içeren 250 mL'lik erlene aktarılmıştır. Çalkalamalı inkübatörde (120 rpm) 33°C'de 24 saat süresince gerçekleşen inkübasyon sonrası örnek 9000 devir/dk'da ve 4°C'de 20 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüş, üstteki hücresiz kısımdan steril 100 mL'lik erlenlere 30'ar mL hacminde aktarılmıştır. 100 mM derişiminde hazırlanmış SeO₂ çözeltisi son konsantrasyon 5,6; 10,7 ve 15,9 mM olacak şekilde süpernatant içeren erlenlere eklenmiş ve örneklerin pH'ları 2 N NaOH ve 2 N HCl ile 7,0-7,30 aralığında ayarlanmıştır. SeO₂ çözeltisi eklenmemiş süpernatant kontrol örneği olarak kullanılmış ve örnekler çalkalamalı inkübatörde (120 rpm) 30°C'de ortam rengi açık sarıdan kiremit kırmızısına dönüşene kadar inkübe edilmiştir. 72 saat sonunda renk dönüşümü gözlenmiş ve deney sonlandırılarak alınan örneklerin spektrofotometrik analizi yapılmıştır. Bunun için, 1/5 oranında seyreltilen örneklerin UV-VIS spektrofotometrde 350-750 nm dalga boyu aralığında spektrum taraması yapılmıştır. Analiz bulgularına göre 10,7 mM ve üzerindeki konsantrasyonlarda çalışma yapılmayacağına karar verilerek, bir sonraki ön çalışma 10,7 mM ve altındaki örnekler için gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla, süpernatant elde edimine kadar yapılan işlemler aynı şekilde tekrarlanmış ve 100 mM SeO₂ çözeltisinden örneklerin son konsantrasyonu 3,8; 4,7; 5,6; 6,5; 7,4; 8,2; 9,0; 9,9 ve 10,7 mM olacak şekilde eklenmiştir. Kontrol örneği olarak SeO₂ eklenmemiş hücresiz sıvı kullanılmıştır. pH'ları süpernatantın orijinal pH'sı olan 7,0±0,5 ayarlanan örnekler çalkalamalı inkübatörde (120 rpm) 30°C'de inkübasyona bırakılarak 96 saat süresince renk değişimleri gözlenmiş ve inkübasyon sonlandırıldıktan sonra damıtık su ile 1/5 oranında seyreltilerek UV-VIS spektrofotometrede 350-750 nm dalga boyu aralığında spektrum taramasına tabi tutulmuştur.

3.2.4. SeNP üretimi

3.2.4.1. İnokülümün optik yoğunluğun ayarlanması

-65°C’de muhafaza edilen mikroorganizma bir öze yardımıyla NA besiyerine sürüldükten sonra Petri kabı 33°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası petriden bir koloni seçilerek içerisinde 30 mL NB bulunan 100 mL’lik erlene aşılantı ve çalkalamalı inkübatörde (120 rpm) 33°C’de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Elde edilen bu kültür NP üretimi için inokülüm olarak kullanılmıştır. Bütün çalışmalarda optik yoğunluğu (OD_{600}) 2,0 olan inokülüm %5 oranında aşılantıdır. Bunun için, NB’da gelişen hücrelerin yoğunluğu UV-VIS spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda ölçülmüş ve belirlenen optik yoğunluğa göre kültürden uygun oranda alınarak taze bir NB besiyerine aşılantıdır. Aşılantı kültür çalkalamalı inkübatörde (120 rpm) 33°C’de 24 saat inkübe edildikten sonra santrifüj edilmiş (4°C, 9000 devir/dk, 20 dakika) ve süpernatant SeNP üretimi çalışmalarında kullanılmak üzere steril bir erlene aktarılmıştır.

3.2.5. SeNP’lerinin üretim koşullarının optimizasyonu

Selenyum nanopartiküllerinin üretim etkinliğini arttırmak amacıyla bazı üretim koşulları optimize edilmiştir. Bu koşullar: SeO_2 çözeltisinin konsantrasyonu, ortam pH’sı, sıcaklık ve inkübasyon süresidir. Bütün çalışmalarda üç paralel ile çalışılmıştır.

3.2.5.1. SeO_2 konsantrasyonunun SeNP üretimine etkisinin belirlenmesi

SeO_2 çözeltisinin optimum konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.2.4.1’de açıklandığı şekilde elde edilen hücresiz sıvı kısma 100 mM’lık SeO_2 çözeltisinden son konsantrasyon 3,8; 4,7; 5,6; 6,5; 7,4; 8,2 ve 9,0 mM olacak şekilde farklı hacimlerde eklenmiştir. Çalkalamalı inkübatörde (120 rpm) 33°C’de 96 saatlik inkübasyon sonucu üretilen SeNP’lerinin yoğunluğunu belirlemek için örnekler damıtık su ile 1/5 oranında seyreltilmiş ve UV-VIS spektrofotometrede 568 nm dalga boyunda absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Absorbans değerinin en yüksek olduğu örneğin sahip olduğu SeO_2 konsantrasyonu optimum olarak belirlenmiştir.

3.2.5.2. pH'nın SeNP üretimine etkisinin belirlenmesi

SeO₂ çözeltisinin optimum olarak belirlenen konsantrasyonunda hazırlanmış süpernatant 2 N NaOH ve 2 N HCl ile pH 3, 5, 7, 9, ve 11 ($\pm 0,5$) olmak üzere beş farklı pH değerine ayarlanmıştır. Çalkalamalı inkübatörde (120 rpm) 33°C'de 96 saatlik inkübasyon sonucu üretilen SeNP'lerinin yoğunluğunu belirlemek için örnekler damıtık su ile 1/5 oranında seyreltilmiş ve UV-VIS spektrofotometrede 568 nm dalga boyunda absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Absorbans değerinin en yüksek olduğu süpernatantın sahip olduğu pH değeri optimum olarak belirlenmiştir.

3.2.5.3. Sıcaklığın SeNP üretimine etkisinin belirlenmesi

Optimum konsantrasyon ve pH değerinde hazırlanmış örnekler 30°C, 33°C, 40°C ve 45°C olmak üzere dört farklı sıcaklıkta inkübe edilmiştir (120 rpm, 33°C, 96 saat). Üretilen SeNP'lerinin yoğunluğu örneklerin damıtık su ile 1/5 oranında seyreltikten sonra UV-VIS spektrofotometrede 568 nm dalga boyunda absorbanslarının ölçümü ile belirlenmiştir. Absorbans değerinin en yüksek olduğu örneğin sahip olduğu sıcaklık değeri optimum sıcaklık olarak kabul edilmiştir.

3.2.5.4. İnkübasyon süresinin SeNP üretimine etkisinin belirlenmesi

İnkübasyon süresinin SeNP üretimi üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla optimum koşullarda 144 saat inkübe edilen örnekten 24 saatlik aralıklarla 0,5 mL alınarak damıtık su ile 2,5 mL'ye tamamlanıp vortexle karıştırıldıktan sonra UV-VIS spektrofotometrede 568 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır.

3.2.6. SeNP'lerinin optimum koşullarda üretimi ve saflaştırılması

Selenyum nanopartiküllerinin karakterizasyonu ve çeşitli özelliklerinin belirlenmesi amacıyla, optimum koşullarda NP üretimi gerçekleştirilmiş ve üretilen NP'ler saflaştırılmıştır. Bunun için öncelikle, erlende üretilen NP'ler santrifüj tüplerine aktarılmış ve birkaç adet kaynatma taşı eklenip vortekste karıştırılmıştır. 9000 devir/dk'da ve 4°C'de 20 dakika süresince gerçekleştirilen santrifüj işleminden sonra

üstte toplanan süpernatant dökülmüştür. Çöktürülen NP'ler sırasıyla 2 kez damıtık su, 2 kez etil alkol (%98) ve iki kez damıtık su ile yıkanarak santrifüj edilmiştir (9000 devir/dk, 4°C, 10 dakika). Yıkandıktan sonra etüvde 33°C'de kurutulan SeNP'leri saf halde elde edilmiştir.

3.3. Laboratuvar analizleri

3.3.1. *Bacillus* sp. EKT1 izolatının tanımlanması

Bakterinin bazı morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla ışık mikroskopunda 100 x büyütme oranındaki objektifle koloni yapısı gözlenmiş; Gram boyama, spor boyama ve katalaz testi yapılmıştır. 16s rDNA genotiplendirme yöntemi ile bakterinin moleküler düzeyde tanımlaması yapılmıştır.

Moleküler tanımlamada suşun 16S rDNA gen sekansının (dizisinin) tespiti Sentegen Biyoteknoloji (Ankara, Türkiye) firması tarafından yapılmıştır. Gene ait 16S rDNA bölümünün amplifikasyonunda (çoğaltılmasında) universal primer (Forward primer 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3') kullanılmıştır. PCR sonrası elde edilen ürün otomatik bir sekanslayıcı (Genetic Analyzer 3130, Applied Biosystems) tarafından sekanslanmıştır. Çoğaltılan gen sekansı (728 adet baz) Blastn programı kullanılarak genomik veri tabanı bankasındaki (GenBank) bakteri türleri ile karşılaştırılmış, bakterinin *Bacillus* türleri ile olan benzerlik oranı filogenetik olarak belirlenmiştir (Liu ve ark., 2015; URL-2, 2017).

Son olarak izolatın çeşitli antibiyotiklere karşı direnci test edilmiştir. Bunun için %50 gliserol içeren besiyeri stoğunda muhafaza edilen *Bacillus* sp. EKT1'den (-65°C) bir öze dolusu alınıp 9 mL TSB besiyerinde aktarılmış ve bakteri 33°C'de inkübe edilmiştir. 24 saat süren aktifleştirme işleminin ardından gelişen kültürden 100 µL alınıp taze hazırlanmış TSA besiyerine sürülmüştür. Bioanalyse (Ankara, Türkiye) firmasından temin edilen antibiyotik diskleri (Ampisilin, kloramfenikol, eritromisin, streptomisin, tetrasiklin) agar plaka üzerine belirli aralıklarla dizilmiş ve 33°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatin sonunda disklerin etrafında görülen zon çapları

bir cetvel yardımıyla ölçülerek, bakteri test edilen antibiyotiklere karşı "duyarlı" ve "dirençli" şeklinde bildirilmiştir (T. C. Sağlık Bakanlığı, 2014).

3.3.2. SeNP'lerinin karakterizasyonu

3.3.2.1. Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu analizi

Selenyum nanopartiküllerinin şekil ve büyüklüklerinin belirlenmesinde alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FESEM) ile analiz yaptırılmıştır. Analizde Sakarya Üniversitesi Araştırma-Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (SARGEM) laboratuvarında bulunan FESEM (FEI Quanta, FEG 450) cihazı kullanılmış, Bölüm 3.2.6'da anlatıldığı şekilde saf halde elde edilen SeNP'leri 15,00 kV'ta ve 50.000 kat büyütme oranında görüntülenmiştir.

3.3.2.2. Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi analizi

Enerji dağılımlı X-ışını (EDX) spektroskopisi maddelerin elementel kompozisyonunu belirleyen bir yöntemdir. SeNP'lerinin EDX analizi Sakarya Üniversitesi Araştırma-Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (SARGEM)'ne yaptırılmış, analizde EDX spektrometresi (EDAX, Octane Plus) kullanılmıştır. Bölüm 3.2.6'da anlatıldığı şekilde saf halde elde edilen SeNP'leri 15,00 kV'ta elementel olarak tanımlanmıştır.

3.3.2.3. FTIR spektroskopisi analizi

Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, kızılötesi (IR) ışınların absorpsiyonu (soğurulması) ile maddeyi oluşturan atomlar arasındaki kimyasal bağların titreşiminin ölçülmesi esasına dayanan bir çeşit absorpsiyon spektroskopisidir. Kızılötesi ışınlar kimyasal bağların gerilme, büzülme ve bükülme gibi farklı titreşim hareketleri ile absorbe olmakta ve kimyasal bağların absorpsiyon özelliklerine göre kızılötesi bölgede spektrum pikleri oluşmaktadır. Farklı fonksiyonel gruplar farklı titreşim frekanslarına ve bu titreşim frekanslarına karşılık gelen absorpsiyon piklerine sahip olduğundan, absorpsiyon pikleri ile elde edilen IR spektrumu her madde için kendine özgüdür ve organik veya inorganik bileşiklerin

kimyasal bileşiminin karakterize edilmesinde kullanılmaktadır (Kılıç ve Karahan, 2010; Büyüksırt ve Kuleaşan, 2014). Kızılötesi ışının yoğunluğuna karşılık gelen dalga sayısı Fourier matematiksel dönüşümü uygulanarak ölçülmektedir (Kılıç ve Karahan, 2010).

Üretilen SeNP'lerinin fonksiyonel gruplarının belirlenmesi amacıyla FTIR analizi yaptırılmış, analizde Sakarya Üniversitesi Kimya Bölümü laboratuvarında bulunan FTIR spektroskopisi (Shimadzu IR, Prestige 21) kullanılmıştır. Bölüm 3.2.6'da anlatıldığı şekilde saf halde elde edilen SeNP'lerinin 400-4000 cm^{-1} bölgesi için spektrumları elde edilmiştir.

3.3.2.4. X-ışını kırınımı analizi

X-ışını kırınımı (XRD), X-ışınlarının kristal bir düzleme belli bir açıyla gönderilmesi ile ışınların kristaldeki atom düzlemine çarparak yansması olayıdır. Kristal yapıdaki her fazın atomik dizilimi kendine özgü olduğundan, X-ışınlarının kırınımı da karakteristik bir düzen içerisinde gerçekleşir, böylece atom düzleminden yansıyan X-ışınlarının oluşturduğu kırınım deseni parmak izi gibi o kristali tanımlar (URL-3, 2017). Analiz edilen örneğin kırınım deseni ile aynı şekli veren standart maddenin deseni karşılaştırılarak örneğin ne olduğu saptanır (Yılmaz, 2014).

Aynı dalga boyundaki X-ışınlarıyla, kristal düzlemlerin arasındaki mesafe tayin edilebilmektedir. Işınlar kristalin paralel düzlemlerine belli bir θ açısı ile çarpar ve bu ışınların bir kısmı en üst düzlemden, bir kısmı onun bir altındaki düzlemden ve bir kısmı da daha alttaki düzlemlerden yansır. Eğer yansıyan ışınlar aynı fazdaysa şiddetli bir yansımış ışın demeti oluşur (Mortimer, 2004).

Belli bir dalga boyunda olan (λ) X-ışınları ile birbirinden d kadar mesafede olan düzlem takımından farklı açılarda yansımalar elde edilir. Bu yansımalar $n = 1, 2, 3$ ve diğer yansımalara karşılık gelirler ve birinci mertebeden, ikinci mertebeden ve diğer mertebelerden yansımalar şeklinde adlandırılırlar. X-ışınlarının geliş açısının (θ) bilinmesi ile Bragg Eşitliği kullanılarak (Denklem 3.1) düzlemler arası mesafe (d) hesaplanabilir (Mortimer, 2004).

$$n \lambda = 2d \sin\theta \quad (3.1)$$

Analiz edilen örneğin kırınım deseni standart maddenin kırınım deseni ile karşılaştırılmasında piklerin şiddet oranı ve düzlemler arası mesafe esas alınır. Şiddet oranı, kırınım açısının pik şiddetinin standart pik şiddetine oranıdır. Elde edilen kırınım desenlerinde örnek ile standart madde aynı kırınım açısında aynı pik şiddetini veriyorsa örneğin kimliği belirlenmiş olur (Özgür, 2008).

Selenyum nanopartiküllerinin kristalitesinin belirlenmesi için XRD analizi yaptırılmış, analizde Sakarya Üniversitesi Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü laboratuvarında bulunan X-ışını difraktometresi (Rigaku, SA-HF3 D/max-2200/PC) kullanılmıştır. Bölüm 3.2.6'da anlatıldığı şekilde saf halde elde edilen SeNP'leri ezilerek toz haline getirilmiş ve analizde kullanılmıştır. Ölçümler 2θ temelinde ve Cu anodu kullanılarak (40 kV, 30 mA) $K\alpha$ ışınımında ($\lambda = 1,5405 \text{ \AA}$) gerçekleştirilmiştir. X-ışınlarının geliş açısı $10-90^\circ$ arasında değişmekle birlikte dakikada 3° artmıştır.

3.3.3. SeNP'lerinin antimikrobiyel aktivitesinin belirlenmesi

Selenyum nanopartiküllerinin bazı Gram pozitif ve Gram negatif patojen bakteriler üzerindeki antimikrobiyel aktivitesi Kirby-Baurer tarafından geliştirilmiş agar difüzyon yönteminin modifiye edilmesi ile belirlenmiştir (Hudzikci, 2009). Üretilen ve saflaştırılan NP'lerin farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltileri (2-8 mg/mL) ile NP'lerin minumum inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi amaçlanmıştır. Aktifleştirilme işlemi için -65°C 'de ve %50 gliserol içeren mikrotüplerde muhafaza edilen patojenler yuvarlak uçlu bir öze yardımı ile alınarak 9 mL TSB içeren deney tüplerine aktarılmıştır. *L. monocytogenes* 30°C 'deki inkübatörde ve diğer patojenler 37°C 'de 24 saat inkübe edilerek aktif hale gelmeleri sağlanmıştır. Gelişen patojenler mikropipetle 100 μL hacminde alınarak TSA besiyerine sürüldükten sonra 6 mm çapındaki steril yuvarlak diskler (Whatman no 1) merkezlerine 2,5 cm uzaklıkta olacak şekilde agar plakanın üzerine yerleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki SeNP çözeltileri otoklavda 121°C 'de 15 dakika steril edildikten sonra mikropipet yardımı ile 10 μL hacminde alınarak disklerin üzerine

inoküle edilmiştir. Kontrol örneğinde diske NP çözeltisi yerine damıtık su inoküle edilmiştir. *L. monocytogenes* 30°C’de ve diğer bakteriler 37°C’de 24 saat süresince inkübe edilmiştir. NP’lerin antimikrobiyel aktivitesinin belirlenmesi amacıyla inkübasyon sonrası diskler etrafında oluşan zon çapları bir cetvel yardımıyla ölçülmüştür.

3.3.4. SeNP’lerinin anti-*Candida* aktivitesinin belirlenmesi

Üretilen ve saflaştırılan NP’lerin farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltileri (2-8 mg/mL) ile NP’lerin *C. albicans* üzerindeki MİK değerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Uygulamada agar difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Aktifleştirilme işlemi için -65°C’de ve %50 gliserol içeren mikrotüpte muhafaza edilen mayadan yuvarlak uçlu bir öze yardımı ile alınarak 9 mL YPG broth içeren deney tüpüne aktarılmıştır. 30°C’de 48 saat inkübasyonun ardından aktif hale gelen mayadan mikropipetle 100 µL hacminde alınarak YPG agar besiyerine sürülmüştür. 6 mm çapındaki steril yuvarlak diskler merkezlerine 2,5 cm uzaklıkta olacak şekilde agar plakanın üzerine dizilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki SeNP çözeltileri otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edildikten sonra mikropipet yardımı ile 10 µl hacminde alınarak disklerin üzerine inoküle edilmiştir. Kontrol örneğinde diske NP çözeltisi yerine damıtık su inoküle edilmiştir. 30°C’de 24 saat inkübasyonun ardından diskler etrafında oluşan zon çapları bir cetvel yardımıyla ölçülmüştür.

3.3.5. SeNP’lerinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi

Selenyum nanopartiküllerinin antioksidan aktivitesi, Forootanfar ve arkadaşları (2014) tarafından uygulanan DPPH giderim metodu esas alınarak belirlenmiştir. Mor renkli DPPH radikali ortamda antioksidan varlığında antioksidan tarafından yakalanmakta ve DPPH çözeltisinin rengi sarıya dönmektedir. Ortamdaki antioksidanın hidrojen kaybetme (yükseltgenme) yeteneği reaksiyonun etkinliğini belirlemektedir.

Bu amaçla farklı konsantrasyonlardaki SeNP ve SeO₂ çözeltisinden (20-400 µg/mL) 1 mL alınmış ve üzerine metanol ile hazırlanmış taze DPPH çözeltisinden (0,15 mM) 1 mL ilave edilmiştir. 3 mL metanol eklendikten sonra örnekler oda sıcaklığında yarım

saat süresince karanlıkta bekletilmiş ve ardından saf metanole karşı sıfırlanmış UV-VIS spektrofotometrede 517 nm dalga boyunda örneklerin absorbans değerleri ölçülmüştür. Kontrol örneğinde SeNP ve SeO₂ çözeltisi yerine damıtık su ikame edilmiştir. DPPH radikalının giderim oranı aşağıdaki eşitlikte (Denklem 3.2) verilmiştir:

$$\text{DPPH radikalının giderim oranı (\%)} = \left[1 - \frac{(A_a - A_b)}{A_c} \right] \times 100 \quad (3.2)$$

A_a: DPPH çözeltisi ilave edilmiş örneğin absorbansı,

A_b: DPPH çözeltisi ilave edilmemiş örneğin absorbansı,

A_c: Kontrol çözeltisinin absorbansıdır.

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Cu ve ZnNP Üretimi

4.1.1. Cu ve Zn metallerine dirençli mikroorganizmalar

NP üretim çalışmalarına başlamadan önce mevcut mikroorganizmaların Cu ve Zn metallerine dayanıklılıkları tespit edilmiştir. Bu amaçla mikroorganizmalar Cu ve Zn katkılı NA besiyerinde geliştirilmiş ve gelişme gösteren bakterilerin bu metallere dirençli oldukları kanısına varılmıştır.

Çalışmada elde edilen bulgular Tablo 4.1.'de var/yok şeklinde gösterilmiştir. Çalışılan 34 adet bakteriden 5'inin (*Bacillus* sp. EBTA2, *Bacillus* sp. EBTA6, *Bacillus* sp. EBTA8, *Bacillus* sp. BMZE4, *Bacillus* sp. EKT1) bakıra; 12'sinin (*Bacillus* sp. EBTA8, *Bacillus* sp. SBT4, *Bacillus* sp. SBT5, *Bacillus* sp. SBT8, *Bacillus* sp. SBT9, *Bacillus* sp. BAST2, *Bacillus* sp. BMZE2, *Bacillus* sp. BMZE4, *Bacillus* sp. ZGT1, *Bacillus* sp. ZGT3, *Bacillus* sp. ZGT9, *Bacillus* sp. EKT2) çinkoya dirençli olduğu gözlenmiştir. *Bacillus* sp. EBTA8 ve *Bacillus* sp. BMZE4 izolatlarının ise her iki metale de dirençli oldukları görülmüştür. Dirençli bakteriler Bölüm 3.2.2.2'de anlatıldığı şekilde metal dayanımları arttırıldıktan sonra stok gliserol çözeltisinde muhafaza edilmiştir.

Çevredeki metal/metalloid kirliliğine maruz kalan mikroorganizmaların farklı mekanizmalar ile metal stresine karşı koyma yeteneğinde oldukları bilinmektedir. Bu sebeple metaller ve mikroorganizmalar arasındaki etkileşim biyoteknolojik uygulamada önemli bir role sahiptir (Dhanjal ve Cameotra, 2010).

Mikroorganizmaların stresli koşullar ile baş başa kaldıklarında canlılıklarını sürdürebilmek adına farklı davranışlar sergiledikleri ve bazı fonksiyonları kısıtladıkları bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda metal iyonları içeren besiyeri

ortamında inkübe edilen bakteriler metal stresi ile karşılaştıklarında morfolojilerinde tepkisel bir değişme gerçekleşmiş ve hücre boyutlarının küçüldüğü görülmüştür. Hücrelerdeki bu küçülme ile bakterilerin yüzey/hacim oranlarını, dolayısıyla bağlı yüzey alanlarını arttırdıkları ve böylece besin maddelerinden daha çok yararlanabildikleri görüşü hâkimdir (Dhanjal ve Cameotra, 2010).

Tablo 4.1. Bakır sülfat ve çinko sülfat katkılı (1 mM) NA besiyerinde gelişme gösteren *Bacillus* cinsine ait izolatlar

Mikroorganizma	Cu-NA	Zn-NA	Mikroorganizma	Cu-NA	Zn-NA
<i>Bacillus</i> sp. EBTA1	-	-	<i>Bacillus</i> sp. SBT12	-	-
<i>Bacillus</i> sp. EBTA2	+	-	<i>Bacillus</i> sp. ZBP4	-	-
<i>Bacillus</i> sp. EBTA3	-	-	<i>Bacillus</i> sp. ZBP10	-	-
<i>Bacillus</i> sp. EBTA4	-	-	<i>Bacillus</i> sp. HTA1	-	-
<i>Bacillus</i> sp. EBTA5	-	-	<i>Bacillus</i> sp. HTA2	-	-
<i>Bacillus</i> sp. EBTA6	+	-	<i>Bacillus</i> sp. BAST2	-	+
<i>Bacillus</i> sp. EBTA7	-	-	<i>Bacillus</i> sp. BMZE2	-	+
<i>Bacillus</i> sp. EBTA8	+	+	<i>Bacillus</i> sp. BMZE3	-	-
<i>Bacillus</i> sp. SBT1	-	-	<i>Bacillus</i> sp. BMZE4	+	+
<i>Bacillus</i> sp. SBT3	-	-	<i>Bacillus</i> sp. ZGT1	-	+
<i>Bacillus</i> sp. SBT4	-	+	<i>Bacillus</i> sp. ZGT3	-	+
<i>Bacillus</i> sp. SBT5	-	+	<i>Bacillus</i> sp. ZGT5	-	-
<i>Bacillus</i> sp. SBT6	-	-	<i>Bacillus</i> sp. ZGT9	-	+
<i>Bacillus</i> sp. SBT7	-	-	<i>Bacillus</i> sp. BAT3	-	-
<i>Bacillus</i> sp. SBT8	-	+	<i>Bacillus</i> sp. GİT2	-	-
<i>Bacillus</i> sp. SBT9	-	+	<i>Bacillus</i> sp. EKT1	+	-
<i>Bacillus</i> sp. SBT10	-	-	<i>Bacillus</i> sp. EKT2	-	+

(+) gelişme gösteren, (-) gelişme göstermeyen.

4.1.2. Cu ve ZnNP üretim çalışması bulguları

Direnç kazandırılan mikroorganizmalar ayrı ayrı Cu ve ZnNP üretim çalışmalarında kullanılmıştır. Bu amaçla her bir stoktan alınan bakterilerin sırasıyla NA ve NB'ta geliştirilmesinden sonra elde edilen hücresiz süpernatantları ile Cu ve ZnNP üretimleri gerçekleştirilmiştir. CuNP üretimi, üretim ortamının renginin maviden yeşile dönmesi şeklinde (Tiwari ve ark., 2016); ZnNP üretimi ise ortam renginin açık sarıdan süt beyazına dönmesi şeklinde gerçekleşmekte ve çıplak gözle takip edilebilmektedir (Rajan ve ark., 2016).

Metal nanopartiküllerinin karakterizasyonu ve optik özelliklerinin belirlenmesi için UV-VIS spektrumunun kullanımı yaygın bir metottur. NP'lerin elektromanyetik ışınlarla etkileşim göstermesi ve akabinde iletken elektronların toplu halde titreşmesi sonucu metal NP'ler kendilerine özgü bir UV-VIS absorpsiyon piki göstermektedirler. Bu durum yüzey plazmon rezonansı (YPR) olarak bilinmektedir. Absorpsiyon piki partiküllerin büyüklüğü, etrafını saran kimyasal yapı ve yüzeye adsorbe olmuş maddeler hakkında bilgi vermektedir (Sinha ve Ahmaruzzaman, 2015).

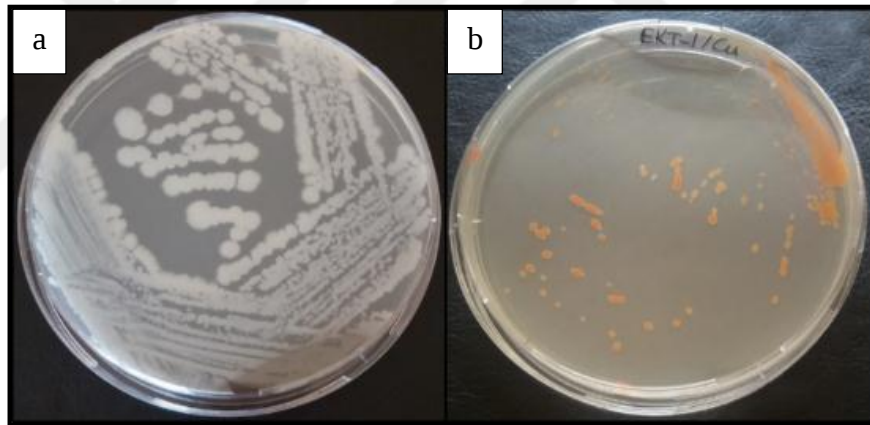
Farklı metallerden biyosentez ile NP üretim çalışmalarında yüzey plazmon rezonansına bağlı olarak tek bir absorpsiyon piki görülmekte, ancak bakır için farklı uygulamalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. CuNP'lerinin mikroorganizmalar aracılığı ile sentezinde absorpsiyon pikinin 570-630 nm ve 300-370 nm olmak üzere iki farklı dalga boyu aralıklarında görüldüğü yapılan çalışmalarla bildirilmiştir (Rajan ve ark., 2016). Biyosentezlenmiş ZnO NP'leri için ise absorpsiyon pikinin 340-360 nm aralığında olduğu bildirilmektedir (Moghaddam ve ark., 2017).

Mevcut denemelerde $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ içeren süpernatantlar 72 saat inkübasyondan sonra dahi başlangıçtaki mavi ve açık sarı renklerinde kalmış ve beklenen renk değişimleri gerçekleşmemiştir. Bununla birlikte spektrum bandında da literatürde belirtilen şekilde pik ya da pikler görülmemiş, bu sebeple mevcut bakterilerin Cu ve ZnNP üretim yeteneğinde olmadığına kanaat getirilmiştir. Böylece Cu ve ZnNP üretim denemeleri sonlandırılarak, mevcut bakterilerle selenyum elementinden NP üretilebilirliği test edilmiştir.

4.2. SeNP Üretim Çalışmaları

4.2.1. *Bacillus* izolatının seçimi

Selenyum nanopartiküllerinin üretim çalışmalarında Bölüm 3.2.2.2’de anlatıldığı şekilde metalik direnç kazandırılmış mikroorganizmalar kullanılmıştır. *Bacillus* izolatları üç farklı SeO_2 konsantrasyonundaki (1,9 mM; 2,9 mM ve 3,8 mM) besiyeri ortamlarında geliştirilmiştir. Bakteriler 1,9 mM katkılı besiyerinde gelişme gösterirken 2,9 ve 3,8 mM’lık besiyerlerinde hiçbir gelişme olmamıştır. Gelişme gösteren izolatlar içerisinde, izole edildikten sonra bakır metaline karşı direnç kazandırılmış ve *Bacillus* sp. EKT1 olarak adlandırılmış izolatın Şekil 4.1.’de de görüldüğü gibi iyi bir gelişme gösterdiği, aynı zamanda rengin de turuncuya dönüştüğü gözlenmiştir. Bu sebeple SeNP üretim çalışmalarında bu izolat kullanılmıştır.



Şekil 4.1. *Bacillus* sp. EKT1 izolatının farklı besiyeri ortamlarındaki gelişimi a) Katkısız NA’da; b) SeO_2 katkılı NA’da

4.2.2. SeNP üretimi için yapılan ön çalışmalar

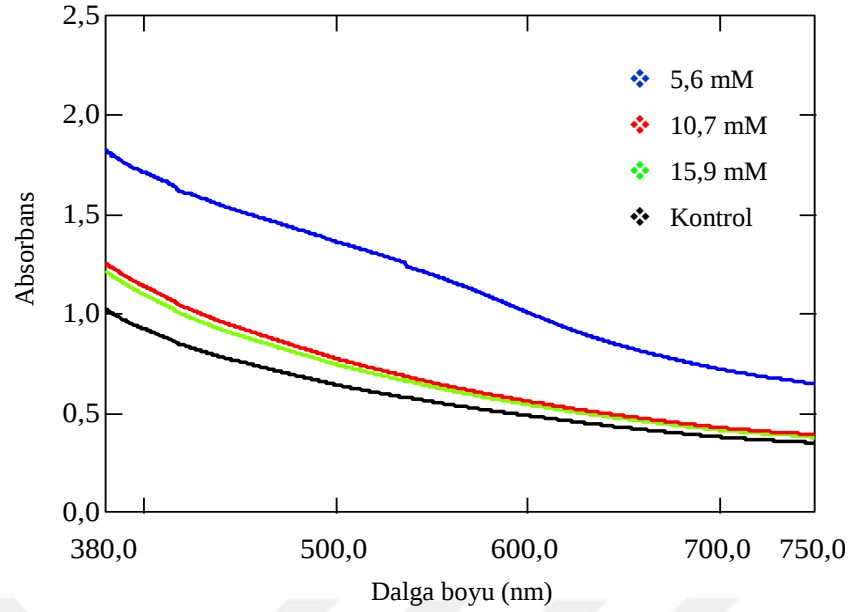
Bacillus sp. EKT1 izolatı ile SeNP üretiminin optimizasyon çalışmalarına başlamadan önce bazı ön denemeler yapılmıştır. Bunun için ilk olarak izolatının sırasıyla NA ve NB’te geliştirilmesi ile elde edilen hücresiz sıvı kısma son konsantrasyonları 5,6; 10,7 ve 15,9 mM olacak şekilde SeO_2 çözeltisi eklenerek NP üretim yeteneği test edilmiştir. Kontrol örneği olarak SeO_2 ilavesiz süpernatant aynı koşullarda muamele edilmiştir.

72 saatlik inkübasyon sonrası 5,6 mM'lık örneğin rengi açık sarıdan kiremit kırmızısına dönüşmüştür (Şekil 4.2.). Diğer örneklerde de koyulaşma olmakla birlikte yoğun bir renk dönüşümü gerçekleşmemiştir. Başlangıçta besiyeri kaynaklı açık sarı olan rengin kiremit kırmızısı rengine dönmesi selenyumun elementel forma (Se^0) indirgendiğinin bir göstergesidir. Ortam renginin kiremit kırmızısına dönmesi, NP'lerin sahip olduğu yüzey plazmon titreşimlerinin uyarılması sayesinde gerçekleşmekte ve NP oluşumunu haber vermektedir (Shakibaie ve ark., 2015).



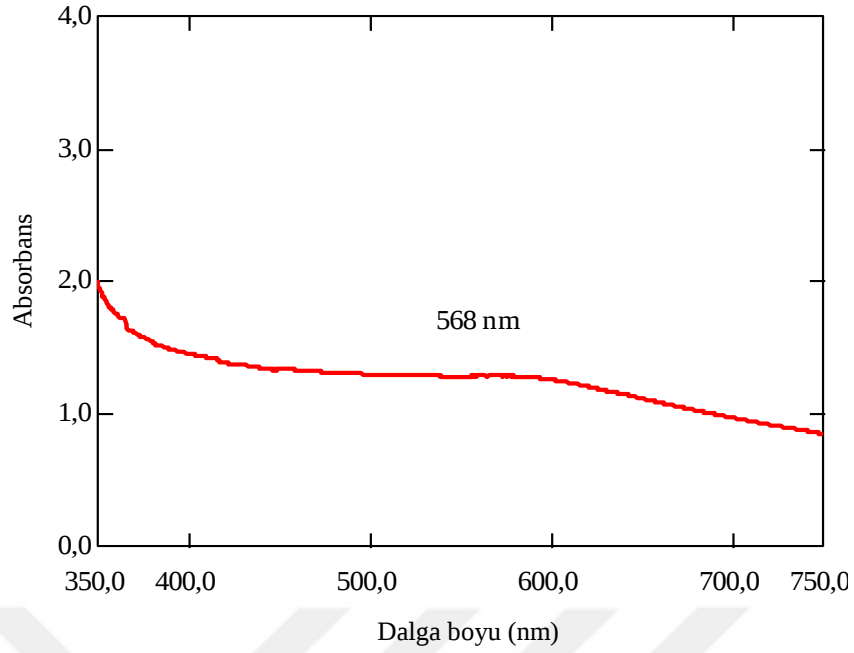
Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonda SeO_2 katkılı süpernatantlar için gözlenen zamana bağlı renk değişim görüntüsü (Soldan sağa: 5,6 mM; 10,71 mM; 15,96 mM)

Örneklerin renk yoğunluklarını kıyaslamak için damıtık su ile 1/5 oranında seyreltilmelerinden sonra UV-VIS spektrofotometrede 350-750 nm dalga boyu aralığında spektrum taramaları yapılmış ve tarama sonucuna göre en yüksek spektrumu renk dönüşümündeki yoğunluktan da beklendiği üzere 5,6 mM'lık örnek vermiştir (Şekil 4.3.). 5,6 mM'ın üzerindeki SeO_2 konsantrasyonuna sahip örneklerin absorbans değerlerinin daha düşük çıkması, SeO_2 'in artan konsantrasyonlarında NP üretiminin azalmasına işaret etmektedir. Ayrıca, 10,7 mM ve 15,9 mM konsantrasyonlarındaki örnekler için absorbans değerlerinin oldukça yakın olduğu saptanmıştır. Bu durum, *Bacillus* sp. EKT1 izolatının SeNP indirgeme potansiyelinin 10,7 mM'ın üzerindeki konsantrasyonlar için anlamlı ölçüde değişmediğini göstermektedir. Bu sebeple daha sonraki çalışmalarda 10 mM'ın altındaki SeO_2 konsantrasyonları için çalışılmıştır.



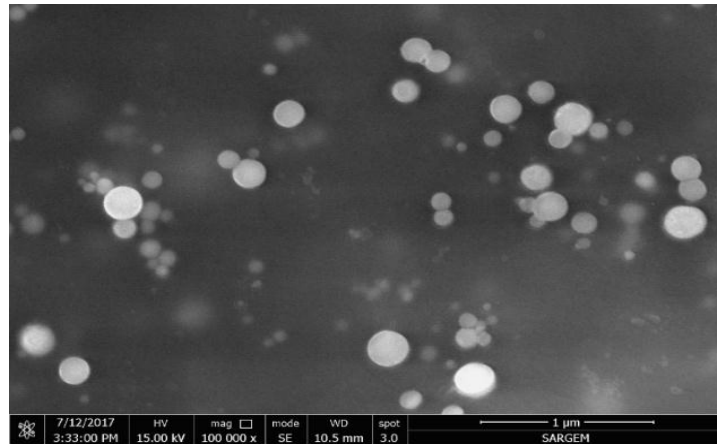
Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonda SeO₂ içeren süpernatantların 72 saatlik inkübasyon sonundaki spektrum grafiği

Spektrum taraması sonucuna göre 5,6 mM'lık örneğin 568 nm'de SeNP'lerinin yüzey plazmon rezonansına karşılık gelen bir absorpsiyon piki verdiği görülmüştür (Şekil 4.4.). Absorpsiyon pikleri pek çok faktöre bağlı olarak farklı dalga boylarında görülebilmektedir. SeNP üretimi için yapılan bazı çalışmalarda, NP'lerin 570 nm dalga boyunda partiküllerin yüzey plazmon rezonansından kaynaklanan bir absorpsiyon pikine sahip olduğu bildirilmiştir (Mollania ve ark., 2016). Bu sebeple daha önce yapılmış çalışmalar da göz önünde bulundurularak mevcut çalışmadaki SeNP'lerinin spektrofotometrik analizi 568 nm dalga boyunda yapılmıştır.



Şekil 4.4. 5,6 mM SeO₂ konsantrasyonundaki süpernatantın 96 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen spektrum grafiği

Nanopartikül üretiminin doğrulanması için ayrıca 5,6 mM konsantrasyonundaki örnek, alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FESEM) ile analiz edilmiştir. Örnek bu amaçla Bölüm 3.2.6’da anlatıldığı şekilde saflaştırıldıktan sonra NP’lerin parçacık boyutları FESEM ile görüntülenmiştir (Şekil 4.5.). Görüntüleme sonucu *Bacillus* sp. EKT1 izolatının SeNP’lerini hücre dışı şekilde üretebildiği tespit edilmiştir. Üretilen NP’lerin yaklaşık 100-200 nm aralığında boyutlara sahip olduğu ve böylece *Bacillus* sp. EKT1 izolatının selenyumu nanoboyuta indirgediği tespit edilmiştir.



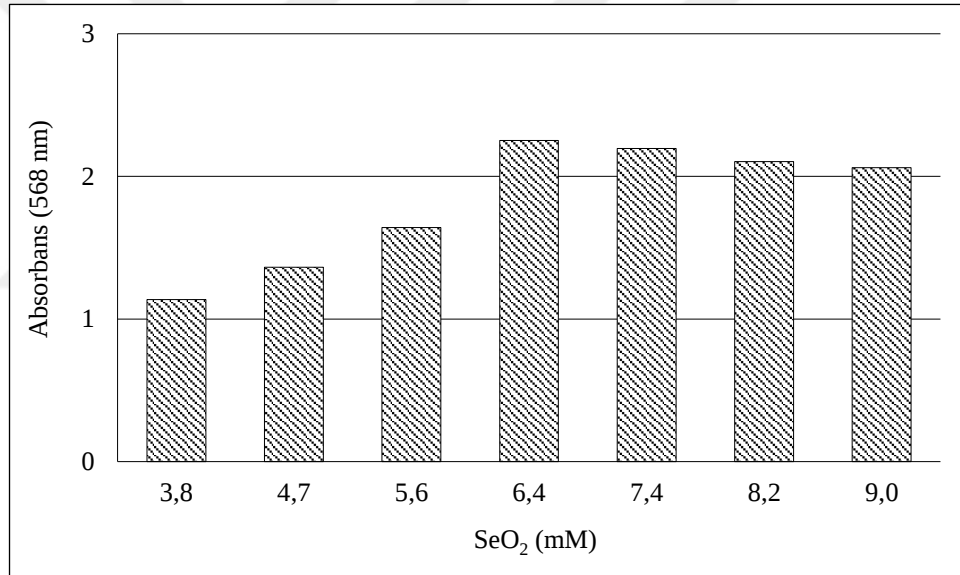
Şekil 4.5. *Bacillus* sp. EKT1 izolatı aracılığıyla 5,6 mM SeO₂ içeren süpernatanttan üretilen SeNP’lerinin FESEM görüntüsü

Renk dönüşümü, UV-VIS spektrum taraması ve FESEM analizleri ile SeNP'lerinin üretilbildiği belirlendikten sonra, çalışmalara *Bacillus* sp. EKT1 tarafından SeNP üretim koşullarının optimizasyonu ile devam edilmiştir.

4.3. SeNP Üretimi için Yapılan Optimizasyon Çalışmaları

4.3.1 SeO₂ konsantrasyonunun SeNP üretimine etkisi

568 nm'de gerçekleştirilen spektrofotometrik analize göre en yüksek absorbans değeri 6,4 mM konsantrasyonundaki örnekte görülmüş (Şekil 4.6.), bu sebeple bundan sonraki optimizasyon çalışmalarına bu konsantrasyonda devam edilmiştir.



Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda SeO₂ içeren süpernatantlardan SeNP'lerinin üretimi sonrası (96 saat) okunan absorbans değerleri

Ayrıca, konsantrasyonu 3,8 mM ile 9,0 mM arasında değişen 7 farklı örnekten üretilen NP'lerin Bölüm 3.2.6'da anlatıldığı şekilde saflaştırılmasının ardından FESEM cihazında 50.000 kat büyütme oranında şekil ve boyutlarının incelenmesiyle morfolojik karakterizasyonları yapılmıştır.

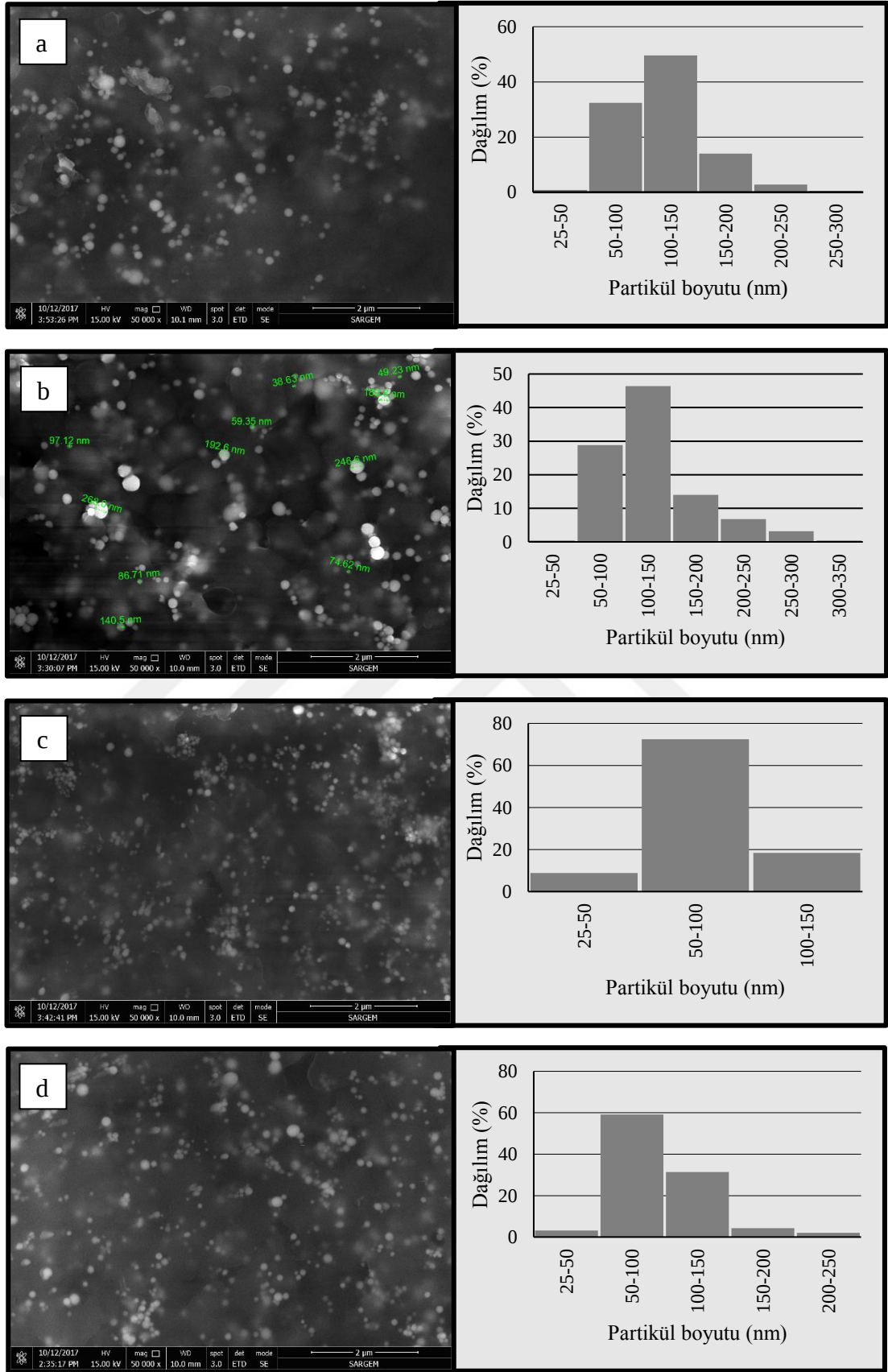
Mevcut çalışmada analiz edilen NP'lerin tamamının küresel şekilde olduğu gözlenmiştir. Örneklerin farklı bölgelerinden alınan görüntülerde yer alan belli

sayıdaki partikülün (250-550 adet) çap uzunluklarının ImageJ programı ile ölçülmesiyle her bir örnek için ortalama partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüklerinin % dağılımı belirlenmiştir (Schneider ve ark., 2012). Ortalama partikül büyüklüğü görüntü alınan bölgedeki partiküllerin toplam çap uzunluğunun aynı bölgedeki toplam partikül sayısına bölünmesi ile belirlenmiştir. Partiküllerin FESEM görüntüleri ve boyut dağılımları Şekil 4.7.'de verilmiştir.

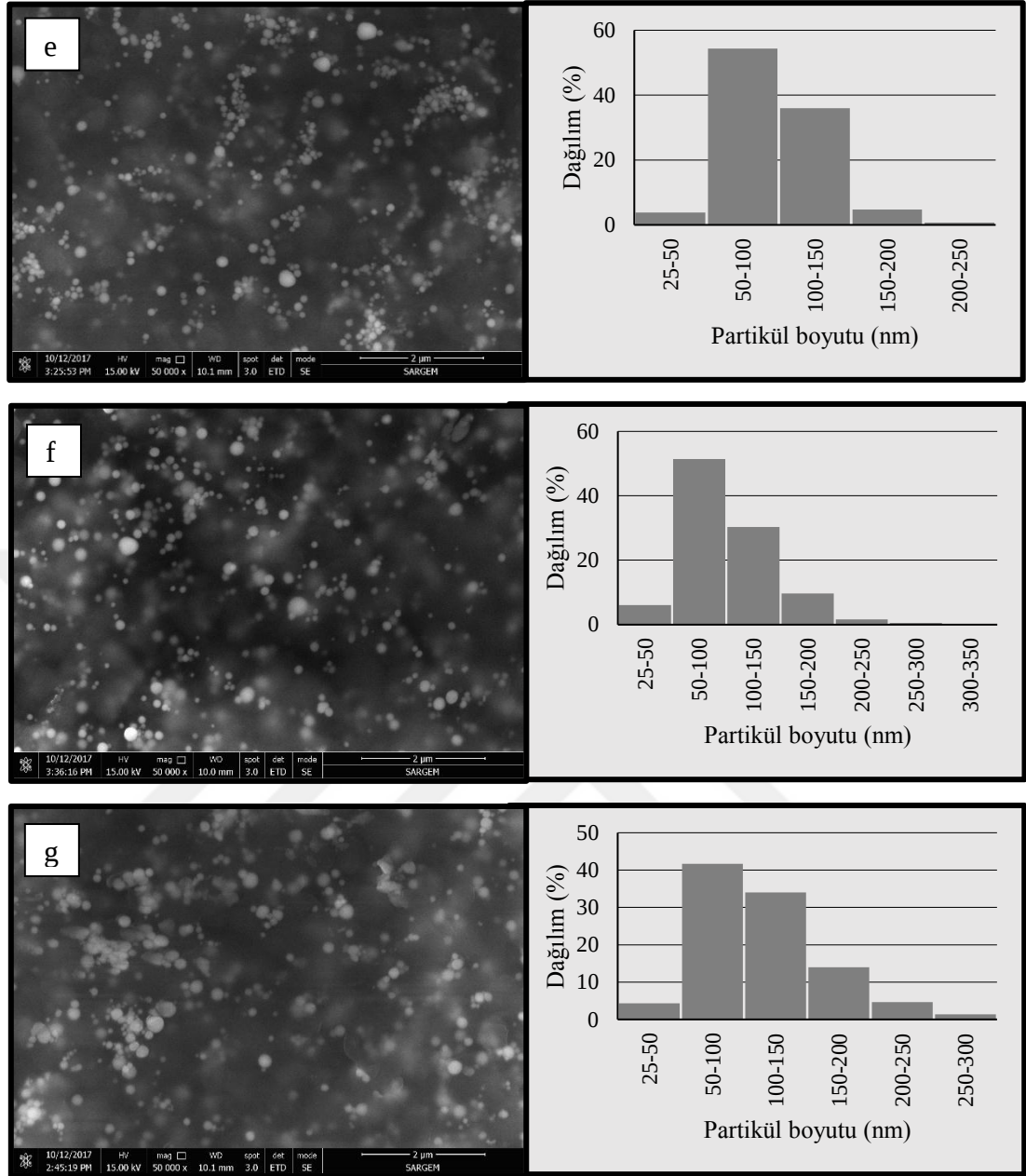
Yapılan ölçümlere göre bütün örnekler arasında en küçük ve en büyük partikül büyüklüğü sırasıyla 30 nm ve 335 nm olarak ölçülmüştür. Örneklerle ait ortalama partikül büyüklükleri Şekil 4.8.'de verilmiştir. En küçük ortalama partikül büyüklüğü 4,7 mM konsantrasyonundaki örneğe ait olup; konsantrasyonun artmasıyla ortalama partikül büyüklüğü de artmıştır.

Örnekler partikül boyutlarının dağılımı hususunda incelendiğinde homojen bir dağılım olmadığı görülmektedir. 3,8 mM ve 4,7 mM'lik örneklerden üretilen NP'ler için boyut dağılımı ağırlıklı olarak 100-150 nm aralığında iken, daha yüksek konsantrasyondaki diğer örnekler için dağılım ağırlıklı olarak 50-100 nm aralığındadır (Şekil 4.9.). Bütün örnekler içinde 5,6 mM'lık örnek heterojen bir dağılım sergilese de monodispers yapıya sahip olmaya en fazla yaklaşan örnektir. Örnek 150 nm'den büyük partikül içermezken 250 farklı partikülün ölçülmesi ile belirlenen boyut dağılımında yüksek oranda (%72) 50-100 nm boyutunda partikül bulunmaktadır. Yalnızca 4,7 mM'lık örnekten üretilen NP'ler diğerlerine kıyasla biraz daha büyük partiküller içermekte (200 nm ve üzeri boyutta) ancak bu partiküllerin sıklığı da %10'u geçmemektedir.

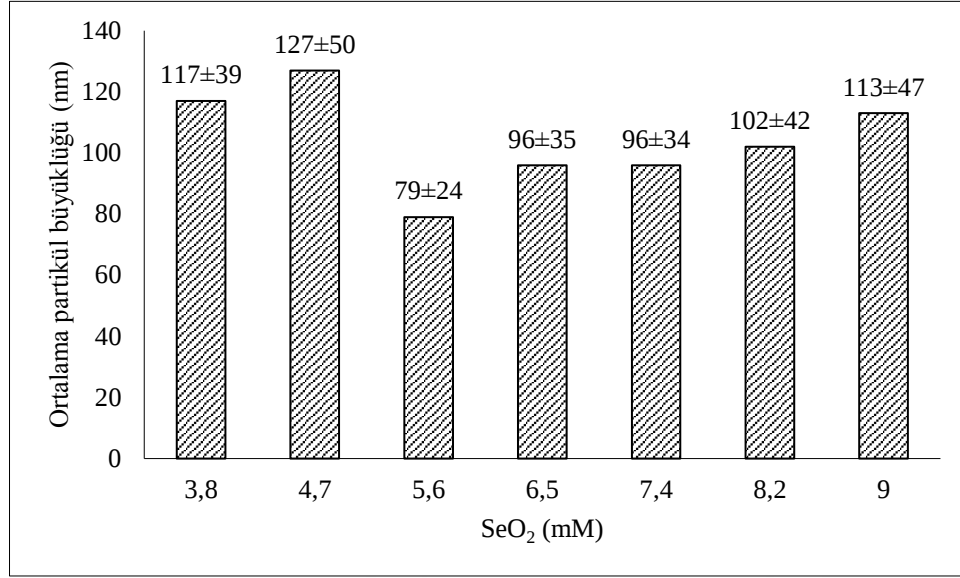
Elde edilen bulgulara göre 5,6 mM'lık örnek fotometrik analizde 568 nm'de en yüksek absorbans değerini vermediği halde FESEM görüntüsünde diğer örneklerle kıyasla daha fazla küçük boyutta partikül içerdiği belirlenmiştir. Ancak partikül boyut dağılımının örneğin belirli bir bölgesinden alınan görüntüdeki sınırlı sayıdaki partikülün ölçülmesiyle belirlendiği unutulmamalıdır.



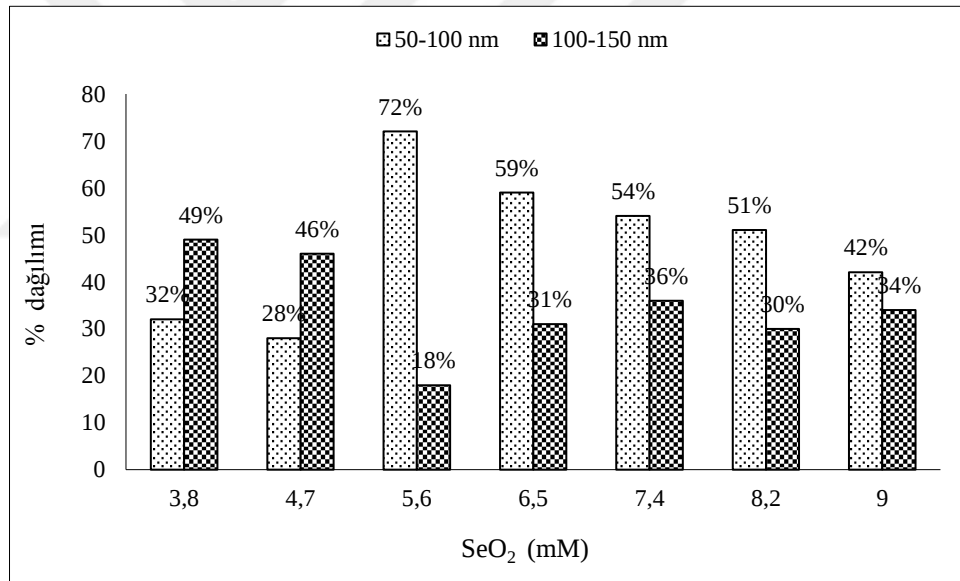
Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda SeO_2 'ten üretilen SeNP'lerinin FESEM görüntüsü ve partikül boyut dağılımı histogramı a) 3,8 mM; b) 4,7 mM; c) 5,6 mM; d) 6,5 mM; e) 7,4 mM; f) 8,2 mM; g) 9,0 mM



Şekil 4.7. (Devamı)



Şekil 4.8. Farklı SeO₂ konsantrasyonlarında üretilen SeNP'lerinin ortalama partikül büyüklüğü



Şekil 4.9. Farklı SeO₂ konsantrasyonlarında üretilen SeNP'lerinin % dağılımı

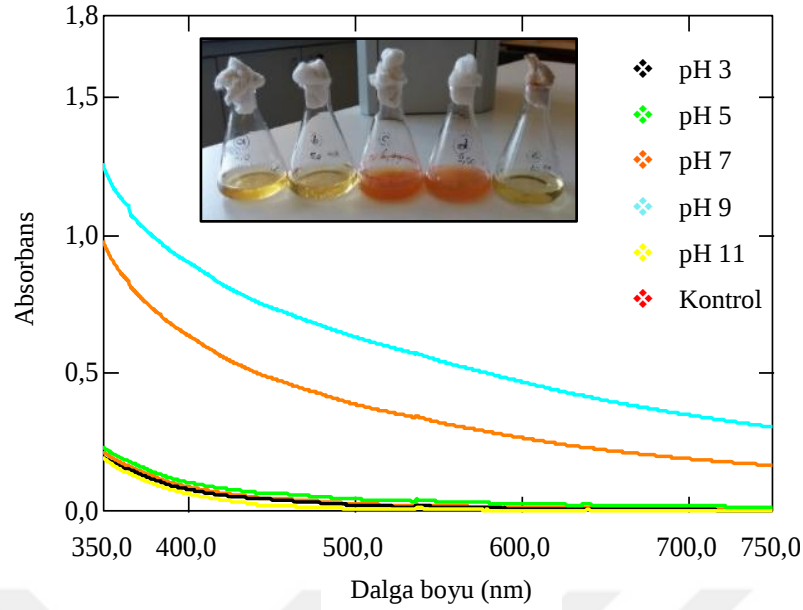
Nanopartiküllerin partikül boyutlarının belirlenmesi endüstriyel ve biyolojik uygulamalar için önem taşırken, 100 nm'den küçük SeNP'lerinin biyokullanılabilirliğinin daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Dhanjal ve Cameotra (2010) yaptıkları bir çalışmada 2 mM selenitin *Bacillus cereus* tarafından hücre içi şekilde indirgendiğini ve üretilen SeNP'lerinin küresel şekilde ve 150-200 nm boyutlarında olduğunu bildirmiştir. Çözelti miktarının NP üretimine etkisinin incelendiği bir çalışmada ise bakteriye ait hücresiz sıvıya farklı konsantrasyonlarda (0,25-5 mM)

sodyum selenit ilave edilerek üretim gerçekleştirilmiş; spektrofotometrik analiz sonucunda belirli bir konsantrasyon değerine (3 mM) kadar absorbans değerlerinin arttığı, üzerindeki konsantrasyonlarda ise absorbansın azaldığı tespit edilmiştir (Mollania ve ark., 2016). Mevcut çalışmada *Bacillus* sp. EKT1 tarafından NP üretiminde çözelti konsantrasyonunun üretime etkisi ve üretilen NP'lerin morfolojileri yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

4.3.2. pH'nın SeNP üretimine etkisi

pH'ları beş farklı değer için (pH 3, 5, 7, 9, 11) ayarlanmış 6,5 mM SeO₂ konsantrasyonundaki süpernatantlar NP üretimleri için test edilmiş ve örneklerin renginin açık sarıdan kiremit kırmızısına dönüşü çıplak gözle izlenmiştir. Kontrol örneği olarak orijinal pH değerindeki (pH 7) SeO₂ ilavesiz süpernatant kullanılmıştır. 96 saat sonunda analiz sonlandırıldığında pH 7 ve 9'da inkübe edilen örneklerde kiremit kırmızısı rengin oluşumu gözlenmiş, diğer pH'lar için göz ile fark edilebilir herhangi bir renk değişimi gerçekleşmemiştir.

Örneklerin tümünün 350-750 nm dalga boyu aralığında spektrum taraması sonucu pH 3, 5 ve 11'de inkübe edilen örneklere ait absorbans eğrilerinin oldukça düşük ve kontrol örneği ile çok yakın değerlere sahip olması, yüksek asidik ve bazik pH değerlerinde NP üretiminin gerçekleşmediği yönünde yorumlanmıştır. Örneklere ait spektrum Şekil 4.10.'da verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi pH 9'da elde edilen absorbans değerleri pH 7'den daha yüksektir. Bu sebeple pH 9 optimum olarak değerlendirilmiş ve sonraki NP üretim çalışmaları bu pH'da gerçekleştirilmiştir.

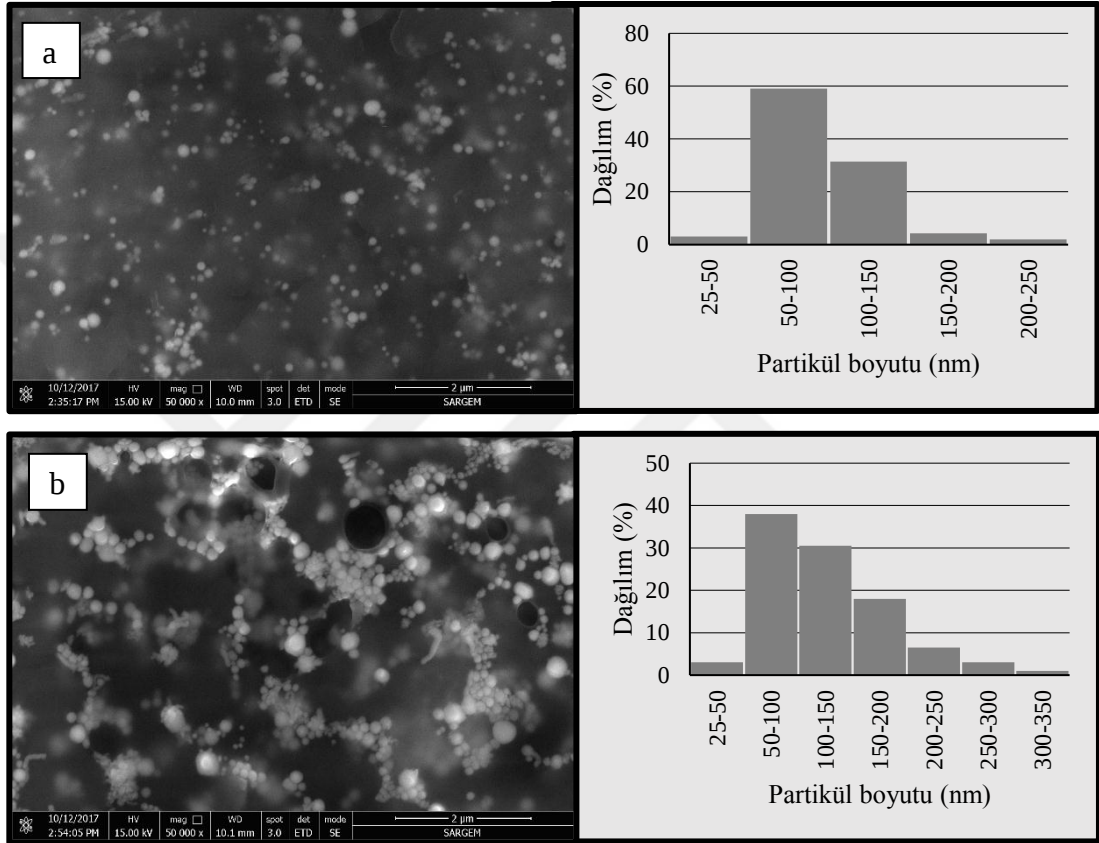


Şekil 4.10. Farklı pH değerlerindeki SeNP üretim ortamlarının 96 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen spektrum grafiği

Kimyasal ve biyolojik yöntemlerle NP üretiminde, üretim ortamına ait pH değeri partiküllerin şekil ve boyutları üzerinde doğrudan etki sahibidir (Alqadi ve ark., 2014). Bu sebeple ortam pH'sının kontrol edilmesiyle farklı morfolojilerde partiküller üretilmektedir. SeNP'lerinin üretiminde selenit iyonları ile polisakkarit, lipid ve protein biyokütellerinin yüzeyindeki farklı fonksiyonel gruplar (karboksil, hidroksil, amin, fosforil vb.) arasında gerçekleşen bazı özel fizikokimyasal etkileşimler sonucunda farklı morfolojilerde partiküllerin üretildiği bildirilmektedir. Gerçekleşen etkileşimin türü ortamın pH'sına bağlı olarak değiştiği için, pH'nın kontrol edilmesiyle NP'ler de manipüle edilebilmektedir (Mollania ve ark., 2016).

Mevcut çalışmada üretimin gerçekleştiği pH değerleri olan pH 7 ve 9'da üretilen NP'lerin morfolojilerinin belirlenmesi amacıyla FESEM analizleri yapılmış; NP'lerin her iki pH değeri için ağırlıklı olarak 50-150 nm boyutlarında ve küresel şekilde olduğu görülmüştür (Şekil 4.11.). pH 7 örneğinin %90'ının, pH 9 örneğinin ise %68'inin 50-150 nm boyutlarındaki partiküllerden oluştuğu tespit edilmiştir. Bu durum pH 7 örneğinin daha küçük partiküllere sahip olduğunu, aynı zamanda daha homojen bir yapı sergilediğini göstermektedir. pH 7 örneğinin 250 nm'den büyük partikül içermediği, pH 9 örneğinin %4'ünün 250 nm ve üzeri boyuttaki partiküllerden

oluştugu saptanmıştır. pH 7’de üretilen NP’lerin UV-VIS absorbans değerleri daha yüksek olmasına rağmen boyutlarının daha küçük ve yapısının daha düzenli olması pH 7’de üretilen SeNP’lerini pH 9’da üretilenlere göre daha avantajlı kılmaktadır. Ayrıca süpernatantın orijinal pH’sının nötral değerde olması pH ayarlama işlemi için kimyasal kullanımı gerekliliğini ortadan kaldırmaktadır.



Şekil 4.11. Farklı pH değerlerinde üretilen SeNP’lerinin FESEM görüntüsü ve partikül boyut dağılımı histogramı a) pH 7; b) pH 9

Wang ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan bir çalışmada *Bacillus subtilis* aracılığı ile SeNP’leri üretilmiş ve üretim hücre içi şekilde, ortam pH’sı 7,0’a ayarlanarak gerçekleştirilmiştir. 48 saat inkübasyonun ardından yapılan analizlerde partiküllerin küresel şekilde ve 50-400 nm boyutlarında olduğu bildirilmiştir. Mevcut çalışmada *Bacillus* sp. EKT1 izolatına ait süpernatant ile pH 7’de üretilen NP’lere ait küresel şekil ve 25-250 nm boyutları yapılan çalışma ile benzerlik göstermektedir.

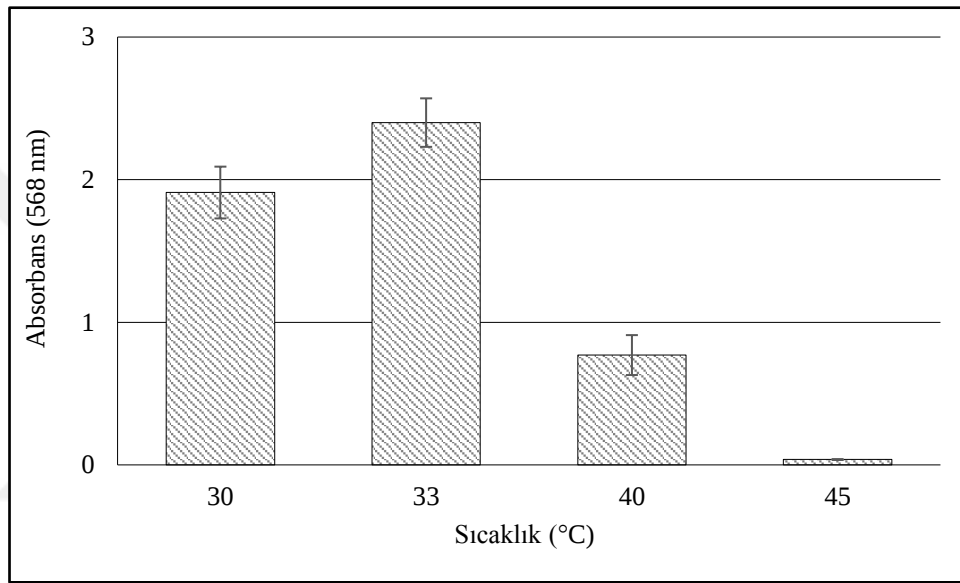
Enterobacter sp. suşunun geliştirilmesinin ardından elde edilen hücresiz sıvı kullanılarak SeNP üretiminin gerçekleştiği bir başka çalışmada, farklı üretim ortamı pH'larının (pH 3-11) partikül üretimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. 570 nm'de gerçekleştirilen spektrofotometrik ölçümler sonucu en yüksek absorbans değeri nötral pH'daki örnek için elde edilmiş; yüksek asidik ve bazik pH'larda ise üretim gerçekleşmemiştir. Üretilen NP'lerin çubuk şeklinde ve 90-120 nm boyutlarında olduğu bildirilmiştir (Mollania ve ark., 2016).

Bacillus sp. EKT1 izolatu ile pH 7 ve 9'da üretilen SeNP'leri farklı absorbans değerleri ve morfolojilere sahip olmakla birlikte, pH 9'daki NP'lerin yüksek oranda agregasyona uğramış olduğu saptanmıştır. Agregasyon, partiküllerin bir arada toplanıp birbirine yapışması sonucu görülen kümeleşme durumudur. Partiküllerin nanoboyuta indirgenmesi neticesinde artan yüzey alanı/hacim oranları sebebiyle partiküller daha fazla yüzey yükü ile yüklenmekte ve atomların sahip olduğu serbest yüzey enerjisi artmaktadır. Sahip oldukları yüksek serbest enerjileri sebebiyle NP'ler yüksek reaktiviteye ve koloidal olarak stabil olmayan bir yapıya sahip olmaktadır. Bu sebeple atom ve moleküller birbiri ile bağ yaparak sahip oldukları yüksek serbest yüzey enerjilerini düşürme eğilimindedirler. Bu durum agregasyon olarak adlandırılmaktadır. Agregasyon sonucu NP'lerin fizikokimyasal özellikleri, reaktiviteleri, taşınımları ve biyo-kullanılabilirlik gibi bazı biyolojik etkileşimlerinin değiştiği bildirilmektedir (Chekli ve ark., 2013; Zhang, 2014).

Mevcut çalışmada, süpernatanta SeO₂ ilavesinin ardından pH'nın 9 olarak ayarlandığı ortamda üretilen NP'lerin pH 7'ye göre daha fazla agregasyon gösterdiği görülmekte; bu durum farklı pH değerlerinde üretilen partiküllerin yüzey fizikokimyalarındaki farklılık ile ilişkilendirilmektedir. Spektrofotometrik ölçümler sonucunda optimum pH değeri 9 olarak belirlense de pH 7'de üretilen NP'ler daha küçük boyutları, nispeten daha homojen boyut dağılımları ve daha az agregasyon göstermeleri sebebiyle biyolojik uygulamalarda daha fazla kullanım potansiyeline sahiptir (Lin ve ark., 2017).

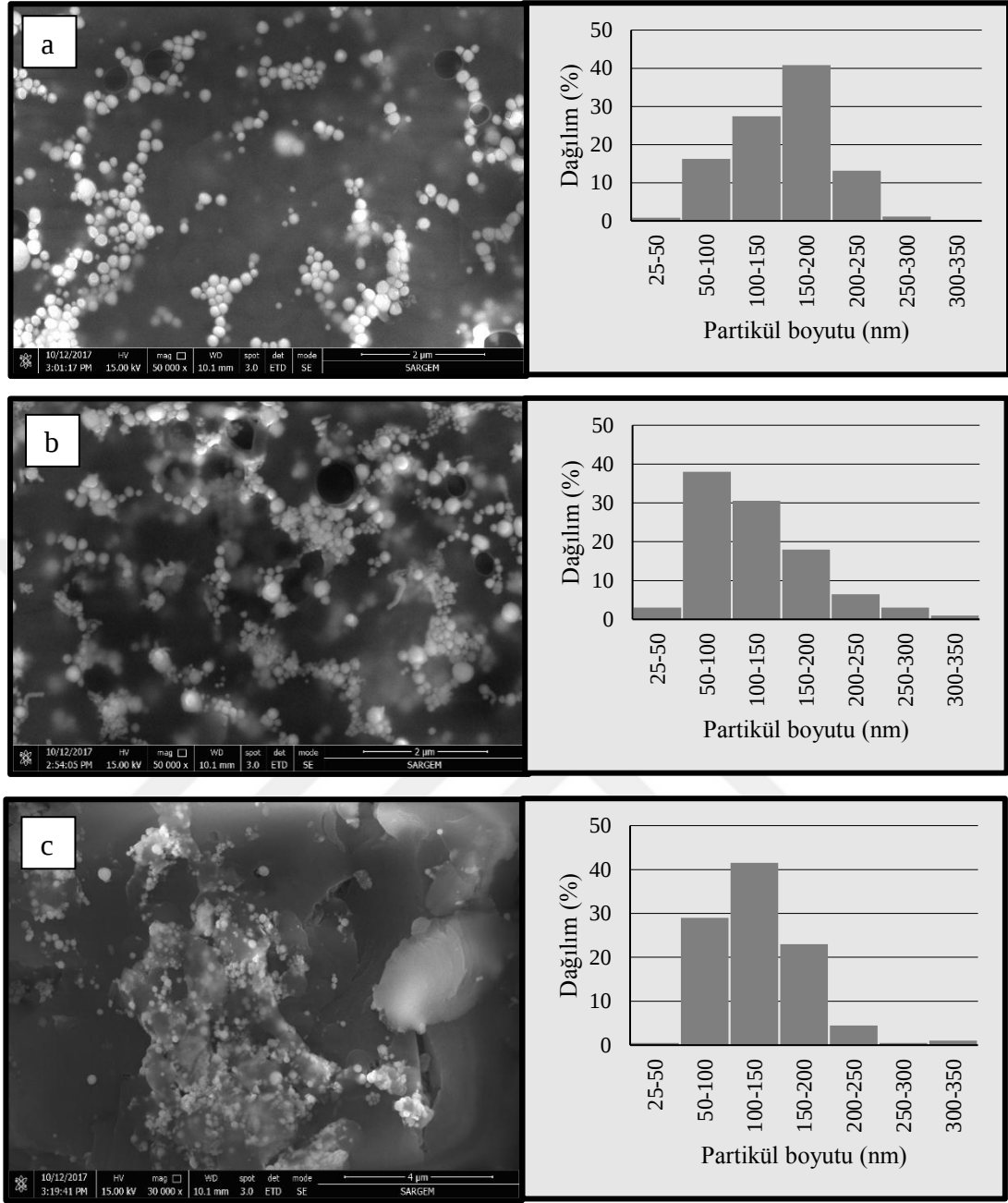
4.3.3. Reaksiyon sıcaklığının SeNP üretimine etkisi

Nanopartikül üretim çalışmaları dört farklı ortam sıcaklığında gerçekleştirilmiş (30, 33, 40, 45°C) ve 568 nm’de ölçülen absorbans değerleri arasında en yüksek absorbansı 33°C’de inkübe edilen örnek vermiştir (Şekil 4.12.). 40°C’de absorbans değeri ve dolayısıyla NP oluşumu azalırken 45°C’de inkübe edilen örnekte renk dönüşümü gerçekleşmemiştir.



Şekil 4.12. Farklı sıcaklıklarda (30°C, 33°C, 40°C, 45°C) 96 saat inkübe edilen SeNP üretim ortamlarının 568 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri grafiği

Farklı sıcaklıklarda üretilen partiküllerin boyut dağılımları Şekil 4.13.’te verilmiştir. 50-100 nm büyüklüğündeki partiküllerin dağılım %’leri 30, 33 ve 40°C için sırasıyla %16, %38 ve %29’dur. 33°C’nin altındaki ve üsteki sıcaklıklarda 50 nm’den büyük boyuttaki partikül yüzdelerinin artması spektrofotometrik bulguları desteklemekte ve 33°C’nin optimum sıcaklık olduğuna işaret etmektedir. Bakteriyel SeNP üretimi için yapılan bazı çalışmalarda optimum sıcaklık 37°C olarak belirlenmiş, üzerindeki sıcaklıklarda üretimin azaldığı ve 55°C’nin üzerinde ise üretimin gerçekleşmediği bildirilmiştir. Bu durum NP’lerin indirgenmesinden sorumlu redüktaz enzimlerinin yüksek sıcaklıklarda etkinliğinin azalması şeklinde yorumlanmıştır (Mollania ark., 2016).



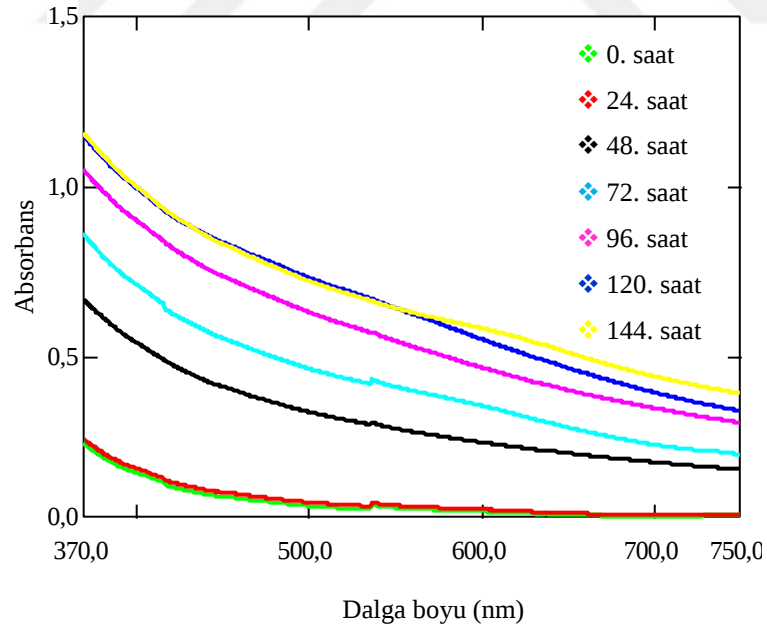
Şekil 4.13. Farklı sıcaklıklarda üretilen SeNP'lere ait FESEM görüntüsü ve partikül boyut dağılımı histogramı a) 30°C; b) 33°C; c) 40°C

4.3.4. İnkübasyon süresinin SeNP üretimine etkisi

İnkübasyon süresinin NP oluşumu üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla üretim ortamından her 24 saatte bir 0,5 mL örnek alınarak damıtık su ile 2,5 mL'ye tamamlanmış, seyreltilen örneklerin spektrofotometrik analizi yapılarak SeNP üretiminin zamana bağlı değişimi gözlenmiştir. İnkübasyonun başlangıcında ortamdan

alınıp seyreltilen örnek 0. saat olarak kabul edilmiş ve NP üretimi 33°C’de 144 saat süre ile gerçekleştirilmiştir.

Spektruma göre 0. saat ile 24. saatin aynı yerde absorbans eğrisine sahip olduğu görülmektedir. Bu durum ilk 24 saatte herhangi bir renk dönüşümünün ve dolayısıyla NP üretiminin gerçekleşmediğini göstermektedir (Şekil 4.14.). Se^{+4} iyonlarının elementel forma indirgenmesi 24 saatten sonra başlamakta, indirgenme işlemi 144. saate kadar devam etmektedir. 120. ve 144. saatler için absorbans eğrilerinin oldukça yakın olması indirgenme işleminin 120 saatin üzerinde anlamlı ölçüde artmadığına işaret etmektedir. *Bacillus* sp. EKT1 izolatu ile SeNP’lerinin üretiminde en yüksek absorbans değerlerine 120 ile 144 saat arasında ulaşılsa da 96. saat için elde edilen absorbans eğrisinin 120. saate yakın olması, 96 saatlik inkübasyon süresini kabul edilebilir kılmaktadır. Mevcut çalışmanın fiziksel ve kimyasal yöntemlerle NP üretimine alternatif olabilmesi için üretimin çevre dostu olmasının yanında ekonomik de olması gerekmektedir. Bu sebeple 96 saatlik inkübasyon süresi NP üretimi için optimum olarak kabul edilmiştir.



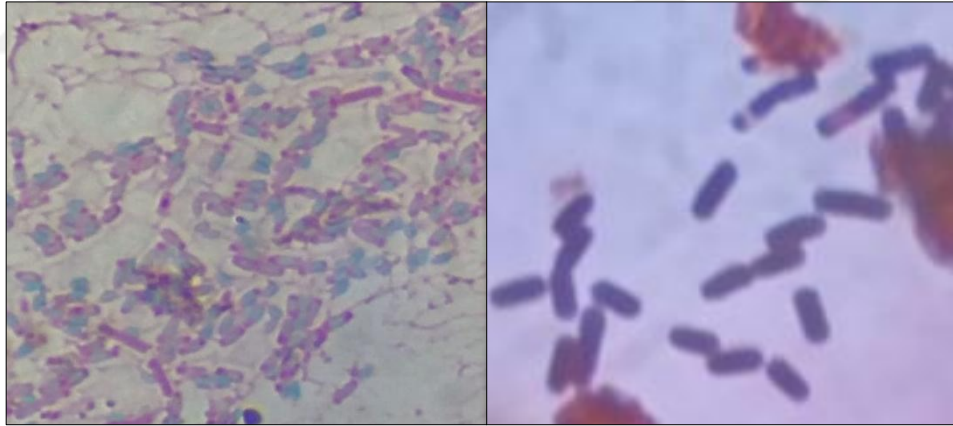
Şekil 4.14. SeNP’lerinin zamana bağlı spektrumları

Nanopartikül üretimi için yapılan bazı kimyasal sentez çalışmalarında ortam renginin birkaç dakikadan birkaç saate kadar dönüştüğü bildirilirken, bakteriyel süpernatantın

kullanıldığı biyo-üretim çalışmalarında indirgenme işlemi mikroorganizmalarca üretilen indirgeyici özellikteki bazı enzimler tarafından gerçekleştiği için kimyasal yöntemlere kıyasla daha uzun sürmektedir. Yapılan mikrobiyel çalışmalarda kiremit kırmızısı rengin genellikle 14-15 saatin sonunda gözlemlendiği bildirilmektedir (Dwivedi ve ark., 2011; Dwivedi ve ark., 2013; Shakibaie ve ark., 2015). Mevcut çalışmada renk dönüşümü 24 saatin sonunda gerçekleşmekte, yapılan çalışmalarla kıyaslandığında büyük bir farklılık göstermemektedir. Renk dönüşümü için gereken süre süpernatanta ilave edilen çözeltinin konsantrasyonu ve inkübasyon sıcaklığı gibi koşullara bağlı olarak daha kısa ya da uzun olabilmektedir.

4.4. *Bacillus* sp. EKT1 İzolatının Tanımlanması

Yapılan morfolojik ve biyokimyasal testler sonucunda *Bacillus* sp. EKT1'in Gram pozitif, spor pozitif, katalaz pozitif ve çubuk şeklinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.15.).

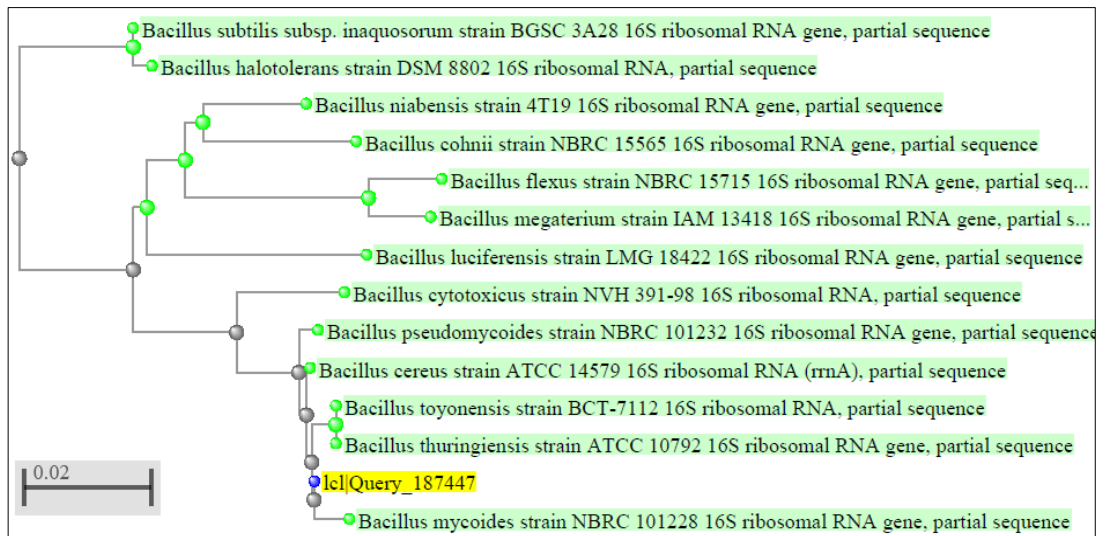


Şekil 4.15. *Bacillus* sp. EKT1 izolatına ait 100 x objektifle elde edilen mikroskop görüntüsü

Moleküler düzeyde gerçekleştirilen 16S rDNA gen dizisi analizine göre izolatın en fazla *Bacillus cereus* türü ile (%99,58) benzerlik taşıdığı belirlenmiştir. EKT1 suşunun bazı *Bacillus* sp. türleri ile olan benzerlik oranları Tablo 4.2.'de, izolata ait filogenetik ağaç Şekil 4.16.'da verilmiştir

Tablo 4.2. EKT1 izolatının *Bacillus* sp. türleri ile 16s rDNA benzerlik oranı

<i>Bacillus</i> sp.	Benzerlik %'si
<i>B. cereus</i> sp.	99,58
<i>B. toyonensis</i> sp.	99,30
<i>B. thuringiensis</i> sp.	99,30
<i>B.pseudomycolides</i> sp.	99,16
<i>B. mycolides</i> sp.	99,16
<i>B. cytotoxicus</i> sp.	96,64
<i>B. luciferensis</i> sp.	93,30
<i>B. niabensis</i> sp.	92,89
<i>B. flexus</i> sp.	92,73
<i>B. subtilis</i> sp.	92,75
<i>B. cohnii</i> sp.	92,59
<i>B. megaterium</i> sp.	92,46
<i>B. halotolerans</i> sp.	92,47

Şekil 4.16. *Bacillus* EKT-1 bakterisine ait 16S rDNA gen dizisi analiziyle elde edilen filogenetik ağaç

Bacillus sp. EKT1 için yapılan antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre (Tablo 4.3.), bakteri ampisilin varlığında geliştiği için ampisiline karşı dirençli olarak belirlenmiştir. Kloramfenikol, eritromisin, streptomisin ve tetrasiklin varlığında ise disklerin etrafında zon oluştuğu gözlenmiş, bakterinin söz konusu antibiyotiklere duyarlı olduğu anlaşılmıştır.

Tablo 4.3. *Bacillus* sp. EKT1 izolatının farklı antibiyotik ilaçlara karşı antimikrobiyel duyarlılığı

Antibiyotik*	Zon çapı (mm)
AM (2 µg)	+
AM (10 µg)	+
C (30 µg)	– (15±0)
E (15 µg)	– (22±0)
S (10 µg)	– (16±0,5)
TE (30 µg)	– (15±0)

(+) EKT1 gelişime gösteriyor (dirençli), (–) EKT1 gelişime göstermiyor (duyarlı) *: AM: Ampisilin, C: Kloramfenikol, E: Eritromisin, S: Streptomisin, TE: Tetrasiklin.

Ampisilin hücre duvarı sentezini durdurarak inhibisyon sağlayan bir antibiyotik çeşitidir. *Bacillus* cinsi bakteriler ile yapılan çalışmalarda ampisiline en fazla direnç gösteren türlerin *B. cereus* ve *B. mycoides* olduğu bildirilmektedir (Sevim ve ark., 2006). da Silva Fernandes ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan bir araştırmada benzer sonuçlar elde edilmiştir. *Bacillus cereus*'e ait 42 farklı alt türün antibiyotik direncinin test edildiği çalışmada suşların tamamı (42/42) ampisiline dirençli, tetrasikline ise duyarlı olarak bildirilmiştir.

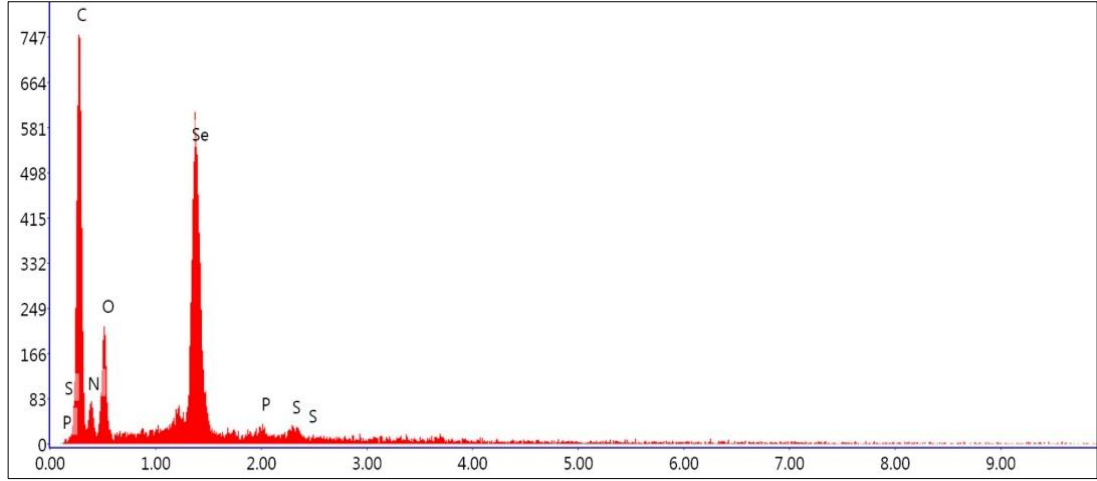
4.5. Üretilen SeNP'leri için Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları

4.5.1. EDX analizi

Selenyum nanopartiküllerine ait EDX spektrumu Şekil 4.17.'de verilmiştir. Spektrumda yaklaşık 1,37 keV'ta selenyuma ait olduğu bilinen karakteristik absorpsiyon pikinin varlığı ortamdaki elementel selenyum varlığını doğrulamaktadır (Dhanjal ve Cameotra, 2010; Wang ve ark., 2017).

SeNP'lerinin elementel kompozisyonu Tablo 4.4.'te verilmiştir. Elementel analizde örneğin toplam ağırlığının yaklaşık %15'inin selenyumun ağırlığı olduğu tespit edilmiştir. Ağırlığın %51'i karbon, %17'si azot ve %15'i oksijen elementine aittir. Geriye kalan %2'lik kısım fosfor ve kükürt elementlerinden oluşmaktadır

Örnek analiz edilmek üzere FESEM donanımına yerleştirildiğinde karbon kaplamalı bir tablanın üzerine koyulmaktadır. Spektrumda görülen karbon atomuna ait absorpsiyon pikinin bir kısmının bu kaplamadan kaynaklı olabileceği düşünülmekte; ancak ortamdaki C, O, P ve S varlığı genel olarak nanopartiküllerin etrafındaki biyolojik moleküllere işaret etmektedir. Yapılan çalışmalarda, biyolojik yöntemlerle üretilen NP'ler için elde edilen EDX spektrumlarında benzer elementlerin bulunduğu bildirilmiş, bu durum partiküllerin protein, enzim ve membran fosfolipitleri gibi bazı organik kalıntılar ile kaplandığı şeklinde yorumlanmıştır (Dwivedi ve ark., 2011; Cremonini ve ark., 2016). Mevcut çalışma için elde edilen EDX spektrumu da partiküllerin benzer şekilde kaplanmış olduklarına işaret etmektedir.



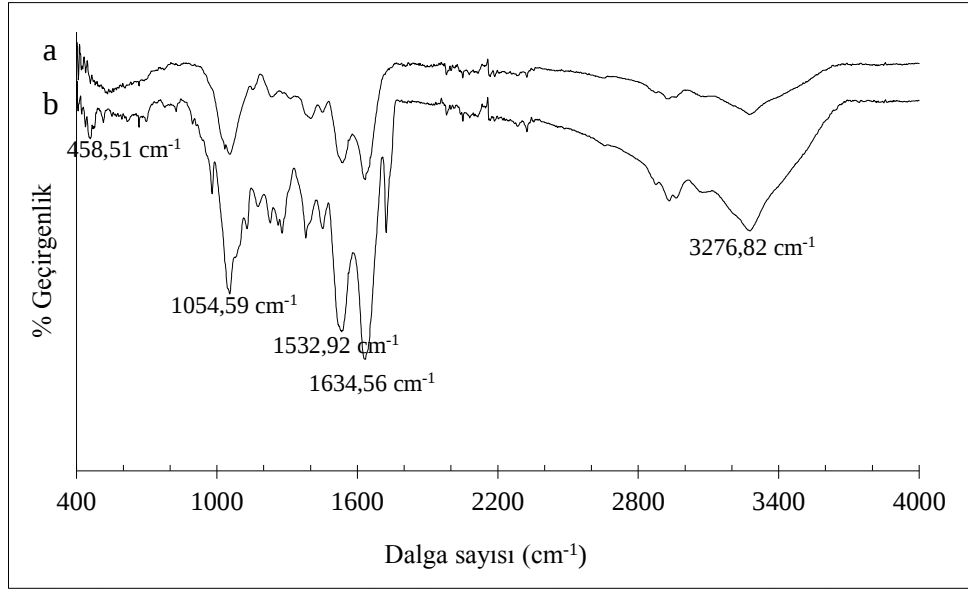
Şekil 4.17. SeNP'lerine ait EDX spektrumu

Tablo 4.4. Üretilen SeNP'lerinin elementel kompozisyonu

Element	% Ağırlık	% Atom	Net Yoğunluk
C	51,33	63,84	115,87
N	17,03	18,16	11,48
O	15,76	14,71	30,11
Se	14,86	2,81	95,96
P	0,46	0,22	4,26
S	0,56	0,26	5,33

4.5.2. FTIR analizi

Nanopartiküller bakteriler gibi organizmaların kullanıldığı biyolojik sistemlerce sentezlendiğinde, gerçekleşen redüksiyon (indirgenme) tepkimeleri sonucu bazı bileşikler NP'lerin yüzey tabakaları içine hapsolürken, bileşiklerin fonksiyonel grupları yüzeyde kalmaktadır (Shakibaie ve ark., 2013). NP'leri çevreleyen organik fonksiyonel grupların belirlenmesi amacıyla FTIR analizi yapılmış ve analiz sonucu elde edilen spektrum Şekil 4.18.'de verilmiştir.



Şekil 4.18. pH 7’de (a) ve pH 9’da (b) üretilen SeNP’lerinin FTIR spektrumu

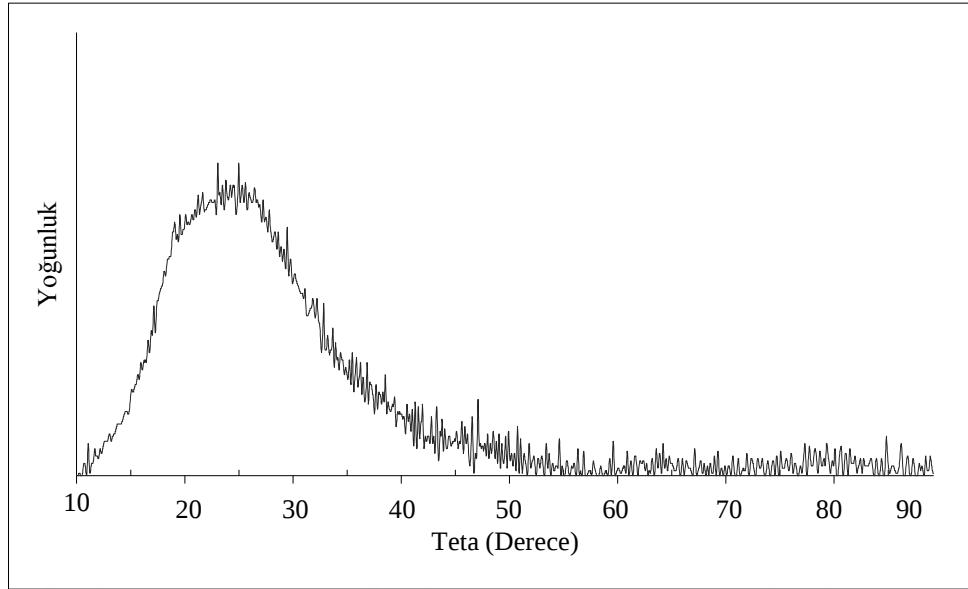
Spektrum incelendiğinde 1054 cm^{-1} , 1634 cm^{-1} ve 3276 cm^{-1} bölgelerinde şiddetli absorpsiyon bantları görülmektedir. 1054 cm^{-1} ’de görülen bant C-O gerilme titreşimine işaret ederken 1634 cm^{-1} ’de görülen bant aldehit, keton veya karboksilik asitte bulunabilen karbonil fonksiyonel gruplarının gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır. 3276 cm^{-1} ’de görülen bant O-H veya N-H bağlarının titreşimine karşılık gelmekte ve bu durum alkol ya da amid ve amin içeren fonksiyonel grupların varlığına işaret etmektedir. Tüm bulgular değerlendirildiğinde üretilen partiküllerin protein molekülleri ile kaplanmış olduğu düşünülmektedir. Çalışmaya ait EDX spektrumu da proteinlerin varlığına işaret ederken, yapılan bazı biyo-üretim çalışmalarında aynı dalga sayılarında benzer bantların görülmesi de bu görüşü desteklemektedir. Yüzeyde bulunan bu proteinlerin Se^{+4} ’ün indirgenmesinden ve NP stabilizasyonundan sorumlu olduğu bildirilmektedir (Shakibaie ve ark., 2013; Mollania ve ark., 2016).

Stabilizasyon NP’lerin üretim ve muhafazasında önem teşkil etmekte, partiküllerin endüstriyel uygulamalardaki kullanım potansiyelini arttırmaktadır. Ticari uygulamalarda stabilizasyonun sağlanması amacıyla partiküller bazı organik ya da inorganik yapıdaki stabilizör yüzey kaplama ajanları (sümfaktanlar) ile kaplanmaktadır. Stabilizörler yapay olarak elde edilen bazı asit ya da tuzlardan oluşabileceği gibi kitosan vb. polisakkarit yapıların, proteinlerin ve bazı diğer biyolojik moleküllerin de

kaplama ajanı olarak işlev gördüğü belirtilmektedir. Partikül yüzeyindeki proteinler redoks tepkimelerinde görev alarak stabilizasyonu sağlamakta, proteinlerin partiküllerin fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkisi pH, sıcaklık vb. çevresel koşullara bağlı olarak değişmektedir. Proteinler hazır olarak temin edilmelerinin yanı sıra NP'lerin biyosentezinde ortamda kendiliğinden de bulunabilmektedir (Chekli ve ark., 2013; Dhanjal ve Cameotra, 2010; Lin ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2004b; Zhang, 2014). Ramya ve arkadaşları (2015) yaptıkları bir çalışmada bakteriyel yolla sentezledikleri NP'lerin yüzeyindeki protein moleküllerinin varlığına dikkat çekmiş, proteinler sayesinde partiküllerin stabilitesinin ve biyolojik aktivitesinin arttığını bildirmiştir. Dobias ve arkadaşları (2011) ise kimyasal yolla NP ürettikleri ortama dışarıdan protein ilave ettiklerinde partiküllerin daha stabil olduğunu bildirerek ortamdaki protein varlığının önemini vurgulamıştır.

4.5.3. XRD analizi

XRD analizi ile, optimizasyon çalışmalarıyla belirlenen koşullarda (6,5 mM SeO₂, pH 9, 33°C, 96 saat) üretilen SeNP'leri analiz edilmiştir. Elde edilen X-ışını kırınım deseni Şekil 4.19.'da verilmiştir. Spektruma göre analiz edilen örnek selenyum elementinin standardına ait kırınım deseni (01-071-0528) ile eşleşmiştir. Bu durum ortamdaki elementel selenyumun varlığını doğrulamaktadır.



Şekil 4.19. Biyosentezlenmiş SeNP'lerinin XRD kırınım deseni

2 θ açısı aralığında ve 10° ile 90° değerleri arasında kırınımına uğrayan partiküllerin yansımalarından elde edilen spektrumda 23-26° aralığında bir adet geniş bir difraksiyon piki bulunmaktadır. XRD kırınım desenindeki sivri ve keskin piklerin kristal yapıdaki partiküllere (Ramya ve ark., 2015), küçük θ derecelerindeki geniş difraksiyon piklerinin ise amorf yapıdaki partiküllere işaret ettiği bilinmektedir (Sharma ve ark., 2014). Bu bilgilerin ışığında, analiz edilen NP'lerin kırınım deseni partiküllerin amorf (düzgün olmayan) yapıda olduğuna işaret etmektedir (Husen ve Siddiqi, 2014).

Zhang ve arkadaşlarının (2011) yaptıkları bir çalışmada, *Pseudomonas alcaliphila* tarafından hücre içi olarak üretilen SeNP'leri alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu ile görüntülendiğinde partiküllerin nanoçubuk ve nanoküre şeklinde olduğu ve küresel NP'lerin nanoçubukların üzerinde yapışmış halde bulunduğu tespit edilmiştir. Partiküllerin kristal yapısının belirlenmesi amacıyla yapılan XRD spektroskopisi analizi sonucu elde edilen kırınım deseni incelendiğinde güçlü ve keskin piklere rastlanmamış; bu durumun nanoçubukların yüzeyinde bulunan amorf yapıdaki nanokürelerden kaynaklandığı bildirilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada *Bacillus* sp. MSh-1 izolatu tarafından SeNP'lerinin hücre içi sentezi gerçekleştirilmiştir. Üretilen partiküller için kristal kafes yapısına işaret eden uzunluk ya da açı ölçüsüne rastlanmamakla birlikte, XRD spektrumundaki geniş difraksiyon pikleri sebebiyle

partiküller yapısal olarak amorf olarak sınıflandırılmıştır (Shakibaie ve ark., 2013). Khiralla ve El-Deeb (2015) tarafından yapılan çalışmada ise *Bacillus licheniformis* tarafından hücre dışı olarak üretilen SeNP'lerinin XRD spektrumunda 3 adet keskin pikin bulunduğu bildirilmiş, bu piklerin kristal yapıdaki yüzey merkezli kübik düzlemlerine işaret ettiği belirtilmiştir. Mevcut çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, bakteriler aracılığı ile SeNP üretiminin hücre içi/hücre dışı olarak gerçekleşmesinin partiküllerin kristal yapısı üzerinde etkiye sahip olmadığı saptanmıştır. *Bacillus* sp. EKT1 tarafından hücre dışı olarak üretilen NP'lerin sahip oldukları geniş difraksiyon pikleri sebebiyle partiküllerin amorf yapıda oldukları doğrulanmaktadır.

4.6. SeNP'lerinin Antimikrobiyel Aktivitesi

Farklı konsantrasyondaki (2000-8000 µg/mL) NP'lerin bazı Gram pozitif (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*) ve Gram negatif (*E. coli* O157:H7, *E. coli* tip-1, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* ve *P. aeruginosa*) bakteriler üzerindeki antimikrobiyel etkisi agar disk difüzyon yöntemi ile test edilmiştir. Belirlenen konsantrasyon aralığındaki hiçbir NP diskler etrafında zon oluşturmamış ve bu sebeple NP'lerin seçilen bakteriler üzerinde antimikrobiyel etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir.

Dirençli türlerin gelişimi ve antimikrobiyel maddelere karşı artan mikrobiyel direnç sebebiyle yüksek dezenfeksiyon performansı gösteren yeni antimikrobiyel maddelere olan talep artmaktadır. Bu hususta NP'ler sahip oldukları yüksek yüzey/hacim oranları ve mikroorganizmalar ile temas eden aktif yüzey alanlarının genişliği sayesinde oldukça etkilidirler (Joardar ve ark., 2016).

Yapılan bir çalışmada *Bacillus licheniformis*'in hücresiz süpernatantı ile üretilen SeNP'lerinin (10-50 nm) gıda kaynaklı bazı patojen bakteriler (*B. cereus*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium* ve *S. Enteritidis*) üzerinde antimikrobiyel etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Khiralla ve El-Deeb, 2015).

Ayrıca biyojenik SeNP'lerinin *P. mirabilis*, *S. aureus* ve *P. aeruginosa* üzerinde antibiyofilm etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Tüm bu bilgilerin ışığında SeNP'leri ya da SeNP'leri ile kaplanmış antimikrobiyel maddeler için yeni antimikrobiyel ve antibiyofilm ajan olarak kullanım potansiyeline sahip olduğu söylenebilir (Shakibaie ve ark., 2015).

4.7. SeNP'lerinin Antifungal Aktivitesi

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan NP'lerin (2000-8000 µg/mL) *C. albicans* üzerindeki antifungal etkisi agar disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Ortam pH'sının üretilen NP'lerin morfolojik ve fizikokimyasal yapısı üzerindeki etkisi göz önünde bulundurularak, çalışmada farklı pH'larda üretilen (pH 7 ve pH 9) NP'ler kullanılmıştır. İnkübasyonun ardından örnekler incelendiğinde, maya hücrelerinin besiyerinin tamamında gelişim gösterdiği ve hiçbir disk etrafında SeNP'lerinden kaynaklı zon oluşmadığı görülmüştür. Böylece, üretilen NP'lerin *C. albicans* üzerinde antifungal etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir.

Shakibaie ve arkadaşları (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, *Bacillus* sp. ile SeO₂'ten (1,26 mM) hücre içi şekilde üretilen SeNP'lerinin *C. albicans* üzerindeki antifungal etkisi NP'lerin minimum inhibisyon konsantrasyonu ile belirlenmiş ve MIK değeri 70 µg/mL olarak rapor edilmiştir. Yapılan çalışma biyojenik SeNP'lerinin *C. albicans* üzerinde antifungal ajan görevinde kullanılabileceğini gösterirken, mevcut çalışmada beklenen sonuç alınamamıştır.

Nanopartiküllerin antifungal etki mekanizması temel olarak iki aşamada gerçekleşmektedir:

- I. Koloit ya da yarı katı formdaki matrikslerin içine gömülü halde olan yahut sübstratların yüzeyinde bulunan bileşiklerden daimi bir nano iyon akışının gerçekleşmesi,
- II. Bu iyonların, fungusun plazma membranındaki duyarlı hedef bölgelere aktif taşınımı (Shakibaie ve ark., 2015).

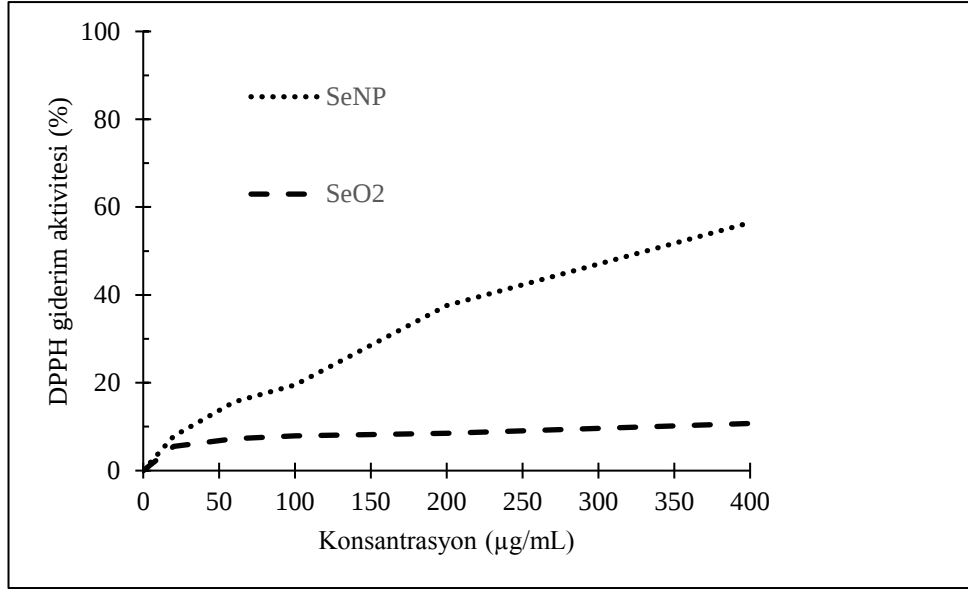
Antifungal aktivite gösteren NP'lerin üretilmesi için bu mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına ihtiyaç vardır.

4.8. SeNP'lerinin Antioksidan Aktivitesi

Nanopartiküllerin antioksidan aktivitesi DPPH radikalini giderme etkinlikleri ile belirlenmiştir. Aynı konsantrasyondaki SeNP ve SeO₂ çözeltileri (200 µg/mL) sırasıyla %37,6±2,5 ve %8,5±1 DPPH giderim etkinliği göstermiştir. Farklı konsantrasyonlardaki SeO₂'in (20-400 µg/mL) giderim etkinliği %5,5-10,7 aralığında değişmekte ve konsantrasyona bağlı kayda değer bir aktivite artışı görülmemektedir. SeNP'lerinin DPPH giderimi konsantrasyon yükseldikçe artmakta ve 400 µg/mL için %56,5±5'e ulaşmaktadır (Şekil 4.20.). DPPH radikalının %50 inhibisyonu için gerekli NP konsantrasyonu (IC₅₀) 322,8 µg/mL'dir.

Partikül büyüklüğü SeNP'lerinin antioksidan aktivitesinde önemli bir rol oynamaktadır. 5-200 nm büyüklüğündeki NP'lerin boyutlarına bağlı olarak serbest radikalleri yakaladığı bildirilmektedir (Peng ve ark., 2007). Partikül boyutları küçüldükçe NP'ler radikallerin gideriminde daha etkin ve dolayısıyla daha yüksek antioksidan aktivitede olmaktadır (Mollania ve ark., 2016).

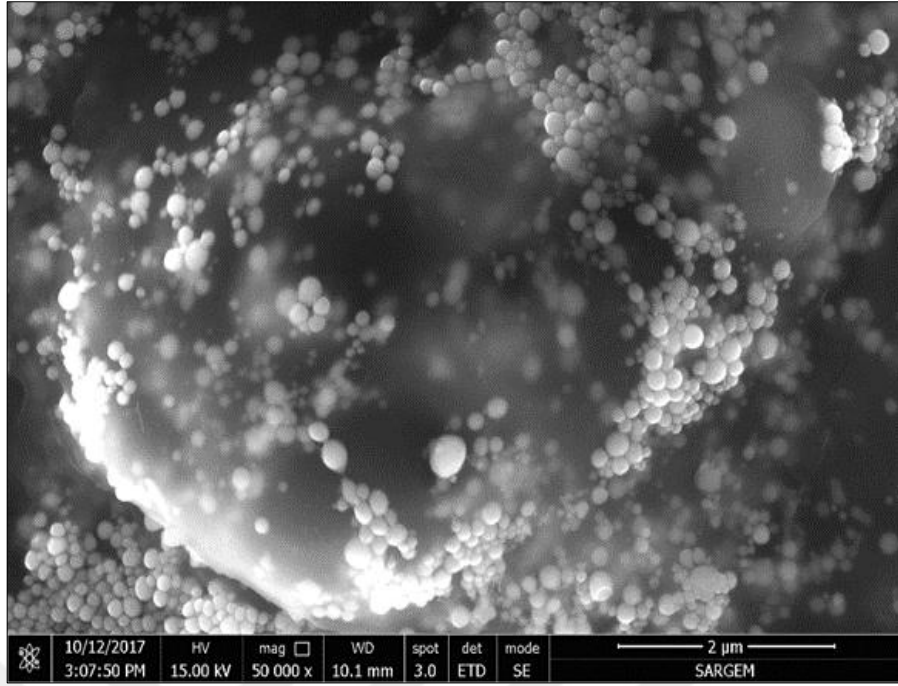
Forootanfar ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, *Bacillus* sp. bakterisi tarafından sentezlenen ve boyutlarının genel olarak 125-150 nm aralığında olduğu belirlenen SeNP'lerinin DPPH giderim etkisi 200 µg/mL için %23,1±3,4 olarak bildirmiştir. Mevcut çalışmada kullanılan NP'lerin boyutları ağırlıklı olarak (%72) 50-100 nm aralığındadır. Bu sebeple yapılan çalışma daha küçük NP'lerin daha fazla antioksidan aktiviteye sahip olacağı görüşünü desteklemektedir.



Şekil 4.20. SeNP ve SeO₂'in DPPH radikalini giderim etkinliği

4.9. SeNP'lerinin Stabilitesi

Selenyum nanopartiküllerinin stabilitesinin belirlenmesi amacıyla, yapılan ön çalışmalarda saf halde elde edilip kurutulan NP'ler buzdolabı sıcaklığında (4-7°C) muhafaza edilmiş ve yaklaşık 3 ay sonra FESEM görüntüleri alınarak morfolojileri incelenmiştir. NP'lerin FESEM görüntüsü Şekil 4.21.'de verilmiştir. Şekil incelendiğinde partiküllerin ortalama 100-150 nm büyüklükte oldukları ve sahip oldukları nanoboyutlarını 3 ay sonra hala muhafaza ettikleri görülmektedir. Bununla birlikte *Bacillus* sp. EKT1 ile yapılan tüm çalışmalarda amorf yapıda ve küresel şekilde elde edilen NP'lerin morfolojilerinin de aynı kaldığı görülmektedir.



Şekil 4.21. Üretilen SeNP'lerinin 3 ay sonraki FESEM görüntüsü (Üretim koşulları: pH 7, 6,5 mM SeO₂, 30°C, 96 saat)

Mevcut çalışmadaki stabilitenin partiküllerle bağ yapan proteinler tarafından sağlandığı düşünülmektedir. Mollania ve arkadaşları (2016) bakteriyel yollarla ürettikleri NP'ler için stabil yapının yüzey proteinleri sayesinde 2 aydan uzun süre korunduğunu bildirmiştir. Ortamda doğal olarak bulunan proteinler uzun vadeli kullanımda stabilizör madde ilavesinin gerekliliği ortadan kaldırmakla beraber daha temiz, güvenli, ekonomik ve çevre dostu bir üretim gerçekleştirilmesine katkıda bulunmaktadır.

BÖLÜM 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, 34 adet *Bacillus* izolatının hücre dışı bakır, çinko ve selenyum nanopartiküllerini üretim yetenekleri araştırılmıştır. Tüm üretim çalışmalarında bakteri gelişimi sonucunda elde edilen hücresiz sıvı kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda hiçbir bakterinin çinko ve bakır nanopartiküllerini üretme yeteneğinde olmadıkları; Kocaeli ilinden alınan bir toprak örneğinden izole edilen *Bacillus* sp. EKT1 suşunun ise SeNP'lerini üretme yeteneğinde olduğu belirlenmiştir. Çalışmaya bu bakteri ile devam edilmiş; reaksiyon koşullarının SeNP üretimine etkisi belirlenmiştir.

Selenyum nanopartikül üretimi hücresiz süpernatant kullanımı ile hücre dışı olarak başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Nanopartikül üretimi reaksiyon başlangıcında açık sarı olan rengin SeNP üretiminin de bir göstergesi olan kiremit kırmızısına dönüşmesi ile gözlenmiştir.

FESEM analizi ile NP'lerin ağırlıklı olarak 50-150 nm büyüklüğünde ve küresel şekilde olduğu saptanmıştır. pH'nın *Bacillus* sp. EKT1'in SeNP sentezini önemli oranda etkilediği ve düşük ve yüksek pH'larda sentezin gerçekleşmediği anlaşılmıştır. Çalışılan pH değerlerinden sadece pH 7 ve 9'da renk dönüşümü ile de anlaşılan nanopartikül üretimi gerçekleşmiştir. pH'nın nanopartikül miktarının yanında nanopartiküllerin boyutları üzerinde de etkili olduğu; pH 9'da elde edilen nanopartiküllerin pH 7'de elde edilenden daha büyük oldukları belirlenmiştir. pH 9'da daha fazla nanopartikül elde edilmesine karşın bu pH'da gözlenen agregasyon bir dezavantaj olmaktadır. SeNP için en iyi üretim sıcaklığının bakteri gelişme sıcaklığında olduğu (33°C), daha yüksek ve düşük sıcaklıklarda nanopartikül üretiminin düştüğü ve partikül boyutlarının da arttığı belirlenmiştir. Yüksek miktarda nanopartikül elde etmek için en iyi SeO₂ son konsantrasyonunun 6,5 mM olduğu; artan konsantrasyonlarda ortalama partikül boyutunun da arttığı belirlenmiştir.

Partiküllerin kristal yapısının belirlenmesi için XRD spektroskopisi ile analizi yapılmış ve amorf yapıda oldukları belirlenmiştir. Nanopartikül üretiminin doğrulanması amacı ile SeNP'lerinin elementel analizleri EDX spektroskopisi ile yapılmış ve elementel selenyumların varlığı tespit edilmiştir. Üretim sırasında ortamda bulunan ve nanopartikül üretiminden büyük oranda sorumlu olan biyolojik moleküllerin varlığı FTIR spektroskopi analizi ile belirlenmiş ve protein moleküllerinin nanopartiküller için stabilizatör ve kaplama ajanı görevi gördüğü saptanmıştır.

Nanopartiküllerin antimikrobiyel aktiviteleri çeşitli gıda patojeni bakteriler ve *C. albicans* kullanılarak belirlenmiş; ancak SeNP'lerinin hiçbir mikroorganizma için antimikrobiyel özellik taşımadığı anlaşılmıştır. Bu durumun, oluşan nanopartiküllerin büyüklüğünden ve agregasyona uğramış olmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte selenyum nanopartiküllerinin antioksidan özelliğe sahip olduğu anlaşılmıştır.

Sonuç olarak, *Bacillus* sp. EKT1 suşu ile başarılı bir şekilde SeNP'leri üretilmiş ve üretilen NP'lerin karakterizasyonu yapılmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara ilave olarak üretilen NP'lerin sahip olduğu antioksidan aktiviteleri üzerine daha fazla çalışma yapılabilir ve NP'lerin antioksidan özellikleri daha detaylı incelenebilir. Bununla birlikte sitotoksitesite çalışmaları yapılabilir, partiküllerin biyo-aktiviteleri ve biyo-kullanım potansiyeli araştırılabilir. Optimizasyon çalışmalarında reaksiyon sıcaklığının NP üretimine etkisinin belirlenmesi amacıyla seçilen sıcaklık değerleri artırılarak, daha düşük ve yüksek sıcaklıkların etkisi gözlemlenebilir. Sıcaklık, pH, çözelti konsantrasyonu gibi parametrelere ilave olarak bakteri yoğunluğu ve gelişim evresinin NP'ler üzerindeki etkisi incelenebilir. Ayrıca, bakteriye ait redüktaz enziminin toprak ve sudaki toksik Se^{+4} iyonlarını biyo-giderim etkinliği araştırılabilir. Antimikrobiyel etki göstermesi beklenen partiküllerin boyutlarının küçültülmesine yönelik çalışmalar yapılarak NP'lerin antimikrobiyel ve antifungal etki mekanizması daha kapsamlı araştırılabilir. Özetle, NP'lerin üretim parametrelerinin çoğaltılmasına yönelik daha fazla çalışmanın yapılması ile NP'lerin belirlenen karakteristik özelliklerine uygun potansiyel kullanım alanları tespit edilebilir.

KAYNAKLAR

- Abouelkheir, S. S., El-Sersy, N. A., Sabry, S. A. F. 2016. Potential application of *Bacillus* sp. SDNS gold nanoparticles. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 5(4): 546-552.
- Ahmad, M. S., Yasser, M. M., Sholkamy, E. N., Ali, A. M., Mehanni, M. M. 2015. Anticancer activity of biostabilized selenium nanorods synthesized by *Streptomyces bikiniensis* strain Ess_amA-1. International Journal of Nanomedicine, 10: 3389–3401.
- Alqadi, M., Abo Noqtah, O., Alzoubi, F., Alzoubi, J., Aljarrah, K. 2014. pH effect on the aggregation of silver nanoparticles synthesized by chemical reduction. Materials Science, 32(1): 107-111.
- Babu, M. G., Gunasekaran, P. 2009. Production and structural characterization of crystalline silver nanoparticles from *Bacillus cereus* isolate. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 74(1): 191-195.
- Beck, M. A., Levander, O. A., Handy, J. 2003. Selenium deficiency and viral infection. The Journal of Nutrition, 133(5): 1463S-1467S.
- Beefa, T., Blanc, M., Lyon, P., Vogt, G., Marchiani, M., Fischer, J. L., Aragno, M. 1996. Isolation of thermus strains from hot composts (60 to 80°C). Applied and Environmental Microbiology, 62: 1723-1727.
- Büyüksırt, T., Kuleaşan, H. 2014. Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ve gıda analizlerinde kullanımı. Gıda, 39(4): 235-241.
- Chekli, L., Phuntsho, S., Roy, M., Lombi, E., Donner, E., Shon, H. K. 2013. Assessing the aggregation behaviour of iron oxide nanoparticles under relevant environmental conditions using a multi-method approach. Water Research, 47(13): 4585-4599.
- Cremonini, E., Zonaro, E., Donini, M., Lampis, S., Boaretti, M., Dusi, S., Vallini, G. 2016. Biogenic selenium nanoparticles: Characterization, antimicrobial activity and effects on human dendritic cells and fibroblasts. Microbial Biotechnology, 9(6): 758-771.
- Çon, A. H., Gökalp, H. Y. 2011. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Gıda Mikrobiyolojisi Ders Notları, Samsun, 24.

- da Silva Fernandes, M., Fujimoto, G., Schneid, I., Kabuki, D. Y., Kuaye, A. Y. 2014. Enterotoxigenic profile, antimicrobial susceptibility, and biofilm formation of *Bacillus cereus* isolated from ricotta processing. *International Dairy Journal*, 38(1): 16-23.
- Dhanjal, S., Cameotra, S. S. 2010. Aerobic biogenesis of selenium nanospheres by *Bacillus cereus* isolated from coalmine soil. *Microbial Cell Factories*, 9(1): 52-62.
- Dikensoy, Ö. 2010. NanoPartiküller ve Plevra. *Plevra Bülteni*, 4: 7-9.
- Diskin, C. J., Tomasso, C. L., Alper, J. C., Glaser, M. L., Fliegel, S. E. 1979. Long-term selenium exposure. *Archives of Internal Medicine*, 139(7): 824-826.
- Dwivedi, C., Shah, C. P., Singh, K., Kumar, M., Bajaj, P. N. 2011. An organic acid-induced synthesis and characterization of selenium nanoparticles. *Journal of Nanotechnology*, 651971: 1-6.
- Dwivedi, S., AlKhedhairi, A. A., Ahamed, M., Musarrat, J. 2013. Biomimetic synthesis of selenium nanospheres by bacterial strain JS-11 and its role as a biosensor for nanotoxicity assessment: a novel Se-bioassay. *PLoS One*, 8(3): e57404.
- Dobias, J., Suvorova, E. I., Bernier-Latmani, R. 2011. Role of proteins in controlling selenium nanoparticle size. *Nanotechnology*, 22(19): 195605-195614.
- Dong, G., Wang, Y., Gong, L., Wang, M., Wang, H., He, N., Li, Q. 2013. Formation of soluble Cr(III) end-products and nanoparticles during Cr(VI) reduction by *Bacillus cereus* strain XMCr-6. *Biochemical Engineering Journal*, 70: 166-172.
- Ezhilarasi, P. N., Karthik, P., Chhanwal, N., Anandharamakrishnan, C. 2013. Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: A review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3): 628-647.
- 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*, 28(1): 75-79.
- Gericke, M., Pinches, A. 2006. Biological synthesis of metal nanoparticles. *Hydrometallurgy*, 83(1): 132-140.
- Gottesman, R., Shukla, S., Perkash, N., Solov'yov, L. A., Nitzan, Y., Gedanken, A. 2011. Sonochemical coating of paper by microbicidal silver nanoparticles. *Langmuir*, 27(2): 720-726.
- Gürmen, S., Ebin, B. 2008. Nanopartiküller ve üretim yöntemleri-1. *Metallurji Dergisi*, 150: 31-38.
- Hays, S. A., Robert, J. S., Miller, C. A., Bennett, I. 2013. Nanotechnology in Cambridge: What do you think? In *nanotechnology, the brain, and the future*, Springer, 3: 357-371.

- He, S., Guo, Z., Zhang, Y., Zhang, S., Wang, J., Gu, N. 2007. Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria *Rhodopseudomonas capsulata*. *Materials Letters*, 61(18): 3984-3987.
- Hnain, A., Brooks, J., Lefebvre, D. D. 2013. The synthesis of elemental selenium particles by *Synechococcus leopoliensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(24): 10511-10519.
- Hoffmann, P. R., Berry, M. J. 2008. The influence of selenium on immune responses. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52(11): 1273-1280.
- Hudzicki, J. 2009. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. American Society for Microbiology.
- Hulla, J. E., Sahu, S. C., Hayes, A. W. 2015. Nanotechnology: History and future. *Human and Experimental Toxicology*, 34(12): 1318-1321.
- Hulkoti, N. I., Taranath, T. C. 2014. Biosynthesis of nanoparticles using microbes—a review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 121: 474-483.
- Husen, A., Siddiqi, K. S. 2014. Plants and microbes assisted selenium nanoparticles: Characterization and application. *Journal of Nanobiotechnology*, 12(1): 28.
- Ibrahim, N. A., Eid, B. M., Abdel-Aziz, M. S. 2016. Green synthesis of AuNPs for eco-friendly functionalization of cellulosic substrates. *Applied Surface Science*, 389: 118-125.
- Ip, C. 2006. Selenium and ER stress response: Implication and exploitation for cancer therapy. *Abstr Proc Int Conference on selenium in Biology and Medicine*, Univ. Wisconsin, Madison, 63.
- İlyasoğlu, H., El, S. N. 2010. Nanoemülsiyonlar: Oluşumları, yapıları ve kolloidal salınım sistemleri olarak gıda sektöründe kullanım alanları. *Gıda*, 35(2): 143-150.
- Joardar, S., Ray, S., Samanta, S., Bhattacharjee, P. 2016. Antibacterial activity of 3,6-di(pyridin-2-yl)-1, 2, 4, 5-s-tetrazine capped Pd(0) nanoparticles against Gram-positive *Bacillus subtilis* bacteria. *Cogent Biology*, 2(1): 1249232.
- Kalishwaralal, K., Deepak, V., Ramkumarpandian, S., Nellaiah, H., Sangiliyandi, G. 2008. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by the culture supernatant of *Bacillus licheniformis*. *Materials Letters*, 62(29): 4411-4413.
- Kalishwaralal, K., Deepak, V., Pandian, S. R. K., Gurunathan, S. 2009. Biological synthesis of gold nanocubes from *Bacillus licheniformis*. *Bioresource Technology*, 100(21): 5356-5358.
- Kanakalakshmi, A., Janaki, V., Shanthi, K., Kamala-Kannan, S. 2017. Biosynthesis of Cr(III) nanoparticles from electroplating wastewater using chromium-resistant *Bacillus subtilis* and its cytotoxicity and antibacterial activity. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45(7): 1304-1309.

- Karkaj, O. S., Salouti, M., Zanjani, R. S., Derakhshan, F. K. 2013. Extracellular deposition of silver nanoparticles by *Bacillus megaterium*. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*, 43(7): 903-906.
- Kessi, J., Ramuz, M., Wehrli, E., Spycher, M., Bachofen, R. 1999. Reduction of selenite and detoxification of elemental selenium by the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 4734-4740.
- Khan, R., Fulekar, M. H. 2016. Biosynthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Bacillus amyloliquefaciens* culture and enhancement of its photocatalytic activity for the degradation of a sulfonated textile dye Reactive Red 31. *Journal of Colloid and Interface Science*, 475: 184-191.
- Khiralla, G. M., El-Deeb, B. A. 2015. Antimicrobial and antibiofilm effects of selenium nanoparticles on some foodborne pathogens. *LWT-Food Science and Technology*, 63(2): 1001-1007.
- Kılıç, G. B., Karahan, A. G. 2010. Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ve laktik asit bakterilerinin tanısında kullanılması. *Gıda*, 35(6): 445-452.
- Kim, E. S. 2008. Directed evolution: A historical exploration into an evolutionary experimental system of nanobiotechnology. *Minerva*, 46(4): 463-484.
- Krumov, N., Perner-Nochta, I., Oder, S., Gotcheva, V., Angelov, A., Posten, C. 2009. Production of inorganic nanoparticles by microorganisms. *Chemical Engineering and Technology*, 32(7): 1026-1035.
- Li, Y., Li, Y., Li, Q., Fan, X., Gao, J., Luo, Y. 2016. Rapid biosynthesis of gold nanoparticles by the extracellular secretion of *Bacillus niabensis* 45: Characterization and antibiofilm activity. *Journal of Chemistry*, 1-7.
- Lin, D., Story, S. D., Walker, S. L., Huang, Q., Liang, W., Cai, P. 2017. Role of pH and ionic strength in the aggregation of TiO₂ nanoparticles in the presence of extracellular polymeric substances from *Bacillus subtilis*. *Environmental Pollution*, 228: 35-42.
- Liu, Y., Lai, Q., Göker, M., Meier-Kolthoff, J. P., Wang, M., Sun, Y., Shao, Z. 2015. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Scientific Reports*, 5: 14082.
- Malaikozhundan, B., Vaseeharan, B., Vijayakumar, S., Thangaraj, M. P. 2017. *Bacillus thuringiensis* coated zinc oxide nanoparticle and its biopesticidal effects on the pulse beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 174: 306-314.
- Mennini, T. 2012. Elemental selenium nanoparticles with reduced toxicity. *Nutrafoods*, 11: N25-N26.
- Mishra, R. R., Prajapati, S., Das, J., Dangar, T. K., Das, N., Thatoi, H. 2011. Reduction of selenite to red elemental selenium by moderately halotolerant *Bacillus megaterium* strains isolated from Bhitarkanika mangrove soil and characterization of reduced product. *Chemosphere*, 84(9): 1231-1237.

- Moghaddam, A. B., Namvar, F., Moniri, M., Md. Tahir, P., Azizi, S., Mohamad, R. 2015. Nanoparticles biosynthesized by fungi and yeast: A review of their preparation, properties, and medical applications. *Molecules*, 20(9): 16540-16565.
- Moghaddam, A. B., Moniri, M., Azizi, S., Rahim, R. A., Ariff, A. B., Saad, W. Z., Mohamad, R. 2017. Biosynthesis of ZnO nanoparticles by a new *Pichia kudriavzevii* yeast strain and evaluation of their antimicrobial and antioxidant activities. *Molecules*, 22(6): 872.
- Mollania, N., Tayebbe, R., Narenji-Sani, F. 2016. An environmentally benign method for the biosynthesis of stable selenium nanoparticles. *Research on Chemical Intermediates*, 42(5): 4253-4271.
- Mortimer, C. E. 2004. Modern Üniversite Kimyası (Çeviri: Altınata, T. vd.), 1.Cilt. Çağlayan Kitabevi, 1-511.
- Mu, D., Mu, X., Xu, Z., Du, Z., Chen, G. 2015. Removing *Bacillus subtilis* from fermentation broth using alumina nanoparticles. *Bioresource Technology*, 197: 508-511.
- Mukherjee, P., Ahmad, A., Mandal, D., Senapati, S., Sainkar, S. R., Khan, M. I., Sastry, M. 2001. Bioreduction of AuCl₄ – ions by the fungus, *Verticillium* sp. and surface trapping of the gold nanoparticles formed. *Angewandte Chemie International Edition*, 40(19): 3585-3588.
- Nair, B., Pradeep, T. 2002. Coalescence of nanoclusters and formation of submicron crystallites assisted by *Lactobacillus* strains. *Crystal Growth and Design*, 2(4): 293-298.
- Narayanan, K. B., Sakthivel, N. 2010. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Advances in Colloid and Interface Science*, 156(1): 1-13.
- Órdenes-Aenishanslins, N. A., Saona, L. A., Durán-Toro, V. M., Monrás, J. P., Bravo, D. M., Pérez-Donoso, J. M. 2014. Use of titanium dioxide nanoparticles biosynthesized by *Bacillus mycoides* in quantum dot sensitized solar cells. *Microbial Cell Factories*, 13(1): 90.
- Ovais, M., Raza, A., Naz, S., Islam, N. U., Khalil, A. T., Ali, S., Shinwari, Z. K. 2017. Current state and prospects of the phytosynthesized colloidal gold nanoparticles and their applications in cancer theranostics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(9): 3551-3565.
- Oyar, P. 2014. Dış hekimliğinde nanopartiküllerin kullanım alanları. *Atatürk Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 24: 49-55.
- Özdoğan, E., Demir, A., Seventekin, N. 2006. Nanoteknoloji ve Tekstil Uygulamaları. *Tekstil ve Konfeksiyon*, 3: 159-168.
- Özgür, I. 2008. Nanotüp ve nanotel yapılarının XRD ile karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Fizik Mühendisliği Bölümü, Yüksek Lisans Tezi.
- Park, T. J., Lee, K. G., Lee, S. Y. 2016. Advances in microbial biosynthesis of metal nanoparticles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(2): 521-534.

- Peng, D., Zhang, J., Liu, Q., Taylor, E. W. 2007. Size effect of elemental selenium nanoparticles (Nano-Se) at supranutritional levels on selenium accumulation and glutathione S-transferase activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101(10): 1457-1463.
- Pereira, L., Mehboob, F., Stams, A. J., Mota, M. M., Rijnaarts, H. H., Alves, M. M. 2015. Metallic nanoparticles: Microbial synthesis and unique properties for biotechnological applications, bioavailability and biotransformation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(1): 114-128.
- Priyadarshini, S., Gopinath, V., Priyadharsshini, N. M., MubarakAli, D., Velusamy, P. 2013. Synthesis of anisotropic silver nanoparticles using novel strain, *Bacillus flexus* and its biomedical application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102: 232-237.
- Qi, P., Zhang, D., Zeng, Y., Wan, Y. 2016. Biosynthesis of CdS nanoparticles: a fluorescent sensor for sulfate-reducing bacteria detection. *Talanta*, 147: 142-146.
- Rajan, A., Cherian, E., Baskar, G. 2016. Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using *Aspergillus fumigatus* JCF and its antibacterial activity. *International Journal of Modern Science and Technology*, 2(1): 52-57.
- Ramya, S., Shanmugasundaram, T., ve Balagurunathan, R. 2015. Biomedical potential of actinobacterially synthesized selenium nanoparticles with special reference to anti-biofilm, anti-oxidant, wound healing, cytotoxic and anti-viral activities. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 32: 30-39.
- Reddy, A. S., Chen, C. Y., Chen, C. C., Jean, J. S., Chen, H. R., Tseng, M. J., Wang, J. C. 2010. Biological synthesis of gold and silver nanoparticles mediated by the bacteria *Bacillus subtilis*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 10(10): 6567-6574.
- Salunke, B. K., Sawant, S. S., Lee, S. I., Kim, B. S. 2016. Microorganisms as efficient biosystem for the synthesis of metal nanoparticles: Current scenario and future possibilities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(5): 88.
- Sastry, M., Ahmad, A., Khan, M. I., Kumar, R. 2003. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and *actinomycete*. *Current Science*, 85(2): 162-170.
- Salata, O. V. 2004. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology*, 2(1): 3.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7): 671-675.
- Schrauzer, G. N., Surai, P. F. 2009. Selenium in human and animal nutrition: Resolved and unresolved issues. *Critical Reviews in Biotechnology*, 29(1): 2-9.
- Sekhsaria, P. 2013. The making of an indigenous scanning tunneling microscope. *Current Science*, 104(9): 1152-1157.

- Sevim, E. Ç., Karaoğlu, Ş. A., Sevim, A., Özgümüş, O. B. 2006. İçme sularından izole edilen *Bacillus* suşlarının identifikasyonu ve antibiyotiklere direnç profilleri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 36(4): 219-223.
- Shah, M., Fawcett, D., Sharma, S., Tripathy, S. K., Poinern, G. E. J. 2015. Green synthesis of metallic nanoparticles via biological entities. *Materials*, 8(11): 7278-7308.
- Shakibaie, M., Shahverdi, A. R., Faramarzi, M. A., Hassanzadeh, G. R., Rahimi, H. R., Sabzevari, O. 2013. Acute and subacute toxicity of novel biogenic selenium nanoparticles in mice. *Pharmaceutical Biology*, 51(1): 58-63.
- Shakibaie, M., Forootanfar, H., Golkari, Y., Mohammadi-Khorsand, T., Shakibaie, M. R. 2015. Anti-biofilm activity of biogenic selenium nanoparticles and selenium dioxide against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Proteus mirabilis*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 29: 235-241.
- Sharma, G., Sharma, A. R., Bhavesh, R., Park, J., Ganbold, B., Nam, J. S., Lee, S. S. 2014. Biomolecule-mediated synthesis of selenium nanoparticles using dried *Vitis vinifera* (raisin) extract. *Molecules*, 19(3): 2761-2770.
- Shin, Y., Blackwood, J. M., Bae, I. T., Arey, B. W., Exarhos, G. J. 2007. Synthesis and stabilization of selenium nanoparticles on cellulose nanocrystal. *Materials Letters*, 61(21): 4297-4300.
- Sinha, T., Ahmaruzzaman, M. 2015. Biogenic synthesis of Cu nanoparticles and its degradation behavior for methyl red. *Materials Letters*, 159: 168-171.
- Sonkusre, P., Cameotra, S. S. 2015. Biogenic selenium nanoparticles inhibit *Staphylococcus aureus* adherence on different surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136: 1051-1057.
- Srivastava, P., Kowshik, M. 2016. Anti-neoplastic selenium nanoparticles from *Idiomarina* sp. PR58-8. *Enzyme and Microbial Technology*, 95: 192-200.
- Sundaram, P. A., Augustine, R., Kannan, M. 2012. Extracellular biosynthesis of iron oxide nanoparticles by *Bacillus subtilis* strains isolated from rhizosphere soil. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17(4): 835-840.
- Süfer, Ö., Karakaya, S. 2011. Gıda endüstrisi ve nanoteknoloji: Durum tespiti ve gelecek. *Akademik Gıda*, 9(6): 81-88.
- Sürengil, G., Kılınç, B. 2011. Gıda-ambalaj sektöründe nanoteknolojik uygulamalar ve su ürünleri açısından önemi. *Journal of Fisheries Sciences.com*, 5(4): 317-325.
- Taran, M., Rad, M., Alavi, M. 2017. Antibacterial activity of copper oxide (CuO) nanoparticles biosynthesized by *Bacillus* sp. FU4: Optimization of Experiment Design. *Pharmaceutical Sciences*, 23: 198-206.
- T. C. Sağlık Bakanlığı Ulusal Mikrobiyoloji Standartları (UMS), 2014. Antibiyogram yorumlama kriterleri ve kısıtlı bildirim kuralları. AMD-TB-03, Sürüm: 1.0.

- Temamoğulları, F., Dinçoğlu, A. H. 2010. Şanlıurfa ve çevresindeki kuyu sularında çinko ve selenyum düzeyleri. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 16(2): 199-203.
- Thakkar, K. N., Mhatre, S. S., Parikh, R. Y. 2010. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(2): 257-262.
- Thirumurugan, A., Ramachandran, S., Tomy, N. A., Jiflin, G. J., Rajagomathi, G. 2012. Biological synthesis of gold nanoparticles by *Bacillus subtilis* and evaluation of increased antimicrobial activity against clinical isolates. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 29(12): 1-5.
- Thornton, B. F., Burdette, S. C. 2013. The ends of elements. *Nature Chemistry*, 5: 350-352.
- Tiwari, M., Narayanan, K., Thakar, M. B., Jagani, H. V., Rao, J. V. 2014. Biosynthesis and wound healing activity of copper nanoparticles. *IET Nanobiotechnology*, 8(4): 230-237.
- Tiwari, M., Jain, P., Hariharapura, R. C., Narayanan, K., Bhat, U., Udupa, N., Rao, J. V. 2016. Biosynthesis of copper nanoparticles using copper-resistant *Bacillus cereus*, a soil isolate. *Process Biochemistry*, 51(10): 1348-1356.
- Tolochko, N. 2009. History of nanotechnology. *Nanoscience and Nanotechnology. Encyclopaedia of Life Support Systems (EOLSS)*, SEolss Yayıncılık, Oxford.
- URL-1, <https://theconversation.com/nanotechnology-could-make-our-food-tastier-and-healthier-but-can-we-stomach-it-60349>, Erişim Tarihi: 26.11.2017.
- URL-2, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>, Erişim Tarihi: 23.11.2017.
- URL-3, <http://merlab.metu.edu.tr/x-isini-difraktometresi>, Erişim Tarihi: 20.11.2017.
- Var, I., Sağlam, S. 2015. Gıda endüstrisinde nanoteknoloji uygulamaları. *Gıda*, 40(2): 101-108.
- Wang, T., Yang, L., Zhang, B., Liu, J. 2010. Extracellular biosynthesis and transformation of selenium nanoparticles and application in H₂O₂ biosensor. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 80(1): 94-102.
- Wang, X., Zhang, D., Pan, X., Lee, D. J., Al-Misned, F. A., Mortuza, M. G., Gadd, G. M. 2017. Aerobic and anaerobic biosynthesis of nano-selenium for remediation of mercury contaminated soil. *Chemosphere*, 170: 266-273.
- Wei, X., Luo, M., Li, W., Yang, L., Liang, X., Xu, L., Liu, H. 2012. Synthesis of silver nanoparticles by solar irradiation of cell-free *Bacillus amyloliquefaciens* extracts and AgNO₃. *Bioresource Technology*, 103(1): 273-278.
- Yalçinkaya, İ., Güngör, T., Başalan, M., Çınar, M., Saçaklı, P. 2010. Broyler rasyonlarında organik selenyum ve vitamin E kullanımının performans, iç organ ağırlıkları ve kan parametreleri üzerine etkisi. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 16(1): 27-32.

- Yee, N., Ma, J., Dalia, A., Boonfueng, T., Kobayashi, D. Y. 2007. Se(VI) reduction and the precipitation of Se(0) by the facultative bacterium *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 are regulated by FNR. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6): 1914-1920.
- Yeğenoğlu, H., Aslım, B., Tamer, U. 2013. Gıda patojenlerinin tanısında kullanılan nanoboyutlu immünosensör tasarımı. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 2(1): 58-68.
- Yılmaz, M. 2014. Elektro döndürme yöntemi ile elde edilen karbon nanolif ve karbon nanotüplerin karakterizasyonu ve işlevselleştirilmesi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, Yüksek Lisans Tezi.
- Yost, D. A., Russell, J. C., Yang, H. 1990. U. S. Patent No. 4,954,452. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Zeng, H., Combs, G. F. 2008. Selenium as an anticancer nutrient: Roles in cell proliferation and tumor cell invasion. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(1): 1-7.
- Zhang, J. S., Gao, X. Y., Zhang, L. D., Bao, Y. P. 2001. Biological effects of a nano red elemental selenium. *Biofactors*, 15(1): 27-38.
- Zhang, J., Zhang, S. Y., Xu, J. J., Chen, H. Y. 2004a. A new method for the synthesis of selenium nanoparticles and the application to construction of H₂O₂ biosensor. *Chinese Chemical Letters*, 15(11): 1345-1348.
- Zhang, S. Y., Zhang, J., Wang, H. Y., Chen, H. Y. 2004b. Synthesis of selenium nanoparticles in the presence of polysaccharides. *Materials Letters*, 58(21): 2590-2594.
- Zhang, J., Wang, H., Yan, X., Zhang, L. 2005. Comparison of short-term toxicity between Nano-Se and selenite in mice. *Life Sciences*, 76(10): 1099-1109.
- Zhang, W., Chen, Z., Liu, H., Zhang, L., Gao, P., Li, D. 2011. Biosynthesis and structural characteristics of selenium nanoparticles by *Pseudomonas alcaliphila*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 88(1): 196-201.
- Zhang, W. 2014. Nanoparticle aggregation: principles and modeling. İçinde: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 811. Sayı, Springer Netherlands, Amerika, 19-43.

ÖZGEÇMİŞ

F. Alev AKÇAY 29.06.1990 tarihinde İzmit’te doğdu. İlk ve ortaöğrenimini İzmit’te tamamladıktan sonra 2009 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünde lisans eğitimine başladı. Lisanstan 2014 yılında mezun oldu ve 2015 yılında Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünde yüksek lisans eğitimime başladı. Yüksek lisans eğitimi devam ederken 2016 yılında Sakarya Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. Halen bulunduğu bölümde görevine devam etmektedir.