



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**DEMİR NANOPARTİKÜLLERİN YEŞİL SENTEZİ,
KARAKTERİZASYONU VE BİYOREMEDİASYONDA
KULLANIMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nazlıcan TOPTAŞ

Danışman: Prof.Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI EFELİ

TOKAT-2023



Tez çalışması; Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2020/109 nolu proje ile desteklenmiştir.

ETİK SÖZLEŞME

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI EFELİ danışmanlığında hazırlamış olduğum “Demir Nanopartiküllerin Yeşil Sentezi, Karakterizasyonu ve Biyoremediasyonda Kullanımı” adlı Yüksek Lisans tezinin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

.../.../...

Nazlıcan TOPTAŞ

ÖZET

DEMİR NANOPARTİKÜLLERİN YEŞİL SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE BİYOREMEDİASYONDA KULLANIMI

Nazlıcan TOPTAŞ

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI EFELİ

Şubat 2023, xiv + 115 sayfa

Bu tez çalışmasında topraktan izole edilen mikroorganizmaların siderofor üretim kapasiteleri araştırılmış ve CAS sıvı deneyinde pozitif sonuç veren, gram boyamada gram (-) basil olduğu anlaşılan mikroorganizmanın, 16S rRNA geni dizi analizi ile *Cronobacter turicensis* olduğu tespit edilmiştir. *C. turicensis* BHC04 olarak adlandırılan suşun optimizasyon öncesinde siderofor üretim yüzdesi % 65 olduğu belirlenmiştir. Optimum siderofor üretim saatinin belirlenmesi çalışmasında, farklı saatlerde CAS sıvı besiyerindeki renk değişimleri (turuncu ve mor), organizmanın iki farklı siderofor sentezlediğini işaret etmesi üzerine bu sideroforlar araştırılmıştır. Ortam koşulları optimize edildiğinde, 1. sideroforun OD₄₀₀'de, 37 °C sıcaklıkta, 18. saatte, pH 8.5'te, karbon kaynağı olarak gliserol, azot kaynağı olarak amonyum klorür kullanılarak ve FeCl₃ ilave edilmeden hazırlanmış CDLIM besiyerindeki üretiminin % 70'e yükseldiği görülmüştür. 2. sideroforun ise OD₅₈₀'de, 37 °C sıcaklıkta, 28. saatte, pH 6.5'te, karbon kaynağı olarak gliserol, azot kaynağı olarak amonyum klorür kullanılarak ve FeCl₃ ilavesi olmadan hazırlanmış CDLIM besiyerindeki üretiminin % 94'e yükseldiği belirlenmiştir. *C. truibensis* BHC04'ün pH 8.5'ta az ürettiğinin belirlenmesi ve yapılan optimizasyonlar sonucunda pH 6.5'ta belirlenen sideroforun daha yüksek miktarlarda üretildiğinin ölçülmesi üzerine, çalışmaya 2. siderofor ile devam edilmiştir. Büyük ölçekli üretimi gerçekleştirilen sideroforun liyofilizasyon ile konsantre hale getirilmesi sonrasında Sephadex LH-20 dolgulu kolon kullanılarak saflaştırılmıştır. Renk ve absorbans miktarları değerlendirilerek 5-20. Fraksiyonlar birleştirilmiştir. Saflaştırılmış fraksiyonlar ile siderofor tipini belirlenmek üzere Arnov ve Csaky testi gerçekleştirilmiş yüksek oranda katekolat tipi siderofor içerdiği anlaşılmıştır. Saflaştırılmış sideroforun

karakterizasyonu amacıyla, sırasıyla HPLC, FTIR ve $^1\text{H-NMR}$ analizleri gerçekleştirilmiş ancak HPLC analizinde elde edilen piklerin, standart olarak kullanılan desferal ve 2,3-dihidroksibenzoik asit (DHBA) larla eşleşmediği görülmüştür. Yapılan FTIR ve $^1\text{H-NMR}$ analizlerinde ise, CDLIM besiyerinde karbon kaynağı olarak kullanılan gliserolün girişim yapması sebebiyle, yeterli veri elde edilememiştir. Bunun üzerine tezin asıl hedefi olan siderefor nanopartikül sentezi ve sudaki arseniğin temizlenmesi çalışmalarının gerçekleştirilmesi amacıyla, çalışmaya, BAP 2020/108 nolu çalışmada çeşitli analizlerle katekolat tipi siderofor olduğu kanıtlanmış olan *Lactobacillus plantarum* BHC03 suşu ile devam edilmiştir. Optimum siderofor üretim koşullarında üretilen suş süpernatantı ile Fe_2O_3 'ün karıştırılması ile hücre dışı biyolojik demir nanopartikül sentezlenmiştir. Sentezlenen FeNP'lerin optimizasyonu gerçekleştirilmiş ve optimum koşulların OD_{350} 'de, 36°C sıcaklıkta, 60. ve 80. saatte, pH 8.5'te absorbans verdiği gözlemlenmiştir. 60. saat ve 80. saatte üretilen FeNP'lerin karakterizasyonu için sırasıyla SEM, EDX, FTIR, XRD ve Zeta potansiyel ölçüm analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda, SEM analiziyle 80-200 nm çaplarında agromelere küresel forma sahip, EDX ile demir, oksijen ve karbon varlığı kanıtlanmış, FTIR analizi ile biyolojik demir nanopartikül spektrumlarına sahip olan, XRD analizi ile ortalama çapının 86 nm belirlenmiş kristal yapıdaki, Zeta potansiyeli -43.9 mV olan biyolojik demir nanopartiküllerin üretildiği belirlenmiştir. 60. saat biyolojik FeNP ile sudaki arsenik giderimi araştırılmıştır. ICP analizi ile biyolojik FeNP miktarının artışına bağlı olarak arsenik miktarının azaldığı görülmüştür. Bu tez çalışması ile sudaki ağır metallerden biri olan arseniğin, çevre kirliliğine sebep olabilecek kimyasal yöntemler yerine daha ucuz ve çevre dostu olan biyolojik demir nanopartikül ile giderimi sağlanabileceği kanıtlanmıştır.

ANAHTAR KELİMELELER: Siderofor, *Cronobacter turicensis*, Demir Nanopartikül, Arsenik Biyoremediasyonu, Yeşil Sentez

ABSTRACT

GREEN SYNTHESIS, CHARACTERIZATION OF IRON NANOPARTICLES AND THEIR USE IN BIOREMEDIATION

Nazlıcan TOPTAŞ

Master's Thesis, Bioengineering

Advisor: Prof. Dr. Bilge Hilal CADIRCI EFELI

February 2023 xiv + 115 page

In this study, the siderophore production capacity of microorganisms isolated from the soil was investigated. The best siderophore-producing microorganism in CAS liquid test was gram (-) bacil and identified as *Cronobacter turicensis* by 16S rRNA gene sequence analysis. It was observed that the isolated strain called *C. turicensis* BHC04 has a siderophore with percentage of 65% before optimizing the production conditions. Two different siderophores were investigated since the color changes (orange and purple) at different production hours point to two different siderophores. It was observed that the production of the optimized 1st siderophore increased to 70% in CDLIM medium prepared at OD₄₀₀, 37 °C, 18th hour, pH 8.5, 0 µl FeCl₃ concentration, using glycerol as carbon source and ammonium chloride as nitrogen source. On the other hand, the production of the optimized 2nd siderophore increased to 94% in CDLIM medium prepared at 37 °C, 28 hours, pH 6.5, 0 µl FeCl₃ concentration, using glycerol as carbon source and ammonium chloride as nitrogen source. The study was continued with the second siderophore. After the large-scale production of the siderophore was concentrated by lyophilization, it was purified using Sephadex LH-20 packed column. By evaluating the color and absorbance amounts, 5-20. fractions have been merged. Arnow and C     tests were performed to determine the siderophore type with the purified fractions, and it was found that it contained a high percentage of catecholate type siderophores. For the characterization of the purified siderophore, HPLC, FTIR and ¹H-NMR analyzes were performed, respectively, but sufficient data could not be obtained due to the incompatibility with the standards in HPLC analysis and the inability to purify and remove the glycerol used as a carbon source in CDLIM medium in FTIR and ¹H-NMR

analyzes. Due to the lack of characterization, the study was continued with the *Lactobacillus Plantarum* BHC03 strain, which was proven to be a catecholate type siderophore by various analyzes in the BAP 2020/108 study. Extracellular biological iron nanoparticle of Fe_2O_3 was synthesized with the strain supernatant produced under optimum siderophore production conditions. Optimization of the synthesized FeNPs was carried out and it was observed that the optimum conditions were absorbance at OD_{350} , 36 °C, 60. and 80. hours, pH 8.5. SEM, EDX, FTIR, XRD and Zeta potential measurement analyzes were performed for the characterization of FeNPs produced at 60th and 80th Hours, respectively. As a result of the characterization, the arsenic removal in water with the 60. hour biological FeNP was investigated, SEM analysis showed that it had a spherical shape with agromes of 80-200 nm in diameter, the presence of iron, oxygen and carbon was proven by EDX, it was observed that it had biological iron nanoparticle spectra with FTIR analysis, and its mean diameter was 86 nm by XRD analysis determined crystal structure, -43.9 mV by Zeta potential measurement analysis. With the ICP analysis, it was observed that the amount of arsenic decreased due to the increase in the amount of biological FeNP. With this thesis, it has been proven that heavy metal (arsenic) in water can be removed with cheaper and environmentally friendly biological iron nanoparticles instead of chemical methods that may cause environmental pollution.

KEYWORDS: Siderophore, *Cronobacter turicensis*, Iron nanoparticle, Arsenic Bioremediation, Green Synthesis.

ÖNSÖZ

Bu çalışmada yer almamı sağlayıp yüksek lisans eğitimim süresince hoşgörüsünü ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, tecrübesiyle bana yol gösteren, tez danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI EFELİ' ye,

Yüksek Lisans' a başlamam için yüksek ikna kabiliyetini kullanıp hayatıma yepyeni deneyimler kazandıran, Lisans ve Yüksek Lisans hayatım boyunca zaman, mekan fark etmeden maddi ve manevi desteğiyle bana arkadaştan çok kardeş olan canımın içi Nazlıcan YÜCESOY ÇOŞGUN'a,

Zorlu çalışma ve tez yazma sürecimde bana manevi desteklerini esirgemeyen biricik kuzenim ve canım arkadaşlarım, Damla ATICI, Derya TÜRKAY ve Kevser TAŞTEMEL'e, tez yazarken beni daima yüreklendirip, cinnet anlarımda sakinleştiren ve bana güzel yemekler hazırlayan canım ev arkadaşım Reyhan ALTUN'a,

Araştırmacı ruhuyla sürekli yeni şeyler öğrenip bize bilgi aktarımı yapan, motivasyon ve neşesiyle bizi yüreklendiren, sevgili doktorantımız Nihan SEMİZOĞLU'na

Engin tecrübeleriyle, tez çalışmamdaki analiz sonuçlarımı değerlendirme konusunda yardımlarını esirgemeyen sayın hocalarım Prof. Dr. Ramazan ERENLER ve Doç. Dr. Kıymet BERKİL AKAR'a

Bütün hayatım boyunca beni her konuda destekleyen, dürüst, adiletli biri olarak yetiştiren, yanımda olamasalar bile sevgilerini her daim hissettiğim canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

Nazlıcan TOPTAŞ

2023

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1. Sideroforlar	3
2.1.1. Siderofor Tipleri.....	3
2.1.2. Siderofor Üreten Mikroorganizmalar.....	7
2.1.3. <i>Cronobacter</i> sp.	8
2.1.4. <i>Cronobacter</i> spp.'nin Siderofor Bağlantısı	9
2.1.5. Sideroforların Bakterilerdeki Taşınımı	10
2.1.6. Sideroforların Biyosentezi	12
2.1.7. Sideroforların Kullanım Alanları	13
2.2. Biyolojik Demir Nanopartiküller (FeNP)	18
2.2.1. Nanoteknoloji.....	18
2.2.2. Nanopartiküller	19
2.2.3. Demir Nanopartiküller (FeNP)	20
2.2.4. Nanopartiküllerin Sentez Yöntemleri.....	21
2.2.5. FeNP'lerin Kullanım Alanları.....	28
2.3. Biyolojik Demir Nanopartiküllerin Biyoremediasyonda Kullanımı	29
2.3.1. Arsenik.....	29
2.3.2. Arseniğin Sağlık Açısından Etkileri.....	31
2.4. Karakterizasyon Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar	32
2.4.1. Siderofor Saflaştırma ve Karakterizasyonunda Kullanılan Cihazlar	32
2.4.2. Nanopartiküllerin Karakterizasyonunda Kullanılan Cihazlar	36
3. MATERYAL VE YÖNTEM	39
3.1. Materyal	39
3.1.1. Kullanılan Besiyerleri	39
3.1.2. Hazırlanan Çözeltiler ve Solüsyonlar.....	40
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	42

3.2. Yöntem.....	43
3.2.1. Siderofor Üreticisi Mikroorganizmaların İzolasyonu	43
3.2.2. Siderofor Üreticisi Mikroorganizmaların Tespiti.....	43
3.2.3. Siderofor Üreticisi Mikroorganizmanın Tanılanması	45
3.2.4. <i>Cronobacter turicensis</i> BHC04 Suşunun Optimum Siderofor Üretim Koşullarının Belirlenmesi	45
3.2.5. <i>Cronobacter turicensis</i> BHC04 Sideroforunun Saflaştırılması ve Karakterizasyonu.....	47
3.2.6. Yeşil Sentez ile Biyolojik Demir Nanopartikül (FeNP) Sentezi.....	50
3.2.7. Biyolojik Demir Nanopartiküllerin (FeNP) Karakterizasyonu	51
3.2.8. Biyolojik Demir Nanopartikül ile Arsenik Giderimi	53
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	54
4.1. Siderofor Üreticisi Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Karakterizasyonu	54
4.2. <i>Cronobacter turicensis</i> BHC04 Suşunun Siderofor Üretimi ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu	58
4.3. <i>Cronobacter turicensis</i> BHC04 Sideroforunun Saflaştırılması ve Karakterizasyonu.....	71
4.4. Yeşil Sentez ile Biyolojik Demir Nanopartikül (FeNP) Sentezi.....	76
4.5. Biyolojik Demir Nanopartiküllerin (FeNP) Karakterizasyonu	80
4.6. Biyolojik Demir Nanopartikül ile Ağır Metal Giderimi	87
5. SONUÇLAR	89
6. REFERANSLAR	93
7. EKLER.....	111
8. ÖZGEÇMİŞ	115

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
μM	Mikro molar
Λ	Dalga boyu
kDa	Kilodalton
L	Litre
ml	Mililitre
Nm	Nanometre
Mm	Milimetre
nM	Nanomolar
G	Gram
Da	Dalton
mM	Milimolar
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
Nm	Nano metre
Fe	Demir
M	Molar
Dk	Dakika
μg	Mikro gram
μl	Mikro litre
mA	Mili Amper

Kısaltmalar	Açıklama
CA	Karbon Anhidrazı
CAS	Crom azurol S
CSIN	Kitosan Stabilize Demir Nanopartikül
DHBA	Dihidroksibenzoik Asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDX	Enerji Dağıtıcı X-Işını Spektroskopisi

FeNP	Demir Nanopartikül
FTIR	Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi
HCl	Hidroklorik asit
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ICP	İndüktif Olarak Eşleşmiş Plazma
LB	Luria-Bertani
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NP	Nanopartikül
OD	Optik yoğunluk
PBS	Phosphate buffered saline
RNA	Ribonükleik asit
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
SPM	Süperparamanyetik
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskop

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 1. Dört sınıfın her biri için temsili sideroforlar	6
Şekil 2. 2. Siderofor aracılığıyla demir taşınımı ve düzenlenmesi, siderofor-demir komplekslerinin dış zar boyunca TBDT (Ton B'ye bağlı taşıyıcılar) ile taşınma mekanizması.	12
Şekil 2. 3. Gram negatif bakterilerde "Truva atı" stratejisinin şeması.	16
Şekil 2. 4. Nanopartikül sentez yöntemleri.....	22
Şekil 2. 5. Bazı bakteriler tarafından hücre dışı üretilen nanopartiküller ve morfolojik özellikleri.	26
Şekil 2. 6. Nanopartiküllerin hücre dışı ve hücre içi sentezi....	26
Şekil 2. 7. Arseniğin karasal ve sucul ekosistemdeki major kaynakları.....	31
Şekil 2. 8. Doğada arsenik döngüsü.	31
Şekil 2. 9. HPLC çalışma mekanizması.....	33
Şekil 2. 10. Ters faz kromatografisi.....	33
Şekil 2. 11. FTIR çalışma prensibi.....	34
Şekil 2. 12. Bazı organik grupların frekans aralıkları.....	35
Şekil 2.13. NMR cihazının genel şeması.....	36
Şekil 4. 1. Siderofor aktivitesi gösteren izolatlar turuncu renkli zon üretmektedir	555
Şekil 4. 2. 4 numaralı örneğin Chromas programı ile elde edilmiş olan 16s rRNA gen dizi analiz kromatografi.....	57
Şekil 4. 3. 4 numaralı örneğin MEGA-X programı ile elde edilen soy ağacı.	57
Şekil 4. 4. (a) Turuncu renk sideroforun optik yoğunluk değerleri (b) Menekşe moru sideroforun optik yoğunluk değerleri (c) Renk değişimiyle iki farklı siderofor varlığına işaret eden örnekler.....	58
Şekil 4. 5. 4 farklı sıcaklıkta <i>Cronobacter turicensis</i> BHC04 suşunun büyüme grafiği	59
Şekil 4. 6. Absorbans değeri 400nm olarak belirlenen 1. sideroforun sıcaklık optimizasyon grafiği ve siderofor yüzdesi.....	600
Şekil 4. 7. Absorbans değeri 580nm olarak belirlenen 2. sideroforun sıcaklık optimizasyon grafiği ve siderofor yüzdesi.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.1
Şekil 4. 8. 18. Saat ve 28. Saatlerinde bakteri büyüme miktarının 600nm absorbans değerinde ölçümü.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.2
Şekil 4. 9. Birinci siderofor için değerlendirilen pH aralıkları	633
Şekil 4. 10. İkinci siderofor için değerlendirilen pH değerleri ve siderofor yüzdesi Hata! Yer işareti tanımlanmamış.4	
Şekil 4. 11. Farklı pH aralıklarında CAS metodu tamamlanan örneklerin renkleri.....	64
Şekil 4. 12. Farklı FeCl ₃ konsantrasyonlarında 1. siderofor üretimi	65
Şekil 4. 13. Farklı FeCl ₃ konsantrasyonlarında 2. siderofor üretimi ve üretim yüzdesi....	66
Şekil 4. 14. Birinci siderofor için karbon kaynağı optimizasyonu ve 1. Sideroforun üretim yüzdesi.....	67
Şekil 4. 15. İkinci siderofor için karbon kaynağı optimizasyonu ve 2. Sideroforun üretim yüzdesi.....	68
Şekil 4. 16. Birinci siderofor için azot kaynağı optimizasyonu.....	69
Şekil 4. 17. İkinci siderofor için azot kaynağı optimizasyonu ve 2. sideroforun üretim yüzdesi	70

Şekil 4. 18. Optimize edilen koşullarda üretilen sideroforlar ve üretim yüzdeleri... **Hata!**
Yer işareti tanımlanmamış.1

Şekil 4. 19. Toplanan fraksiyonların CAS metoduna göre OD580’de ölçüm sonuçları	712
Şekil 4. 20. Katekolat tipi siderofor testi için Arnow testi ve (b) Hidroksamat tipi siderofor için karışımın Casky testi sonuçları.....	73
Şekil 4. 21. Saflaştırılmış siderofor örneklerinin FTIR analiz sonuçları.....	74
Şekil 4. 22. ¹ H-NMR analizin tüm spektrumları	75
Şekil 4. 23. Alifatik bölgede görülen zayıf pikler	76
Şekil 4. 24. Katekolat tipi siderofor süpernatantı ile sentezlenen biyolojik FeNP’lerin petrideki görüntüsü	77
Şekil 4. 25. Sentezlenen biyolojik FeNP’lerin optik yoğunluk (OD) optimizasyonu	77
Şekil 4. 26. Sentezlenen biyolojik FeNP’lerin zaman optimizasyon grafiği.....	78
Şekil 4. 27. Sentezlenen biyolojik FeNP’lerin sıcaklık optimizasyon grafiği.....	79
Şekil 4. 28. Sentezlenen biyolojik FeNP’lerin pH optimizasyon grafiği	80
Şekil 4. 29. 60. Saat FeNP’lerin SEM görüntüsü.....	81
Şekil 4. 30. 60. Saat FeNP’lerin EDX spektrumları	81
Şekil 4. 31. 80. Saat FeNP’lerinin SEM görüntüsü.....	82
Şekil 4. 32. 80. Saat FeNP’lerin EDX spektrumları	82
Şekil 4. 33. 60. Saat FeNP’lerin FTIR analiz sonucu	83
Şekil 4. 34. 80. Saat FeNP’lerin FTIR analiz sonucu	84
Şekil 4. 35. 60. Saatte alınan FeNP’lerin XRD sonuçları.....	85
Şekil 4. 36. 80. Saatte alınan FeNP’lerin XRD sonuçları.....	86
Şekil 4. 37. 60. Saat ve 80. Saat FeNP’lerin zeta potansiyel sonuçları	87

ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2. 1. Mikroorganizmalar tarafından üretilen siderofor grupları.....	5
Tablo 2. 2. Bazı demir oksit fazları ve özellikleri.....	211
Tablo 2. 3. Arseniğin kimyasal özellikleri.....	30
Tablo 3. 1. Kullanılan cihazlar ve markaları.....	42
Tablo 3. 2. Demir nanopartiküllerin karakterizasyonunda kullanılan metotlar.....	51
Tablo 4. 1. Elde edilen saf kolonilerin morfolojik görüntülenmesi.....	54
Tablo 4. 2. MM9 ortamında büyütülen izolatların CAS metodu ile boyanması, verileri ve renkleri.....	55
Tablo 4. 3. Arsenik ile farklı konsantrasyonlardaki FeNP'lerin muamele edilmesi sonucunda gözlemlenen arsenik miktarı.....	88



1. GİRİŞ

Boyutları 100 nm ve altında olan partiküller olarak bilinen nanopartiküller, nanometre boyutunda olan malzemelerin ve böylelikle nanoteknolojinin temelini oluşturmaktadır. Nanoteknolojik yöntemlerle nano boyuta indirgenen demir partikülleri (FeNP) temelde biyomedikal ve fizikokimya olmak üzere biyoremediasyon, eczacılık, elektrik-elektronik, otomotiv sanayi, gıda sanayi, tıp gibi pek çok farklı alanda kullanılmaktadır. Fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere üç farklı üretim yöntemi bulunan nanopartiküller, organik ve inorganik nanopartiküller olarak sınıflandırılmaktadırlar (Hammamchi H., 2019). Organik ve inorganikler nanoyapıların sentezi için farklı fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Ancak, bu yöntemlerle nanopartiküllerin sentezlenme süresi ve maliyeti düşük olsa da elde edilmiş nanopartiküllerin birçoğunda sentez aşamasında toksik kimyasallar kullanılmaktadır. Dolayısıyla elde edilen nanopartiküllerin toksik özellikler taşıması, günümüzde insanların yaşam alanlarında kullanılan bu nanopartiküller için büyük bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu da herhangi bir toksik kimyasal madde kullanmadan, doğal yöntemler kullanılarak nanopartiküllerin sentezini gerekli kılmaktadır. Bazı bitki ekstraktlarıyla ve mikroorganizmaların hücre içi ve hücre dışı salgılarıyla birtakım indirgenme reaksiyonları gerçekleştirerek demir nanopartiküller üretilmektedir.

Mikroorganizmalar doğadaki çeşitlilikleri, kolay izole edilebilir olmaları ve nanopartikül üretimindeki kolaylıkları sebebiyle oldukça ön plandadırlar. Bakteri, mantar, alg ve aktinomisetler tarafından düşük demir konsantrasyonuna sahip ortamlarda yaşadıkları zaman salınan ve “demir taşıyıcı” anlamına gelen sideroforlar, düşük molekül ağırlıklı demir bağlayan ajanlardır.

Endüstriyel atık sular tüm canlılar için zehirli ve tehlikeli olan arsenik, kurşun, bakır, nikel, civa, demir ve krom gibi ağır metaller içermektedirler. Bu ağır metallerin çevreye verilmeden önce arıtılarak çeşitli su standartlarına göre, izin verilen değerlerin altına düşürülmesi gerekmektedir. Literatürde sideroforların, çevresel sorunlara yol açan birçoğu ağır olan metalleri As^{3+} , Fe^{3+} , Ag^{+} , Al^{3+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cr^{2+} , Cu^{2+} , Eu^{3+} , Ga^{3+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Sn^{2+} , Tb^{3+} , Tl^{+} ve Zn^{2+}) belirli oranlarda bağladığı (demir affinitesi en fazla olduğu) bildirilmiştir (Aydın B., 2014 ; Chen ve ark., 1994 ; Braud ve ark., 2009).

Bu tez çalışmasında, sideroforlardan üretilen demir nanopartiküllerin seçici, kolay, ucuz ve çevre dostu olan biyolojik yöntemle sentezlenerek atıksulardan ağır metal giderim yöntemi araştırılmıştır. Demir partiküllerin uygulanan manyetik alana cevap vererek istenilen şekilde hareket ettirilebilmeleri birçok uygulamada avantaj sağlamaktadır. Çalışmada nanopartikül sentez aşamasında; kullanılacak siderofor miktarları, ağır metal giderim analizleri için de pH, sıcaklık, zaman ve nanopartikül miktarı gibi parametreler değiştirilerek optimizasyon yapılmış, partikül karakterizasyonu gerçekleştirilerek, metal giderim testleri yapılmakla beraber, büyük çaplı üretimler için de çalışmalara ön basamak olması hedeflenmiştir.

Sideroforlarla ilgili birçok araştırma olmasına rağmen bu demir şelatlayıcı ajanların hücre dışı olarak senteziyle elde edilecek demir nanopartiküllerinin ağır metal olan arsenik içeren sulardaki arsenik giderimiyle ilgili henüz bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Demir afinitesine sahip sideroforların demir nanopartiküllerinin biyolojik üretiminde rol oynayabileceği fikriyle bu tez kapsamında, son yıllarda dikkatleri üzerine toplayan demir şelatlayıcı ajanların, biyoteknoloji disiplinleri kullanılarak biyolojik üretim yöntemiyle demir nanopartikülleri sentezleyerek, çevre kirliliğine önemli ölçüde sebebiyet veren ağır metalden biri olan arsenik giderimi üzerine etkisi araştırılmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Sideroforlar

Demir, neredeyse tüm aerobik organizmaların büyümesi için gerekli olan temel bir elementtir. Ökaryotik organizmaların demiri çözmesi çok zor olmasına rağmen, bakteriler kendileri için gerekli olan demiri kullanmak için farklı stratejiler geliştirmişlerdir. Demirden yoksun ortamlarda bakterilerin çoğu, dış ortamdan demir alımında görev yapan siderofor adı verilen moleküller üretmektedir. Yunanca'da "demir taşıyıcı" anlamına gelen sideroforlar 400-1500 Da moleküler ağırlığına sahip, bakteri, mantar, alg ve aktinomisesler tarafından salınan düşük molekül ağırlıklı demir bağlayan ajanlardır (Miethke ve Marahiel, 2007). Siderofların yapısı, türler arasında oldukça büyük değişiklikler göstermekle birlikte şimdiye kadar farklı mikroorganizmalardan yaklaşık 500 siderofor türü izole edilmiştir (Boukhalfa ve Crumbliss, 2002). *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Azospirillum* ve *Rhizobium* (Glick ve ark., 1999, Loper ve ark., 1999) gibi mikroorganizmalar tarafından sentezlenen bu düşük moleküler ağırlıklı demir şelatlayıcı bileşikler, serbest demir ile kompleks oluşturarak membran reseptör molekülleri tarafından hücreye taşınmaktadırlar ve taşınımının ardından hücreye yeterli miktarda demir alındığında üretimden sorumlu genlerin operonları kapatılmaktadır (Lewin, 1984). Sideroforlar çoğunlukla kimyasal kompozisyon ve mikrobiyal orijinlerine göre hidroksamat, katekolat (fenolat) ve karboksilat ve karışık ligantlar olmak üzere dört önemli gruba ayrılmaktadır (Modi ve ark. 2012).

2.1.1. Siderofor Tipleri

Mikrobiyal sideroforlar, hem bakteri (*ferrioxamine B*) hem de mantarlar (*ferrichrome*) tarafından üretilen hidroksamatlar, katekolatlar (*enterobactin*), karboksilatlar (*rizobactin*) ve bakteriler tarafından üretilen karışık tipte (*pyoverdin*) olmak üzere dört ana tipten oluşmaktadır (Ahmed ve Holmström, 2014).

Hidroksamat Sideroforlar

Hidroksamat tipindeki sideroforlar, doğada en sık bulunan siderofor gruplarından biri olmakla birlikte *Ustilago sphaerogena* mantarı tarafından üretilen ilk ferrikrom

siderofordur. Bu sideroforlar, başta mantarlar ve bakteri olmak üzere birçok mikroorganizma tarafından üretilmektedir. Tüm hidroksamatlar $N\delta$ -acyl- $N\delta$ -hydroxy-L-ornitin içermektedir (Van der Helm ve Winkelmann, 1994). Çoğu hidroksamat sideroforu, bir $C(=O)N-(OH)R$ grubu içermektedir; buradaki R, bir amino asit ya da bunun bir türevidir. Hidroksamat grubundaki iki oksijen molekülü, iki değerlikli bir demir ligandı oluşturur ve dolayısıyla siderofor Fe^{3+} ile altı değerli bir oktahedral kompleks oluşturabilmektedir. Ayrıca hidroksamatlar, ferrik Fe'ye bağlanmak için $10^{22} - 10^{32} M^{-1}$ aralığında bir bağlanma sabitlerine sahip (Rezanka ve ark., 2018) olması ile birlikte, hidroksamat bir siderofor demire bağlandığında 425 ile 500 nm arasında güçlü bir absorpsiyon gösterdiği bildirilmektedir (Messenger ve Ratledge, 1985). Demir ve siderofor arasındaki bu güçlü bağ, demir siderofor komplekslerini hidroliz ve enzimatik bozulmaya karşı korumaktadır.

Hidroksamat tipinde sideroforlar Neilands (1993), O-CAS (Pérez-Miranda ve ark., 2007) olmak üzere birçok yolla tespit edilebilmektedir. (Pluhacek ve ark., 2016). Hidroksamat sideroforlara örnek olarak, Desferrioksamin B (deferoksamin), desferrioksamin E, fusarinin C, ornibaktin, enterobaktin, ferrioksamin ve ferrikrom verilebilir (Crosa ve Walsh, 2002).

Katekolat (Fenolat) Sideroforlar

Çoğunlukla bakteriler tarafından üretilen katekolat sideroforları en sık görülen ikinci siderofor tipidir. Her katekolat grubu, demir iyonu için, demir iyonunun (Fe^{3+}) çok yüksek bir afinite gösterdiği (kompleks sabiti) $K=10^{52} M^{-1}$ sabitine sahip olduğu, altı dallı bir oktahedral kompleks oluşturan, iki oksijen atomu içermektedir. Genellikle Neilands testi ile tespit edilmekte ve kompleksler 495 nm'de absorbans sergilemektedirler (Rezanka ve ark., 2018). Katekolat sideroforlara bacillibaktin, enterobaktin, vibriobaktin, agrobaktin, pyochelin ve yersiniabaktin örnek verilebilir (Neilands, 1981).

Karboksilat Sideroforlar

Çoğunlukla *Rhizobium* veya *Staphylococcus* bakteriler ve *Mucorales* sınıfı mantarlar tarafından üretilen karboksilat grubu sideroforlar, hidroksamat ve fenolat ligandlara sahip olmamakla birlikte, Fe^{3+} 'ü bağlamak için, α -hidroksikarboksilat ve karboksilat tarafından

özel olarak elde edilmektedirler. Ayrıca, karboksil ve hidroksil grupları yoluyla demire bağlanmaktadır. Rhizobactin, Fe ile bir şelat bağı oluşturan etilen diamin dikarboksil ve hidroksil kısımlarından oluşan bir amino polikarboksilik aside sahip sideroforlardan biridir. Karboksilat sideroforlar, O-CAS veya bakır kompleksi kullanılarak spektrofotometrik (UV 190-280 nm) yöntemlerle teptit edilebilmektedir (Pluhacek, 2016). Staphyloferrin A, mikobaktin, rhizoferrin, petrobaktin, piyoverdin, azotobaktin ve ferribaktin bu gruba ait sideroforlara örnek verilebilmektedir (Dave ve Dube, 2000).

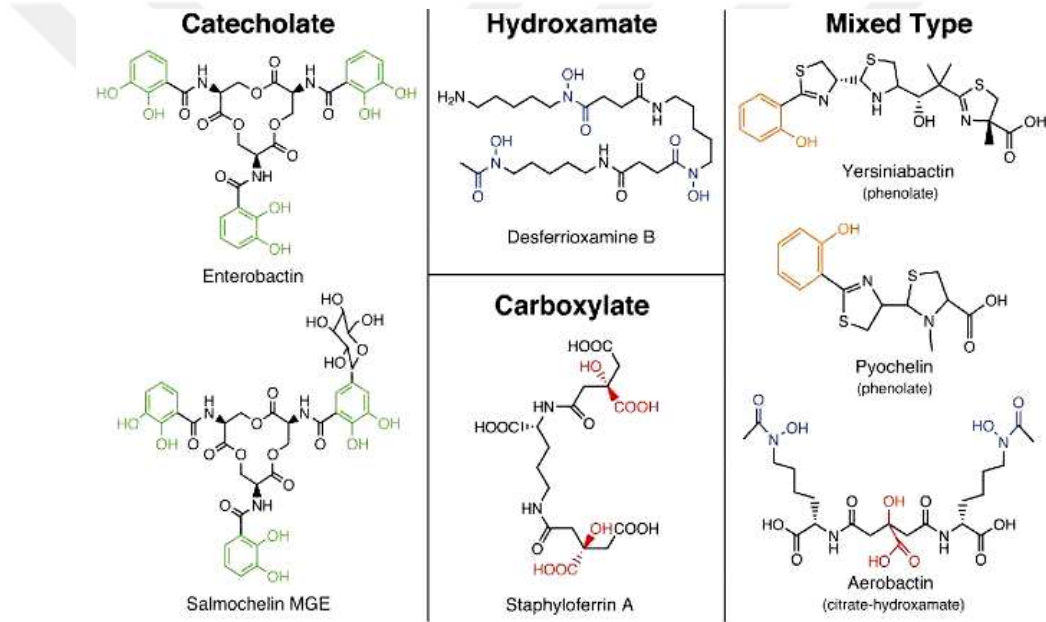
Karışık Ligand (Fitosiderofor)

Hem karboksilat hem de hidroksil gruplarını içeren siderofor tipi olan karışık ligand sideroforlar, heterosiklik şelatlama grupları da içerebilmektedir. İlk siderofor olan mikobaktin, Gram-pozitif bir bakteri Mycobacteria'lar tarafından üretilmiş (Francis ve ark., 1949). ve Nocardia'lar tarafından üretilen bir başka siderofor türü olan karışık ligand siderofor nocobaktin, mycobaktinler ile oldukça benzer özellik ve yapı içermektedir. Nocobaktinler lipit içerisinde çözünabilir sideroforlardır ve bakterilerin lipit zengini kısımlarında lokalize olmaktadır. Karışık sideroforlara örnek olarak mikobaktin, petrobaktin, azotobaktin, pyoverdin, yersiniabaktin ve maduraferin verilebilmektedir (Modi ve ark., 2012 ; Ratul ve ark., 2012).

Tablo 2. 1. Mikroorganizmalar tarafından üretilen siderofor grupları (Modi ve ark. 2012).

Sideroforun Kimyasal Tipi	Siderofor	Mikroorganizma
Hidroksamat	Ferrikrom	<i>U. sphaerogena</i>
	Desferrioksamin B	<i>S. pilosus</i>
	Desferrioksamin E	<i>S. coelicolor</i>
	Fusarinin	<i>Fusarium roseum</i>
	Ornibaktin	<i>Burkholderia cepacia</i>
Katekolat	Enterobaktin	<i>Escherichia coli</i>
	Bacillibaktin	<i>Bacillus subtilis</i> <i>B. anthracis</i>
	Vibriobaktin	<i>Vibrio cholerae</i>

Karboksilat	Rhizobaktin	<i>Rhizobium meliloti</i>
	Rhizoferrin	<i>Rhizopus microspores</i>
	Staphyloferrin A	<i>Staphylococcus hyicus</i>
Karışık Ligand	Azotobaktin	<i>Azotobacter vinelandii</i>
	Pyoverdin ve pyochelin	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Yersiniabaktin	<i>Yersinia pestis</i>
	Maduraferrin	<i>Acinomadura madurae</i>



Şekil 2. 1. Dört sınıfın her biri için temsili sideroforlar (Holden ve Bachman, 2015).

Desferrioxamine B bir hidroksamat sideroforları (Moore ve Emery 1976), enterobaktin ve salmochelin MGE bir katekolat sideroforu (Pollack ve Neilands 1970 ; Lin ve ark., 2005), stafiloferrin A bir polikarboksilat sideroforu (Konetschny - Rapp ve ark. 1990 ; Meiwes ve ark. 1990) ve yersiniabaktin, pyochelin, aerobactin, demiri koordine etmek için hem karboksilat hem de hidroksamat gruplarını kullanan karışık bir hidroksamat-polikarboksilat sideroforudur (Gibson ve Magrath 1969). Demir şelatlamak için kullanılan fonksiyonel gruplar renkli ile gösterilmiştir.

2.1.2. Siderofor Üreten Mikroorganizmalar

Son yıllarda sideroforun sentezi, yapıları, özellikleri ve kullanım alanlarına yönelik bilimsel araştırmalar giderek artmış ve bakteri, aktinomiset, mantar, bitki ve alglerin farklı siderofor türlerini ürettiği bildirilmiştir (Winkelmann, 2002 ; Güney, 2014).

Aktinomisetler

Aktinomisetler, aerobik, gram pozitif, aseksüel spor formunda bulunan hetetrofik bakterilerdir. Doğada saprofit olarak bulunmukla birlikte, yoğunluğu fazla olan metalleri tolere edebilme özelliklerine sahiptirler. Aktinomisetler, hidroksamat ve karışık tiptee siderofor üretebilme yeteneğine sahiptirler. Siderofor üreten aktinomisetler arasında, *A. madurae*, *N. asteroides*, ve *S. griseus* vardır (Bergeron ve Burne, 2001).

Mantarlar

Mantarlar oldukça fazla siderofor üretme yeteneğine sahiptir. Esas olarak hidroksamat tipi siderofor ürettiği bilinen mantarlar ayrıca katekolat (Capon ve ark., 2007) ve karboksilat tipte de sideroforlar üretebildiği bildirilmektedir (Holinsworth ve Martin, 2009). Başlıca siderofor üreten mantarlar, *Aspergillus nidulans*, *Penicillium chrysogenum*, *Trametes versicolor*, *U.sphaerogina*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula minuta*'dır. Öte yandan *S. cerevisiae*, siderofor demir alma mekanizmasına sahiptir fakat siderofor üretmediği için diğer mikroorganizmalar tarafından üretilen sideroforu kullanmaktadır (Eisendle ve ark., 2006; Philpott ve Protchenko, 2008; Ozan ve Maden, 2010).

Algler

Yapılan çalışmalarda alglerin de siderofor üretimi gerçekleştirdiği verilmektedir. *Schizokinen*, *Anabaena* sp. tarafından üretilen hidroksamat tipi sideroforun demir alınımını kolaylaştırdığı bildirilmiştir. Ayrıca, *A. flosaquae* ve *A. cylindrica* bakırı biriktiren siderofor ürettiği gözlemlenmiştir (Lesuisse ve ark., 2001).

Bakteriler

Siderofor üretiminin en fazla gerçekleştiği mikroorganizmalardan biri bakterilerdir. Bakterilerin metal bulunan ortamlarında yaygın olarak bulunması ve ağır metallere tutunarak birikmesi siderofor üretimlerini etkilemektedir. Özellikle Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarları metal bağlama yeteneğine sahiptir. Ayrıca, bazı bakteriler metal bağlayan polisakkarit de üretebilmektedir. Ek olarak, nikel, mangan ve demir gibi metalleri özel reseptörler yardımıyla absorbe edebilmektedirler. Demir bulunan ortamda, bakteriler ferrik demiri bağlayan ve taşıyan siderofor üretirler. Bu sideroforlar mineral ya da organik maddelerden demirin hücre dışında çözünür duruma getirilmesinde önemli bir rol oynamaktadırlar. Siderofor üreten bazı önemli bakteriler *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *V. cholerae*, *V. anguillarum*, *Aerobacter aerogenes* ve *Mycobacterium tuberculosis* 'dir (Crosa ve Walsh, 2002).

2.1.3. Cronobacter sp.

Cronobacter (eski adıyla *Enterobacter sakazakii*), *Enterobacteriaceae* familyasına ait, *Enterobacter* ve *Citrobacter* cinsleri ile yakın akrabalığı olan patojen bir bakteri cinsidir (Chenu ve Cox, 2009, Kucerova ve ark. 2011, Grim ve ark. 2012). Bu cinse ait bakteriler, Gram-negatif, çubuk şeklinde, hareketli, fakültatif anaerob spor oluşturmeyen özelliktedirler. (Iversen ve ark. 2008, Jaradat ve ark. 2009, Jaradat ve ark. 2011, Joseph ve ark. 2012). İlk zamanlarda sarı pigment oluşturmaması sebebiyle *E. cloacea* olarak tanımlanan *Cronobacter* spp., antibiyotik direnci, katalaz üretiminin görülmesi, oksidaz noksanlığı, DNA-DNA homolojisi, sarı pigment gözlemlenmesi sebepleriyle Farmer (1980), yeni bir tür olarak sınıflandırmış, *Enterobacter sakazakii* olarak isimlendirmiştir (Acer Ö., 2014).

Cronobacter familyasına ait, *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. muytjensii*, *C. turicensis*, *C. dublinensis*, *C. universalis* ve *C. condimenti* olmak üzere 7 tür bulunmaktadır (Grim ve ark. 2012; Jaradat ve ark. 2014). Bu türler yeni yeni aydınlatılmaya başlanmıştır.

C. turicensis türü 2008 yılında yeni bir tür olarak tanımlanmıştır (Iversen ve ark., 2008). Fakültatif anaerobik, Gram negatif ve hareketli olan, kokoid çubuk şeklinde bakterilerdir. Hücreleri 1.0 µm genişliğinde ve 1.5-2.5 µm uzunluğundadır ve tek tek veya çiftler

halinde bulunmaktadır. TSA ortamında 37 °C'de 24 saatlik aerobik inkübasyondan sonra koloniler sarı pigmentlidir ve dışbükeydir. Katalaz pozitif ve zayıf oksidaz pozitif göstermektedirler. Koloniler 10 °C'de (3 gün içinde) iyi büyüdüğü, ancak 44 °C'de zayıf büyüdüğü bilinmektedir. Ayrıca ornitin ve malonat dekarboksilaz reaksiyonları pozitif, üreaz, arginin dihidrolaz ve lisin dekarboksilaz testleri negatiftir. İndol ve H₂S üretimi testleri ve Voges-Proskauer testleri negatiftir (Stephan, 2007).

Carranza ve arkadaşları 2009'da yayınladıkları çalışmalarında *C. turicensis* 3032 suşu ile çalışmış ve fenotipik deneylerle doğrulanan birkaç virülans faktörü tanımlamışlardır. Konakçı hücrelerde *C. turicensis* devamlılığında yer alan bir makrofaj enfektivite güçlendiricisi, patojeni reaktif oksijen türlerine karşı koruyan bir süperoksit dismutaz ve siderofora bağlı demir alımı için bir enterobaktin-reseptör proteini olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, böceklerle ve mantarlara karşı etki gösterebilecek bir kitinaz ve bir metaloproteaz bulunduğunu, ancak hiçbir kazein hidrolize edici enzim bulunmadığını, dolayısıyla da *C. turicensis* 3032'nin çevresel bir doğal yaşam alanı olabileceğini ifade etmişlerdir (Carranza ve ark., 2009).

2.1.4. *Cronobacter* spp.'nin Siderofor Bağlantısı

Franco ve arkadaşları 2011'de yayınladığı çalışmalarında, bütün *Cronobacter* RepFIB plasmidlerinin, bir siderofor aracılı demir toplama sistemi (iucABCD/iutA operonu) kodladığını bununla birlikte ATP bağlayıcı kaset aktarımı aracılı demir alımı ve siderofor sistemi (eitCBAD operonu) olmak üzere iki demir toplama sistemi kodladığını ispatlamışlardır. Franco ve arkadaşlarının 2011'de yayınladığı bir diğer çalışmalarında, iucABCD/iutA sideroforunun (*cronobactin*), *Cronobacter*'in sahip olduğu tek fonksiyonel siderofor mekanizması olduğunu bildirirler de Grim ve arkadaşlarının (2013), hidroksamat tipi aerobaktin benzeri bir siderofor olan *cronobactinin*, *Cronobacter* sp. içerisinde sahip olunan tek demir kazanım mekanizması olmadığını bildirmişlerdir. *Cronobactinin* DNA üzerindeki fiziksel konumu, biyosentetik genler iucABCD'ye ve reseptör geni iutA'ya homolog olan beş genden meydana gelir (Joseph ve ark, 2012).

Grim ve arkadaşlarının 2013 yılında yapmış oldukları çalışmada, dokuz tane *Cronobacter* genomunu incelemiş ve siliko içi hedefli sekans analizini bildirmiştir. Bunun sonucunda *Cronobacter*'in, yedi tür arasında demir kazanım mekanizmalarını

paylaştığını ve bununla birlikte ferröz ve ferrik taşıyıcıları kodlayan demir kazanım genlerine ve hem-demir şelatlayıcılara ve aynı zamanda putatif TonB'ye bağımlı demir reseptörlerine ve ferrik redüktazlara sahip olduğunu kanıtlamıştır. Ferröz demir kazanımı için, tüm *Cronobacter* cinsi bakterilerin Efe ve Feo mekanizmalarına sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, ferrik demirin taşınması için, bütün plazmit barındıran suşların (% 97) aerobaktin benzeri siderofor cronobactinine sahip olduğu bildirilmiştir. Buna ek olarak, bütün *cronobacter* cinsinin, 22 enterobaktin benzeri siderofor kodlayan genlere sahip olduğunu fakat bu sideroforun fonksiyonel olmadığı düşünülmektedir.

Ayrıca Grim ve arkadaşları (2013), enterobaktin ve cronobaktin reseptörlerine ek olarak, bütün *Cronobacter* cinsi bakterilerin, sideroforlar için ayrıca diğer organizmalar tarafından da üretilen beş ortak reseptöre (FhuA, YncD, FoxA, FhuE ve PfeA) sahip bulunduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte, Ferrik disitrat aktarım mekanizması spesifik olarak, *C. sakazakii* ve *C. malonaticus* suşlarının (birçoğu klinik numeden izole edilmiş) küçük alt kümesinde gözlemlenmiştir. Bu da bu demir kazanım mekanizmasının *Cronobacter* virulansında ilişkili olduğunu göstermektedir. Çalışmalar sonucunda, *C. dublinensis* ve *C. muytjensii*'nin, bitki patojenleri tarafından üretilen heterolog sideroforlar için Fct ve FcuA olmak üzere iki başka reseptöre sahip olduğuna dair kanıt niteliğindedir (Grim ve ark., 2013).

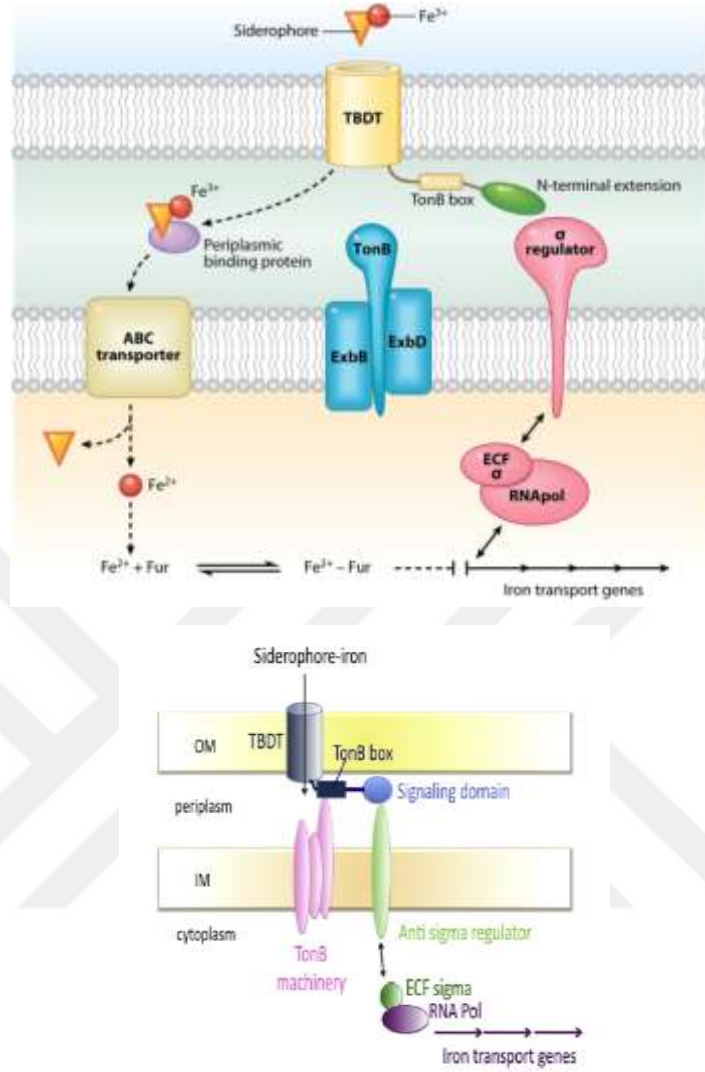
Jang ve arkadaşları (2020) *Cronobacter*'in toksin ve diğer ekzoprotein salgılarını, virülans, adaptasyon ve devamlılıklarının üzerine çalışmış ve ürettikleri pESA3, pCS2, pSP291-1 ve pCTU1 plazmidlerinin dizi hizalamasını yaparak siderofor bölgelerini belirtmişlerdir.

2.1.5. Sideroforların Bakterilerdeki Taşınımı

Sideroforlar özel taşıma sistemleri ile hücre içerisine taşınmaktadır. Mikroorganizmalarda siderofor aracılığıyla demir alımı hem reseptör hem de enerjiye bağımlı bir süreçtir (Sigel ve Sigel, 1998). Sideroforlar, ferrik (Fe^{+3}) demirini hücre içerisine taşımak için çok bileşenli bir sistemin önemli bir parçası olarak işlev görmektedir. Diğer bileşenlerden biri, iç zardaki spesifik dış membran reseptör proteinleridir; *E. coli*'de bu reseptörler, FhuA, (ferrikrom için), FecA (ferriksitrat için) ve FepA (enterobaktin için), iken *P. aeruginosa* ise FpvA (piyoverdin için) ve FptA

(piyokelin için) dış membran reseptörleri olarak bilinmektedir (Ferguson ve ark., 2001). TonB-ExbB-ExbD protein kompleksi, periplazmik siderofor bağlayıcı proteini (PBP) ve iç membranda ATP'ye bağlı kaset (Fec CDE - Fep CDE) proteini diğer bileşenler arasındadır (Ratul ve ark., 2012).

Demir eksikliği altında olan bir bakteri siderofor sentezler ve siderofor molekülü, hücrenin membran reseptörünün dışına atıldığı durumda, siderofor-demir kompleksi ile bağlanarak, demiri Fec A ve Fep A dış membran reseptörü (OM) yoluyla hücre içersine taşımaktadır. ABC-Transporter sistemleri (ATP-bağlayıcı kaset) olarak adlandırılan Fec C, D, E ve Fep C, D, E'ye (Davidson ve Nikaido, 1991, Boos ve ark., 2001) biri protein ve bir geçiş hücresi olarak hareket eden membranı kapsayacak şekilde, diğeri de taşıma için enerji sağlamak üzere ATP'yi hidrolize edebilen iki proteinden oluşmaktadır. Sonrasında, membran proteini Ton B'nin yardımıyla sitoplazmada siderofor-demir kompleksi salımını gerçekleştirmektedir. Siderofor-demir kompleksleri dış zar boyunca TBDT'ler (TonB'ye bağlı taşıyıcılar) ile taşınmaktadır (Isabelle ve ark., 2012). Bu taşıyıcılar, gram negatif bakteriler tarafından, 600 Da'dan daha yüksek veya bakteri hücresinin ortamında düşük konsantrasyonlarda bulunan moleküler ağırlıktaki bileşiklerin alımı için gerekmektedir. TBDT'ler, siderofor alımında ve bazı durumlarda, demir alımında rol alan genlerin ekspresyonunu düzenleyen sinyal kaskadlarına katılmaktadırlar. Hücre dışı ortamdan gelen siderofor-demir kompleksleri, periplazmaya taşınırken spesifik TBDT'leriyle tanınmaktadırlar. Bazı TBDT'ler ayrıca demir alımında yer alan proteinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunu da düzenleyen sinyal kaskadlarını da içermektedirler. Bu sinyal kaskadı, siderofor-demir kompleksinin TBDT'ye bağlanmasıyla başlatılmakta ve birkaç bileşen içermektedir: N-terminal sinyal alanı, TBDT, iç zar sigma regülatörü proteini ve sitoplazmik ekstraktoplazmik fonksiyon (ECF) sigma faktörü gibi. Ayrıca, hem taşıma hem de indüksiyon fonksiyonları için, iç zardaki TonB mekanizmasından enerji iletimi gerektirmektedir. Hücre sitoplazmasında, hala şüphe duyulan bir mekanizma ile kompleksden salınan demir: siderofor molekülünün NAD (P) siderofor redüktaz tarafından hidrolitik yıkımı veya Ent A, B, C, D proteinleri nedeniyle Fe^{3+} 'ün azalmasına yol açabilmektedir. Ortaya çıkan Fe^{2+} , siderofora yüksek bir afiniteye sahip olmadığından dolayı kompleksden ayrılmaktadır.



Şekil 2. 2. Siderofor aracılığıyla demir taşınımı ve düzenlenmesi, siderofor-demir komplekslerinin dış zar boyunca TBOT (Ton B'ye bağlı taşıyıcılar) ile taşınma mekanizması (Isabelle ve ark., 2012).

2.1.6. Sideroforların Biyosentezi

Siderofor biyosentezi non-ribozomal peptidil sentetazlar (NRPS) ve NRPS'den bağımsız siderofor sentetazlar (NIS) olmak üzere iki ana yol ile gerçekleşmektedir. NRPS, adenilasyon, tiyolasyon ve kümelenme alanlarının, amino asitleri tiyol bazlı ara maddeler yoluyla bağlamak için koordineli ve sıralı bir şekilde işlev gördüğü modüler, çok bölgeci enzimlerdir (Carroll ve Moore, 2018). NRPS modülleri kullanacakları substratlar için oldukça seçici olmakla birlikte, (bu özellikle adenilasyon alanı için geçerlidir) her modül sadece bir substrat amino asidi içermektedir. Bu nedenle, NRPS enzimleri yoluyla peptit oluşumu için kullanılan substratların, NRPS modüllerinin sayısı ve sırasına göre daha

kolay tahmin edildiği gözlemlenmiştir (Marahiel ve Essen, 2009). NRPS enzimleri, amino asitlere ek olarak, yağ asitlerini, α -keto asitlerini ve α -hidroksi asitlerini, antibiyotikler ve antifungal ajanlar gibi diğer ikincil metabolitlerin biyosentezinde de benzer bir şekilde koordineli olarak bağlayabilmektedirler (Wilkinson ve Micklefield, 2009). ATP hidrolizi ile substratın aktivasyonundan sorumlu olan Adenilasyon domaini (A domain), 55 kDa ağırlığında olup substrat seçimini gerçekleştirmektedir (Turgay ve ark. 1992; Stachelhaus ve ark. 1996). Peptidil taşıyıcı protein domain (PCP), 10 kDa ağırlığında olup tiyoester oluşumunu gerçekleştirmektedir (Stachelhaus ve ark. 1996). Kümeleme domaini (C domain), 50 kDa ağırlığında olup peptit bağının oluşumunu katalizleyerek bunun sonucunda zincir uzaması gerçekleşmesini sağlamaktadır. Ayrıca ürünlerin çeşitliliğine katkı sağlamak için epimerizasyon domaini (E domain) tarafından modifikasyon gerçekleştirilmektedir (Konz ve Marahiel, 1999). Son domain de genellikle bir TE (tiyoesteraz) alanı bulundurmaktadır. TE domaininden hidroliz veya siklizasyon sonucunda toplanan zincir NRPS'den salınmaktadır. NRPS enzimleri yoluyla biyosentezlenen sideroforlar arasında yersiniabaktin (*Y. pestis*; Gehring ve ark., 1998), vibriobaktin (*V. cholerae*; Keating ve ark., 2000), mikobaktin (*M. tuberculosis*; Quadri ve ark., 1998) ve enterobaktin (*Escherichia*; Gehring ve ark., 1998) bulunmaktadır.

NIS sentetazları ise tek bir enzimatik reaksiyondan sorumludur ve tipik olarak sitrik asit veya türevini, bir amin veya alkol grubu ile kümelemek için çalışmaktadır. Karakterize edilen tüm NIS enzimleri korunmuş bir N-terminal demir alım şelat alanına (Iuc) A / (Iuc) C ve demir taşınması veya metabolizması ile ilgili bir C-terminal alanına sahiptir (Carroll ve Moore, 2018). NIS yolu esas olarak polikarboksilat veya karışık tip sideroforların biyosentezinde kullanılmaktadır.

2.1.7. Sideroforların Kullanım Alanları

Tarımsal uygulamaları

Tarımda toprağın psödobaktin üreten *P. putida* ile aşılınması, çeşitli bitkilerin büyümesini ve verimini arttırdığını göstermiştir (Kloepper ve ark., 1980). Bitki büyümesini teşvik edici faaliyetler arasında HCN, sideroforlar, proteaz, antimikrobiyaller, fosfat çözündürücü enzimlerin üretimi bulunmaktadır (Chaiarn ve ark., 2008). Powell ve arkadaşları (1980), hidroksamat sideroforlarının çeşitli topraklarda

mevcut olduğunu ve ayrıca su ortamlarında da üretildiğini göstermiştir. Ağır metallerin daha fazla birikmesi, çoğu bitki için toksiktir ve toprağı kirletir, bu da toprak mikrobiyal aktivitesini ve toprak verimliliğini azaltır ve verim kayıplarına neden olmaktadır (McGrath ve ark. 1995). Bu bağlamda, toprakta bulunan hidroksamat tipi sideroforlar, metallerin hareketsizleştirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Burton ve ark. (1954), bazı bakterilerin sideroforları sentezlediğini, bazılarının da bunları sentezlemeden kullandıklarını göstermiştir.

Biyokontrol Ajan

Birçok bakteri, siderofor, antibiyotik ve siyanür üreterek zararlı mikroorganizmaların büyümesini baskılamaktadır (Edi Husane, 2005). Sideroforlar kendi kendilerine, *Phytophthora parasitica* (Seuk ve ark., 1988), *Phythium ultimum* (Hamdan ve ark., 1991), ve *Sclerotinia sclerotiorum* (Mc Loughlin ve ark., 1992) gibi çeşitli patojen inhibitörleri büyötmektedirler. Ayrıca, Kloepper ve arkadaşları (1980), *Erwinia carotovora*'nın birkaç bitki büyümesini teşvik eden *P. floresens* suşlarının A1, BK1, TL3B1 ve B10 tarafından biyolojik kontrol mekanizmasında siderofor üretiminin önemini ilk kez ortaya koymuştur. Flüoresan psödomonadlarda siderofor sentezi ile *F. oxysporum*'un klamidosporlarının çimlenmesini önleme kapasiteleri arasında in vitro olarak doğrudan bir ilişki kurulmuştur (Elad ve Baker, 1985; Sneh ve ark., 1984). Antibiyotiklerde de olduğu gibi, bazı sideroforları üretemeyen mutantlar, örneğin *Pyoverdin*, farklı bitki patojenlerini baskılama kapasitelerinde azalma gözlemlenmiştir (Keel ve ark., 1989 ; Loper ve Buyer, 1991).

Tıbbi Uygulamaları

Aşırı Demir Yükü Hastalıkları, β -Talasemi

Talasemi ve diğer bazı anemilerin tedavisinde periyodik olarak tam kan transfüzyonu gerekmektedir (Hershko ve ark. 2002). Demirin insandan atılımı için spesifik bir fizyolojik mekanizma olmadığından, sürekli transfüzyon tedavisi sürekli bir demir birikmesine yol açmaktadır. Bu demir aşırılıklarının yanı sıra hemokromatoz ve hemosideroz gibi birincil aşırı demir yükü hastalıkları ve kazara demir zehirlenmesi durumunda demirin vücuttan, özellikle karaciğerden çıkarılmasını gerektirir. Bu hastalıklar, siderofor esaslı ilaçlar ile ana model olarak siderofor hareketliliğinden yola

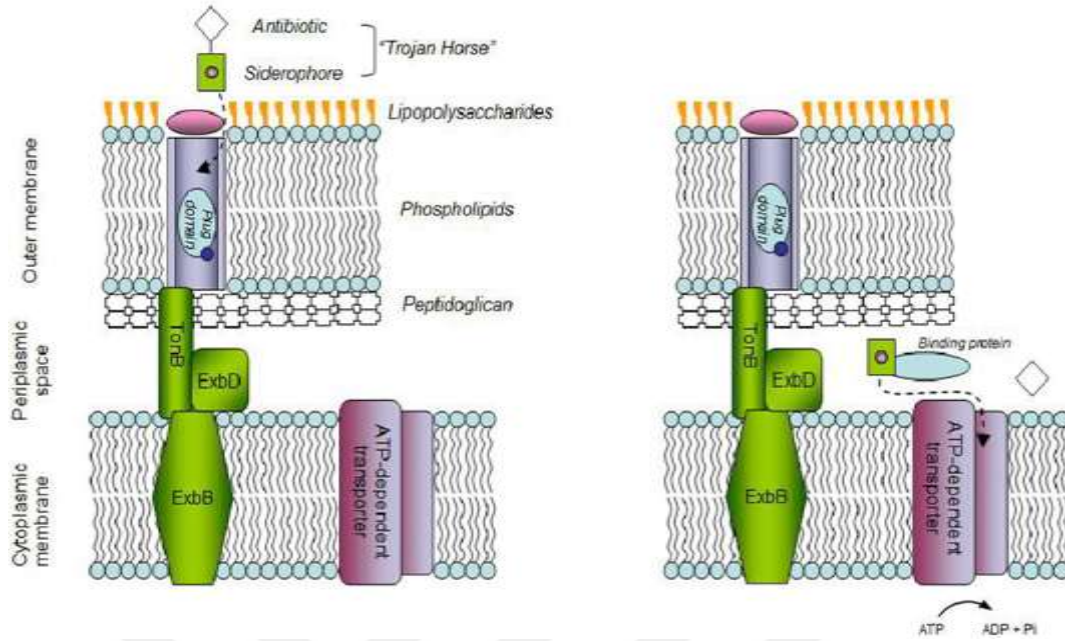
ıkarak etkili bir şekilde tedavi edilebildiği görülmüştür (Pietrangelo, 2002). Ayrıca, Desferrioksamin B ile alüminyum aşırı yüklenmesine bağlı çeşitli patolojik durumlar için terapötik uygulamalar bulunmuştur (Ackrill ve ark., 1980). Bu toksik metal birikimi, böbrek atılımı yoluyla temizleme yeteneğini kaybetmiş kronik diyaliz hastalarında sıklıkla görülmektedir. Bu tip vakaların teşhisi için Desferrioxamine B tavsiye edilmektedir (Ali ve Vidhale, 2013).

Enfeksiyon

Demir insan vücudunda bol miktarda bulunur, ancak bu hücre içi ve hücre dışı bileşenlere (transferrin, laktoferrin, ferritin; hemo-proteinler) bağlıdır. Bu sıkı demir homeostazı, konakçı vücudundaki patojenik bakteriler için serbest demirin bulunmamasına yol açmaktadır. Çoğu aerobik, fakültatif anaerobik ve saprofitik mikroorganizma, hücre yüzey reseptörleri yoluyla asimilasyonuna izin veren yüksek afiniteli ferrik demiri elatlayabilen demir bağlayıcı bileşikler (siderofor) retme yeteneğine sahiptir, bu nedenle siderofor üretimi bakteriyel virülansa katkıda bulunmuştur. Birçok patojenik mikroorganizmanın temel demirlerini bu yolla konakılarından aldıkları dnlmektedir (Litwin ve Calderwood, 1993 ; Payne, 1994, Wooldridge ve Williams, 1993).

Truva Atı Stratejisi

Antibiyotik moleküllerinin, spesifik siderofor alım yolunu kullanarak bakteri membranları yoluyla etki alanına iletme stratejisine “Truva Atı Stratejisi” adı verilmektedir (Möllmann ve ark., 2009 ; Braun ve ark., 2009). Truva Atı stratejisi, sideroforlar ve antimikrobiyal ajanlar arasındaki konjugatların hazırlanmasıyla ilaçları hücelere taşımak için sideroforların demir taşıma yeteneklerini kullanan potansiyel olarak güçlü bir uygulamadır. Ferrimisin (Bickel ve ark., 1966), salimisin (Vrtesy ve ark., 1995) veya albomisin gibi siderofor-antibiyotik örnekleri doğada mevcuttur (Benz ve ark., 1982). Antibiyotik bağlı sideroforlar, Ton kompleksiyle etkileşimleri üzerine periplazmik boşluğa taşınmasına yardımcı olan dış memberan reseptörlerine bağlanmaktadırlar. Sideroforlar periplazmada, hücreye girişlerine yardımcı olan ATP'ye bağlı taıyıcılara ulaştıran periplazmik bağlayıcı proteinler tarafından sekestre edilmektedirler. Bu nedenle hücresel zararları geçmeyecek antibiyotikler salınabilmektedirler (de Carvalho ve Fernandes, 2014).



Şekil 2. 3. Gram negatif bakterilerde "Truva atı" stratejisinin şeması (de Carvalho ve Fernandes, 2014).

Doğal siderofor-antibiyotik oluşumu, sentetik Truva Atları üretmenin yolunu açmıştır.

Transuranik Elementler

Nükleer enerji kullanılarak elektrik üretiminin gelişimiyle, alüminyum gibi transuranik elementlerin insan maruziyetinin artışına neden olmuştur. Sideroforların, bu elementleri vücuttan çıkarmak için kullanılabilirliği ve bu tür elementlerin vücuttan çıkarılma kapasitesini değerlendirmek adına araştırmalar yapılmıştır. Desferioksamin formu sideroforun hastalığın semptomlarında uygulanmasıyla, vücuttaki alüminyum seviyesini düşürüldüğü gözlemlenmiştir (Arze ve ark., 1981).

Manyetik Rezonans Görüntüleme

Manyetik Rezonans Görüntüleme için kullanılan kontrast maddenin geliştirilmesi için Mn^{2+} , Fe^{3+} ve Gd^{3+} gibi farklı paramanyetik iyonlar kullanılmaktadır. Gd^{3+} , yüksek manyetik momenti ve uygun elektronik gevşeme oranı nedeniyle teşhis amaçlı tıbbi MRG'de kontrast maddesi olarak oldukça uygundur ancak, Gd^{3+} MRG için gereken konsantrasyonlarda oldukça toksiktir. Bu nedenle, serbest katyonun in vivo salınımını

önleyen şelatörler gereklidir. Yine, sideroforlar ve bunların sentetik analogları, bu tür şelatörler için ana model olarak işlev görmektedirler (Doble ve ark., 2003).

Kanser Tedavisi

Kanser tedavisinde potansiyel demir şelatör olarak, Dexrazoxane, O-trensox, desferriexochelins, desferrithiocin, tachpyridine, gibi sideroforlar kullanılmıştır (Miethke ve Marahiel, 2007). Ayrıca sideroforlar, kanser tedavisinde bazı kemoterapilerin sonucu olarak meydana gelen, transferrinle bağlı olmayan demirin serumda temizlenmesi için de kullanılmıştır (Chua ve ark., 2003).

Anti-Malaria

Bazı sideroforların *Plasmodium falciparum*'un neden olduğu sıtmanın tedavisinde faydalı olduğu gözlemlenmiştir. *Klebsiella pneumoniae* tarafından üretilen siderofor, antimalaryal ajan olarak işlev görmektedir (Gysin ve ark., 1991). *Streptomyces pilosus* tarafından üretilen Desferrioxamine B (kimyasal sentez ile de üretilmektedir) *P. falciparum*'a karşı in vitro olduğu kadar in vivo da aktiftir. Siderofor *P. falciparum* hücrelerinin içine girerek hücre içi demir tükenmesine neden olmaktadır. Aynı sideroforun, insan kan dolaşımında uyku hastalığına neden olan başka bir protozoik parazit olan *Trypanosoma brucei*'nin büyümesini inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Breibach ve ark., 2002).

Çevresel uygulamalar

Sideroforların Ağır Metal Giderimindeki (Biyoremediasyon) Rolü

Metaller, bitkiler için gerekli olan mikro besinlerdir. Ağır metaller (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb ve Ni) toprakta doğal olarak mevcut olmasına rağmen, jeolojik ve antropojenik aktiviteler, bu elementlerin konsantrasyonunu hem bitkiler hem de hayvanlar için zararlı olan miktarlara arttırmaktadır (Özkan, 2009; Sah ve Singh, 2015). Bakteriler tarafından siderofor üretiminin bu metallerin topraktan ekstraksiyonunu kolaylaştırdığı varsayılmaktadır (Von Gunten ve Benes 1995). Örneğin, Zn (II) varlığında *A. vinelandii* tarafından yapılan siderofor üretimi artırılmıştır. Siderofor üreten rizobakteri (SPR), ağır metallerle kirlenmiş toprakların fitoremediasyonuna yardımcı olmada önemli bir rol oynayabilen, bitki büyümesini teşvik eden bir rizobakteri grubudur. Sideroforlar, ağır

metal birikimi, pas giderme, biyolojik kirlenme, boya bozulması, kanalizasyon arıtma ve biyo-yıkama gibi bu çevresel sorunları çözme potansiyeline sahiptir. Toprakta bulunan hidroksamat tipi sideroforlar, bu ağır metallerin hareketsiz hale getirilmesinde önemli rol oynamaktadır.

Ayrıca sideroforlar, depolanmadan önce radyoaktif atıkları arıtmak için de kullanılmıştır (Von Gunten ve Benes 1995; Bouby ve ark. 1998). *Fusarium sp.* ve *P. aeruginosa* gibi bakteriler, pH'ı değiştirebilen Uranyum (U^{6+}) ve toryum (Th^{4+}) gibi bazı elementlerin şelasyonunu arttırabilen, elemente özgü sideroforlar üretmişlerdir (Joshi ve ark. 2014).

P. putida, aromatik bir substrat olan benzil alkolün mevcudiyetine yanıt olarak siderofor sekresyonunu arttırmaktadır. Aromatik substratlara yanıt olarak hızlandırılmış siderofor salgısı, demire bağımlı oksijenazların etkili bir şekilde çalışması için gerekli olan bir demir "takviyesi" sağlamaktadır. Uyarılmış siderofor sekresyonu, bu organizmanın aromatik bozunma için bir biyo-büyütme ajanı olarak başarılı bir şekilde entegrasyonunda ve çoğalması konusunda oldukça önemli bir faktör olmaktadır. Sadece verimli bir şekilde aromatik kullanımını kolaylaştırmakla kalmaz, aynı zamanda çeşitli mikrobiyal topluluklar arasında demir asimilasyonu için daha iyi fırsatlar sunarak, daha iyi yaşama ve çoğalma sağlamaktadırlar (Joshi ve ark. 2014). Ekolojik dengede büyük değişikliğe sebep olan, toksik reaktif boyalar, klorolignin kalıntıları ve tekstil ürünlerinin koyu renklendirilmesi gibi işlemlerin farklı aşamalarında büyük miktarlarda atık üretilmektedir. Tekstil atıklarının koyu renklenmesinden sorumlu klorolignin kalıntılarının ve kromoforik grupların biyolojik olarak parçalanması, beyaz çürüklük mantarı, *Phanerochaete chrysosporium*'dan üretilen sideroforlar ve enzimler kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Asamudo ve ark. 2005).

2.2. Biyolojik Demir Nanopartiküller (FeNP)

2.2.1. Nanoteknoloji

Nano kelimesi milimetrenin milyonda birini ifade etmektedir. Nanoteknoloji ise, 1 ile 100 nm ($1\text{ nm} = \text{metrenin } 10^{-9}\text{u}$) boyutlarındaki mühendislik ve teknoloji çalışmalarının tamamına verilen addır. Bu teknoloji, esas olarak boyutlarını ve şekillerini kontrol ederek istenilen özelliklere sahip malzemeler yaratma yeteneği sunmaktadır (Novack ve Bucheli,

2007). Bu yenilikçi alan çeşitli endüstriyel kullanımların yanı sıra, çevre kirliliği, içecekler, kozmetik, biyomedikal uygulamalar, ilaç üretimi, farklı sağlık tesisleri, katalitik analiz, mekanik, farklı türde cihazların geliştirilmesi, uzay endüstrileri gibi birçok alana yayılmaktadır (Wang ve Herron, 1991).

2.2.2. Nanopartiküller

"Nanopartiküller" terimi, nano-araştırmalarda yapı taşları olarak yararlanılabilecek bir boyut için 100 nm'den daha küçük boyuttaki partiküller veya maddeler kümesi olarak tanımlanmaktadır (Narayanan ve Sakthivel, 2010 ; Manivasagan ve ark., 2014). Esas olarak, yüzey veya dış katman, kabuk katmanı ve çekirdek olmak üzere üç katmana sahip olan karmaşık moleküllerdir (Shin ve ark., 2016). Yüzey veya dış katman, etrafında çeşitli küçük moleküller, iyonlar, yüzey aktif maddeler ve polimerler bulundurarak işlevselleştirilebilir. Kabuk tabakası, NP'lerin yapısına göre farklılık gösterebilirler. Doğal veya yapay olabileceği gibi kimyasal olarak her yönüyle çekirdekten farklı olabilmektedir. Öte yandan, çekirdek aslında NP'lerin sonunda nanopartikülün kendisini ifade eden merkezi kısmıdır. Sonuç olarak, NP'lerin bu karmaşık aktif yapısı, çeşitli benzersiz ve uygun fizikokimyasal özellikler sağlar.

NP'ler, kuantum boyut etkileri, elektronik yapısının boyut bağımlılığı, yüzey atomlarının eşsiz karakterleri, yüksek yüzey/hacim oranı ve termal stabiliteden dolayı nanopartiküllerin yüzeyleri farklı fonksiyonel gruplar ile kimyasal modifikasyonlar için kullanılabilir (Ünak, 2008). Yapılarındaki bu özellikler sayesinde yüksek aktiviteli katalizörler, optik uygulamalar için özel teknolojik malzemeler ile birlikte süper iletkenler, yüzey aktif maddeler, ilaç taşıyıcılar ve özel teşhis aletleri gibi birçok teknolojik ve farmakolojik ürünlerin hazırlanmasında rol oynamaktadırlar (Goldstain, 1997).

Nanopartiküller periyodik tabloda bulunan birçok element ile üretilmekte, organik, inorganik, yarı iletken, metalik ve moleküler olarak çeşitli sınıflara ayrılmaktadır. Bu sınıflandırmada demir nanopartiküller metalik geniş yüzey alanları sebebiyle büyük bir öneme sahiptir (Oropeza ve ark., 2012). Ayrıca, nanopartiküllerin sentezi için biyolojik birer kaynak olan bitki, fungus, aktinomisetler ve bakterilerin amorf silika, manyetit, kalsit ve mineraller gibi maddeleri üretebilme yeteneğine sahip oldukları bilinmektedir

(Jena ve ark., 2015 ; Składanowski ve ark., 2017). Yapılan çalışmalarda altın, gümüş, platin, demir sülfür, kadmiyum sülfür, selenyum, demir oksit, çinko oksit, bakır gibi toksik olmayan metal nanopartiküllerinin sentezlenebildiği rapor edilmiştir (Zhang ve ark., 2016).

2.2.3. Demir Nanopartiküller (FeNP)

Demir, dünyada en çok bulunan 6. elementtir. Oldukça reaktif bir element olduğu için çok hızlı bir şekilde oksitlenerek doğada en yaygın olan manyetit, (Fe_3O_4), maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ve hematit ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) formuna dönüşmektedir. (Can ve ark., 2012).

Demir oksitler, Fe (II) ya da Fe (III) kanyonlarını, O_2 yada OH anyonlarını kapsayan oksitler, hidroksitler ve oksi-hidroksitlerden oluşan birleşiklerdir. Literatürde 16 saf demir oksit belirtilmektedir. Bunlar, $\text{Fe}(\text{OH})_2$, $\text{Fe}(\text{OH})_3$, $\text{Fe}_5\text{HO}_8 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, FeO , Fe_3O_4 , beş FeOOH polimorfu ve dört Fe_2O_3 ' tür (Bahadar ve ark., 2011 ; Kharisov ve ark., 2012). Demirin en bilinen formları, maghemit $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ve hematit ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), manyetit (Fe_3O_4) olarak bildirilmektedir (Chaturvedi ve ark., 2020 ; Maiti ve ark., 2015). Yapılan çalışmalar incelendiğinde, maghemitin ferromanyetik veya süperparamanyetik, hematitin zayıf ferromanyetik ve manyetitin ferromanyetik veya süpermanyetik olduğu belirtilmiştir (Bayrak, 2012).

Demir nanopartiküller (FeNP'ler) yüksek miktarda boyutsal kararlılık sergilemenin yanı sıra toksik olmamasıyla bilinen nanopartiküllerdir. Yüksek yüzey alanı, elektriksel ve termal iletkenliğe sahip olmakla birlikte manyetik özelliklere de sahiptirler bu nedenle manyetik nanopartiküller olarak da bilinmektedirler (Arabi ve ark., 2016).

Demir nanopartikülleri, çevresel konularda oldukça ilgi çekmektedir. Hematit ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ve manyetit (Fe_3O_4) gibi demir oksit nano adsorbanları, çevresel ya da endüstriyel atıklardan As (V), Cr (VI), Cr_2O_7 , MnO_4 , Cu (II), Pb (II), ve Hg (II) gibi kirleticilerin giderilmesi amacıyla araştırmacılar tarafından sıklıkla kullanılmaktadır (Sharma ve ark., 2018). Ayrıca, FeNP'lerin antimikrobiyal özelliklerinin olduğu ve boyaların bozunması (adsorpsiyon özelliği sayesinde), antibiyotikler, atık su arıtımı, metal kirleticilerin gideriminin sağlanması için çevresel süreçlerde heterojen katalizörler olarak kullanılmışlardır. Demir nanopartiküllerinin çevresel iyileştirme uygulamalarında

kullanımları, manyetik duyarlılık, toksik olmama ve su ile reaksiyonunda ikili redoks yeteneğinden kaynaklanmaktadır (Bolade ve ark., 2019).

Tablo 2. 2. Bazı demir oksit fazları ve özellikleri (Ramimoghdam ve ark., 2014 ; Bayrak, 2012).

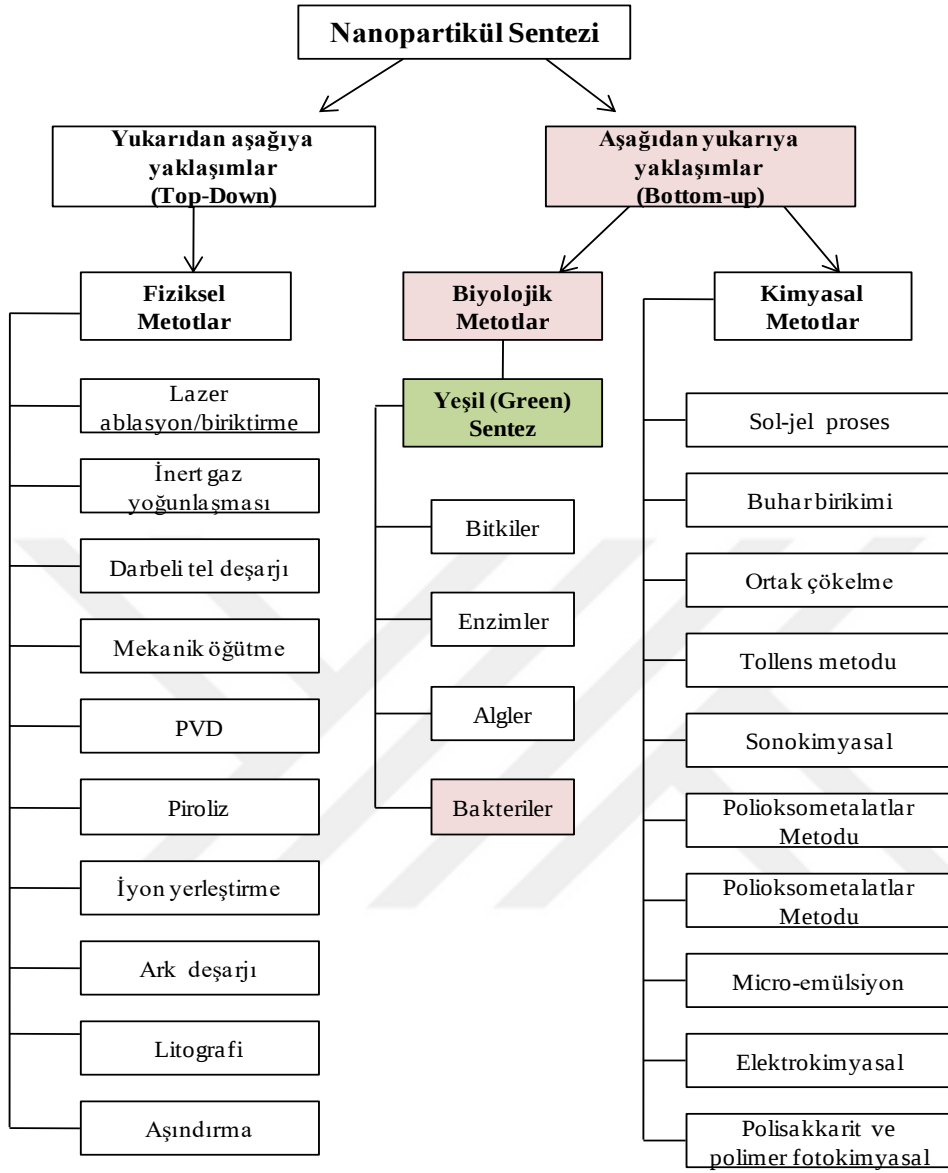
Demir oksit fazları	Moleküler Formülü	Kristalografik sistem	Renk
Magnetit	Fe_3O_4	Kübik	Kahverengi / siyah
Hematit	$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Hekzagonal	Kırmızı/kahverengi
Maghemit	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Kübik	Kırmızımsı kahverengi
Akaganetit	$\beta\text{-FeO(OH)}$	Monoklinik	Sarımsı kahverengi
Götit	$\alpha\text{-FeO(OH)}$	Ortorombik	Sarımsı kahverengi
Ferrokisit	$\delta\text{-FeOOH}$	Hekzagonal	Kırmızı kahverengi
Demir (III) hidroksit	Fe(OH)_3	Ortorombik	Koyu yeşil

Hematitlerin ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) Özellikleri

Fazlasıyla reaktif olan Fe elementinin oksitlenmesi sonucu oluşan kararlı bir demir oksit şeklidir. Fe(III) oksit, Fe_2O_3 , $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ olarak formülize edilmektedirler. Kristal parametresi (nm) $a=0.5034$ olan, kristalografik sistemde hekzagonal şekilde bulunan, Korindon yapısal türünde, zayıf ferromanyetik özelliktedirler. Doğada kırmızı veya kahverengi renklerinde bulunabilmektedirler (Bayrak, 2012). Hematit ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), çevre dostu, ekonomik, biyouyumlu ve korozyona karşı oldukça dirençlidir. (Bhateria ve Singh 2019).

2.2.4. Nanopartiküllerin Sentez Yöntemleri

Nanopartikül sentezi için çeşitli yöntemler ve protokoller uygulanmaktadır. Bununla birlikte, bu yöntemlerin tümü aşağıdan yukarıya sentez (bottom up) ve yukarıdan aşağıya sentez olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılmaktadır (Yasin ve ark., 2013). Bu ana gruplar da reaksiyon koşullarına, işlemlerine ve benimsenen protokollerine göre biyolojik, fiziksel ve kimyasal şema yöntemleri üç alt gruba kategorize edilebilmektedir. Aşağıdaki şekilde NP sentez yöntemleri verilmekle birlikte tez çalışmasında uygulanacak metotlar renkli gösterilmiştir.



Şekil 2. 4. Nanopartikül sentez yöntemleri (Rajoriya, 2017 ; Devatha ve ark., 2018).

Yukarıdan Aşağıya Sentez (Top-Down)

“Yukarıdan aşağıya” sentez yönteminde yıkıcı yaklaşımlar kullanılmaktadır. Bu yöntemde, kütle halindeki metaller veya daha büyük moleküller sistematik olarak çok küçük partiküllere ayrılmaktadır. Böylelikle de bu çok küçük partiküller, istenen boyutlarda metal nanopartiküllere dönüştürülmeye uygun hale gelir. Yukarıdan aşağıya sentezde ayrıca, partikül sentezi model veya matris tarafından kontrol edilmektedir (Rajoriya, 2017). Bu yaklaşımın temel teknikleri inert gaz yoğunlaşması, darbeli teldeşarjı, mekanik öğütme, PVD, Piroliz, iyon yerleştirme, arkdeşarjı, litografi, aşındırma ve lazer biriktirmedir. Altın (Au), kadmiyum sülfid (CdS), gümüş (Ag) ve kurşun sülfid

(PbS), manyetit (Fe_3O_4) vb. çeşitli metalik nanopartikül türleri geçmişte özellikle inert gaz yoğunlaşması olmak üzere fiziksel metotlar kullanılarak sentezlenmiştir (Magnusson ve ark., 1999).

Yukarıdan aşağıya sentez metotunun uygulanması kolaydır fakat bu metotla alakalı en büyük sorun, nanopartiküllerin yüzey kimyası ve fizikokimyasal özelliklerindeki değişimden dolayı, standart olmayan şekillerde ve çok küçük boyutlu partiküllerin sentezi için uygun değildirler (Nadagouda ve ark., 2011).

Aşağıdan Yukarıya Sentez (Bottom-up)

Burada nanopartiküller nispeten daha küçük ve basit moleküllerden sentezlenir, buna 'inşa etme' sentezi de denir. Bu sentez sistemi, indirgeme ve sedimentasyon mekanizmalarının yardımıyla kimyasal veya biyolojik yöntemlerle nanopartikülleri sentezlemek için küçük maddelerin birleştirilmesini içerir (Parab ve ark., 2011).

Bu sentez metotlarında, metal tuzlarının öncüsü olan sulu metal iyonları nanopartikül üretimi için önemli bir rol oynamaktadır. Farklı indirgeyici ajanlar bu metal iyonlarını metal partiküllere dönüştürür. Sonuç olarak, karışımda temel olarak nanopartiküllerin yapısını belirleyen bir renk değişikliği meydana gelir. Bununla birlikte, dispersif sentezlenmiş NP'leri stabilize etmek için koruyucu ajanların kullanılması, onları hazırlarken oldukça önemlidir. Bu nedenle topaklanmayı önlemek için, partikülleri koruyarak koruyan sentez ortamlarına çeşitli stabilizatörler eklenir (Liu ve ark., 2015). Genel olarak hem biyolojik yaklaşımlar hem de fotoindüklenmiş indirgeme, buhar biriktirme, soljel işlemi, tollens yöntemi vb. kimyasal yöntemler, fiziksel yöntemlere göre daha ucuzdur.

Yeşil Sentez ile Nanopartikül Sentezi

NP'ler, hem fiziksel hem kimyasal hem de bunların modifiye edilmiş hibrit metotları ile üretilmekteydi (Mohanpuria ve ark., 2008). Kimyasal metotlar, ticari olarak daha kısa bir süre içinde nispeten büyük miktarda nanopartikül sentezi için yararlı olsa da nanopartikül sentezi sonucunda çevresel tehlikeler yaratan toksik yan ürünler üretebilmektedir. Ayrıca, fiziksel yöntemler pahalı enstrümantasyonlar, yüksek basınç ve sıcaklık gerektirmekte ve dolayısıyla da muazzam bir enerji tüketimi gerektirmektedir (Parashar ve ark., 2009 ;

Tiwari ve ark., 2008). Üstelik, istenilen şekil, boyut, kalite ve miktarda üretilmemektedir (Wang ve ark., 2004). Bu nedenle, 1990'larda nano-biyoteknoloji alanındaki gelişme ve ilerlemelerle birlikte, “Yeşil kimya” olarak bilinen yeni kavram gelişmiştir (Parashar ve ark., 2009 ; Anastas ve ark., 2000).

Bakteri, mantar ve maya gibi mikroorganizmalar hızlı büyüme oranları, kolay üremeleri, pH'ları ve basınçlarından dolayı, nanopartikül (NP) sentezi için oldukça tercih edilmektedirler. Biyo-iyileştirme, biyo-özütleme ve biyo-mineralizasyon amacıyla bakteri - NP (siderofor - FeNP kompleksi) etkileşimleri yaygın şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Hammamchi H., 2019). Bakteriye dayalı nanopartikül sentezinin başlıca avantajı ise, toksik kimyasalların minimal kullanımı ile büyük ölçekli sürdürülebilir üretimini sağlamasıdır.

Bakteriyel Nanopartiküllerin Hücre İçi Biyosentezi

Bazı metallerin birtakım bakterilere toksik etki gösterdiği bilinmektedir. Metal varlığında gelişebilen bakterilerin söz konusu metalleri hücre içinde daha az toksik olan nanopartiküllere indirgeyerek hücreye toksisite direnci kazandırdıkları bildirilmiştir (Durán ve ark., 2011). Metal iyonlarının metal nanopartiküllere indirgenmesi için redoks sentez mekanizmasında ortamda elektron taşıyıcı bir sistemin bulunması gerekmektedir. Bu amaçla bakterilerin enzimler, tiyoller ve hidrokinonlar gibi redoks bileşiklerini salgıladıkları belirlenmiştir (Prakash ve ark., 2010). Bakteriyel nanopartiküllerin hücre içi üretim mekanizmasının, iyonların bulunduğu ortamdan bakteri hücresinin içine çoğunlukla enzimler aracılığıyla taşınması şeklinde olduğu bildirilmiştir. Pozitif yüklü metal iyonları ile negatif yüklü hücre duvarı arasındaki elektrostatik etkileşim sonucu gerçekleşen mekanizmada, bakterinin hücre duvarı önemli bir role sahiptir (Salunke ve ark., 2016; Skłodanowski ve ark., 2017).

Başta *Bacillus*'lar olmak üzere *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Magnetospirillum*, *Clostridium* cinslerine ait bakterilerin çeşitli nanopartikülleri sentezleme yeteneğinde oldukları bildirilmiştir. Bakteriler tarafından hücre içi olarak sentezi gerçekleştirilen nanopartiküller arasında altın, gümüş, selenyum, paladyum, demir oksit, magnetit, kadmiyum sülfür, çinko sülfür ve çinko oksit

bulunmaktadır (Sweeney ve ark., 2004; Narayanan ve Sakthivel, 2010; Harikrishnan ve ark., 2014; Lampis ve ark., 2014; Markus ve ark., 2016).

Nanopartiküllerin geri kazanımındaki güçlükler ve yüksek maliyeti nedeni ile hücre içi biyosentez çok tercih edilmemektedir (Das ve ark., 2014; Singh ve ark., 2015).

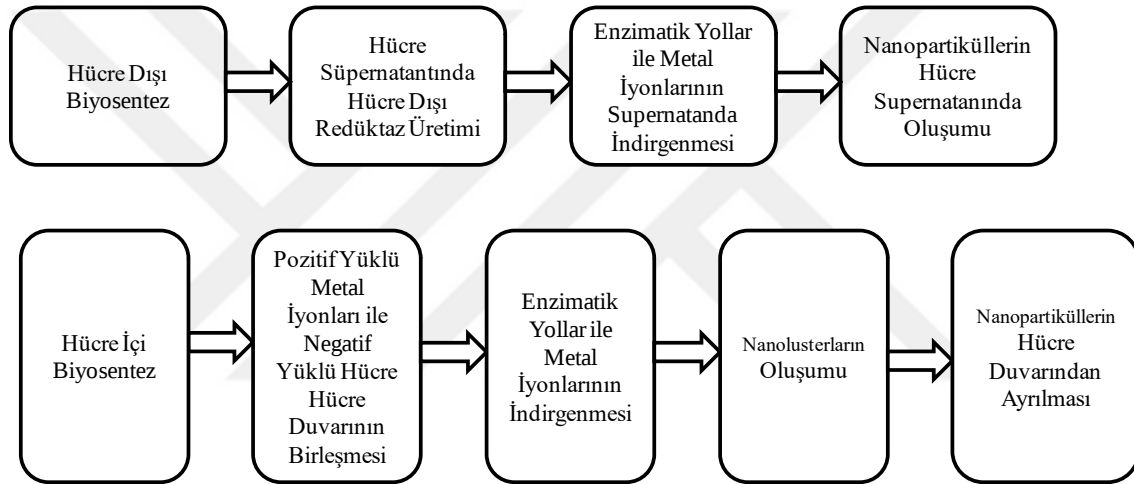
Bakteriyel Nanopartiküllerin Hücre Dışı Biyosentezi

Metal nanopartiküllerin bakteriler ile hücre dışı üretim mekanizması tam olarak aydınlatılamamakla birlikte pek çok araştırma, burada da hücre içi sentezde olduğu gibi özellikle enzimlerin aracılık ettiği bir sentez mekanizmasının olduğunu ortaya koymuştur (Das ve ark., 2014; Khan ve Fulekar, 2016). Altın ve gümüş nanopartiküllerinin biyosentezinde NADH ve NADH bağımlı nitraz redüktaz enzimlerinin rol aldığı; biyosentezin nitrat redüktaz enzimi tarafından NADH'den elektron transferi ile başladığı bildirilmiştir. Burada, nitrat redüktaz enzimi elektron taşıyıcısı olarak görev yapmakta; metal iyonları da elektron alarak elementel forma indirgenmektedir (Durán ve ark., 2011; Tikariha ve ark., 2012). Tripathi ve ark. (2014), doğrudan bakteri kullanılarak gerçekleştirilen hücre dışı kadmiyum sülfür nanopartiküllerinin sentezinde ortamda bulunan metallerin etkisi ile metal stresine maruz kalan bakterinin metalleri detoksifiye etmek amacıyla hücre dışına birtakım enzimler/proteinler salgıladığını bildirmiştir. Nitraz redüktaz enziminin yanında, bakterinin gelişmesi ile oluşan ortamdaki peptit hidrolizatlarının da gümüş iyonlarının indirgenmesine yardımcı oldukları belirtilmiştir (Elbeshehy ve ark., 2015).

Çeşitli araştırmacılar tarafından başta gümüş (Lateef ve ark., 2015; Du ve Yi, 2016; Wang ve ark., 2016) ve altın (Abouelkheir ve ark., 2016; Ojo ve ark., 2016) olmak üzere, titanyum dioksit (Dhandapani ve ark., 2012), demir oksit (Sundaram ve ark., 2012), kadmiyum sülfür (Tripathi ve ark., 2014), bakır (Tiwari ve ark., 2016), kurşun (Prakash ve ark., 2010) ve çinko oksit (Jayaseelan ve ark., 2012) gibi metal nanopartiküllerinin üretimi hücre dışı yollarla başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Bakteri	Nanopartikül	Boyut (nm)	Şekil	Kaynak
<i>B. subtilis</i>	Titanyum	66-77	Küresel, oval	Kirthi ve ark., 2011
<i>B. cereus</i>	Bakır	11-33	Küresel	Tiwari ve ark., 2016
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Çinko	57	Küresel	Jayaseelan ve ark., 2012
<i>B. safensis</i> LAU13	Altın	10-45	Küresel	Ojo ve ark., 2016
<i>R. capsula</i>	Altın	10-20	Küresel	He ve ark., 2007
<i>B. safensis</i> LAU13	Gümüş	5-95	Küresel	Lateef ve ark., 2016
<i>B. methylotrophicus</i>	Gümüş	10-30	Küresel	Wang ve ark., 2016
<i>Bacillus</i> sp. AZ1	Gümüş	7-31	Küresel	Deljou ve Goudarzi, 2016
<i>Bacillus</i> sp. CS11	Gümüş	42-92	Küresel	Das ve ark., 2014
<i>V. guangxiensis</i>	Gümüş	10-40	Düzensiz küresel	Du ve Yi, 2016
<i>A. amyloliquefaciens</i>	Gümüş	14,6	Dairesel, üçgen	Wei ve ark., 2012
<i>B. subtilis</i>	Demir oksit	60-80	Küresel	Sundaram ve ark., 2012

Şekil 2. 5. Bazı bakteriler tarafından hücre dışı üretilen nanopartiküller ve morfolojik özellikleri (Akçay ve Avcı, 2018).



Şekil 2. 6. Nanopartiküllerin hücre dışı ve hücre içi sentezi (Fariq ve ark., 2017).

Önceki çalışmalarda, Nayak ve ark. (2016), *Bacillus thuringiensis* tarafından gümüş nanopartiküllerinin hücre içi sentezi sırasında nitraz redüktazın gümüş iyonlarını nanoboyuta indirgediğini belirlemiştir.

Feng ve ark. (2012), Süperparamanyetik yüksek yüzey alanına sahip Fe_3O_4 nanopartiküllerini arsenik gideriminde için adsorban olarak kullanmıştır.

Lu ve Liu 2006'da Karbon nanotüpler ile nikel (II) 'nin sulu çözeltiden uzaklaştırılmasını araştırmıştır.

Kim ve arkadaşları da, (2007) gümüş nanopartiküllerinin farklı derişimleri (0.2'den, 33 nM'ye kadar) ile maya, *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı gerçekleştirilen antimikrobiyal testler üzerinde işlem yapmışlardır. Aynı zamanda mayaları sığır mastitisinden izole etmişlerdir. Pozitif kontrol, itrakonazol ile oranında inhibisyon etkisinin varlığını saptamışlardır. Bu

sinerjik etkiyi açıklayacak hipotez olarak da her iki fungal ajanının fungal hücre duvarına zarar vermesi sonucu hücre duvarının zayıflaması ve geçirgenliğinin artmasıyla sonuçlanacağını bildirmişlerdir (Beykaya ve Çağlar, 2016).

Bir başka çalışmada, Pan ve arkadaşları (2009) *Aspergillus oryzae*'den elde edilen β -D-galaktozidaz enziminin manyetik Fe_3O_4 -kitosan nanopartiküller üzerine immobilizasyonunu etkili bir şekilde gerçekleştirmişlerdir. Kopresipitasyon metodu ile hazırlanan manyetik nanopartiküller üzerine kitosan elektrostatik adsorpsiyon ile kaplanmıştır. Elde ettikleri materyalin karakterizasyonunu TEM, X-ray dağılım, FTIR spektroskopi, titreşen örnek magnetometri ve termogravimetrik analiz kullanarak gerçekleştirmişlerdir. β -D-galaktozidaz nanokompozit üzerine aktive edici ajan olarak glutaraldehitin kullanıldığı kovalent bağlama ile immobilize edilmiştir. Immobilizasyon süresi, çapraz bağlayıcı ile inkübasyon süresi, enzim konsantrasyonu, glutaraldehit konsantrasyonu, enzim ve glutaraldehit çözeltisinin pH'sı gibi parametreleri optimize etmişlerdir.

Vinoba ve arkadaşları (2011) CO_2 biyomedikal sekestrasyonu için amin/tiyol fonksiyonlu mezogözenekli SBA-15 üzerine altın nanopartiküller hazırlamışlardır. İnsan karbonik anhidrazın immobilizasyonu çalışılmıştır. Gözenekli SBA-15'nin fizikokimyasal özellikleri XRD, BET, SEM, TEM, EDS ve zeta potansiyeli analizi ile belirlenmiştir. Biyokatalitik performanslı p-nitrofenil asetatın (p-NPA) hidrolizi incelenmiştir. hCA/Au/MPTES/SBA-15 ve hCA/Au/APTES/SBA-15 için kinetik parametreler K_m değerleri 22.35 ve 27.75 mM olarak bulunmuştur. Depolama stabilitesi ve tekrar kullanılabilirliği çalışmaları hCA / Au / MPTES / SBA-15'nin 25 °C'de 20 gün depolanması sonucunda aktivitesini muhafaza ettiğini göstermiştir. Mevcut sonuçlar göstermektedir ki; hCA/Au/ MPTES/SBA-15 ve hCA/Au/APTES/SBA-15, endüstriyel ölçekli CO_2 tutma için yüksek verimli potansiyel nanobiyokatalizördür.

Yadav ve arkadaşları (2012) karbon anhidrazı (CA) kitosan stabilize demir nanopartikül (CSIN) üzerine biomimetik karbonasyon reaksiyonu için immobilize etmiştir. CSIN, TEM, X-RAY kırımını ve FTIR cihazları kullanılarak karakterize edilmiştir. pH, sıcaklık ve saklama stabilizasyonu gibi çeşitli parametrelerin immobilize CA üzerine etkisi (p-NPA) metodu kullanılarak araştırılmıştır.

Bunlar arasında manyetit, Fe_3O_4 , daha kararlı yapısında olmasından dolayı en güçlü manyetizmaya sahiptir. Uygun şartlar altında kararlı demir oksitler son derece kararlıdır. Ve belirli koşullarda, demir oksitler birbirine dönüşmektedir. Aşırı ince boyutu ve yüksek özgül yüzey alanı nedeniyle, sıfır-değerli demir nanoparikülleri havada kolayca oksitlenirler. Oksitlenme, büyük ölçüde tanecik büyüklüğüne bağlı olduğundan, aşırı ince tanecik kullanan pek çok araştırmacı, demir nano tanecikleri paslanmaktan korumak için tanecikleri sabit soy metal, metal oksit, organik malzeme veya polimer kullanmışlardır (Li, 2006). Dietrich ve arkadaşları (2012) nanopartiküllere eklenebilecek stabilleştiriciler olarak; monomerik stabilleştiriciler (karboksilat, fosfat, sülfat); polimerler (dekstran, PEG, sitozan), inorganik malzemeleri (silika) sıralamıştır.

Demir oksitlerin yapısını gösteren temel iki yol vardır; Ya anyonların düzenlenmesi açısından (paketleme) ya da her bir merkez katyon ve ona en yakın komşu anyonlardan oluşan tetrahedral veya oktahedral bağlantılardır. (Cornell, 2003).

2.2.5. FeNP'lerin Kullanım Alanları

Demir nanopartikülün kabuk yapısı, çevresel uygulamalarda önemli rol oynamaktadır (Liu, 2005). Çekirdek-kabuk yapısındaki nanopatiküllerin, tepkimeye girmesini sağlayan etkenin Fe^0 çekirdeğin yükseltgenmesi olduğu kabul edilir (Liu, 2005). Demir nanopartiküllerinin (FeNP), manyetik rezonans görüntülemeye (MRG) süperparamanyetik davranış, mükemmel biyoyuymululuk, düşük maliyet gibi önemli özellikleri vardır. Ayrıca, FeNP'ler dış mıknatıslar kullanarak hedeflenen ilaç dağıtımında kullanılabilirler. FeNP'lerin bu özellikleri, görüntülemeye (Hu ve ark., 2016; Wang ve ark., 2010), termoterapide (Espinosa ve ark., 2016), DNA ve ilaçların hedef alınmasında (Nel ve ark., 2009), tümör büyümesinin tespiti ve inhibisyonunda (Pal ve Alocilj, 2010), gen terapisinde (Tang ve ark., 2010), doku onarımında (Shubayev ve ark., 2009), biyomoleküllerin in vivo tespiti ve ayrılmasında (Hasany ve ark., 2012; Wang ve ark., 2008) kullanımına katkı sağlamaktadır. Ayrıca bu tez kapsamında çalışılacak olan ağır metal olan arseniğin biyoremediasyonu araştırılmıştır. Yalın haldeki FeNP'lerin yüzey işlevselliği sayesinde, bu tür moleküllerin bağlanma afiniteleri demir yüzeylere tutulurken ki değişiminden dolayı yabancı molekülleri bağlamak için kullanılmaktadır (Wang ve ark., 2012, 2010, 2008 ; Nel ve ark., 2009; Jin ve ark., 2012). Bu bağlamda düşük moleküler ağırlıklı hidrofilik ve polar doğal moleküller olan sideroforlar, demir

için yüksek bağlanma eğilimleri nedeniyle bu çalışmada ilgi çekmektedir (Johnstone ve Nolan, 2015).

2.3. Biyolojik Demir Nanopartiküllerin Biyoremediasyonda Kullanımı

Atom numarası 20'den büyük olan, yoğunluğu 5 g/cm³'den fazla olduğu bilinen, toksisite ve kirliliğe sebebiyet veren metaller, ağır metaller olarak tanımlanmaktadır (Apaydın A., 2005). Bu gruba kurşun (Pb), kadmiyum (Cd), krom (Cr), kobalt (Co), bakır (Cu), nikel (Ni), cıva (Hg), çinko (Zn) ve **arsenik (As)** gibi metaller dahildir (Özkan, 2009).

2.3.1. Arsenik

Periyodik cetvelin 5A grubunda yer alan arsenik “As” simgesi ile gösterilen, yeryüzünde 20. deniz suyunda 14. ve insan vücudunda 12. en yaygın olarak bulunan elementtir. Literatüre göre 1250 yılında arseniği ilk kez serbest element halinde tanımlayan Albertus Magnus, As₂S₃ (realgar) ısıtarak arsenik elde etmiştir (Matschullat ve ark., 2000; Mandal ve Suzuki, 2002; Mohan ve Pittman Jr., 2007). Atom numarası 33, atom ağırlığı 74,91'dir. Kimyasal olarak hem metal hem de ametal özelliği gösterdiği için, yarı metal (metalloid) olarak sınıflandırılır (ATSDR, 2007). Arseniğin beş değerlik durumu vardır: -3, 0, +1, +3 ve +5 (Welch ve ark., 1988).

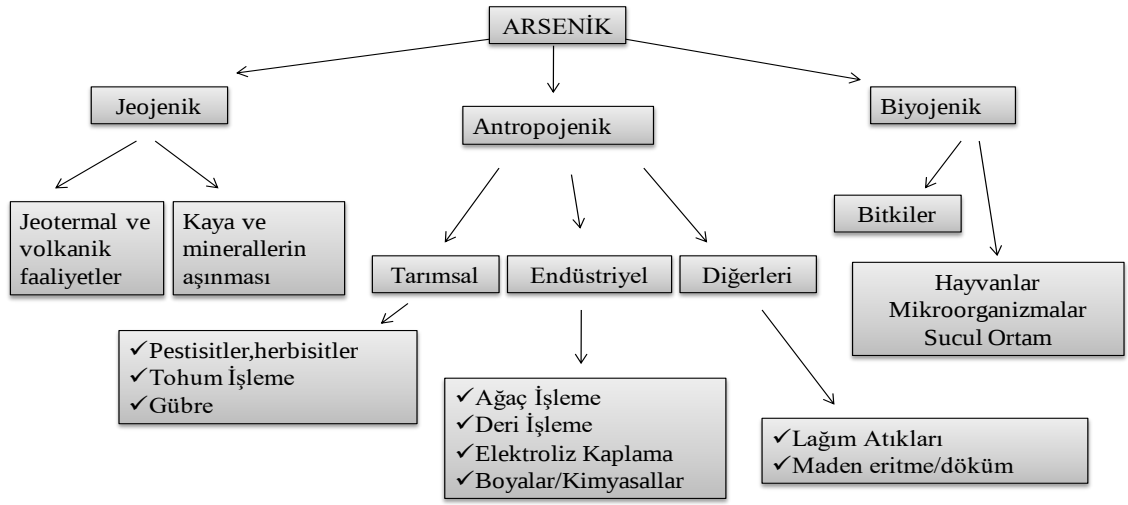
Gri ve sarı kristaller halinde iki ayrı biçimde bulunabilen arsenik elemental, gaz (arsin), organik ve inorganik formlarda bulunmaktadır. Doğada en çok bulunan formu inorganik arseniklerden biri olan arsenik trioksittir. Arseniğin gaz formu en toksik formudur. İnsanlar günlük 300 µg alabilirler. Arsenik ppm'den ppd'ye değişen konsantrasyonlarda toprakta, suda ve canlı organizmalarda bulunmaktadır (Yağmur ve Hancı, 2002).

Arsenik doğada serbest olarak nadir bulunurken, arsenat ve arsenit biçimindeki mineraller olarak yaygın olarak bulunmaktadır (Bissen ve ark., 2003). Sulardaki arsenik kirliliği; biyojenik, jeolojik ve antropojenik şekillerde olmaktadır. Doğal yollarla arseniğin, bağlı olduğu kayaçlar, mineraller ve maden filizlerinin doğa olayları sonucu çözünmesi ile su ortamına geçmesi mümkündür. Antropojenik olarak ise boya endüstrisi (matbaa mürekkebi, tekstil boyaları), metal sanayi, cam ve seramik endüstrisi, lastik üretimi, petrol rafinasyonu, organik ve anorganik kimya sektörleri gibi endüstriler arsenik kirliliğine yol açmaktadır (Bissen ve ark., 2003). Ayrıca bazı deterjanların yapısından da

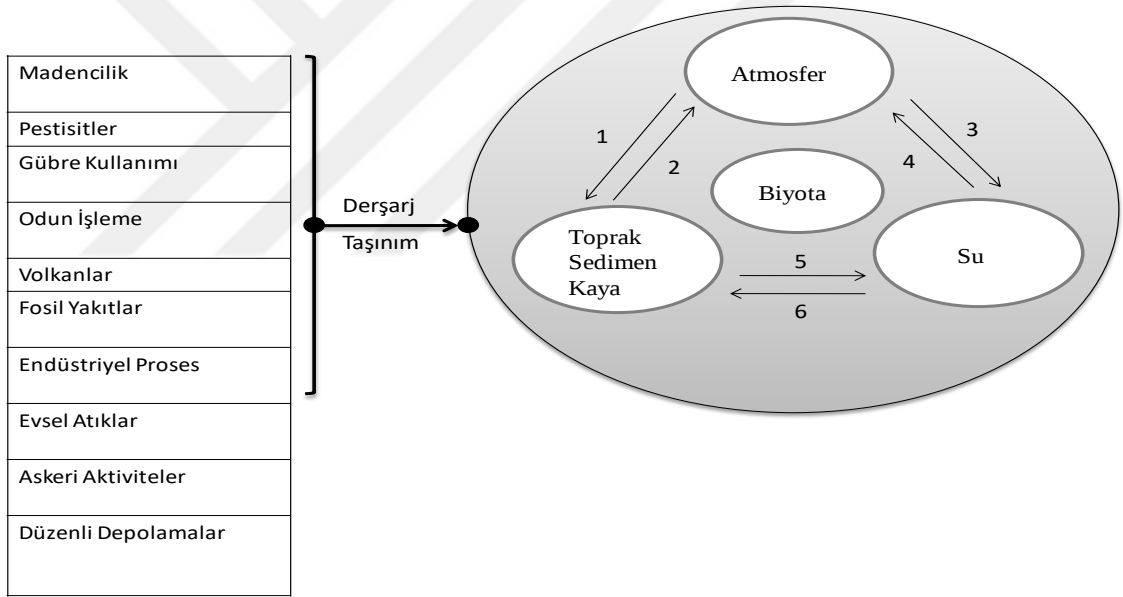
arseniğin sulara karıştığı görülmektedir. Buna ilave olarak, içinde çeşitli arsenik bileşikleri olabilen tarımsal mücadele ilaçlarının (pestisit, herbisit gibi) kullanılması da sulardaki arseniğin diğer kaynaklarıdır.

Tablo 2. 3. Arseniğin kimyasal özellikleri (Topal, 2009).

Sembol	As	
Atom Numarası	33	
Atom Ağırlığı	74.9216	
Yoğunluk, g /cm ³	5.73	
Erime Noktası, °C	817 ^a	
Kaynama Noktası, °C	613 ^b	
İyonlaşma Enerjisi, kJ/mol	1.	947
	2.	1798
	3.	2736
Atomlaşma Enerjisi, kJ / mol	302	
Elektron İlgisi, kJ / mol	-77	
Elektronegativite, Pauling skalası	2.0	
Yükseltgenme Basamakları	+ V, + III, 0, - III	
Elemental Yapı	Polimer ^c	
Kristal Formu	Gri metal	
Sudaki Çözünürlüğü	Çözünmez	
Diğer Çözücülerdeki Çözünürlüğü	HNO ₃ 'te çözünür	
a: 28 atm'de, b: 36 Atm'de süblimleşir, d: Metal olmayan hal içindir.		



Şekil 2. 7. Arseniğin karasal ve sucul ekosistemdeki major kaynakları (Mahimairaja ve ark., 2005).



Şekil 2. 8. Doğada arsenik döngüsü (Wang ve ark., 2006 ; Nriagu ve ark., 2007).

2.3.2. Arseniğin Sağlık Açısından Etkileri

Kokusuz ve renksiz olan arsenik gastrointestinal sistem, solunum sistemi ve parenteral yollardan absorbe olmaktadır. İnorganik arseniğin gastrointestinal absorpsiyon hızı çok yüksektir. En fazla absorpsiyon ince bağırsaktan olur. Ancak sütteki kazein absorpsiyonu azaltmaktadır. Solunum yoluyla alınan arsenik %80 sistemik absorpsiyonla sonuçlanır. Arseniğin cilt tarafından sistemik absorpsiyonu çok fazla değildir. Akut alımda en fazla

dağılım karaciğer ve böbrekte olur, daha sonra beyindedir. Arseneğin fazla alımı durumunda ölüm gerçekleşmektedir (Yağmur ve Hancı, 2002).

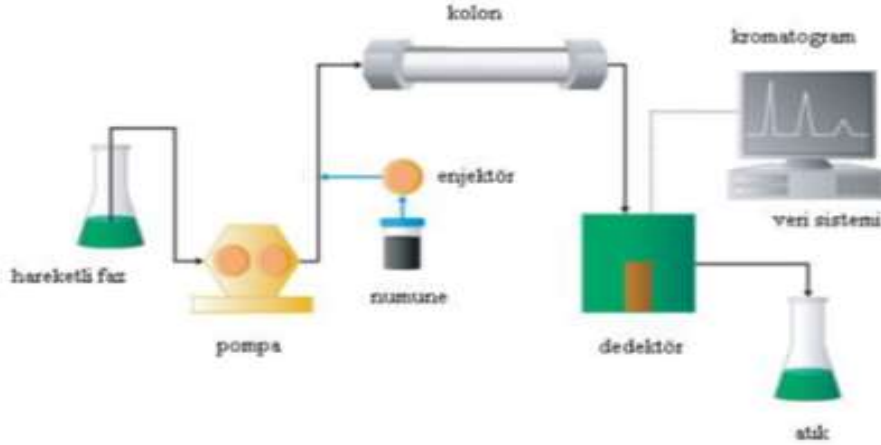
Arsenik, anorganik ve organik bileşikler şeklinde bulunabildiği gibi anorganik bileşikler, organik bileşiklerine oranla çok daha zehirlidir. Arseniğin zehirlilik oranı “Arsin > arsenit As^{+3} > Organik As^{+3} > arsenat As^{+5} > organik As^{+5} > arsonyum” şeklindedir. Arsenit arsenata oranla 60 kat, anorganik arsenik ise organik 7 arseniğe oranla 100 kat daha toksik niteliğe sahiptir (Hughes M., 2002). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) arsenik elementinin insan sağlığına üzerine olan etkilerini, görülme sürekliliği, uygun arıtma teknolojilerini, analiz tekniklerini ve uzun vadede kullanılması neticesinde kanser riskini dikkate alarak 1993 yılında suda arsenik bulunma miktarı ile ilgili düzenlemelerde bulunmuş ve arsenik üst limitini 10 µg/L değerine indirmiştir.

2.4. Karakterizasyon Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar

2.4.1. Siderofor Saflaştırma ve Karakterizasyonunda Kullanılan Cihazlar

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC analizi, sıvıda çözünebilen numunelerin bileşenlerini ayırma, tanıma ve miktarını belirlemeye olanak sağlayan bir analiz çeşididir. Bileşenlerin farklı hızlarda hareket etmesinden faydalanarak kromatografik olarak ayrılabilen yöntemdir. Ayrılan bileşenler kolondan çıktıktan sonrasında hemen dedektöre iletilirler. Dedektörlerin, her bir ayrılmış olan bileşeni hareketli faz referansına karşı dedekte eden akış hücresi vardır. Her bir bileşene karşılık gelen elektriksel sinyali bilgisayar data sistemine göndermektedir. Data sistemi, zamana karşılık oluşan piklerin grafiğini çizmektedir. Her bir pik farklı bir bileşen için dedektörün cevabını ifade etmektedir.



Şekil 2. 9. HPLC çalışma mekanizması (Sezen H., 2010).

Ters Faz HPLC

Ters faz HPLC, sulu ortamdan direkt enjeksiyon yapılabilmeyle olanak sağlamaktadır. Kolonların stabil ve seçici olması, hareketli faz optimizasyonunda kolaylık sağlaması sebebiyle fazlasıyla tercih edilen bir yöntemdir. Sabit fazın veya analitin özelliklerini iyileştirmek, pH değerini değiştirmek ya da farklı ajanlar eklenerek gerçekleştirilmektedir.



Şekil 2. 10. Ters faz kromatografisi (Sezen H., 2010).

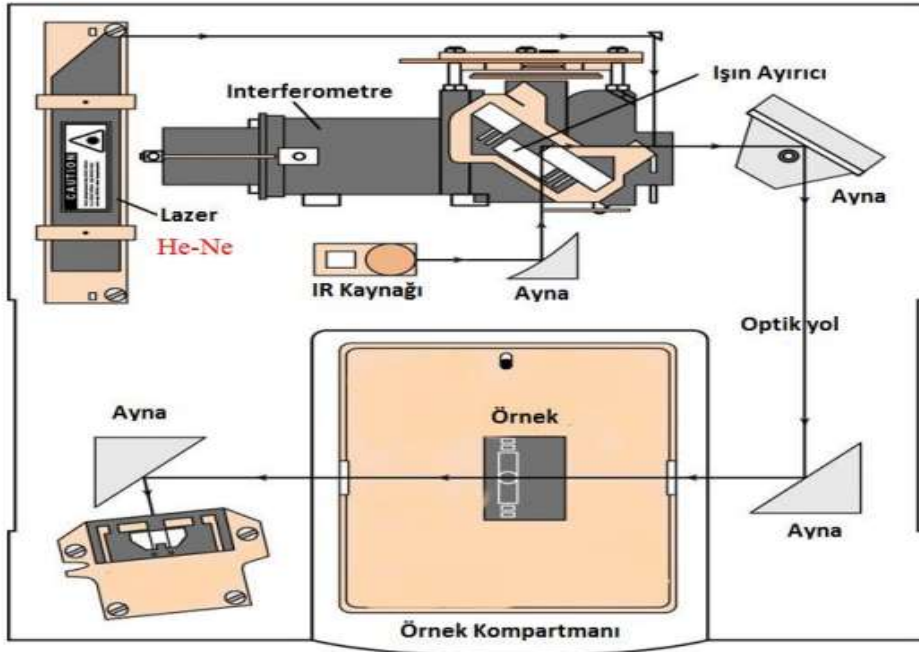
Son yıllarda, geniş kullanım aralığı olması sebebiyle HPLC çalışmalarının %75'i ters faz ayırma yöntemiyle gerçekleştirilmektedir. Ayrıca, su ve organik (asetonitril yada metanol) karışımı mobil faz ile C18 sabit faz en sık kullanılan fazlardır. (Skoog ve ark. 2007).

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

FTIR analizi, molekül içerisindeki belirli işlevsel grupların varlığının belirlenmesinde ucuz, kullanışlı ve pratik olması sebebiyle, spektroskopik yöntemler arasında sık kullanılan analiz yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır (Carey ve ark., 2007).

FTIR cihazının çalışma prensibi, kızılötesi ışının (radyasyonun) madde ile etkileşimine dayanmaktadır. Işık manyetik ve elektrik alandan oluşur. Bu iki alan düzlemde birbirine diktir ve elektrik alan madde ile etkileşime giren kısımdır (Smith B., 1996).

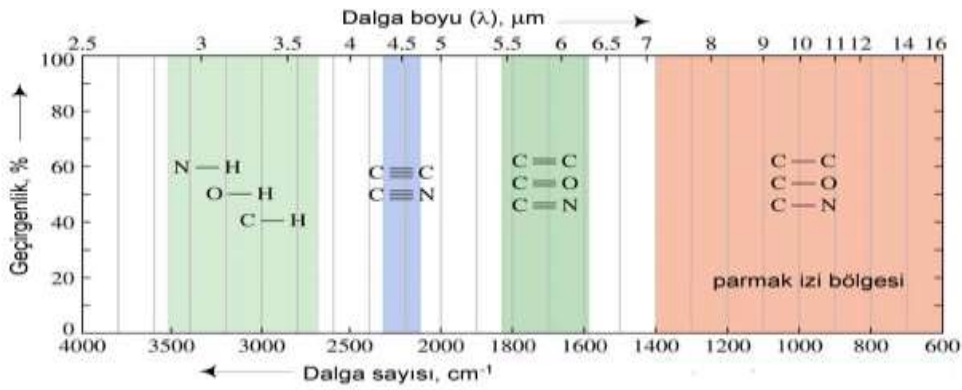
IR cihazında radyasyon kaynağı elektrik ile ısıtılmakta ve buradan çıkan ışın ayna kullanarak ikiye bölünmektedir. Işın sabit ayna ve hareketli ayna olmak üzere ikisine de gönderilmektedir. Bunu takiben ışın, aynadan yansıyarak ayırıcıya gelmekte ve ardından örnek üzerine gönderilmektedir. Örnek ile etkileşen ışın heterokromatik yapıdadır. IR spektroskopisinde monokromatörden geçirilen ışın tek dalga boyuna indirilir. Yani ışık monokromatik yapıdadır. Işık örnek ile etkileştikten sonra dedektöre gider ve buradan bilgisayar ile ölçülebilecek sinyallere dönüşür. Işığın madde ile etkileşimiyle simetrik ve asimetrik olmak üzere yüksek enerji durumunda germe, düşük enerji durumunda bükme titreşimleri meydana gelmektedir (Harwood ve Claridge, 2007).



Şekil 2. 11. FTIR çalışma prensibi (Erer F., 2019).

IR bölgeleri, 12400-4000 cm^{-1} , 4000-400 cm^{-1} , 400-10 cm^{-1} olmak üzere üç dalga sayısı bölgesinden oluşmaktadır. En sık kullanılan bölge 4000-400 cm^{-1} dalga sayısı olan orta infrared bölgesidir (Yaşar, 2016 ; Erer, 2019). Ayrıca FTIR spektrumlarına 519 ve 432 cm^{-1} 'deki bantlar $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 'ün karakteristik özelliklerine karşılık gelir ve bu tepe noktaları

Fe – O gerilim titreşimlerini temsil etmektedir. 519 cm⁻¹'deki yüksek frekans bandı, hematitin oktahedral ve tetrahedral bölgelerindeki Fe-O deformasyonuna bağlanabilirken, 432 cm⁻¹'deki düşük frekans bandı, hematitin oktahedral bölgesindeki Fe-O deformasyonu kaynaklı olabilmektedir (Mirzaei ve ark., 2016; Li ve ark, 2016; Karakoç V., 2013). Ayrıca literatürde 670 cm⁻¹ ve 400 cm⁻¹ dalga sayısı arasındaki piklerin Fe-O gerilim piki olduğu belirtilmiştir (Mandal, 2005).

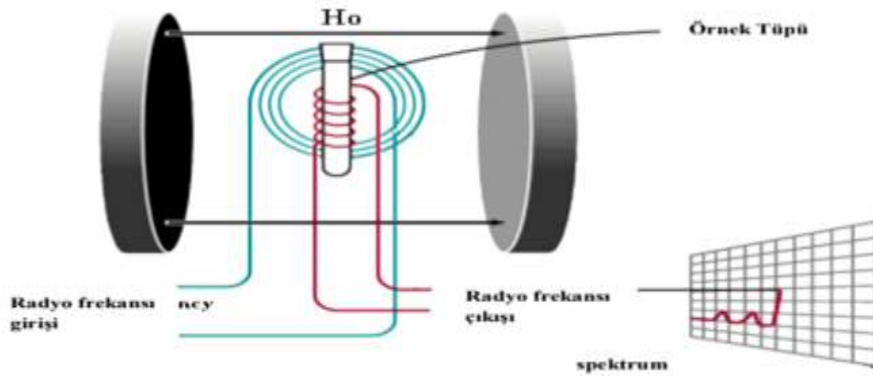


Şekil 2. 12. Bazı organik grupların frekans aralıkları (Beşergil B., 2015).

Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi

NMR Spektroskopisi birçok alanda moleküllerin yapı tayinlerinde ve özelliklerinin incelenmesinde kullanılan, diğer spektroskopik yöntemlerden farklı olarak elektronlar yerine çekirdeklerle ilgilenen bir tekniktir. FTIR Spektroskopisinde moleküldeki fonksiyonel gruplar, elementel analizde atomların yüzdeleri belirlenirken, NMR Spektroskopisinde, atom çekirdeğinin manyetik özelliğine bağlı olarak, molekülün iskeleti hakkında bilgi vermektedir. Molekülde hidrojen içeren grupların sayıları haricinde, bu gruba komşu olan farklı gruplar da tespit edilebilmektedir.

NMR Spektrometresi, homojen ve sürekli dış manyetik alanı kapsayan bir mıknatıs, radyo frekanslı alıcısı, radyo frekanslı vericisi, integratör, dedektör ve kaydediciden oluşmaktadır. Numune analiz yapılmak üzere NMR tüpü içerisine aktararak güçlü manyetik alan içine yerleştirilir sonrasında radyo dalgaları gönderilir. Rezonans için uygun frekans yakalandığında, radyo dalgaları protonlar tarafından soğurulur ve protonlar alt enerji seviyesinden üst enerji seviyesine dönüşür. Bu absorpsiyon işlemiyle birlikte sinyal olarak kaydedilerek analiz tamamlanır.



Şekil 2. 13. NMR cihazının genel şeması (Erer, 2019).

NMR spektroskopisinde alınan sinyaller, manyetik alana ve radyo frekansına bağlı olarak değiştiğinden dolayı referansa standart da eklenmektedir. Referansın konsantrasyonu azaldıkça sinyal gücü azalırken, referansın konsantrasyonu arttıkça sinyal gücü de artmaktadır. Genellikle döterolanmış su, döterolanmış kloroform, döterometanol, etilalkol ve dimetilsülfoksit çözücülerini kullanılmaktadır (Namlı, 2017).

Ayrıca, NMR spektroskopisinde, (^1H), karbon 13 (^{13}C), oksijen 17 (^{17}O), sodyum 23 (^{23}Na), nitrojen 15 (^{15}N) ve fosfor 31 (^{31}P) kullanılmaktadır (Brevard ve Granger, 1981).

2.4.2. Nanopartiküllerin Karakterizasyonunda Kullanılan Cihazlar

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

SEM analizi, numunelerin morfolojisi ve atomik bileşimi ile malzemelerin dış tabakasının topografik detaylarının nano düzeyde ortaya çıkarılmasını ve değerlendirilmesini destekleyen yöntemdir (Hall ve ark., 2007).

SEM cihazının içindeki elektron ışınları, numune yüzeyi ile etkileşime girer. Bu etkileşim, ışınların numune yüzeyini çapraz olarak taramasına ve incelemesine yardımcı olur. Moleküllerin bu genel taraması, çok daha yüksek çözünürlüklü görüntüler oluşturmak için çalışmaktadır (Ianoul ve Johnston, 2007). SEM cihazı, vakum sistemi ve elektron tabancası gibi diğer bazı işlevsel özelliklerin yanı sıra özel yoğunlaştırıcı lenslere sahiptir. Bu lenslerin yardımıyla, geri saçılan elektron görüntüsü, dış X-ışını haritası ve ikincil e⁻ görüntüsü (elektron tabanlı görüntü) olmak üzere 3 tip birincil görüntü oluşturur

(Bogner ve ark. 2005). Bu yöntem, malzemenin nano düzeyde morfolojik analizi için çeşitli avantajlar sunar. SEM uygulaması gerçeğe uygun ve pratiktir ve nanopartiküllerin şekli, boyutu ve boyut dağılımını açıkça ortaya çıkar. Ek olarak, bu mikroskopik teknik kullanılarak üç boyutlu bir görünüm elde edilebilmektedir (Ranjbar ve Gill, 2009).

Enerji Dağıtıcı X-Işını Spektroskopisi (EDX)

Enerji Dağıtıcı X-ışını Mikroanalizi (EDXMA/EDXA) olarak da bilinen Enerji Dağıtıcı X-ışını Spektroskopisi (EDX, XEDS veya EDXS), atomik, mikro ve hatta nano seviyelerde çalışmaya olanak sağlayan, örneklerin moleküler düzeyde kimyasal karakterizasyonu için tasarlanmış, uygulanabilir ve sistematik bir metodik uygulamadır. Bu spektroskopik yöntemi, malzeme bilimi, mikroelektronik ve biyoteknoloji dallarının yanı sıra özellikle de yeşil nanoteknoloji ile sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyonu için oldukça kullanılan bir yöntemdir (Doniach S., 2001).

EDX mekanizmasında, dört ana çalışma bileşeni bulunmaktadır. Bunlar, uyarıcı ve kaynak (x-ışını elektron ışını), EDX detektörü, darbe işlemcisi ve analizördür. Cihaz içindeki bir dedektör, X-ışını ışınlarını/enerjisini uyarıcı, onları voltaj ışınlarına veya sinyale dönüştüren dönüştürücü olarak çalışır. Bu voltaj sinyalleri, işlemciye aktarılır. Darbe işlemcisi, sinyalleri ölçer. İnceleme ve analiz için verileri dönüştürür (Corbari ve ark., 2008).

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

FTIR çalışma mekanizması ve temel bilgiler yukarıda siderofor tayin yöntemlerinde verilmiştir. Kısacası, Oradaki bilgilere ek olarak, nanopartiküllerin fonksiyonel gruplarını, yan zincirlerini ve çapraz bağlarını belirlemek adına FTIR oldukça kullanılan bir spektroskopik yöntemdir. Nanopartiküllerin oluşum ve stabilizasyonunu değerlendirmek adına, yeşil teknolojiyi kolaylaştırmaktadır (Faraji ve ark., 2010). FTIR analizi ile iç tabakadaki yük dengeleyen anyon varlığı, anyonlar ile oluşmuş bağların tipini ve yerleşim yerlerini tespit etmek mümkündür. Adsorplanan moleküllerin IR spektrumları incelendiğinde, fiziksel ve kimyasal adsorpsiyonun birbirinden kolayca ayırt edilebildiği bir yöntem olduğu bilinmektedir. (Yılmaz ve ark., 2001).

Toz X-ışını Difraktometresi (XRD)

X-ışını kırınımı (XRD), değerlendirme fonksiyonlarının kapasitesini araştırma, sentezlenmiş nanopartiküllerin kristallliğini anlama ve boyutunu ölçmeye yönelik işlevi nedeniyle oldukça tercih edilen bir karakterizasyon yöntemidir (Chauhan ve ark. 2012). Moleküler seviyelerdeki partiküllerin kristallik üzerine ortalama boyut tayini, üçüncül yapıları oluşturmak ve değerlendirmek için çok önemli bir anahtar olarak kabul edilmiştir (Sapsford ve ark., 2011).

Bragg yasasına göre, XRD analizinden elde edilen moleküllerin kırınım tepe noktaları, incelenen yalnızca bir numunenin kristal düzlemlerine ışın yansımaları göstermektedir (Cantor ve Schimmel, 1980). Sonuca ulaşabilmek için, kırınım uğramış olan toz numunelerin bileşim ve bağlantı parametreleri, kırınım açısı hesaplanır analiz edilir ve X-ışını demeti üzerine gelmeye hazırlanır. Partikül boyutu, Scherrer formülü kullanılarak belirlenir. Bu formül, ortalama partikül boyutunu hesaplamak için düzlemler arası boşluk değerlerini ve XRD yansıma tepe noktalarını hesaplamaktadır (Gupta ve ark., 2013). Ayrıca partiküllerin boyut dağılımları ve kristallliği, yansıma tepe noktalarının genişliğine bağlıdır. Numunelerin kimliğini ve kimyasal bileşimini doğrulayan XRD modelini karşılaştırmak için standart bir veri tabanı kullanılmaktadır. Ek olarak bu veriler, incelenen numunelerin yapısal bilgilerini çözmek için kullanılabilecek kristalografik veriler olarak da kabul edilmektedir (Klug ve Alexander, 1974).

Son yıllarda dünya nüfusunda sürekli büyüme, insan ihtiyaçlarını karşılamak için güvenli, temiz suya erişim sağlama ihtiyacını ortaya koymaya devam etmektedir. Nano oksit emiciler olarak demir nanopartiküllerin kullanılması, su arıtımı için yeni bir manyetik ayırma stratejilere yol açmıştır. Tıp, tarım ve çevre sektöründeki siderofor uygulamaları rapor edilmiş ancak, nanoteknolojide hızla gelişmekte olan demir nanopartikülleri ile yeterli düzeyde uygulamaları sağlanamamıştır. Bu tez kapsamında çevre, tıp, biyomedikal, biyoremediasyon ve daha birçok konuda uygulamalara sahip demir şelatlayıcı bileşikler olan sideroforların demir nanopartikül üretme yeteneklerinden yola çıkarak demir nanopartikül (FeNP) elde ederek bu nanopartiküllerin su kirliliğine neden olan ağır metallerin giderimi sağlanacaktır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Besiyerleri

Kullanılan tüm besiyerleri 121 °C’de 15 dakika süreyle otoklavlanarak steril edilmek suretiyle hazırlanmıştır. Kullanılan tüm cam malzemeler kullanılmadan önce 10 mM HCl muamele edilmiş, MilliQ su ile iyice durulanmış ardından Pastor fırınında 180 °C’de 1 saat steril edilmiştir.

Luria Bertani Besiyeri (1 L, pH 7.5): Tripton: 10 g, Yeast Extract: 5 g, NaCl: 10 g, tartılmış dH₂O ile 1 L’ye tamamlanarak LB Broth besiyeri hazırlanmıştır. Aynı besiyerine 15 g/L agar ilave edildiğinde besiyeri LB Agar adını almıştır.

Chemically defined low-iron medium (CDLIM) Besiyeri: K₂SO₄: 2 g, K₂HPO₄: 3 g, NaCl: 1 g, MgSO₄.7H₂O: 0.08 g, ZnSO₄.7H₂O: 0.002 g, CaCl₂.2H₂O: 0.1 g, CuSO₄: 5 x 10⁻⁶ g, MnSO₄.H₂O: 3.5 x 10⁻⁵ g, Thiamin.HCl: 2 x 10⁻⁴ g, Gliserol: 25 ml, NH₄Cl: 5 g Karışım hazırlanmadan önce gliserol 121 °C 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Sterilizasyon sonrasında 800 ml MilliQ olan beher içerisine steril gliserol eklenerek manyetik karıştırıcıda homojen olana kadar karıştırılmıştır. Berrak görüntü elde edildikten sonra tek tek diğer kimyasallar da eklenmiş, 1 litreye tamamlamak üzere 200 ml MilliQ su eklenmiştir. Berrak bir karışım elde edildikten sonra pH 6.5’a ayarlanmış, bek alevinde 0,22 µm şırınga filtre yardımı ile steril edilmiştir. (Muller ve Raymond, 1984).

M9 Mineral Ortamı (MM9): Na₂HPO₄: 6 g, KH₂PO₄: 3 g, NH₄Cl: 1 g, NaCl: 0.5 g, Glukoz Solüsyonu: 10 ml, MgSO₄.7H₂O solüsyonu: 1 ml Thiamine•HCl solüsyonu: 1 ml, CaCl₂ solüsyonu: 1 ml ölçülerek pH 7.0 ± 0.2’ye ayarlanmış ve 1 litreye tamamlanmıştır (Atlas, 2004).

LB- CAS Agar: 900 ml LB agar besiyeri hazırlanıp pH 6.5’e ayarlanır. Otoklavda steril edildikten sonra besiyerinin 50 °C’ye kadar sıcaklığının düşmesi beklenerek 100 mL CAS boya solüsyonu ile birleştirilir (Hu ve Xu, 2011)

3.1.2. Hazırlanan Çözeltiler ve Solüsyonlar

Glukoz Solüsyonu (0.1 M): 20 g D-glukozu distile suya eklenmiş, hacmi 1 litreye getirilmiş. İyice karıştırıldıktan sonra 15 dakika 120°C’de otoklavlanmıştır. M9 ortamına belirtilen miktarda ilave edilmiştir.

MgSO₄.7H₂O solüsyonu (1 M): 100 ml 1 M solüsyon hazırlamak için 24.647 g Magnezyum sülfat heptahidrat beher içinde tartılmıştır. 100 ml distile su eklenerek tamamen eriyene kadar karıştırılmıştır. İyice karıştırıldıktan sonra 121 °C’ de 15 dakika otoklavlanmıştır. M9 ortamına belirtilen miktarda ilave edilmiştir.

Thiamine•HCl solüsyonu (0.003 M): Ölçülen thiamine HCl distile suya eklenmiş ve hacim 1 litreye tamamlanmıştır. İyice karıştırdıktan sonra 0.22 µm çepere sahip filtre ile steril edilmiştir. M9 ortamına belirtilen miktarda ilave edilmiştir.

CaCl₂ Solüsyonu (1 M): 14.7 g CaCl₂ distile suya eklenmiş ardından hacim 1 litreye tamamlanmıştır. İyice karıştırıldıktan sonra 121 °C’ de 15 dakika otoklavlanmıştır. M9 ortamına belirtilen ilave edilmiştir.

Shuttle (200 mM 5-Sülfosalisilik asit dihidrat) solüsyonu: 5 ml distile su bulunan falkona 0,25 gr 5-Sülfosalisilik asit dihidrat eklenmiştir. Homojen karışım elde etmek amacıyla 1 dakika vorteklenmiş, çevresi folyo ile kaplanarak kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir. CAS metodunda kullanılmıştır.

K₂SO₄ Sentezi: CDLIM besiyerinde kullanılacak olan K₂SO₄ tuzu laboratuvarımızda bulunmaması sebebi ile H₂SO₄ ve KCl reaksiyonu ile sentezlenmiştir. Mohr pipeti ile çekilen 1.6 ml H₂SO₄ dikkatli bir şekilde 1.64 gr KCl üzerine eklenmiştir. KCl tamamen çözünene kadar karıştırılmış, ardından 24 saat kuruması için bekletilmiştir. Güçlü bir tepkime gerçekleştiği için çıkan gazın solunmamasına dikkat edilmelidir.

PBS Tampon (10X): KH₂HPO₄: 2,0 g, Na₂ HPO₄: 11,5 g, KCl: 2,2 g, NaCl: 80.6 g tartılarak 800 ml dH₂O içerisine eklenmiş ve manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürülmüştür. pH 7,2’ye ayarlandıktan sonra üzeri 1 L’ye tamamlanmıştır. 0,45 µm gözenekli filtrede steril edilerek kullanılmak üzere steril cam stok şişesinde saklanmıştır. Bakteri peletinin yıkanıp CDLIM besiyerine eklenmesi aşamasında kullanılmıştır.

Chrome Azurol S (CAS) Boya Solüsyonu: Solüsyon 1'in içerisine 9 ml solüsyon 2'den ilave edilmiştir. Ardından solüsyon 3'ün tamamı yavaşça aktarılarak karıştırılmıştır. Solüsyon mavi renge ulaştıktan sonra cam stok şişeye aktarılmış ve 121 °C 15 dakika otoklavda sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Boya renginin korunması adına şişe folyo ile kaplanmıştır. (Boya 1 hafta süreyle taze hazırlanmıştır.)

Solüsyon 1: 0,06 gr CAS tartılarak 50 ml ddH₂O içerisinde çözündürülür. 0,22 µl şırınga filtre ile steril edilir.

Solüsyon 2: 0,0027 gr FeCl₃.6H₂O tartılarak 10 ml 1Mm HCl içerisinde çözündürülür.

Solüsyon 3: 0,073 gr HDTMA tartılarak 40 ml ddH₂O içerisinde çözündürülmüştür (Homojen karışımın sağlanması için birkaç saniye ısı ile muamele edilmiştir).

HCl Çözeltisi (0.5 M): 1,83 gr HCl distile suya eklenmiş ardından hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. Çözünme gerçekleştirilene kadar yavaşça karıştırılmıştır. Arnow testinde kullanılmıştır.

HCl Çözeltisi (10 mM): 800 ml dH₂O üzerine 40 ml HCl eklenmiş ardından çözelti 1 L'ye tamamlanmıştır. Tüm cam malzemelerin sterilizasyonu için kullanılmıştır.

Nitrat molibdat reaktifi: 10 g sodyum nitrat ve 10 gr sodyum molibdatın 100 ml su içinde eritilmesiyle hazırlanmıştır. Arnow testinde kullanılmıştır.

NaOH (1N): 4 g NaOH 100 ml distile su içerisine eklenmiştir. Arnow testinde kullanılmıştır.

Sülfanilik Asit (100 ml): 1 gr sülfanilik asit 100 mL %30'luk asetik asit (70 ml su + 30ml asetik asit) içeren distile su içerisinde çözünmüştür. Çözelti, Csáky testinde kullanılmıştır.

Sodyum Arsenat (50ml, 0.2 M): 1 gr sodyum arsenat 50 ml distile su içerisinde çözünmüştür. Çözelti, Csáky testinde kullanılmıştır.

İyot Çözeltisi (10 ml): 0.13 gr iyot 10 ml glacial asetik asit içerisine eklenir. Çözelti, Csáky testinde kullanılmıştır.

α-Naftilamin Çözeltisi: 0.3 gr α-Naftilamin, 100 mL %30 asetik asit (70 ml distile su + 30 ml asetik asit) içerisinde çözündürülür. Çözelti, Csáky testinde kullanılmıştır.

Sodyum Asetat (4 M): 17.5 g sodyum asetat 50 ml distile su içersine eklenmiştir. Çözelti, Csáky testinde kullanılmıştır.

H₂SO₄ (6 N): 16.6 ml H₂SO₄ 100 ml distile su üzerine eklenmiştir. Çözelti, Csáky testinde kullanılmıştır.

Fe₂O₃ Çözeltisi (50 mL, 2 mM): 0.016 g Fe₂O₃ tartılarak 50 ml'lik süpernatant içersine eklenmiş, pH 8.5 olarak ayarlanmıştır. FeNP biyosentezi için kullanılmıştır.

As(III)Oksit (25 ml): 0.1 mg As(III)Oksit 25 ml deiyonize su içersine eklenmiş ve çalkalanmıştır.

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Tablo 3.1. Kullanılan cihazlar ve markaları

CİHAZLAR	MARKA
Manyetik Karıştırıcı	MTops MS300HS
Çalkalamalı İnkübatör	New Brunswick Scientific
Masa Üstü Çalkalamalı İnkübatör	Lab. Companion SI-600
Santrijüj	Hettich Rotixa/RP
Masa Üstü Santrifüj	Heraeus Labofuge 400R
Su Banyosu	Haake B3
+4°C ve -20°C Buzdolabı	Arçelik
Etüv	Gemo DT104
Pasteur Fırını	Paraffin
Vorteks	Scilogex MX-S
Hassas Terazi	Radwag AS220.R2
pH Metre	İnoLab
UV-Spektrofotometre	PG T60
0.45 ve 0.22 µm Steril Filtre	Millex - HV
Quartz Küvet	PG Instruments Limited
Lam	Iso Lab
Mikroskop	Olympus CX21
0.5-10 µl Otomatik Pipet	Capp

1-5 ml Otomatik Pipet	Capp
10-100 µl Otomatik Pipet	Capp
Otoklav	Hirayama
-80°C Derin Dondurucu	New Brunswick Scientific Premium
Vakum Evaporatör	Heidolph

3.2. Yöntem

3.2.1. Siderofor Üreticisi Mikroorganizmaların İzolasyonu

Tokat Kemalpaşa bölgesinde demir noksanlığı nedeniyle renk değişimi görülen şeftali ağaçlarının dibinden ve Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesinin farklı bölgelerinden alınan toprak örneklerinden elde edilen izolatların, siderofor üretme kapasitesi araştırılmıştır. Örnekler toprağın 5 cm altından steril poşete alınarak en kısa zamanda laboratuvara getirilmiş ve işlem yapana kadar +4 °C’de muhafaza edilmiştir (Karataş, 2013).

Toprak örneklerinden 10 gr tartılarak, siderofor üreticisi mikroorganizmaları ön zenginleştirme amacıyla demir içermeyen MM9 mediumuna eklenmiş ve iyice çalkalandıktan sonra örnekler 37 ° C’de 2 gün boyunca inkübe edilmiştir. Ardından dilüsyon serileri hazırlanmış, desimal seyreltilmiş dilüsyondan 100 ul alınarak LB agar plaklarına yayma ekimi gerçekleştirilmiştir. Farklı morfolojik görüntülere sahip koloniler seçilerek LB agara çizgi ekimi yapılmıştır. Art arda yapılan seri pasajlarla elde edilen saflaştırılan koloniler, gram boyama ile kontrol edildikten sonra, %20 gliserol içerisinde -80 °C’de muhafaza edilmişlerdir.

3.2.2. Siderofor Üreticisi Mikroorganizmaların Tespiti

Sideroforun ferrik demire yüksek affinitesinden faydalanılarak siderofor tespitinde Chorome Azurol S (CAS) yöntemi kullanılır. CAS agar plateleri, Fe⁺³ boyasının kompleks oluşturmamasından ötürü mavi renkte görülmektedir. Siderofor varlığında aşağıda verilen reaksiyon gerçekleşerek serbest boya açığa çıkmakta ve başta mavi görülen renk, turuncuya dönüşmektedir.

Fe^{+3} - CAS (mavi) + Siderofor $\rightarrow \rightarrow \text{Fe}^{+3}$ - Siderofor + CAS (turuncu) (Körçoban S., 2020).

Buna göre izole edilen mikroorganizmalar, CAS agar besiyerine çizgi ekim yapılmış ve 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda mavi olan besiyerinde turuncu renkli üreme görülmesi pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir (Payne, 1994 ; Louden ve ark. 2011).

Siderofor Üretiminin Kantitatif Tayini:

CAS agar denemesinde koloniler etrafında en yüksek turuncu zona sahip olan kolonilerin siderofor üretim değerleri, yine CAS boyası kullanılarak kantitatif olarak spektrofotometrede ölçülmüştür. Bu amaçla; 10 µL saf mikroorganizma 5 ml LB besiyerine inoküle edilmiş (% 0.2 oranında inokülasyon), 30 °C 180 rpm’de çalkalamalı inkübatör 24 saat boyunca ön aktivasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu kültürden 500 µl alınarak 5 ml LB besiyerine inoküle edilerek (%10) aynı koşullarda 18 saat boyunca 2. Aktivasyonu gerçekleştirilen hücrelerin konsantrasyonu UV-Spektrofotometre OD₆₀₀ nm’de ölçülmüş ve OD: 1–1.1’e yoğunluk ayarlandıktan sonra 7000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. LB besiyerinden gelebilecek demirin uzaklaştırılması amacıyla pelet, PBS tamponu ile 2 kere yıkandıktan sonra 1 ml pelet 49 ml CDLIM içerisine aktararak (%2), 37 °C, 180 rpm hızdaki çalkalamalı shaker içerisinde inkübasyona bırakılmıştır. 3 saat aralıklarda kültürden 1500 µl süpernatant alınarak 7000 rpm 5 dakika santrifüj edildikten sonra 300 µl CAS boyası ve 20 µl shuttle solüsyonu eklenmiş ve reaksiyonun tamamlanıp renk değişimini gerçekleşmesi için 5-10 dk bekletilerek UV – spektrofotometrede 630 nm’de absorbans değerleri alınmıştır. Renk değişimleri ve absorbans değerleri karşılaştırılarak % siderofor birimi hesaplanmıştır (Payne, 1994 ; Cordero ve ark., 2012).

$$\% \text{ Siderofor birimi} = ((\text{Ar}-\text{As}))/\text{Ar} * 100$$

Ar: Referans değeri As: Örnek değeri

3.2.3. Siderofor Üreticisi Mikroorganizmanın Tanılanması

Gram boyama

24 saat LB besiyerinde büyütülmüş olan izolatlardan bir öze dolusu alınarak temiz lam üzerine yayılmıştır. Yayılarak kurutulması sağlanan örneğin birkaç kez ateşten geçirilmesi ile fiksasyonu sağlanmıştır. Preparat üzerine pastör pipet yardımıyla kristal viyole damlatılarak 1 dk bekletilmiş ardından su ile yıkanmıştır. Lam üzerine iyot-lügol çözeltisi eklenerek örneğin tamamının boyanması sağlanmış, ardından 1 dakika bekletilmiştir. Preparat su ile yavaşça yıkanmıştır. Örnek üzerindeki mor renk giderilinceye kadar (yaklaşık 15 saniye) %96'lık etil alkol ile muamele edilmiştir. Lam, su ile yıkandıktan sonra safranin ile 30 sn muamele edilmiştir, distile su ile yıkanıp oda sıcaklığında kuruması sağlanmıştır. Objektifin ve lam üzerindeki örneğin çizilmesini önlemek adına immersiyon yağı damlatılarak mikroskopta 100X objektif kullanılmış ve görüntüler incelenmiştir (Coico, 2005).

16s rRNA Gen Dizi Analizi

Siderofor üretimini gerçekleştirdiği belirlenen izolat, tanılanmak üzere 16S rRNA analizine tabi tutulmuşlardır. LB besiyerinde 30°C sıcaklıkta gece boyunca inkübe edilerek olgunlaştırılan siderofor üretici bakteri kültürünün DNA'sı, GeneAll marka genomik DNA izolasyon kiti prosedürlerine uyularak izole edilmiştir. 27F-1492R primerleri ve 785F ve 907R internal primerleri kullanılarak yapılan dizi analizleri Atlas Biyoteknoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiş ve SeqScape programı ile sekans çakışmaları değerlendirilmiştir. www.ncbi.nlm.nih.gov adresinde bulunan BLAST programı ile bilinen mikroorganizmalar ile karşılaştırılarak tanımlanan bakteri suşuna ait soy ağacı, MegaX programının Phylogeny bölümündeki Test Neighbor-Joining Tree algoritması kullanılarak oluşturulmuştur.

3.2.4. *Cronobacter turicensis* BHC04 Suşunun Optimum Siderofor Üretim Koşullarının Belirlenmesi

Her ölçüm öncesinde bakteri kültürlerinden 2 ml örnek alınarak 600 nm'de hücre yoğunluk ölçümleri yapılmıştır. Kör olarak steril CDLIM besiyeri kullanılmıştır. Deneyler en az 3 kez tekrar edilmiştir.

Optik Yoğunluk (OD) Optimizasyonu

Optik yoğunluk optimizasyonu ile üretilen sideroforların en yüksek absorbans değerinin hangi OD değerinde verdiği araştırılmıştır. Öncelikle siderofor üretimi gerçekleştirilmiş ve CAS boyası ile boyama prosedürü uygulanarak UV - Spektrofotometrede OD₄₀₀, OD₄₅₀, OD₅₈₀ ve OD₆₃₀ absorbans değerlerinde ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Sıcaklık Optimizasyonu

Siderofor üretimi, 23°C, 30 °C, 37 °C ve 45 °C olmak üzere farklı sıcaklık koşullarında gerçekleştirilmiştir. Ardından 3 saat aralıklarla siderofor örneklerine CAS boyası ile boyama prosedürü uygulanarak UV- Spektrofotometrede bir önceki basamakta belirlenen absorbans değerlerinde ölçüm alınmıştır.

pH Optimizasyonu

CDLIM besiyerinin pH'sı 4, 5, 6.5, 7, 8.5, 10 ve 12 olmak üzere 7 farklı pH'a ayarlanarak siderofor üretimi gerçekleştirilmiştir. Önceki aşamada belirlenen sıcaklık değeri doğrultusunda üretilen sideroforlara, 3 saat aralıkla CAS metodu uygulanmış ve OD optimizasyonunda belirlenen absorbans değerlerinde UV- Spektrofotometrede ölçümleri alınmıştır.

FeCl₃ Optimizasyonu

CDLIM besiyerine 0, 1, 2,5, 5, 50 ve 100 uM FeCl₃ ilave edilerek siderofor üretimi yapılmıştır. Önceki optimizasyon aşamalarında belirlenen optimum koşullarda gerçekleşen deneyde, 3 saat aralıklarla CAS metoduyla siderofor miktarları UV - Spektrofotometrede ölçülmüştür.

Karbon Kaynağı ve Azot Kaynağı Optimizasyonu

Maksimum siderofor üretiminin belirlenmesi amacıyla gerçekleşen karbon kaynağı optimizasyonunda, süt tozu(milk), sükröz, süksinik asit, maltoz, gliserol ve glikoz olmak üzere 6 farklı karbon kaynağı kullanılmıştır. CDLIM besiyerine belirlenen karbon

kaynakları ilave edilmiş ve 3 saat aralıklarla CAS metodu ile siderofor örneklerinin UV-spektrofotometrede ölçümleri alınmıştır.

CDLIM besiyerine yeast extract, amonyum klorid, tripton, potasyum nitrat, pepton, amonyum sülfat olmak üzere 6 farklı azot kaynağı ilave edilmiş ve 3 saat aralıklarla CAS metoduyla siderofor örneklerinin UV- spektrofotometrede ölçümleri alınmıştır.

3.2.5. *Cronobacter turicensis* BHC04 Sideroforunun Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

Optimizasyon çalışmasının ardından sideroforların saflaştırılması ve karakterizasyonu amacıyla, belirlenen koşullarda mikroorganizmanın 2 litre CDLIM besiyeri içerisinde üretimi gerçekleştirilmiştir. Ön aktivasyon ve CDLIM'ye inokülasyon koşulları, daha önce belirtilen oranlarda gerçekleştirilmiştir. 28 saat inkübasyon sonrası 7000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapılmış ve kültür süpernatantlarının hacmini azaltmak amacıyla 50 °C boru sıcaklığı, 280 rpm dönme hızı, 962 mbar basınç altında Heidolph marka vakum evaporatör yapılmış ve falkon tüplere ayrılarak -20°C'de dondurulduktan sonra liyofilize edilmişlerdir. Liyofilizasyon işlemi Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında bulunan Labconco marka cihaz ile 0,1 mbar basınç, -64 °C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

Sideroforun saflaştırma işlemi kolon kromatografisinde ve tanılama/ileri saflaştırma amaçlı preparatif Yüksek Basıncılı Sıvı kromatografisi (HPLC) uygulanmıştır (Jürgen ve ark., 2001)

Kolon (Jel Filtrasyon) Kromatografisi

Liyofilizasyon ile kurutulmuş olan örnekler 1 ml metanolde çözündürülmüş, çözünmeyen bileşiklerin uzaklaştırılması adına 7000 rpm 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernatant, 0,45 µM'lık şırınga filtresinden geçirildikten sonra büret yardımıyla Sephadex LH-20 resini içeren jel filtrasyon kromatografisine aktarılmıştır. Saflaştırılan örnekler CAS metodu uygulanmak üzere her bir tüp 2 ml olacak şekilde 50 fraksiyon toplanmıştır. Renk değişimi ve UV- Spektrofotometrede pozitif sonuç veren fraksiyonlar bir araya toplanmıştır.

HPLC Analizi

Toplanan fraksiyonların analizi için ters faz (Reverse Phase) HPLC metodu kullanılmıştır. 217 nm dalga boyu ve 4 nm rezolüsyonda 1mg standart kullanılarak standart kalibrasyonu tamamlanmıştır. Jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırılan örnekler, C18 kolonunda (190 Å'lık 5 µm partikül boyutunda, 150 mm uzunluk, 4,6 mm iç çapa sahiptir), kolon sıcaklığı 30°C olmak üzere 1 ml dk-1 akış hızında, eluent olarak %28 metanol ve %72 deiyonize H₂O (%0.1 trifloroasetik asit) varlığında 217 nm dalga boyu ve 4 nm rezolüsyonda, 1 mg örnek kullanılarak ters faz HPLC metodu ile analiz edilmiştir (Schwabe ve ark., 2018). Standart olarak katekolat analogu olarak 2,3-DHBA kullanılırken, hidroksamat analogu olarak içerisinde hidroksamat tipi siderofor ailesine ait desferrioksamin içeren ilaç grubu olan desferal kullanılmıştır. Analiz için Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Shimadzu-Prominence Modular LC20A marka HPLC cihazı kullanılmıştır. Kromotogram incelenerek sonuçlar değerlendirilmiştir.

Siderofor tipinin belirlenmesi amacıyla kolon kromatografisi sonucu birleştirilen fraksiyonlara Arnow ve Cšaky testi yapılmıştır. Katekolat tipi sideroforlar Arnow testi (Arnow, 1937), hidroksamat tipi siderofor için Cšaky testi (Cšaky, 1948) ile görülmektedir.

Arnow Testi ile siderofor karakterizasyonu

Arnow testi, katekolün nitroz asit (HNO₂) ile reaksiyonu sonucu sarı bir renk vermesi temeline dayanmaktadır. Sarı renk, fazla NaOH varlığında turuncu-kırmızıya dönüşmektedir (Arnow,1937). CDLIM besiyerinde yapılan inkübasyonun 28. Saati sonundaki santrifüjde elde edilen süpernatantlar, 1 ml 0.5 mol/L HC1 ile homojen olacak şekilde birkaç saniye karıştırılmıştır (bu aşamada çözelti renksiz olmalıdır). 1 ml nitrat molibdat reaktifi eklenmesi sonucu numunede katekol tipi siderofor varlığı ile sarı bir renk oluşumu ile gösterilmektedir. Ardından üzerine 1 ml NaOH solüsyonu eklenen karışım reaksiyonun gerçekleşmesi amacıyla 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir (inkübasyondan sonra karışımın rengi kırmızımsı olmalıdır). Bu aşamada katekolat grubu

siderofor içeren karışımın rengi kırmızıya dönmesi gerekmektedir. Karışımın absorbansı spektrofotometrede 510 nm dalga boyunda ölçülmüştür. (Payne, 1994). Aşılanmamış ortam, kontrol olarak kullanılmıştır.

Csáky testi ile siderofor karakterizasyonu

Csáky testi hidroksamik asitler için kantitatif bir metottur ve bu nedenle desferrioksaminler gibi hidroksamat sideroforlarını saptamak ve ölçmek için kullanılmaktadır (Csáky, 1948). CDLIM besiyerinde yapılan inkübasyonun 28. Saati sonundaki santrifüjden elde edilen 1 ml süpernatantın üzerine 1ml H₂SO₄ (6N) eklenmiştir ve karışım 130 °C’de 30 dk bekletilmiştir. Soğutulmasının ardından, karışıma 1 ml sülfanilik asit ve ardından 0.5 ml iyot çözeltisi ilave edilerek 5 dakika oda sıcaklığında reaksiyona girmesi sağlanmıştır. Fazla iyotun yok edilmesi için ayrıca 1 ml sodyum arsenat (% 2) ilave edilmiştir. Son olarak 1 ml naftalamin çözeltisi (% 30 asetik asit içinde % 3) ilave edilerek 20-30 dakika oda sıcaklığında reaksiyona girmesine izin verildikten sonra renk değişikliği gözlemlenmiştir. Hidroksamat tipi siderofor varlığında rengin pembe renge dönüşmesi beklenmektedir (Csáky, 1948). Karışımın absorbansı spektrofotometrede 526 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Fourier Transform Infrared (FTIR) Spektroskopisi ile Siderofor Karakterizasyonu

Saflaştırılmış ve metanol içerisine toplanmış olan saf siderofor fraksiyonundan 1 ml alınarak etüvde 40°C sıcaklıkta kuruması sağlanmıştır. Konsantre hale getirilen örnekler (gliserol kaynaklı örneklerin tamamen konsantre olamadığı görülmüştür) cam pastör pipeti ucuyla numune okuma bölgesine yerleştirilerek analiz gerçekleştirilmiştir. Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Kimya Bölümü, Anorganik Laboratuvarında bulunan Jas.co FT/IR 4700 marka FTIR cihazında analiz edilmiştir. Yapılan analiz ile moleküler bağ karakterizasyonu gerçekleştirilerek sıvı halinde bulunan saf sideroforun yapısındaki fonksiyonel gruplar, yapıdaki bağların durumu, bağlanma yerleri ve yapının aromatik ve alifatik grupları incelenmiştir.

¹H-NMR ile Siderofor Analizi

Metanol içerisinde toplanan fraksiyonların, analizi esnasında yanılmaya sebebiyet verebilecek piklerin önüne geçmek adına metanol uçurulana kadar etüvde bekletilmiştir.

Ardından, 450 µL dötero metanol (metanol-d₆) içerisinde çözdürülmüş olan örneklerin ¹H-NMR analizi gerçekleştirilmiştir. ¹H-NMR spektrumları değerlendirilerek saf siderofor örneklerinin yapı tayinleri, fonksiyonel grupları, komşu grupları incelenmiştir. Analiz Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopi Laboratuvarında, Bruker 400 MHz Ultra Shield marka NMR cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. Yeşil Sentez ile Biyolojik Demir Nanopartikül (FeNP) Sentezi

Bu aşamada kültür süpernatantı kullanılarak demir nanopartiküllerinin hücre dışı biyosentezi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 50 mL MilliQ su ile hazırlanmış 2 mM Fe₂O₃ (pH 8.5) çözeltisi üzerine 50 mL bakteri kültürünün süpernatantı ilave edilmiş ve 36 °C, 180 rpm karanlık koşullarda 120 saat (5 gün) boyunca inkübe edilmiştir. Benzer koşullar altında bakteriyel süpernatant içermeyen bir kontrol de oluşturulmuştur. Demir oksit nanopartiküllerin ön tespiti 200 - 1,100 nm aralığında UV-Vis spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir (Sundram ve ark., 2012).

Optik Yoğunluk (OD) Optimizasyonu

Üretilen biyolojik demir nanopartikülün optik yoğunluk optimizasyonunda 260, 280, 320, 350, 400, 580, 800 nm olmak üzere 7 farklı dalga boyunda UV – Spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır. 120. Saat sonunda sentezlenen FeNP'lerin farklı dalga boyundaki absorpsiyon değerlerine bakılmıştır. 400 nm altındaki ölçümler için kuvarts küvetler kullanılmıştır. 3 farklı karışımın spektrumları karşılaştırılmıştır. Bunlar; siderofor içeren hücre süpernatantı, demir nanopartikülüne bağlanarak serbest siderofor miktarını tespit edebilmek adına siderofor + Fe₂O₃ kompleksi ve siderofor içermeyen yalnızca Fe₂O₃ çözeltisidir. Alınacak verilerde demir ile kompleks oluşurması beklenen siderofor miktarının azalması, yalnızca Fe₂O₃ içeren çözeltinin zaman içerisinde sabit kalması beklenmektedir.

İnkübasyon süresinin nanopartikül oluşumuna etkisi

İnkübasyon süresinin nanopartikül oluşumu üzerindeki etkisini araştırmak ve optimum inkübasyon süresini belirlemek amacıyla, 120 saate kadar her 20 saatlik inkübasyon

süresinden sonraki optik yoğunluk ölçülmüş, inkübasyon süresi hariç tüm parametreler önceki deneylerde olduğu gibi sabit tutulmuştur.

Sıcaklığın nanopartikül oluşumuna etkisi

Sıcaklığın nanopartikül oluşumu üzerine etkisini araştırmak ve optimum sıcaklık değerini belirlemek amacıyla 28, 36 ve 45 ° C olmak üzere üç farklı sıcaklıkta siderofor-FeNP üretimi gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sisteminin diğer parametreleri sabit tutulmuştur. UV-Spektrofotometrede belirlenmiş olan absorbans değerinde ölçüm alınmıştır.

pH'in nanopartikül oluşumuna etkisi

pH'in nanopartikül oluşumu üzerine etkisini araştırmak ve optimum pH değerini belirlemek amacıyla pH 5, pH 7 ve pH 8.5 olmak üzere üç farklı pH değerinde siderofor-FeNP üretimi gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sisteminin diğer parametreleri sabit tutulmuştur.

3.2.7. Biyolojik Demir Nanopartiküllerin (FeNP) Karakterizasyonu

Biyolojik demir nanopartiküllerin karakterizasyonu için kullanılan metodlar ve kullanım amaçları Tablo 3.1 'de verilmiştir.

Tablo 3. 2. Demir nanopartiküllerin karakterizasyonunda kullanılan metotlar

Metot	Kullanım Amacı
Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	Nanopartikül şekli ve yüzeyinin içeriğinin tanımlanması
Enerji dağıtıcı x-ışını spektroskopisi (EDX)	Yüzey malzemesinin elementel bileşiminin belirlenmesi
Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)	Nanopartikül yüzeyinde kimyasal kompozisyonu tanımlanması
X-ışını kırılma (XRD)	Elemental içeriğin belirlenmesi
Ç-Zeta potansiyeli analizörü (Zeta-Sizer)	Sulu çözelti içindeki nanopartiküllerin yüzey yükünün ölçümü

Fourier Transform Infrared (FTIR) Spektroskopisi

Tez kapsamında biyolojik yollarla sentezlenen demir nanopartiküllerin biyosentezinde görev alan fonksiyonel grupların, Fe⁺³ iyonlarını indirgeyerek, oluşan nanopartiküllerin

üzerine bağlanmasıyla nanopartiküllerin hangi bileşiklere sahip olduğunu anlayabilmek, adına Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Kimya Bölümü, Anorganik Laboratuvarındaki Jas.co FT/IR 4700 marka FTIR cihazıyla analizi gerçekleştirilmiştir. Metanol ile temizlenen cihazın okuma bölgesine cam pastör pipeti ucuyla toz haldeki numuler eklenerek analiz tamamlanmıştır.

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Fe₂O₃ ile sentezlenen biyolojik demir nanopartiküllerin yüzey morfolojisinin anlaşılması adına nanopartiküller çift yapışkan bant ile sabitlenerek altın ile kaplanmış ve SEM altında incelenmiştir. FeNP'lerin morfolojik özelliklerini analiz etmek için 4 dakika boyunca altın kaplama üzerine 10 KV'luk bir hızlanma voltajında, elektrik alan emisyonu tarama elektron mikroskobu kullanılmıştır. Topografik görüntü analizi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi İleri Teknolojin Araştırma ve Uygulama Merkezinde bulunan, Mira3 TESCAN markalı taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Enerji Dağıtıcı X-ışını (EDX) Spektroskopisi Analizi

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi İleri Teknolojin Araştırma ve Uygulama Merkezinden hizmet alımı gerçekleştirilen SEM analizi yapıldıktan sonra, görüntülenen nanopartiküllerin SEM cihazı üzerinde entegre halde bulunan Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi ataçmanı ile elementel analizi gerçekleştirilmiştir.

X-ışını Difraksiyon (XRD) Analizi

Sentezlenen biyolojik FeNP'lerin yapısını analiz etmek amacıyla toz haline getirilmiş FeNP'lerin XRD analizi; 40 KV hızlanma gerilimine sahip CuK α ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) radyasyonu kullanılarak 20°/dak tarama hızı ile 20° ila 70° aralığında 2-ışınlı difraktometrede kaydedilmiştir. Numunelerde bulunan farklı fazlar, arama ve eşleştirme yüksek skor yazılımı ile değerlendirilmiştir.

Scherrer Denklemi ile kristalit boyutları belirlenmiştir (Shah ve Ahmad, 2010).

$$D \text{ (nm)} = \frac{K \times \lambda}{\beta \times \cos \theta}$$

Formülde, D = Ortalama kristalit boyutu, $K = 0.94$ 'e eşit bir sabit, λ = X-ışını radyasyonunun dalga boyu (0.154 nm), β = Tam genişlikte tepe noktasının maksimum yarı (FWHM) (radyan cinsinden) ve 2θ = Bragg açısını (derece) ifade etmektedir (Sulak, 2021). Çalışmada Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezindeki Rigaku Smart Lab X-ışını Difraktometresi (adım aralığı $0,02^\circ 2\theta$, $2^\circ 2\theta/\text{min}$ artış hızı) cihazı kullanılmıştır.

Zeta Potansiyeli Ölçümü

Elektrokinetik potansiyeli olarak da bilinen zeta potansiyeli, sentezlenen FeNP yüzeyindeki elektrik yükünün ölçüsüdür ve kolloidal FeNP'lerin yük kararlılığının miktarını belirtmektedir. Sentezlenen FeNP'lerin yüzey yüklerinin belirlenmesi ve taneler arasındaki itme veya çekme değerinin tespit edilmesi amacıyla Zetasizer Nano ZSP (Malvern) cihazı kullanılarak zeta potansiyeli ölçümleri yapılmıştır. Örneklerin her biri 25°C 'de, pH titrasyonları, Malvern cihazının otomatik titrasyon özelliği kullanılarak nötr pH'da başlatılarak, 0.1 M HNO_3 ile asidik pH'a veya 0.1 M NaOH ile alkali pH'a getirilerek gerçekleştirilmiştir.

3.2.8. Biyolojik Demir Nanopartikül ile Arsenik Giderimi

Tez kapsamında sentezlenen biyolojik FeNP'lerin absorpsiyon özelliklerini araştırmak amacıyla 60. Saatte elde edilmiş olan FeNP'lerin farklı konsantrasyonlarda arsenik absorblama miktarı incelenmiştir. 0.5 mg/L, 1 mg/L, 1.5 mg/L, 2 mg/L konsantrasyonlarda hazırlanan FeNP'ler 25 mL %2 HNO_3 içeren deiyonize suda çözündürülmüş ve 0.1 mg/L As(III)Oksit üzerine eklenmiştir. Karışımın pH'ı 7.0'ye ayarlandıktan sonra, FeNP'lerin arseniği tutması için 25°C 'deki oda sıcaklığında 60 rpm çalkalamalı olarak 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda mıknatıs yardımıyla FeNP'ler toplanmış ve geriye kalan çözelti içerisindeki arsenik miktarındaki değişikliğin tespiti için Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Laboratuvarındaki Perkin Elmer Optima 2100 DV markalı cihaz ile ICP-OES analizi gerçekleştirilmiştir. Kontrol için FeNP içermeyen karışım oluşturulmuş aynı koşullar uygulanmıştır (Feng, 2012 ; Başok, 2019). Deney 2 kere tekrarlanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Siderofor Üreticisi Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Karakterizasyonu

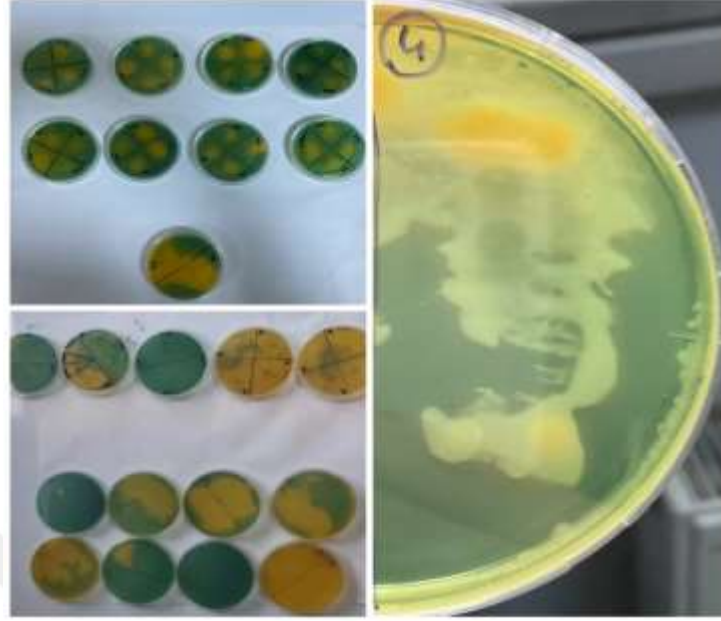
Siderofor üretici mikroorganizmanın belirlenmesi amacıyla Tokat Kemalpaşa bölgesinden ve Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesinin kampüsünden yapılan izolasyonlar sonucunda 27 adet saf koloni elde edilmiştir. Yapılan gram boyama işlemi sonuçları Tablo 4.1’de verildiği gibidir.

Tablo 4. 1. Elde edilen saf kolonilerin morfolojik görüntülenmesi

No	GRAM BOYAMA	ŞEKİL	No	GRAM BOYAMA	ŞEKİL
1	(-)	Basil	29S	(+)	Streptobasil
2	(-)	Basil	29B	(+)	Streptobasil
3	(-)	Basil	35	(-)	Basil
4	(-)	Basil	32	(+)	Basil
5	(-)	Basil	38	(-)	Basil
6	(-)	Basil	39	(-)	Kok
7	(+)	Maya	42	(+)	Kok
8	(-)	Basil	43	(-)	Streptokok
9	(+)	Streptobasil	46	(-)	Kok
10	(-)	Kokobasil	30	(-)	Streptobasil
11	(-)	Basil	15B	(+)	Kok
20	(-)	Basil	Anti ⁻¹	(-)	Basil
22	(+)	Basil	L.10 ⁻³	(-)	Basil
24	(+)	Basil			

İzole edilen mikroorganizmalar içerisinde siderofor üreticisi suşların kalitatif olarak tespiti için CAS agar besiyerinde koloni etrafındaki turuncu renkli zonların oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.1). Yüksek yayılım gösteren organizmaların pozitif sonuçları not edilmiştir.

Turuncu zon veren toprak bakterilerinin siderofor üretim miktarının belirlenmesi için CAS boyası kullanılarak yapılan ve OD₆₃₀ absorbans değerinde ölçülen kantitatif değerler sonucunda en yüksek siderofor üreticisi olarak **4 numaralı** örnek seçilmiştir. Örneklerin seçiminde örnek + CAS boyası + shuttle birleşiminde oluşan karışım 10 dakika bekletilmesi sonucu oluşan reaksiyonun ardından karışımın rengi de dikkate alınmıştır.



Şekil 4. 1. Siderofor aktivitesi gösteren izolatlar turuncu renkli zon üretmektedir (Chaitanya, 2014).

Mor ve turuncu tonları tercih edilmiştir. Mavi ve yeşil sonuçlar negatif sonuç kabul edilmiştir (Tablo 4.2). CAS metodu uygulanırken literatürde verilen 1:1 oranında boyama aşamasında UV-Spektrofotometrede ölçüm zorluğundan dolayı 1:3 oranında CAS boyası, 20 µl shuttle uygulayarak deneye devam edilmiştir. CAS boyası ile boyanan örnekler 10 dk karanlıkta bekletilmesinin ardından, reaksiyon sonucunda solüsyonun renginde değişim gözlemlenmesi siderofor varlığına işaret etmiştir. Boyanın renginin maviden menekşe mora dönmesi katekolat tipi siderofor varlığını, maviden turuncuya dönmesi hidroksamat tipi siderofor varlığını ve maviden açık sarıya dönmesi ise karboksilat tipi siderofor varlığını gösterdiği bilinmektedir. (Schwyn ve Neilands, 1987). Farklı zaman aralıklarında renk değişimleri (menekşe moru ve turuncu) ve absorbans değerleri değerlendirildiğinde 4 numaralı örneğin siderofor ürettiği kabul edilmiş ve % siderofor birimi hesaplanmıştır. Hesaplanan % Siderofor birimine göre 4 numaralı örneğin en yüksek üretimin %65 olduğu gözlemlenmiştir.

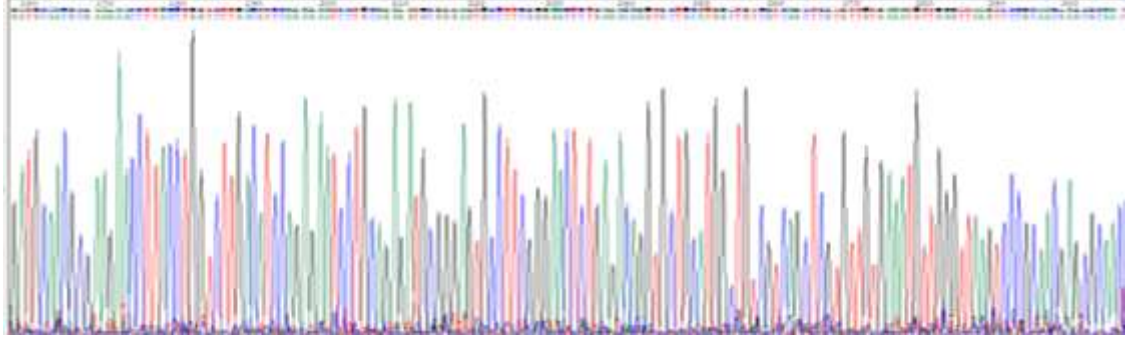
Tablo 4.2. MM9 ortamında büyütülen izolatların CAS metodu ile boyanması verileri ve renkleri

No	RENK	OD ₆₃₀	No	RENK	OD ₆₃₀
1	Yavru Ağzı	0,279	29S	Sarı	0,170
2	Pembe	0,343	29B	Yavru Ağzı	0,296
3	Yavru Ağzı	0,338	35	Yavru Ağzı	0,397
4	Mor	0,410	32	Yavru Ağzı	0,359
5	Pembe	0,400	38	Sarı	0,293
6	Yavru Ağzı	0,403	39	Açık Pembe	0,349
7	Açık Pembe	0,381	42	Yeşil	0,484
8	Açık Pembe	0,359	43	Pembe	0,409
9	Yavru Ağzı	0,408	46	Yeşil	0,336
10	Sarı	0,276	30	Sarı	0,230
11	Açık Pembe	0,398	15B	Yavru Ağzı	0,338
20	Açık Pembe	0,272	Anti ⁻¹	Mavi	0,499
22	Yavru Ağzı	0,392	L.10 ⁻³	Açık Pembe	0,400

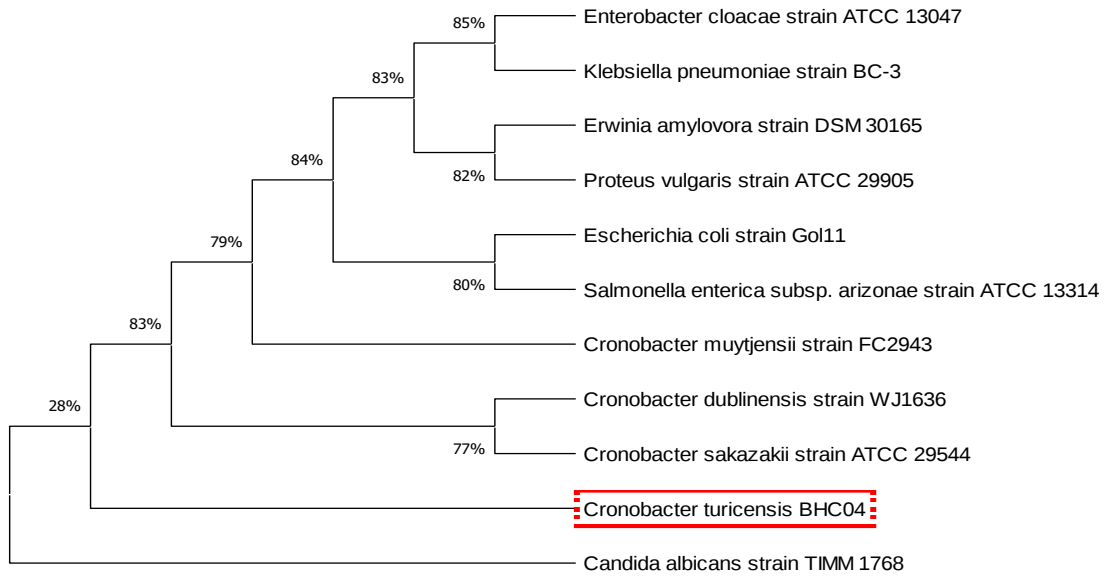
Siderofor üreticisi olarak kabul edilen 4 numaralı örneğin tanımlanması adına 16s rRNA gen dizi analizi yapılmıştır (Şekil 4.2). Sonuçlara göre 4 numaralı mikroorganizmanın 16s rRNA gen bölgesinden elde edilen dizinin www.ncbi.nlm.nih.gov adresinde bulunan dizi karşılaştırma programı olan BLAST ile diğer mikroorganizmalarla kıyaslanması sonucunda, %99.8 benzerlik oranı ile *Cronobacter turicensis* olarak tanımlanmış ve BHC04 suş numarası verilmiştir. MEGAX programı kullanılarak yapılan soyağacı Şekil 4.3'te verildiği gibidir.

5'GAGCAGCTTGCTGCTCTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCC
TGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCCTCGGACCAAA
GTGGGGGACCTTCGGGCCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGG
GTAAAGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGA
ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGC
AAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGTACTTTTCAGC

GAGGAGGAAGGGATTGTGGTTAATAACCGCAGTCATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACC
GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCCAGCGTTAATCGGAATTACT
GGGCGT-3'



Şekil 1. 2. 4 numaralı örneğin chromas programı ile elde edilmiş olan 16s rRNA gen dizi analiz kromotogramı

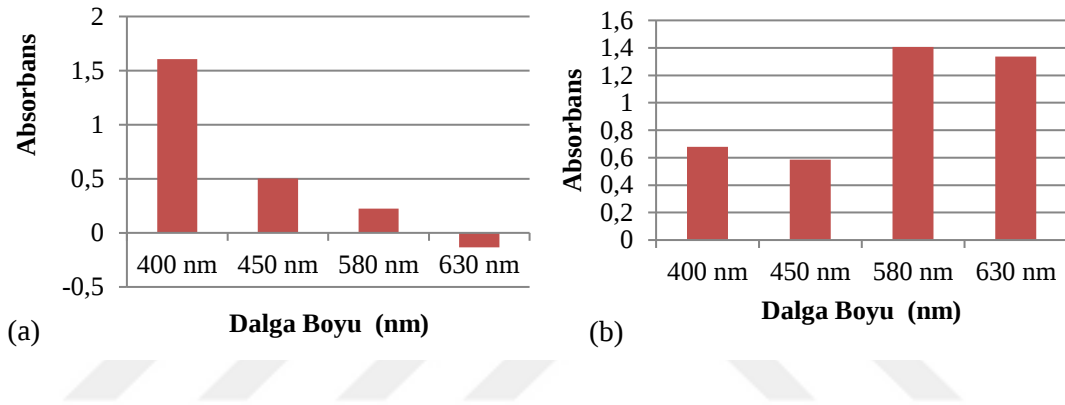


Şekil 4. 3. 4 numaralı örneğin MEGA-X programı ile elde edilen soy ağacı.

16s rRNA sonucu *Cronobacter turicensis* olduğu kesinleştirilen 4 numaralı örnek *Cronobacter turicensis* BHC04 suşu olarak adlandırılmıştır.

4.2. *Cronobacter turicensis* BHC04 Suşunun Siderofor Üretimi ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu

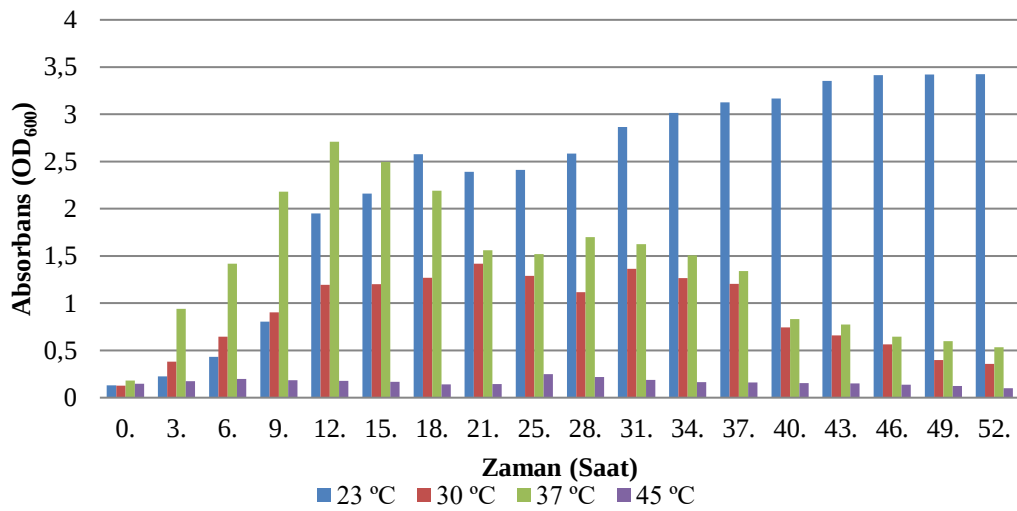
Sideroforların en yüksek absorbans değerinin belirlenmesi amacıyla yapılan OD değeri optimizasyonu sonucunda *C. turicensis* BHC04 suşunun 18. Saat ve 28. saatte iki farklı renkte (menekşe moru ve turuncu) gözlemlenen sideroforlar ürettiği belirlenmiştir (Şekil 4.4). Bu nedenle iki farklı siderofor için optik yoğunluk optimizasyonu yapılmış, menekşe moru siderofor için en uygun absorbans değeri 580nm olduğuna, turuncu renk için 400nm olduğuna karar verilmiştir



Şekil 4. 4. (a) Turuncu renk sideroforun optik yoğunluk değerleri (b) Menekşe moru sideroforun optik yoğunluk değerleri (c) Renk değişimiyle iki farklı siderofor varlığına işaret eden örnekler

İki farklı sideroforun farklı sıcaklıklarda üretim optimizasyonu araştırılmıştır. 23°C, 30 °C, 37 °C ve 45°C’de yapılan çalışmada öncelikle bu sıcaklıklarda *C. turicensis* BHC04 suşunun üreme durumu OD₆₀₀’de yapılan ölçümlerle takip edilmiştir. Şekil 3.8’de görüldüğü üzere, *C. turicensis* BHC04 en iyi 37 °C’de ürerken, 23 °C’ ve 30 °C’de de üremesi devam etmektedir. Ancak 45°C’de bakteri büyümesi inhibe olmaktadır. Bakteri en hızlı 37°C’de üremekte ve 12. Saatte stasyonere faza geçmektedir. Stephan ve arkadaşlarının çalışmasında 10 °C ve 44° sıcaklıkları arasında gerçekleştirilen çalışmaya

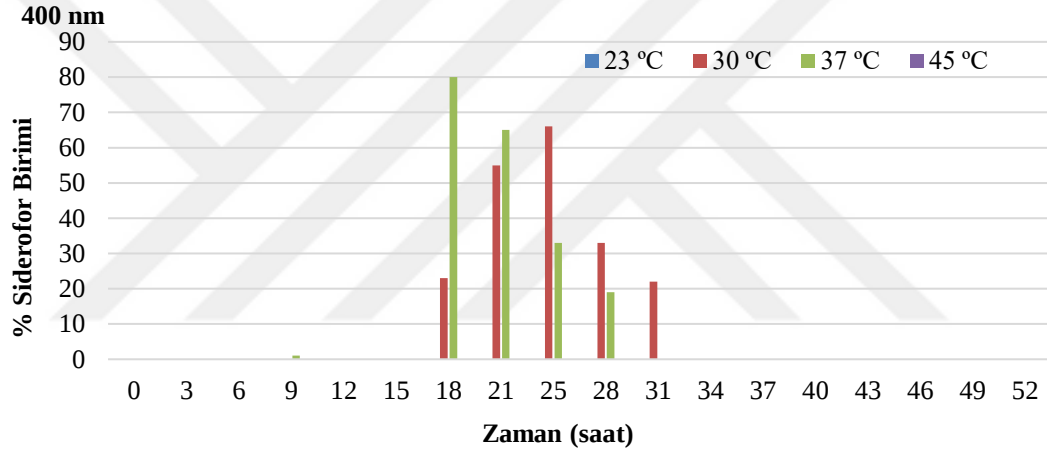
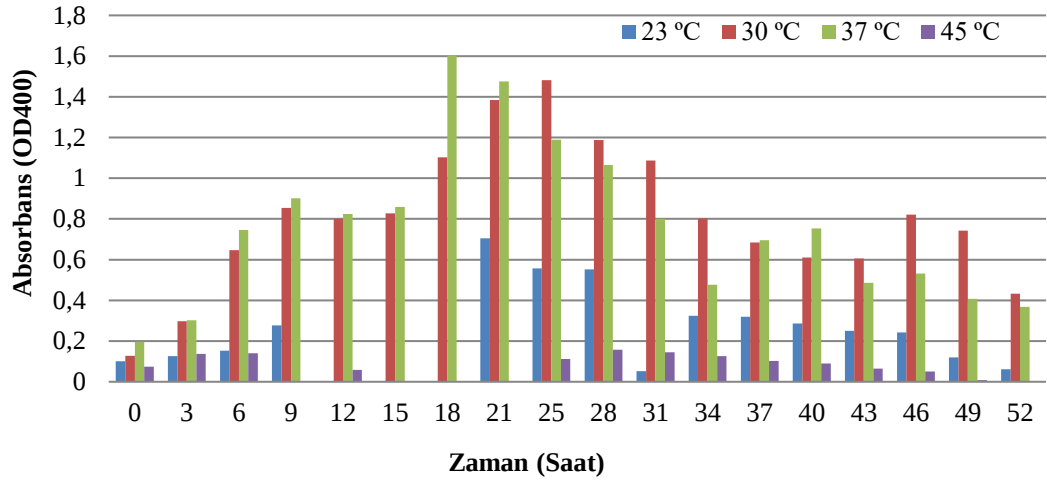
benzer şekilde en az üreme 45°C’de gözlemlenirken, en yüksek üreme sıcaklığı 37 °C olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda *Enterobacter turicensis*’nin TSA besiyerinde 37 °C sıcaklıkta 24 saat büyüdüğü, 10°C’de ise 3 gün ardından büyüme gözlediklerini bildirilmiştir. Aynı çalışmada 44 °C’de büyüme çok az miktarda gözlemlenmiştir (Stephan ve ark., 2007). Bir başka çalışmada LB broth içerisinde 37 °C sıcaklıkta 175 rpmde *C. turicensis* ve türlerinin ürediği belirtilmiştir (Grim ve ark., 2012; Zeng ve ark., 2021).



Şekil 4. 5. 4 farklı sıcaklıkta *Cronobacter turicensis* BHC04 suşunun büyüme grafiği

Ayrıca 9. Saat itibari ile inoküle edilmiş CDLIM besiyerinin renginde, kokusunda ve yapısında değişiklikler gözlemlenmiştir. Bakteri üremesine bağlı olduğu düşünülen kötü koku, beyaz renge dönüşen renk değişimi ve mukoza yapısına geçişle birlikte erlen çevresinde oluşan beyaz yapı nedeniyle biyofilme bağlı EPS miktarında artış olduğu düşünülmektedir. Yapılan literatür taramalarında da *Cronobacter spp.* türlerinin biyofilm oluşturulduğu belirtilmiştir (Jaradat ve ark., 2014). Bu nedenle 23°C’de alınan ölçümlerin yüksek piklere sahip olması, bakterinin büyümesine bağlı EPS miktarının artmasından dolayı olduğu düşünülmektedir.

Optik yoğunluk optimizasyonunda belirlenen, 400nm dalga boyunda görülen 1. Sideroforun sıcaklık optimizasyonunda Şekil 4.6’da gösterildiği üzere 37°C’de 18. saatte maksimum siderofor üretiminin gerçekleştiği görülmektedir.

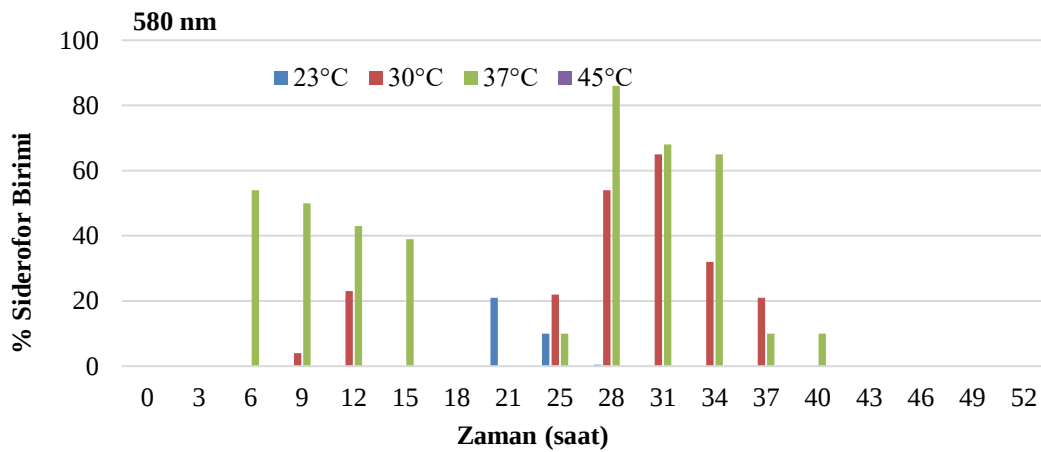
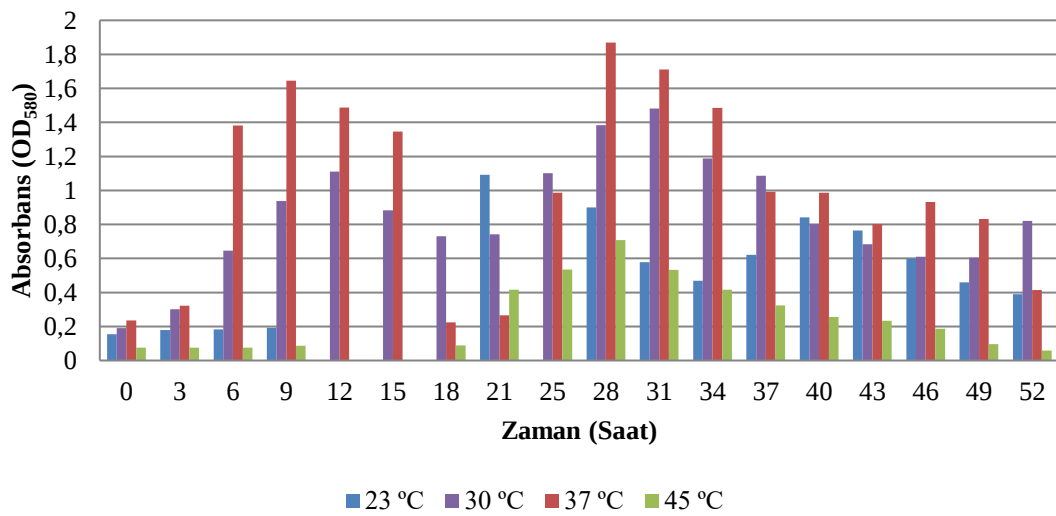


Şekil 4. 6. Absorbans değeri 400nm olarak belirlenen 1. sideroforun sıcaklık optimizasyon grafiği ve siderofor yüzdesi

Siderofor yüzdeleri incelendiğinde ise; 45 °C ve 23 °C sıcaklıkta siderofor üretimi gözlemlenmemiştir. Bu nedenle 37 °C ve 30 °C sıcaklıklar üzerine yoğunlaşmıştır. 30°C sıcaklıkta üretilen birim siderofor yüzdeleri sırasıyla %23, %25, %66, %33 ve %22'dir. En yüksek siderofor üretim yüzdesi %66 oranında 25. saatte gözlemlenmektedir. 37 °C sıcaklıkta üretilen birim siderofor yüzdeleri sırasıyla %80, %65, %33, %19'dur. En yüksek siderofor üretim yüzdesi % 80 oranında 18. Saatte gözlemlenmiştir. 400nm'de gerçekleştirilen sıcaklık optimizasyonunun sonucunda %14 oranında bir verim artışı olduğu görülmektedir. 30°C ile 37°C karşılaştırıldığında 37°C sıcaklıkta daha erken log evresine geçtiği ve daha yüksek siderofor üretim yüzdesi olduğu görülmektedir. Bu

nedenle 37°C sıcaklıkta 18. Saatte gözlemlenen siderofor örneği, 1. siderofor olarak araştırılmıştır.

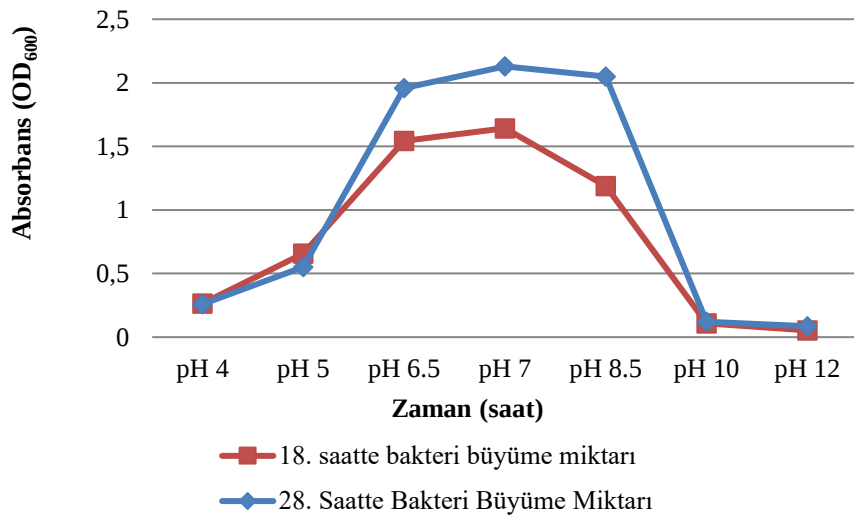
2. siderofor için 580 nm dalga boyunda yapılan ölçümlerden elde edilen Şekil 4.7 incelendiğinde 23°C ve 45°C sıcaklıktaki siderofor üretimi, 30°C ve 37°C sıcaklığındaki siderofor üretim ile karşılaştırıldığında oldukça az miktarda olduğu görülmektedir. 30°C sıcaklıkta 12. ve 31. Saatlerde yüksek pikler olduğu, 37°C sıcaklıktaki siderofor büyüme miktarına bakıldığında ise 9. ve 28. saatte en yüksek piklerin olduğu görülmektedir.



Şekil 4. 7. Absorbans değeri 580nm olarak belirlenen 2. sideroforun sıcaklık optimizasyon grafiği ve siderofor yüzdesi

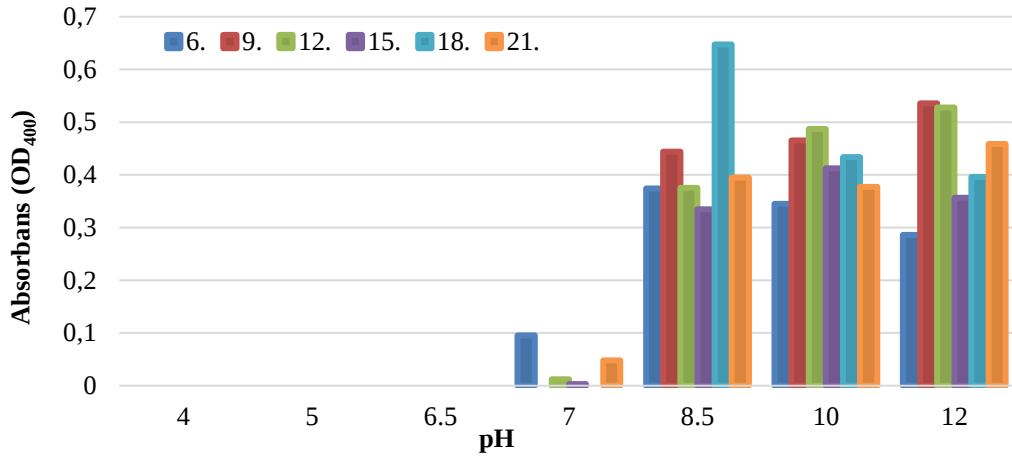
Siderofor birim yüzdeleri incelendiğinde ise, 30°C'lik sıcaklıkta gözlemlenen birim siderofor yüzdeleri sırasıyla, %22, %54, %65, %32 ve %21'dir. En yüksek siderofor üretim yüzdesi %65 oranında 31. Saatte gözlemlenirken, 37°C sıcaklıkta ise siderofor üretim yüzdeleri sırasıyla %10, %86, %68, %65 ve %10'dur. En yüksek siderofor üretim yüzdesi %86 oranında 2. Saatte gözlemlenmiştir. 580 nm'de gerçekleştirilen sıcaklık optimizasyonu sonuçları değerlendirildiğinde %21 oranında verim artışı gözlemlenmiştir. Şekil 3.11 sonuçları ve literatür incelemesi sonucunda 37 °C sıcaklıkta 28. saatte log evresinde olan siderofor, araştırılmak üzere 2. siderofor olarak seçilmiştir.

İki farklı sideroforun optimum pH'sının belirlenmesi için 7 farklı pH'da siderofor üretimi araştırılmıştır.



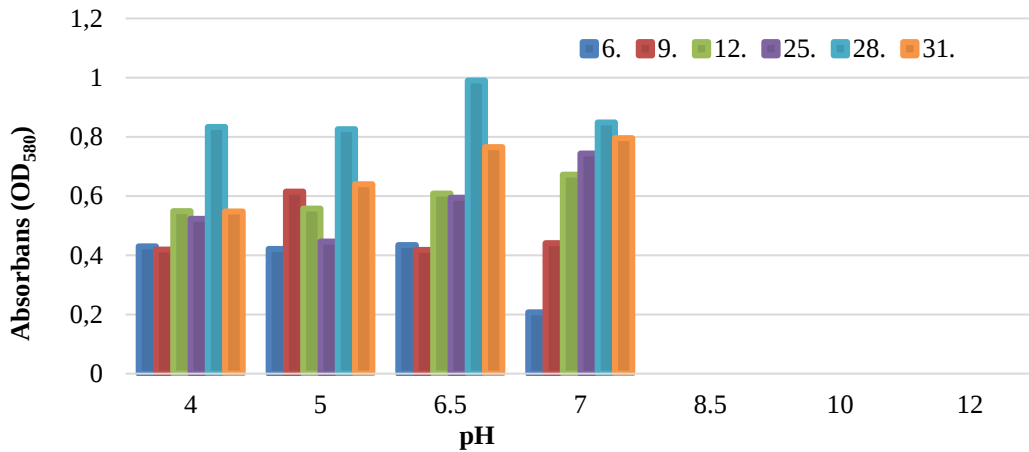
Şekil 4. 8. 18. Saat ve 28. Saatlerinde bakteri büyüme miktarının 600nm absorbans değerinde ölçümü

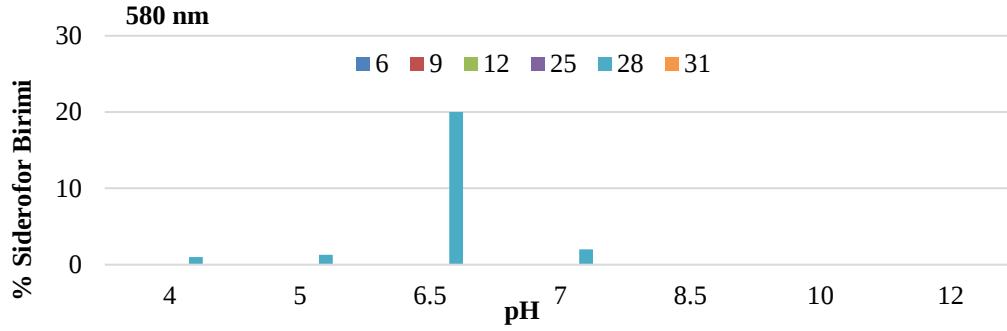
Şekil 4.8'de *C. turicensis* BHC04 suşunun 37 °C sıcaklıkta, farklı pH aralıklarında 18. ve 28. saatte vermiş oldukları optik yoğunlukları incelendiğinde, pH 4, pH 10 ve pH 12'de çok az büyüme görülmekte iken, pH 5'ten itibaren bakteri üretimi artmıştır. Bakteri büyümesinde optimum pH değeri pH 7, ardından pH 6.5 ve takiben pH 8.5 olarak görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi bakterinin büyüme miktarı 18. Saate göre 28. saat daha fazladır. Bu da bakterinin 28. Saate kadar hala büyüdüğünü göstermektedir. Sonuç olarak bakteri büyümesi için optimum pH değeri pH 7 olduğu görülmektedir.



Şekil 4. 9. Birinci siderofor için değerlendirilen pH aralıkları

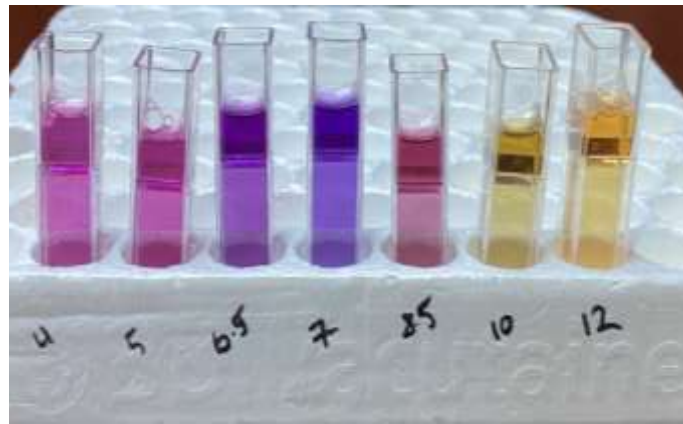
1. Siderofor için gerçekleştirilen pH optimizasyonu incelendiğinde, Şekil 4.9'da görüldüğü üzere, 400nm dalga boyunda yapılan ölçümlerde pH 4, pH 5 ve pH 6.5'ta siderofor üretimi gerçekleşmemiştir. pH 7'de çok az miktarda siderofor olduğu, log evrenin 18. Saatte pH 8.5 olduğu görülmektedir. pH 10 ve pH 12'de pozitif sonucun olması pH'a bağlı olarak CAS metodu uygulanırken karışımın turuncuya dönmesi kaynaklı olabileceği göz önüne alınarak optimum pH değeri pH 8.5 olarak kabul edilmiştir. Düşük miktarda siderofor artışı gözlemlenmesi sebebiyle birim siderofor yüzdesi hesaplandığında bir değişiklik görülmemiştir. Patel ve arkadaşları 2020'de yayınladığı çalışmada sıcaklık ve pH denemeleri üzerine etkilerini araştırmış ve pH 8'de siderofor üretiminin gerçekleştiğini bildirmiştir (Patel ve ark., 2020).





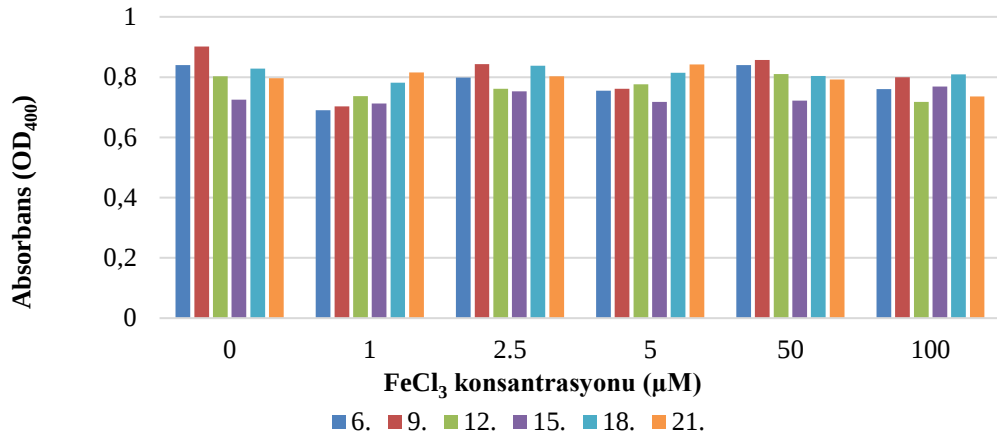
Şekil 4. 10. İkinci siderofor için değerlendirilen pH değerleri ve siderofor yüzdesi

2. Siderofor için gerçekleştirilen pH optimizasyonu incelendiğinde Şekil 4.10'da görüldüğü üzere, 580 nm dalga boyunda yapılan ölçümlerde pH 8.5, pH 10 ve pH 12 de üretim gerçekleşmemiştir. pH 4, pH 5, pH 6.5 ve pH 7 sonuçları değerlendirildiğinde ise, en yüksek verim %20 oranında pH 6.5'te gözlemlenmiştir. Log evresi pH 6.5 olduğu belirlenmiş olan örneklerin pH 4 ve 5'te pozitif sonuç vermesi CAS metodu uygulama esnasında pH'a bağlı olarak karışımın pembe renge dönüşmesinden kaynaklanabilmesi göz önüne alınarak en yüksek değer olan pH 6.5 optimum değer kabul edilmiştir. Bharucha ve arkadaşlarının 2011'de yayınladığı çalışmada katekolat tipi sideroforlarda alkalik pH aralıklarında siderofor üretiminin olmadığını bildirmiştir.



Şekil 4. 11. Farklı pH aralıklarında CAS metodu tamamlanan örneklerin renkleri.

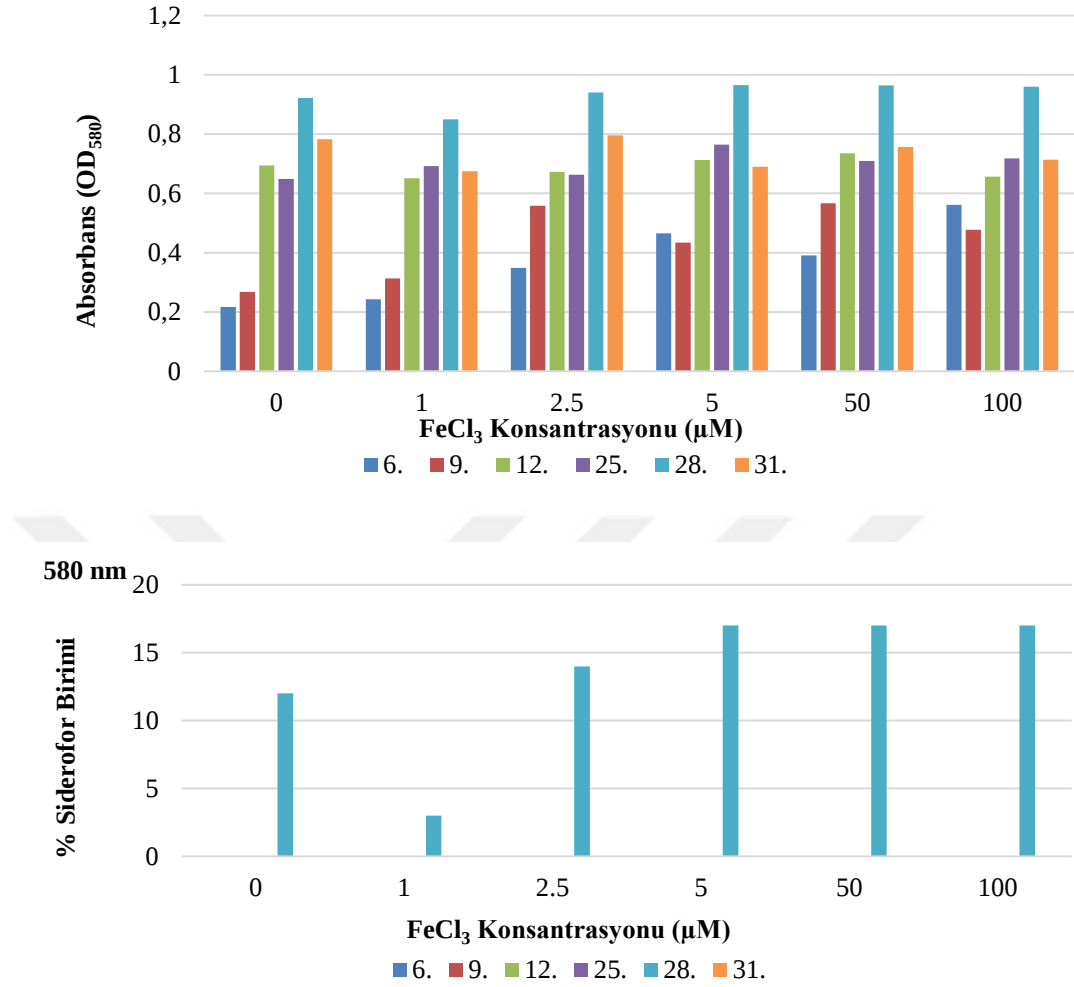
İki farklı sideroforun farklı demir konsantrasyonlarında üretim optimizasyonu 18. Saatte üretilen 1. siderofor için 400nm pH 8.5, 28. Saatte üretilen 2. siderofor için 580 nm pH 6.5 olmak üzere 0, 1, 2.5, 5, 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarında 6 farklı FeCl_3 optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4. 12. Farklı FeCl₃ konsantrasyonlarında 1. siderofor üretimi

1. siderofor için 400 nm’de gerçekleştirilen Şekil 4.12’de verilen sonuçlar incelendiğinde, demire bağlı bir verim artışı gözlemlenmemiştir. Bunun sebebinin *C. turicensis* bakterisinin demire karşı toleransının olduğu düşünülmektedir. Literatür araştırmalarında *Cronobacter spp.* türlerinin biyofilm oluşturduğu, ısı, kuraklık ve asit stresi gibi ekstrem durumlarda büyüme koşullarına olağandışı direnç gösterdiğini bildirilmiştir (Jaradat ve ark., 2014). Ayrıca 0 - 150 µM Fe (III) varlığında siderofor üretiminin gerçekleştiği bildirilmiştir (Ko ve ark., 2011). Şekil incelendiğinde artan demir konsantrasyonuna bağlı olarak siderofor miktarının da sabit kaldığı, verim artışı olmadığı gözlemlenmiştir.

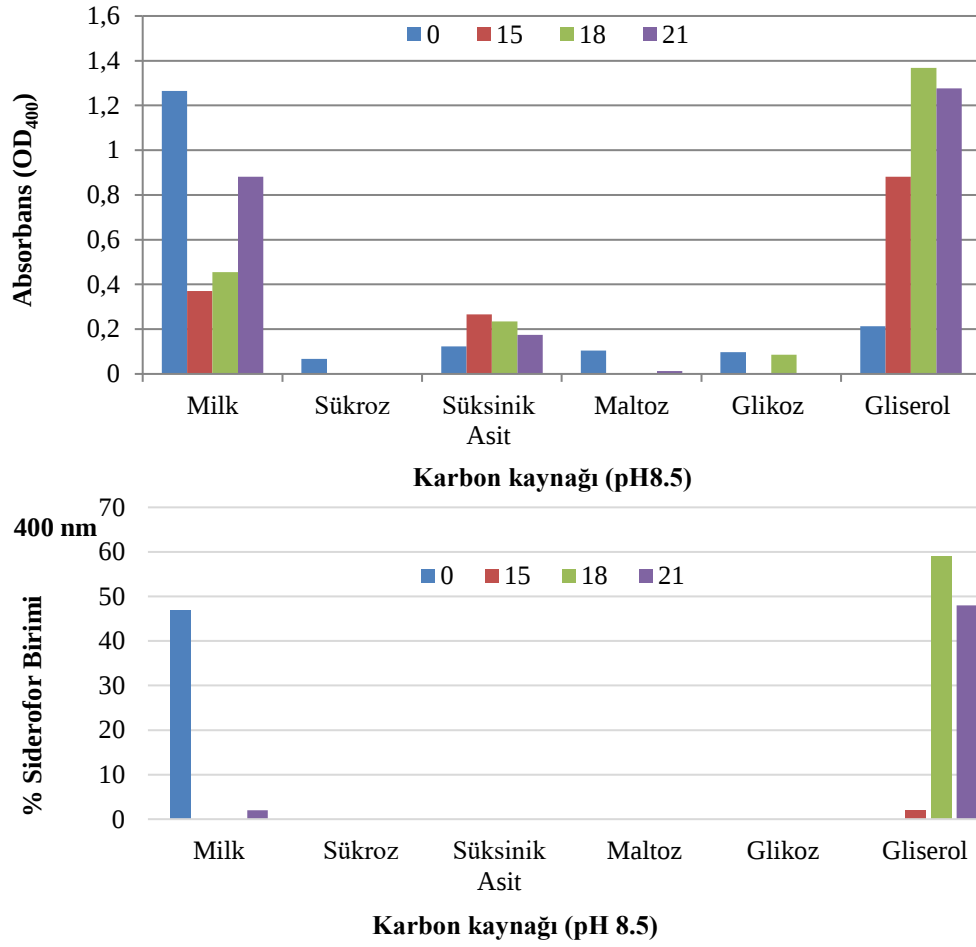
2. siderofor için 580 nm’de gerçekleştirilen FeCl₃ optimizasyonu incelendiğinde ise 0, 1, 2.5, 5, 50 ve 100 µM demir konsantrasyonu içeren besiyerlerinde birim siderofor yüzdesi hesaplandığında sırasıyla %12, %3, %14, %17, %17 ve %17 oranında siderofor üretimi gerçekleştiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.13). Yine 1. Sideroforda olduğu gibi bakterinin artan FeCl₃ konsantrasyonunda siderofor üretiminin sabit kaldığı ve bakterinin FeCl₃ stresine karşı yaşamsal fonksiyonlarını devam ettirebilmek için sürekli olarak siderofor ürettiği düşünülmektedir.



Şekil 4. 13. Farklı FeCl₃ konsantrasyonlarında 2. siderofor üretimi ve siderofor üretim yüzdesi

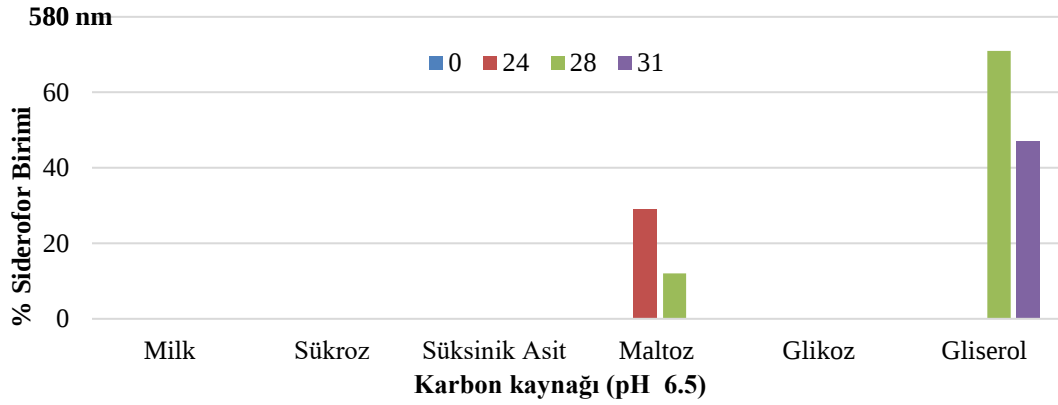
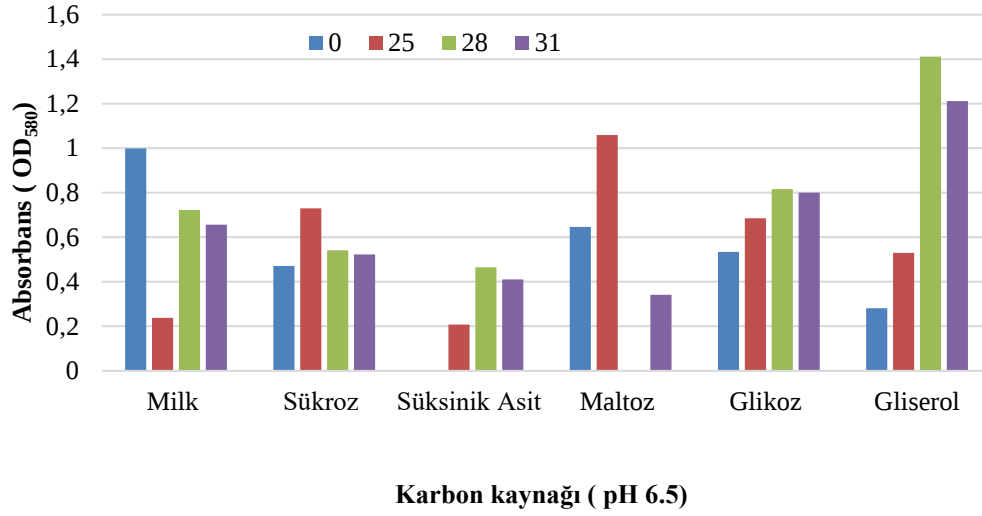
Birinci ve ikinci siderofor için FeCl₃ optimizasyon sonuçları incelendiğinde 2. Siderofor için de artan demir konsantrasyonuna karşı yüksek oranda verim elde edilemediğinden çalışmanın devamında 0 µM oranında FeCl₃ konsantrasyonu tercih edilmiştir.

Maksimum siderofor üretiminin belirlenmesi amacıyla süt tozu (milk), sükröz, süksinik asit, maltoz, gliserol ve glikoz olmak üzere 6 farklı karbon kaynağı kullanılmıştır. 1. siderofor için 400 nm’de gerçekleştirilen karbon kaynağı optimizasyonunda şekil sonuçları incelendiğinde, en yüksek siderofor üretimi sırasıyla gliserol, milk ve süksinik asit olarak görülmüştür (Şekil 4.14).



Şekil 4. 14. Birinci sideroforun karbon kaynağı optimizasyonu ve 1. sideroforun üretim yüzdesi

Süksinik asit denemesinde örneklerin CAS metodu öncesinde ve sonrasında renginin pembe olması, spektrofotometre sonuçlarının doğruluğunu şüpheye soktuğu için süksinik asit değerlendirilmemiştir. Süzkroz, maltoz ve maltozda az miktarda siderofor üretimi gözlemlenmiştir. Siderofor üretim yüzdeleri hesaplandığında ise en yüksek %59 oranında gliserol olduğu tespit edilmiş. İkinci en yüksek verim % 47 oranında milk (süt tozu) olduğu görülmüştür. Fakat milkin besiyerinde tam olarak çözünmemesi ve besiyeri içerisinde çökelmeye sebep olması sebebiyle tercih edilmemiştir. Absorbans değerleri ve yüzde siderofor birimi sonuçları değerlendirildiğinde 1. siderofor için karbon kaynağı olarak gliserol seçilmiştir.

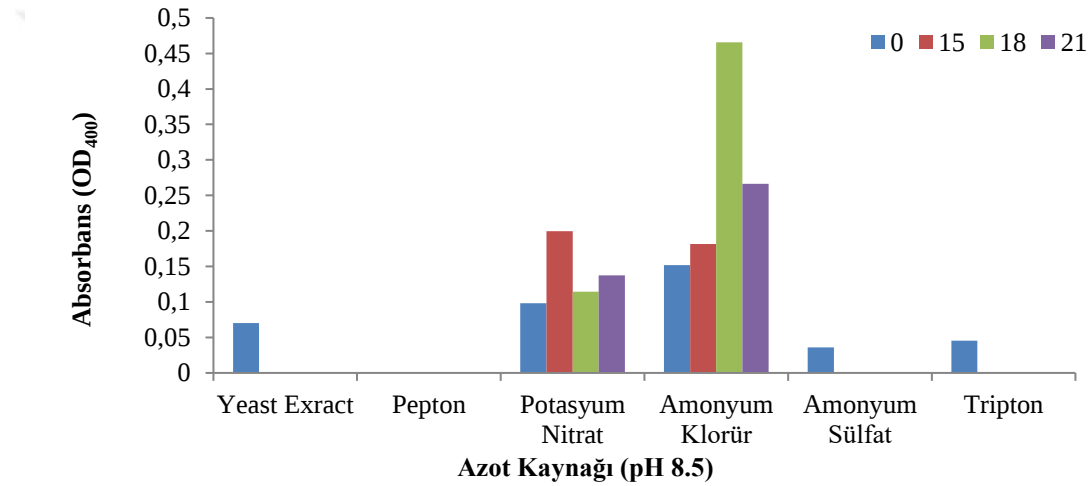


Şekil 4. 15. İkinci siderofor için karbon kaynağı optimizasyonu ve 2. sideroforun üretim yüzdesi

2. siderofor için Şekil 4.15 incelendiğinde en yüksek siderofor üretimi sırasıyla gliserol, milk (süt tozu) ve maltozda görülmüştür. Diğer karbon kaynakları incelendiğinde gözle görülür bir artış gözlemlenmemiştir. Siderofor üretim yüzdeleri hesaplandığında ise en yüksek %71 oranında gliserolde görülmüştür. İkinci en yüksek verim ise %29 oranında maltozda gözlemlenmiştir. Gliserolün üretim yüzdesinin maltoza oranla çok daha yüksek olması sebebiyle 2. siderofor için karbon kaynağı gliserol seçilmiştir. Ayrıca literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, Robbel ve arkadaşlarının 2010’ da yayımladığı *Erythrochelin-Saccharopolyspora erythraea* genomundan üretilen hidroksamat tipi bir siderofor üretiminde karbon kaynağı olarak gliserol kullandığı görülmüştür (Robbel ve ark., 2010). Patel ve arkadaşlarının 2020’de yayımladığı heterotrofik bakterilerle siderofor üretimi

çalışmasında da besiyerinde karbon kaynağı olarak gliserol kullandığı görülmüştür (Patel ve ark., 2020).

Maksimum siderofor üretiminin 6 farklı azot kaynağının araştırıldığı optimizasyon çalışmasında 1. siderofor için en yüksek siderofor üretimi sırasıyla amonyum klorür ve potasyum nitrat olarak görülmüştür (Şekil 4.16). Yeast extractın, amonyum sülfatın ve triptonun 0. Saatte 400 nm’de absorbens değeri sonraki saatlere göre yüksek olmasının sebebi, yüksek pH değerinde çözünmeyen azot kaynaklarının zamana bağlı olarak çözünmesinden dolayı olduğu düşünülmektedir.

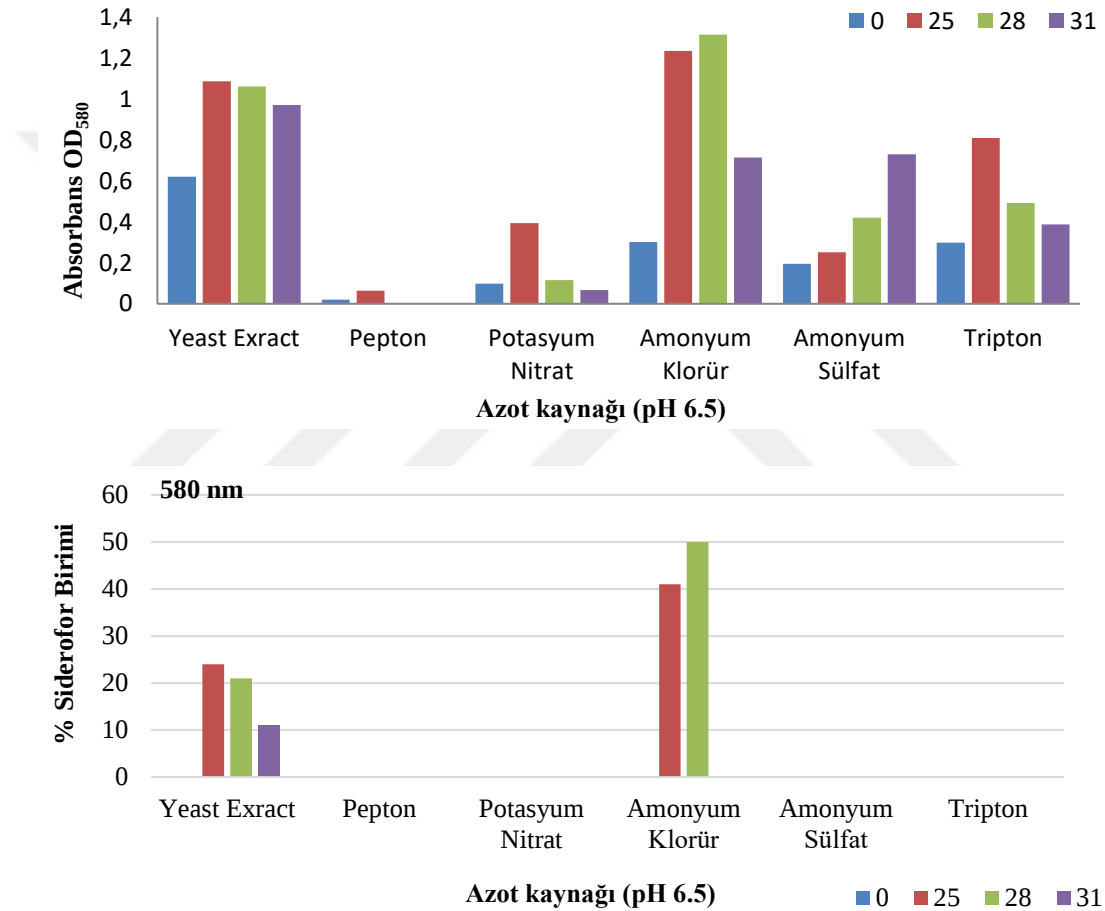


Şekil 4. 16. Birinci siderofor için azot kaynağı optimizasyonu

Siderofor üretim yüzdeleri hesaplandığında verim farkı gözlemlenmemiştir. Potasyum nitratın amonyum klorüre oranla daha düşük miktarda olması, potasyum nitratın saflaştırma ve karakterizasyon aşamasındaki cihazlar konusunda tehlike yaratabilmesi ve yüksek basınç uygulandığında güçlü patlama özelliği göz önüne alınarak (Şen, 2013), 1. siderofor için azot kaynağı amonyum klorür seçilmiştir. Ayrıca literatür incelendiğinde hidroksamat sideroforların yapısal ve kimyasal karakterizasyonu üzerine yapılan çalışmada siderofor üretiminde kullanılan besiyerinde amonyum klorür kullanılmıştır (Murugappan ve ark., 2011). *Erythrochelin-Saccharopolyspora erythraea* genomundan üretilen hidroksamat tipi bir siderofor üretiminde de azot kaynağı olarak amonyum klorür kullanılmıştır (Robbel ve ark., 2010). Güney’in 2014’te yayımlanan yüksek lisans tezinde *Bacillus* sp. türlerinde katekolat türü siderofor üretimi gerçekleştirilirken azot kaynağı olarak amonyum klorür kullanılmıştır. (Güney E., 2014). Patel ve arkadaşlarının

2020'deki siderofor çalışmasında da benzer şekilde azot kaynağı olarak amonyum klorür kullandığı gözlemlenmiştir (Patel ve ark., 2020).

2. siderofor için gerçekleştirilen azot kaynağı optimizasyonunda en yüksek siderofor üretimi sırasıyla yine amonyum klorür, yeast extract, tripton, amonyum sülfat olarak görülmüştür (Şekil 4.17). Potasyum nitrat ve peptonda ise az miktarda siderofor üretimi görülmektedir.

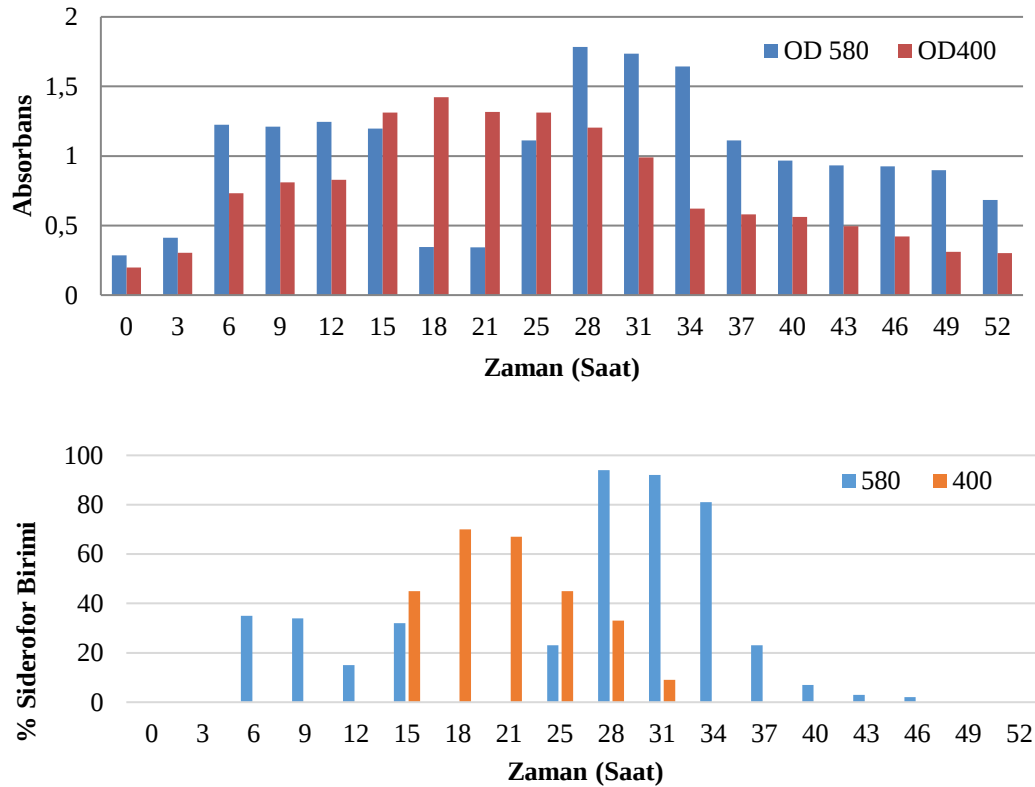


Şekil 4. 17. İkinci siderofor için azot kaynağı optimizasyonu ve 2. sideroforun üretim yüzdesi

Siderofor üretim yüzdeleri hesaplandığında ise en yüksek miktarın 28. Saatte görülen %50 oranında amonyum klorür ile elde edildiği görülmüştür. İkinci en yüksek verim ise %24 oranında yeast extractta gözlemlenmiştir. Amonyum klorür üretim yüzdesinin yeast extractta oranla çok daha yüksek olması sebebi ile 2. Siderofor için azot kaynağı amonyum klorür seçilmiştir.

4.3. *Cronobacter turicensis* BHC04 Sideroforunun Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

Optimizasyon öncesinde 630 nm’de ölçüm alınan 30 °C sıcaklık, pH 7.0 μM FeCl_3 , karbon kaynağı olarak gliserol, azot kaynağı olarak amonyum klorür kullanım koşullarıyla üretilen sideroforun üretim yüzdesi %65 iken optimizasyon sonrasında belirlenen koşullarda üretilen sideroforun üretim yüzdesi 18. Saatteki 1. sideroforda %5 artarak %70’e ulaşmıştır. 28. Saatteki siderofor da ise %29 artarak %94’e ulaşmıştır. Tüm optimizasyon süreci değerlendirildiğinde 18. Saatte yüksek pik veren 1. siderofor için optimum koşulların karbon kaynağı olarak gliserol, azot kaynağı olarak amonyum klorür kullanıldığında ve FeCl_3 ilavesinin olmadığı ortam pH’sının pH 8.5 olduğu koşullarda, 37 °C’de yapılan inkübasyon sonucu elde edildiği; 28. Saatte yüksek pik veren 2. siderofor için ise yine karbon kaynağı olarak gliserol, azot kaynağı olarak amonyum klorürün kullanıldığı, FeCl_3 ’ün ilave edilmediği ve inkübasyon sıcaklığının 37 °C olduğu durumlarda elde edildiği ancak ortam pH’sının pH 6.5’a ayarlandığı zaman gerçekleştiği belirlenmiştir (Şekil 4.18).

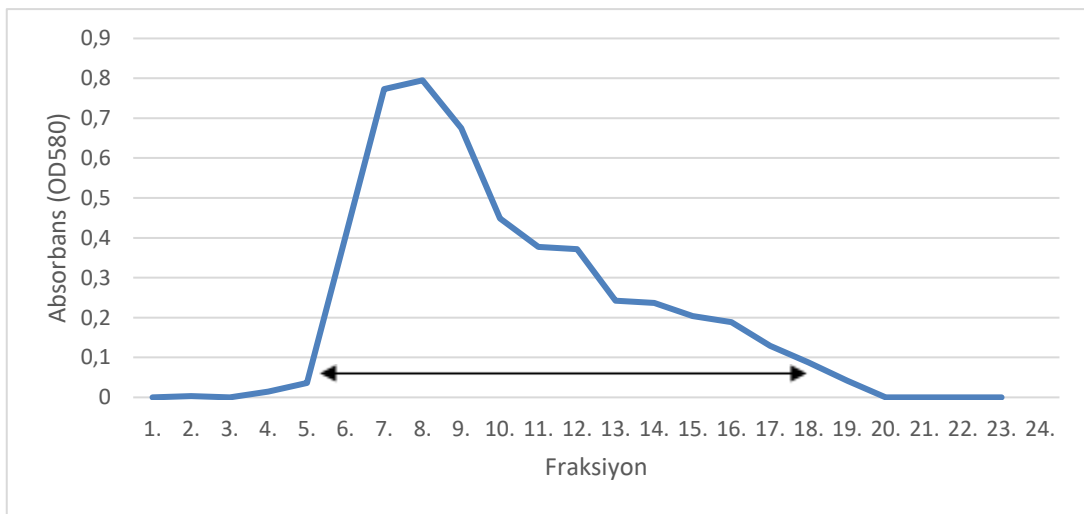
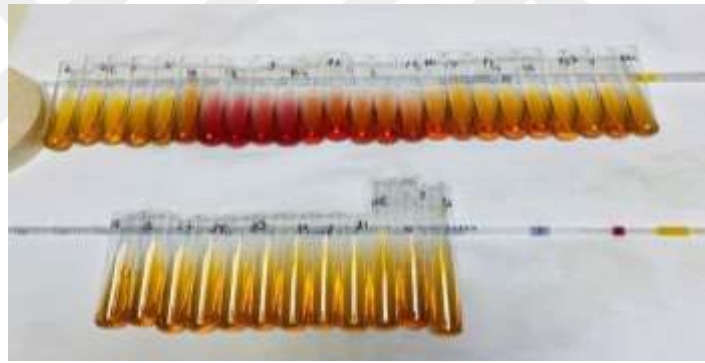


Şekil 4. 18. Optimize edilen koşullarda üretilen sideroforlar ve üretim yüzdeleri

Çalışmanın devamında yapılması planlanan karakterizasyon ve nanopartikül üretimi çalışmasının, saflaştırma basamağında düşük miktardan dolayı (%70) kayıp olmaması adına 18. saatte pH:6.5'ta üretilen 1. Siderofor yerine, 28. saatte %94 oranında üretimin gerçekleştiği, menekşe moru renkli 2. siderofor ile devam edilmesine karar verilmiştir.

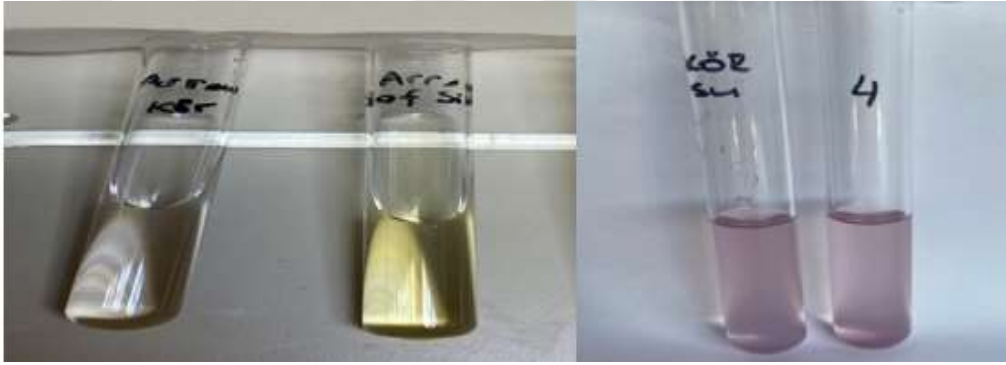
2. sideroforun saflaştırma ve karakterizasyonu için 2 litre besiyerinde üretim yapılmış vakum evaporatörde hacim azaltıldıktan sonra ve steril falkonlar içerisinde liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon işlemi sonunda dondurularak kurutulan örnekler içerisinde eser miktarda gliserol kaldığı gözlemlenmiştir.

Sideroforların saflaştırılması için 1 ml metanol içerisinde çözünen liyofilize haldeki 1 falkon örnek, Sephadex LH-20 kolonunda yüklenmiştir. Toplanan 22 fraksiyondaki siderofor varlığının gösterildiği Şekil 4.19'a göre 5. – 20. fraksiyonlar birleştirilmiştir.



Şekil 4.19. Toplanan fraksiyonların CAS metoduna göre OD580'de ölçüm sonuçları

Birleştirilen fraksiyonlardaki sideroforların spektrofotometrik karakterizasyonu Arnov ve Csáky testi ile belirlenmiştir (Şekil 4.20). Arnov testi gerçekleştirilen saflaştırılmış sideroforun UV- Spektrofotometrede OD₅₁₀ ölçümü 0,023 absorbans göstermiştir. Bu siderofor yüzdesinin %76 olduğunu ifade etmektedir. Hidroksamat tipi siderofor varlığının tespiti için gerçekleştirilen Csáky testinin sonucunda absorbansın OD₅₂₆: 0,019 olduğu belirlenmiştir Formülde yerine konulduğunda siderofor yüzdesinin %48 olarak hesaplanmıştır. Görülen bu sonuçlar 28. saat sideroforunun yüksek miktarda katekolat olduğunu gösterirken, hidroksamat siderofor varlığını da işaret etmektedir. Hidroksamat varlığı, 18. saatteki 1. sideroforun zaman içerisinde parçalanması kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

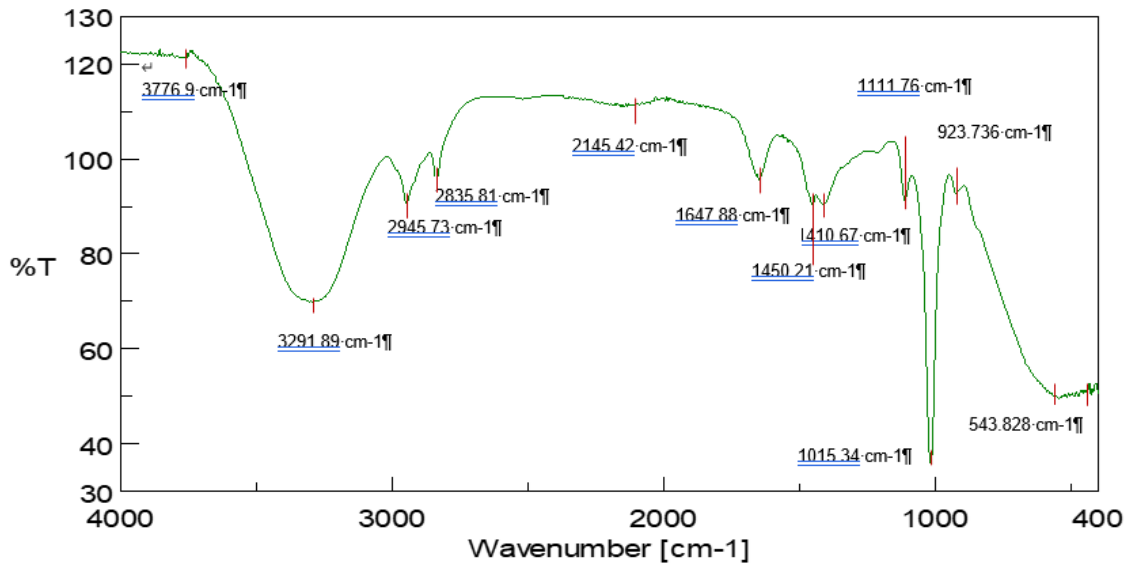


Şekil 4. 20. Katekolat tipi siderofor testi için Arnov testi ve (b) Hidroksamat tipi siderofor için karışımın Csáky testi sonuçları

Birleştirilen fraksiyonlardaki siderofor varlığı 2,3-DHBA ve desferrioksamin içeren standartı ile ters faz HPLC kullanılarak araştırılmıştır (Schwabe ve ark., 2018). Katekolat analogu olan 2,3-DHBA standartının kromatogramında görülen %98.8 oranındaki en yüksek pik, kullanılan maddenin 21.6 dakika sonra kolondan ayrıldığını göstermektedir. Desferrioksamin içeren Desferal standartının kromatogramı incelendiğinde ise maddenin 26.6 dakika sonra kolondan ayrıldığı ve %58.8 oranında en yüksek pik olduğu görülmektedir (Ekler). İki standart kromatografisi incelendiğinde Desferal standartının 2,3-DHBA standartına göre daha fazla safsızlık içerdiği görülmektedir. Bu safsızlıkların sebebinin ilacın içerisindeki diğer maddelerin varlığı olduğu düşünülmektedir. Katekolat tipi siderofor tayini yapılan benzer bir çalışmada, ters faz HPLC analizi 244 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiş ve sideroforun 1.95 dakikada kolondan ayrıldığı gözlemlenmiştir (Bharucha ve ark., 2011).

Saflaştırılmış iki farklı fraksiyon için HPLC analizi yapıldığında 2.8 dk, 3 dk, 3.4 dk, 3.9 dk, 5.1 dk, 8.6 dakikalarda aynı pikler görülmektedir. Bir fraksiyonda bu dakikalar haricinde 4.1 ve 11.4 dakikalarda farklı ayrılmalar da gözlemlenmiştir. Gerçekleştirilen HPLC analizi değerlendirildiğinde katekolat analogu 2,3-DHBA ve hidroksamat analogu Desferal standartlarıyla eşleşme görülmemiştir (Ekler). Ancak, CAS metodunda siderofor deneylerinin pozitif çıkması ve incelenen bir saflaştırılmış fraksiyon kromatografında yeni piklerin gözlemlenmesi, farklı tür siderofor olabileceğini düşündürmektedir. Ters Faz HPLC analiz sonuçlarının yetersiz olması sebebi ile diğer analiz yöntemleri ile desteklenmiştir.

Sideroforların karakterizasyonu için kullanılan yöntemlerden birisi FTIR analizidir. Şekil 4.21’de verilen FTIR spektrumu değerlendirildiğinde 3291 cm^{-1} da O-H gerilmesine bağlı olarak alkol varlığına işaret etmektir, 1647 cm^{-1} da görülen pik C=C gerilmesine işaret etmektedir. 1111 cm^{-1} ve 1015 cm^{-1} da görülen pikler C-O gerilme titreşimine aittir ve yapıda eter, ester veya karboksilik asit varlığına işaret edebilir. 1410 cm^{-1} ve 1450 cm^{-1} pikleri aromatik C=C gerilme titreşimine veya C-H alifatik eğilme titreşimine ait olabilir. 2945 cm^{-1} ve 2835 cm^{-1} görülen pikler alifatik C-H bağlarının varlığına işaretir (Patel ve ark., 2009 ; Murugappan ve ark., 2011).

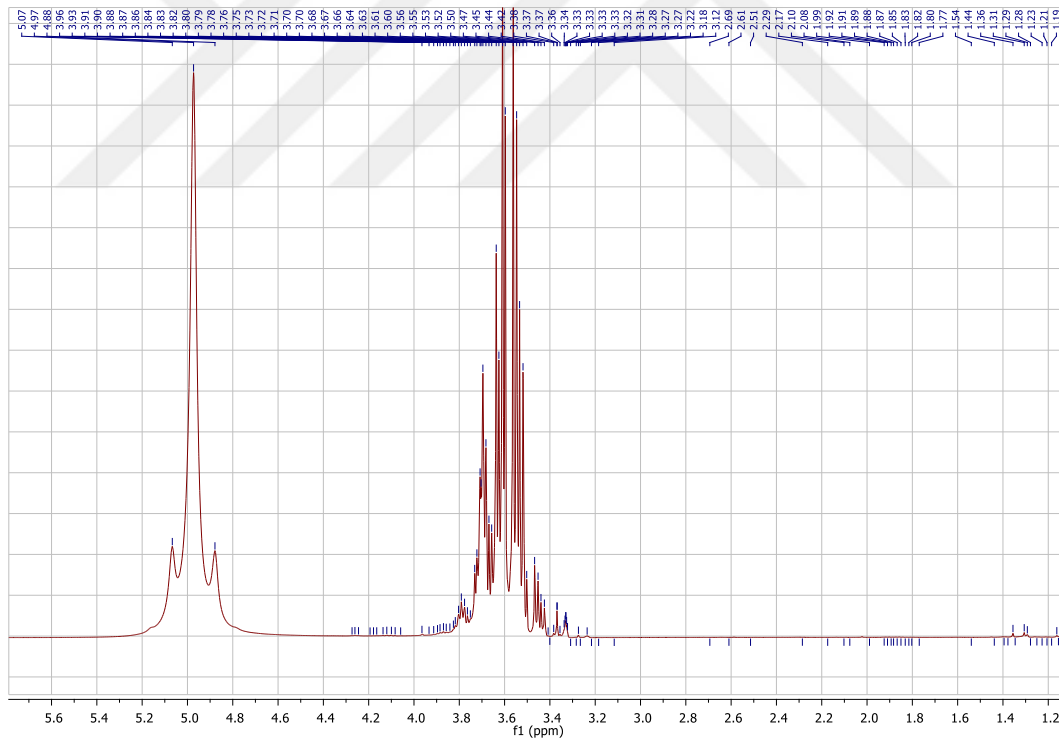


Şekil 4. 21. Saflaştırılmış siderofor örneğinin FTIR spektrumu

Şekil 4. 21’de verilen FTIR analizinde katekolat ve hidroksamat tipi siderofor varlığını destekleyecek bölgelerde pikler mevcuttur fakat gliserolün uzaklaştırılamaması ve önceki

analiz sonuçları göz önüne alındığında, görülen pikler besiyeri ile karşılaştırılmış ve 1410.67 cm^{-1} piki hariç diğer piklerin inoküle edilmemiş CDLIM besiyeri ile birebir örtüştüğü anlaşılmıştır. 1410.67 cm^{-1} 'de görülen pikin varlığı tek başına aromatik grubun varlığı için bir kanıt teşkil edemez.1

Siderofor karakterizasyonu ile ilgili olarak yapılan ^1H -NMR spektrumları incelendiğinde 5.0 - 4.9 ppm arasında güçlü bir OH piki olduğu görülmektedir (Şekil 4. 22). Bu pikin CDLIM besiyerinde kullanılan gliserolün OH gruplarından, sudan ve dötero metanolün OH grubundan kaynaklı olduğu düşünülmektedir. 3.5 - 3.6 ppm arasında görülen diğer güçlü multiplet pikin ise gliserolün -CH ve -CH₂ gruplarına ait olduğu anlaşılmaktadır (Lameiras ve ark., 2011). Ayrıca aromatik bölgede 7.7 – 7.0 ppm arasında küçük bir –OH piki görülmektedir ve bu pikin yine besi yerinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Aromatik bölgede siderofora ait bir pikin bu pikin altında kalmış olması olasıdır.

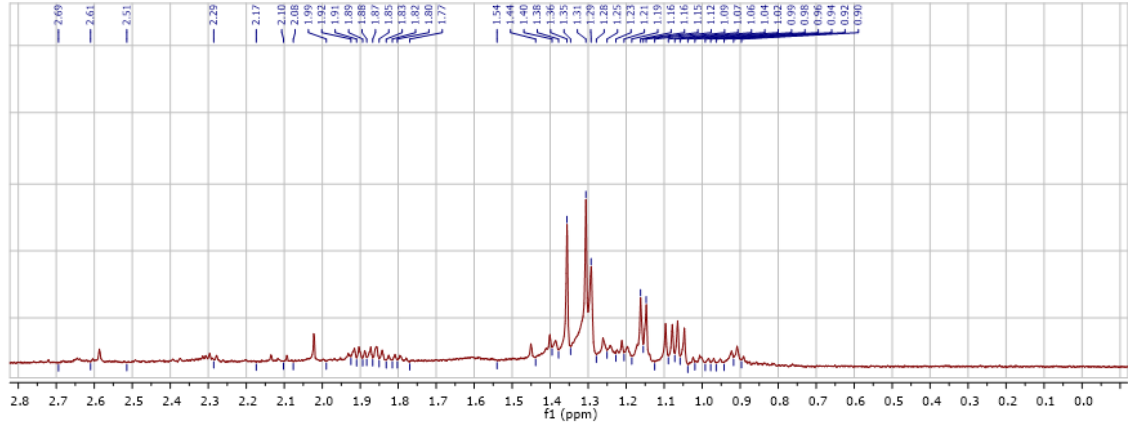


Şekil 4. 22. ^1H -NMR analizin tüm spektrumları

Ayrıca, 3.3 ppm'de CD_3OD çözücüsüne ait zayıf bir pik görülmekle birlikte, -CH₃, -CH₂ ve -CH gruplarını kapsayan alifatik bölgeyi kapsayan 2.5 – 1 ppm arasında çok sayıda zayıf pikler görülmüştür. Besiyerinden kaynaklı olduğu gözlemlenen 1.3 ppm ve 1.36

ppm pikleri haricindeki diğer piklerin besiyerinin ^1H -NMR sonuçları ile karşılaştırıldığında besiyeri kaynaklı olmadığı anlaşılmıştır.

Aromatik bölgenin –OH piki ile kaplanması katekolat siderofor varlığı hakkında bilgi vermese de alifatik bölgedeki zayıf piklerin görünmesi az miktarda hidroksamat olabileceğini düşündürmektedir (Şekil 4.23).



Şekil 4. 23. Alifatik bölgede görülen zayıf pikler

Zayıf piklerin 18. saatte üretilen ancak saflaştırılmayan 18. Saat (turuncu) sideroforunun parçalanmasından kaynaklı olabileceği ihtimaller arasındadır.

Kimyasal ve kromatografik yöntemlerle gliserolün uzaklaştırılması ile sideroforun varlığı net olarak tespit edilebilse de tez süresinin ve bütçesinin kısıtlı olması nedeniyle laboratuvarımızda eş zamanlı gerçekleştirilen 2020/108 numaralı Bilimsel Araştırma Projesi kapsamında varlığı çeşitli analizlerle kanıtlanan *Lactobacillus plantarum* BHC03 suşundan elde edilmiş olan katekolat tipi ile nanopartikül aşamasına devam edilmiştir.

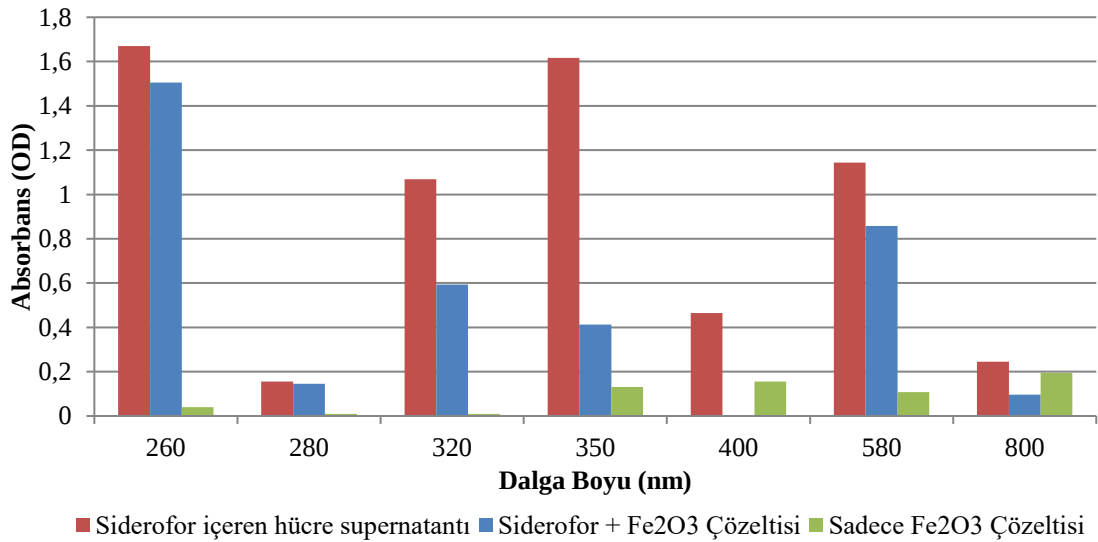
4.4. Yeşil Sentez ile Biyolojik Demir Nanopartikül (FeNP) Sentezi

2020/108 numaralı Bilimsel Araştırma Projesi kapsamında varlığı çeşitli analizlerle kanıtlanan *L. plantarum* BHC03 suşu 37 °C’de 48 saat boyunca büyütülmüş ve daha önce anlatıldığı gibi 120 saatlik biyolojik nanopartikül sentez protokolü izlenerek nanopartikül sentezlenmiştir (Şekil 4.24). Güçlü mıknatıs ile kontrolü sağlanan partiküllerin orta şiddetinde manyetik özellik gösterdiği gözlemlenmiştir. Literatür incelendiğinde, hematitlerin zayıf ferromanyetik özellik gösterdiği bildirilmektedir (Bayrak, 2012).



Şekil 4. 24. Katekolat tipi siderofor süpernatantı ile sentezlenen biyolojik FeNP'lerin petrideki görüntüsü

Sentezlenen FeNP'lerin spektrofotometrik olarak varlığının hızlıca gösterilmesi amacıyla optimum optik yoğunluğu çalışması yapılmıştır. Optimizasyon sürecinde Şekil 4.25'de görüldüğü üzere 260 nm, 280 nm, 400 nm, 580 nm ve 800 nm dalga boyundaki ölçümleri gerçekleştirilen FeNP'lerin spektrumları incelendiğinde yalnızca siderofor içeren karışım ile siderofor + Fe_2O_3 kompleksinin oluşturduğu karışımın arasında fazla fark gözlemlenmezken, 320 nm ve 350 nm dalga boylarında yapılan ölçümlerde büyük ölçüde fark olduğu gözlemlenmiştir. Bu farkın siderofor ile Fe_2O_3 'ün kompleks bir yapı oluşturarak serbest demir miktarındaki azalış kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

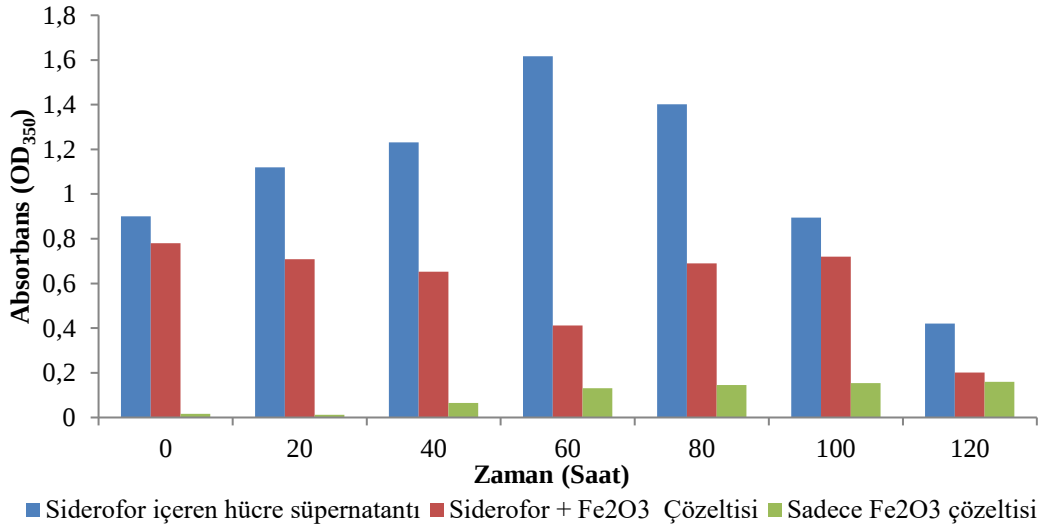


Şekil 4. 25. Sentezlenen biyolojik FeNP'lerin optik yoğunluk (OD) optimizasyonu

Yapılan literatür çalışmalarında da demir nanopartiküller için 200 – 400 nm aralığında absorbans değerleri kabul edilmiştir. UV bölgesinin ($< 400\text{nm}$) yakınında görünen tepe noktaları elektronik geçişlerden (Fe^{+3} ligand alan geçişleri) kaynaklanıyor olabilmektedir

(Farahmandjou ve Soflaee, 2015). Absorbans 200–300 nm aralığında görülen zirve α - Fe_2O_3 nanopartiküllerinin morfolojisi ile ilgilidir (Wang ve ark., 2007). UV bölgesindeki soğurma bölgesinin (ultraviyole bölge) yoğunluğunun her zaman görünür bölgedekinden daha yüksek olduğunu bildirilmiştir (Luna ve ark., 2016). Şekil ve literatür incelemesi sonucu 350 nm'deki farkın 320 nm'den fazla olması sebebi ile optimum değerin 350 nm dalga boyu olduğuna, dolayısıyla *L. plantarum* BHC03'e ait katekolat tipi sideroforun nanopartikül haline getirildiğinin kontrolünün 350 nm'de yapılabileceği belirlenmiştir.

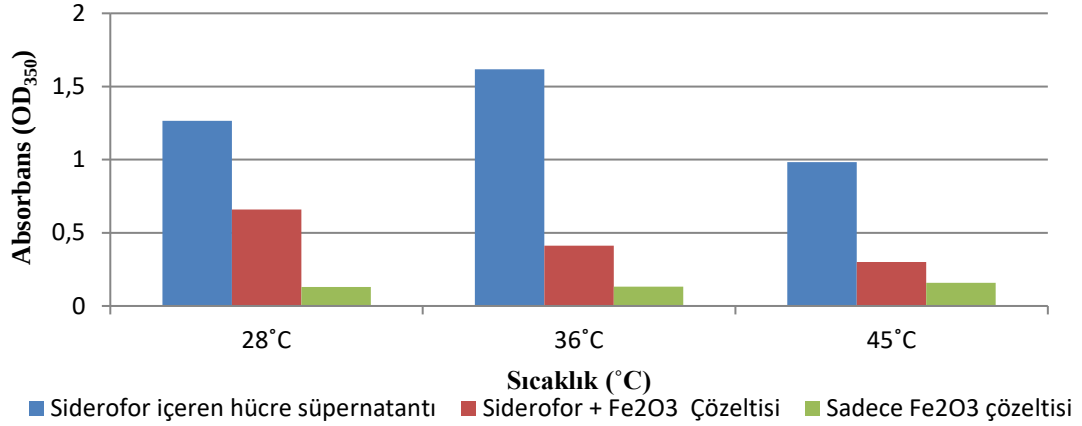
Nanopartikül sentezi esnasında inkübasyon süresinin nanopartikül oluşumu üzerindeki etkisini araştırmak ve optimum inkübasyon süresini belirlemek amacıyla, yapılan çalışmada siderofor içeren hücre süpernatantı en yüksek absorbans değeri 60. Saatte görülmüş ve ardından düşüşe geçmiştir (Şekil 4.26). Siderofor + Fe_2O_3 kompleksi ile siderofor içeren hücre süpernatantı arasındaki en yüksek fark 60. Saat olduğu görülmüş ve optimum zaman olduğu kararlaştırılmıştır. Sadece Fe_2O_3 çözeltisi zaman aralıklarında sabit görülmüştür.



Şekil 4. 26. Sentezlenen biyolojik FeNP'lerin zaman optimizasyon grafiği

Sundram ve arkadaşlarının 2012'de ki çalışmaları referans alınarak gerçekleştirilen çalışmada 80. saatte elde edilen biyolojik nanopartikül optimum zaman olarak bildirilmiştir. Buna istinaden, optimizasyon süresinde 60. Saate yakın absorbans değerinde olması sebebiyle 80. saat nanopartikülleri de karakterize edilmiştir.

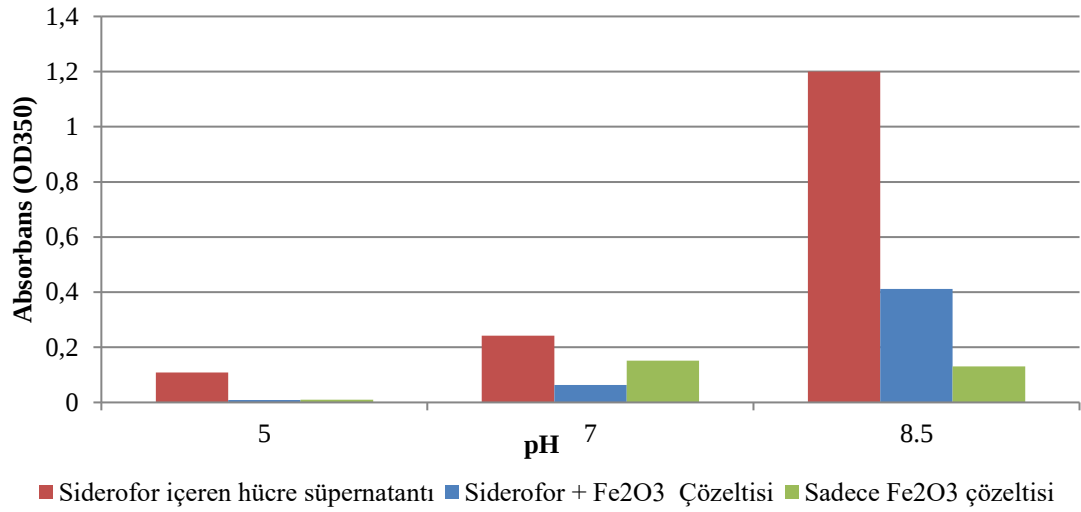
Sıcaklığın nanopartikül oluşumu üzerine etkisini araştırmak amacıyla yapılan çalışma sonucu elde edilen Şekil 4.27 incelendiğinde, siderofor içeren supernatantın 36 °C sıcaklıkta en yüksek absorbans değeri gösterdiği görülmüştür. Siderofor + Fe₂O₃ çözeltisinin OD₃₅₀'de 28 °C sıcaklıkta en yüksek absorbans değeri gösterdiği ve sıcaklık arttıkça düştüğü görülmektedir.



Şekil 4. 27. Sentezlenen biyolojik FeNP'lerin sıcaklık optimizasyon grafiği

Fe₂O₃ içeren ve içermeyen çözelti karşılaştırıldığında en büyük fark 36 °C sıcaklıkta görülmektedir. Sebebinin siderofora tutunan demir miktarının fazla olmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Sonuç değerlendirildiğinde 36 °C sıcaklığın optimum sıcaklık olduğu kararlaştırılmıştır.

pH'in nanopartikül oluşumu üzerine etkisini araştırmak için 36°C'de sentezlenip 60. saatte kurutulan FeNP'lerin, absorbans değerlerini veren Şekil 4. 28 incelendiğinde pH 5 ve pH 7'de siderofor içeren süpernatantın oldukça az absorbans verdiği gözlemlenirken, pH 8.5'te absorbansın oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Siderofor + Fe₂O₃ kompleksinin OD ölçümlerinde ise yine benzer şekilde pH 8.5'e göre pH 5 ve pH 7'de oldukça az absorbans görülmektedir. Veriler karşılaştırıldığında en fazla fark pH 8.5'te görülmektedir bu nedenle de optimum pH değeri pH 8.5 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4. 28. Sentezlenen biyolojik FeNP'lerin pH optimizasyon grafiği

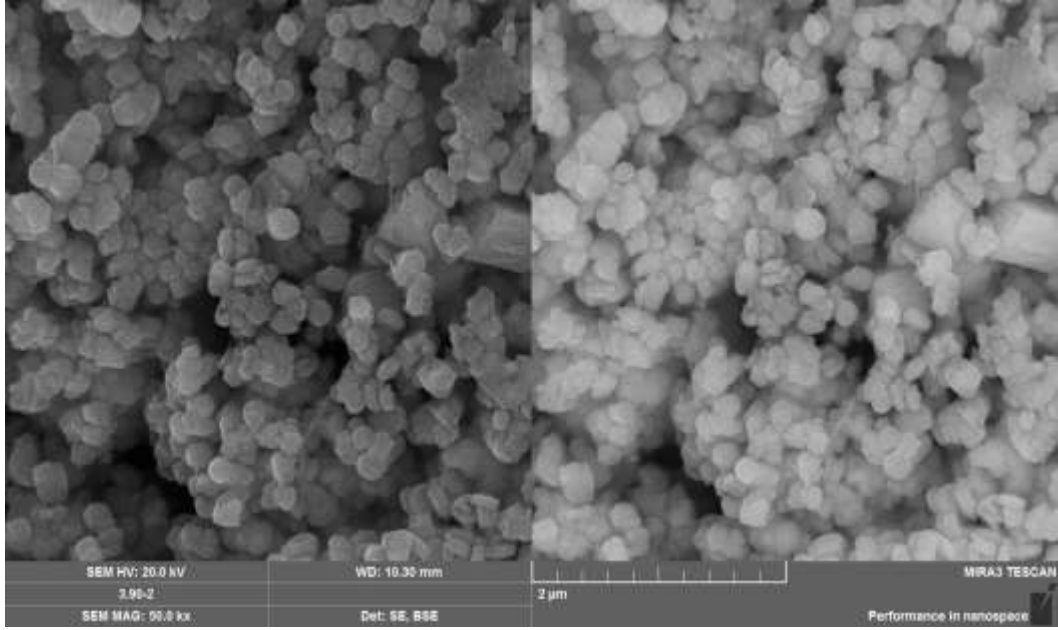
Yapılan çalışmalarda siderofor ile kaplanmış demir nanopartiküllerin pH:6–12 aralığında daha fazla verim verdiğini bildirilmiştir (Raju ve ark., 2017). Yapay siderofor – Fe³⁺ iyon kompleksleri ile modifiye edilmiş altın nanopartikül üretiminin yapıldığı bir çalışmada, bu nanopartiküllerin seçici olarak mikroplar üzerine adsorbe olduğu ve seçici agregasyonu başlattığını bildirilmiştir. Ayrıca mikropların toplanması, sideroforla modifiye edilmiş kuvars kristali mikro terazi (QCM) sensörleri kullanılarak ölçüldüğünde, algılama hassasiyetinin artmasına yol açtığını da bildirilmiştir (Inomata ve ark., 2014).

4.5. Biyolojik Demir Nanopartiküllerin (FeNP) Karakterizasyonu

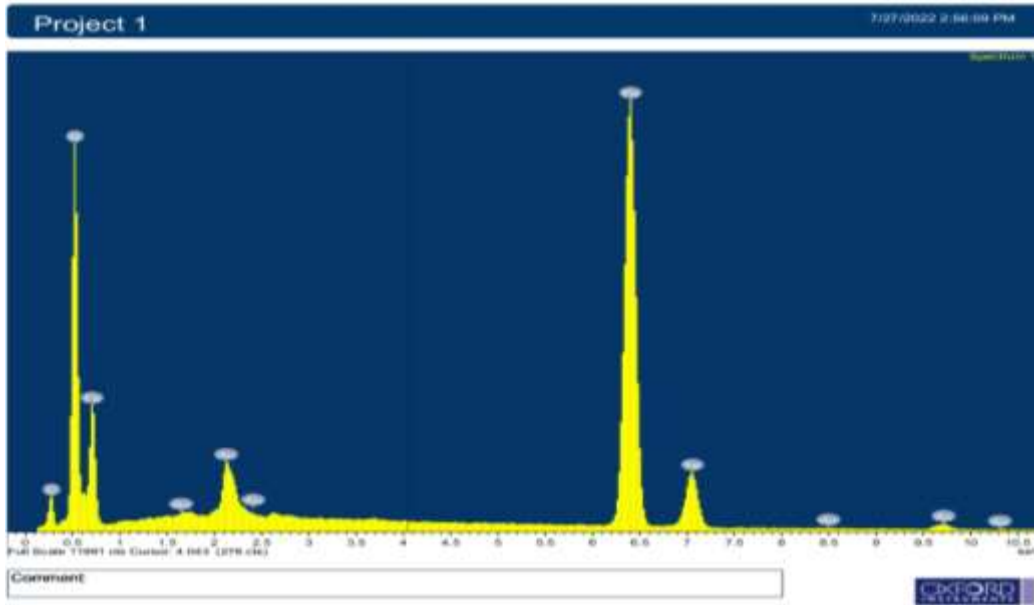
Fe₂O₃ ile sentezlenen biyolojik demir nanopartiküllerin yüzey morfolojisinin anlaşılması için topografik görüntü analizi, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile gerçekleştirilmiştir. SEM analizi sırasında yüzey malzemesinin elementel bileşimini elde etmek amacıyla enerji dağıtıcı x-ışını spektroskopisi (EDX) yapılmıştır. Sentezlenen nanopartikül yüzeyinin özelliklerine dair alınan görüntüler Şekil 4. 29 ve Şekil 4. 31'de verilmiştir. Elementel bileşimini gösteren EDX sonuçları ise Şekil 4.30 ve Şekil 4.32'de gösterilmiştir.

Altın kaplama yöntemi ile gerçekleştirilen EDX analizi sonuçlarında gözlemlenen altın elementine ait pikler ihmal edilmiştir.

Şekil 4.31'deki SEM görüntüsü incelendiğinde, nanopartiküllerin birbirleriyle temas halinde bulunan ve yaklaşık 90-250 nm çaplarında agromelere küresel formlarda olduğu tespit edilmiştir.



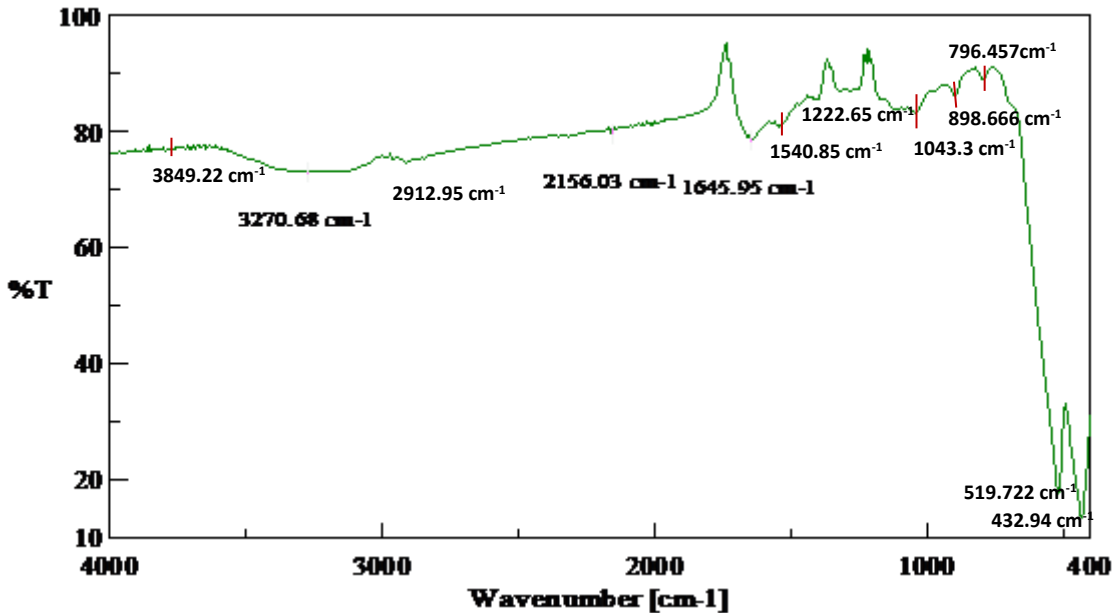
Şekil 4. 31. 80. Saat FeNP'lerinin SEM görüntüsü



Şekil 4. 32. 80. Saat FeNP'lerin EDX spektrumları

Şekil 4.32'deki EDX spektrumları incelendiğinde sentezlenen nanopartikülün yapısında ağırlıkça %40.69 demir, %46.34 oksijen ve %12.97 karbon varlığı, istenilen demir nanopartikülün üretildiğini kanıtlanmıştır. Yine EDX spektrumlarından nanopartikülün yapısında atomik olarak %15.48 demir, %61.56 oksijen ve %22.96 karbon varlığı belirlenmiştir. Ayrıca EDX sonuçlarında karbon piklerinin varlığı biyolojik olarak hücre dışı sentez (siderofor) kaynaklı karbon varlığını işaret etmektedir. Altın kaplama yöntemi ile gerçekleştirilen EDX analizi sonuçlarında gözlemlenen altın elementine ait pikler ihmal edilmiştir. Bu sonuçlara göre hem 60 hem de 80. saatlerde nanopartikül üretimi gerçekleşmiştir.

İki farklı saatte de üretilen nanopartiküllerin biyosentezinde görev alan fonksiyonel gruplarının belirlenmesi için FTIR analizi yapılmıştır. Şekil 4.33'te görülen 60. saat biyolojik FeNP analiz sonuçlarında 3270 cm^{-1} piki zayıf $-\text{OH}$ grubunun varlığını, 2912 cm^{-1} piki alifatik C-H bandını ifade etmektedir. 1645 cm^{-1} ve 1540 cm^{-1} pikleri sırasıyla amid I ve amid II bantları bulunduğunu, 1278 ve 1222 cm^{-1} deki pik C-O ve COOH gerilimini ifade etmektedir. 1042 cm^{-1} 'deki pik ise C-O gerilimini işaret etmektedir (Lim ve ark., 2009).

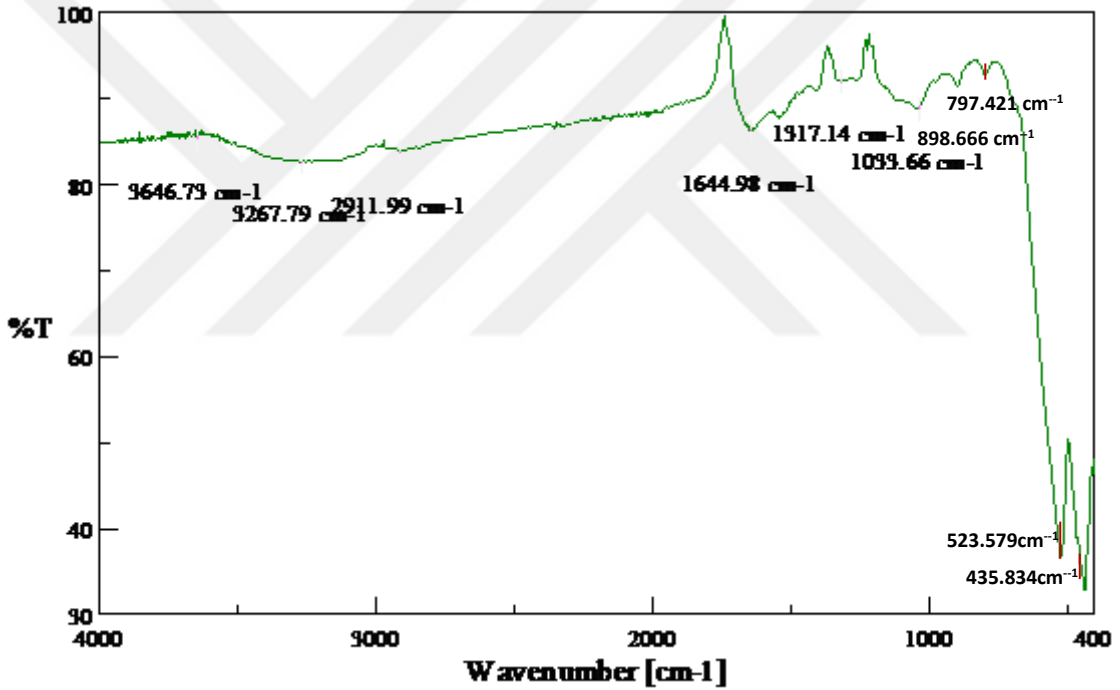


Şekil 4. 33. 60. Saat FeNP'lerin FTIR analiz sonucu

FTIR spektrumlarına 519 ve 432 cm^{-1} 'deki bantlar $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 'ün karakteristik özelliklerine karşılık gelir ve bu tepe noktaları Fe – O gerilim titreşimlerini temsil etmektedir. 519 cm^{-1} 'deki yüksek frekans bandı, hematitin oktahedral ve tetrahedral bölgelerindeki Fe-O

deformasyonuna bağlanabilirken, 432 cm⁻¹'deki düşük frekans bandı, hematitin oktahedral bölgesindeki Fe-O deformasyonu kaynaklı olabilmektedir (Mirzaei ve ark., 2016; Li ve ark., 2016; Karakoç, 2013).

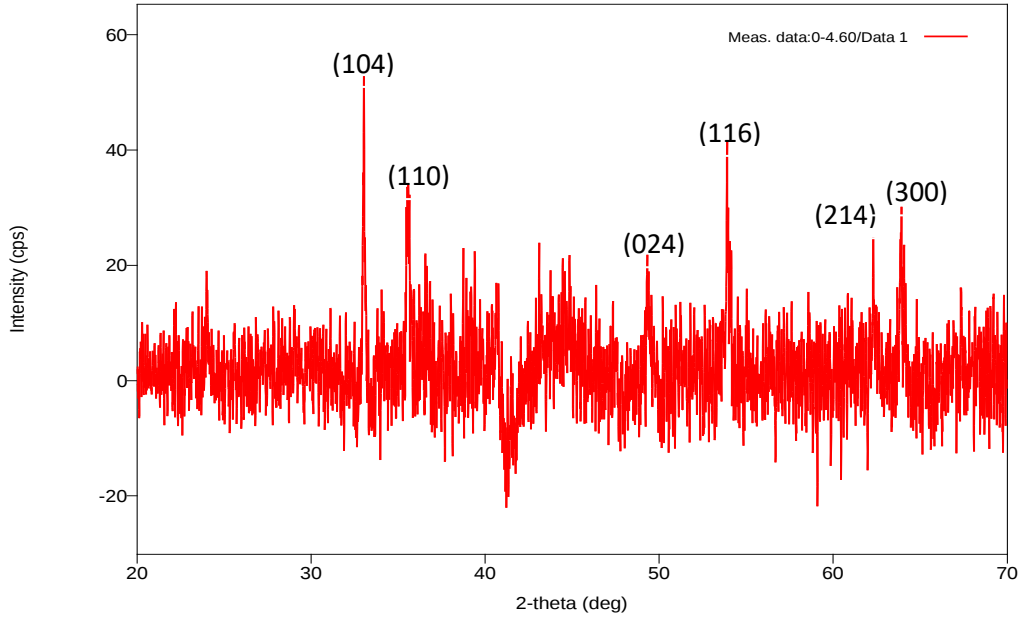
80. saat biyolojik FeNP analiz sonuçlarının verildiği Şekil 4. 34'te görülen 3267 cm⁻¹ piki zayıf bir -OH gerilimini, 1644 cm⁻¹ C=O gerilimini, 1317 cm⁻¹'deki pik kaymış olan C-O ve benzer şekilde 1033 cm⁻¹'deki piki C-O gerilimini ifade etmektedir (Lim ve ark., 2009). Yeşil sentez ile elde edilmiş olan demir nanopartiküllerin karakteristik spektrumları olan 523 ve 435 cm⁻¹'deki tepe noktaları, FeNP'lerin varlığını ortaya koyan Fe – O gerilim titreşimlerini temsil etmedir.



Şekil 4. 34. 80. Saat FeNP'lerin FTIR analiz sonucu

L. plantarum BHC03 sideroforu ile biyolojik olarak sentezlenen FeNP'lerin kristallografik özelliklerinin ve içerdikleri fazların belirlenmesi amacı ile XRD analizi gerçekleştirilmiştir. 60. Saatte elde edilen nanopartikül ile yapılan analiz sonuçlarının verildiği Şekil 4. 35'te gösterilen Fe₂O₃ ile sentezlenmiş olan biyolojik demir nanopartikülün 60. saat XRD spektrumu standart ile eşleştirildiğinde (JCPDS 33 - 0664) 2θ karakteristik yansıma pikleri sırasıyla 33.05°, 35.61°, 49.32°, 53.89°, 62.35°, 63.93°'de görülmektedir. İndeks değerleri ise sırasıyla (104), (110), (024), (116), (214), (300) düzlemlerini ifade etmektedir (Cao ve ark., 2011). İndex değerleri incelendiğinde (104)

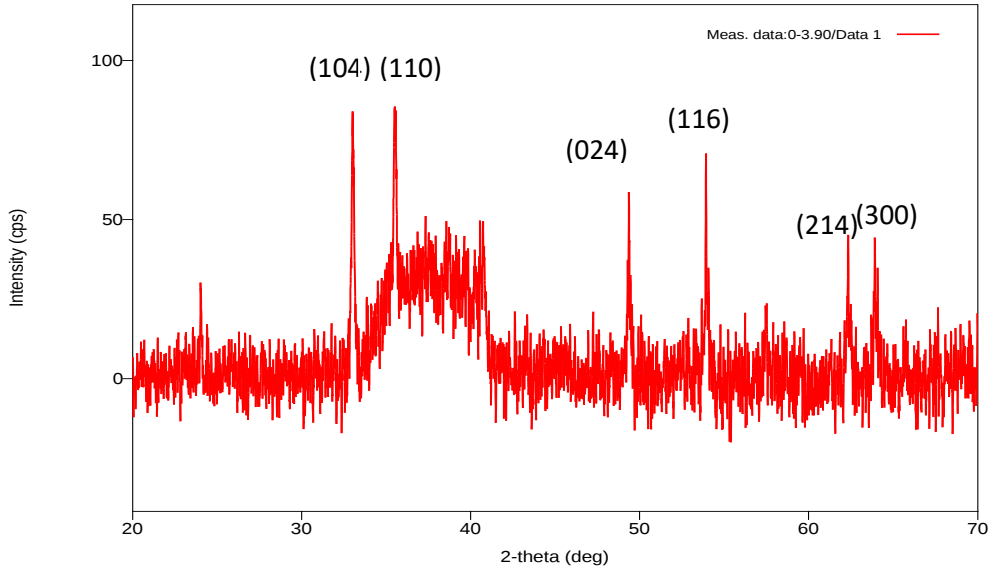
kırınımının tepe yoğunluğunun diğer tepe noktalarına oranla daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu, Fe_2O_3 'ün oldukça kristal yapıda olduğunu göstermektedir (Kızıldaş, 2021).



Şekil 4. 35. 60. Saatte alınan FeNP'lerin XRD sonuçları

Ayrıca XRD analizi ile elde edilen tüm kırınım piklerinin literatür değerleri ile tutarlı olan hekzagonal (altıgen) yapıya sahip olduğu görülmektedir (Qurashi ve ark., 2010). Şiddetin azaldığı ve kaymaların meydana geldiği görülmektedir, sebebinin siderofor varlığı olabileceği düşünülmektedir. 60. saatte elde edilen biyolojik demir nanopartiküllerin boyutu Scherrer denklemi ile hesapladığında ortalama ϕ ap 86 nm olarak belirlenmiştir.

Şekil 4. 36'da gösterilen Fe_2O_3 ile sentezlenen biyolojik demir nanopartikülün 80. saat XRD spektrumu 2 θ karakteristik yansıma pikleri benzer şekilde sırasıyla 33.02°, 35.53°, 49.37°, 53.87°, 62.43°, 63.85°'de olduğu görülmektedir. İndeks değerleri ise sırasıyla (104), (110), (024), (116), (214), (300) düzlemlerini ifade etmektedir. İndex değerleri incelendiğinde yine (104) kırınımının tepe yoğunluğunun diğer tepe noktalarına oranla daha yüksek olduğu görülmekte ve α - Fe_2O_3 'ün oldukça kristal yapıda olduğu anlaşılmaktadır. 60. Saat FeNP'ye benzer şekilde bu piklerin üretilen biyolojik demir nanopartiküllerin kristal yapıda olduğu ancak 33° - 40° arasında hafif genişleme ve amorf piklerin de olduğu görülmektedir.

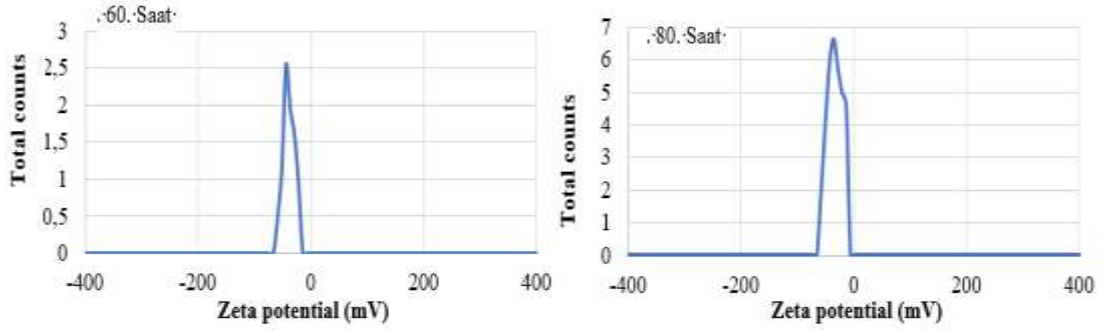


Şekil 4. 36. 80. Saatte alınan FeNP'lerin XRD sonuçları

Ayrıca, tüm kırınım piklerinin literatür değerleri ile tutarlı olan hekzagonal (altıgen) yapıya sahip olduğu görülmektedir. Şiddetin azaldığı ve kaymaların meydana geldiği görülmektedir, sebebinin siderofor varlığı olabileceği düşünülmektedir. 80. saatte üretilen siderofor demir nanopartiküllerin boyutu Scherrer denklemi ile hesapladığında ortalama çap 67 nm olarak belirlenmiştir.

İki XRD sonucu değerlendirildiğinde birbiriyle ve literatür ile uyumlu sonuçlar görülmüştür. Benzer bir çalışmada, α -Fe₂O₃ ile üretilmiş demir nanopartiküllerin 97 nm olduğu görülmüştür (Kızıлтаş, 2021).

Sentezlenen FeNP yüzeyindeki elektrik yükünün ölçülmesi ve koloidal FeNP'lerin yük kararlılığının miktarının belirlenmesi amacıyla 60 ve 80. saatlerde üretilen siderofor nanopartiküllerin Zeta Potansiyel Ölçümü ile ilgili veriler sırasıyla Şekil 3. 49 ve Şekil 4.37'de verilmiştir. Buna göre 60. Saatte elde edilen demir nanopartikülün zeta potansiyeli -43.9 mV değerinde iken, 80. Saatte elde edilmiş olan demir nanopartikülün zeta potansiyeli -35 mV olduğu görülmüştür.



Şekil 4. 37. 60. Saat ve 80. Saat FeNP’lerin zeta potansiyel sonuçları

Bu değer anyonik kararlılık ajanın kordinasyonunu göstermekle birlikte, negatif yüklerin birbirini itmesi ile kararlılık sağlanırken aynı zamanda demir nanopartikülün agromelere yapısını engellemeye yöneliktir.

Tüm karakterizasyon sonuçları değerlendirildiğinde, sentezlenen demir nanopartiküllerin literatür ile uyumlu olduğu görülmekle birlikte, 350 nM optik yoğunlukta ölçüm alınmak üzere, 36 °C sıcaklıkta, pH 8.5’te, 180 rpm çalkalama hızı ile 60. saatte elde biyolojik demir nanopartikülün optimum değerde olduğu gözlemlenmiş ve arsenik gideriminde araştırılmasına karar verilmiştir.

4.6. Biyolojik Demir Nanopartikül ile Ağır Metal Giderimi

Tez kapsamında sentezlenen demir nanopartikülün arsenik giderimindeki rolü araştırılmıştır. Bu bağlamda 60. saat FeNP’leri tarafından tutulan arsenik miktarları Tablo 4.3’te verilmiştir.

Yapılan analiz sonucunda biyolojik olarak sentezlenen FeNP konsantrasyonu arttıkça, arsenik miktarının azaldığı gözlemlenmiştir. Siderofor ile desteklenmiş demir nanopartiküllerin arsenik gideriminde faydalı olduğu görülmüştür.

Tablo 4. 3. Arsenik ile farklı konsantrasyonlardaki FeNP'lerin muamele edilmesi sonucu sonucunda gözlemlenen arsenik miktarı

Arsenik Konsantrasyonu (mg/L)	Siderofor NP'ün adsorpsiyonu sonrası ortamda bulunan Arsenik Miktarı (mg/kg)	
	1. Deneme	2. Deneme
0.5 mg/L	-0,087	-0,101
1 mg/L	-0,09	-0,113
1.5 mg/L	-0,097	-0,116
2 mg/L	-0,099	-0,118

Sideroforun arsenat stresindeki bakterinin büyümedeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, bakterilerin arsenik indirgeme etkinliği de değişen siderofor konsantrasyonundan önemli ölçüde etkilendiğini, yüksek siderofor konsantrasyonunun arsenata karşı daha yüksek direnç sağladığını bildirilmiştir (Ghosh ve ark., 2015). Arseniğe dirençli *Staphylococcus* sp. TA6 tarafından üretilen sideroforun arsenik ile kirlenmiş yeraltı suyuna adaptasyonda faydalı olduğu, üretilen sideroforun arsenat stresinde bakterinin büyümesine olanak sağladığını bildirilmiştir (Das ve Barooah, 2018).

Raju ve arkadaşlarının 2017'de yayımladığı çalışmasında siderofor kaplı manyetik demir nanopartiküllerin sudaki Al^{3+} giderimini araştırılmış ve Fe_3O_4 nanopartikülünün mıknatıslık özelliği sayesinde Al^{3+} miktarının azaldığını bildirmişlerdir.

Farklı bir çalışmada manyetit ve hematit nanopartiküllerinin güçlü adsorpsiyon, büyük geciktirme faktörü ve dirençli desorpsiyon şartlarında, kumlu topraktaki arseniği kendi yerinde tekniklerle gidermek için kullanılma potansiyeline sahip olduğunu bildirmektedir (Shipley ve ark., 2010).

Bu tez çalışması, toprak ve suda bulunan ve canlılar ciddi tehlikelere sebebiyet veren arseniğin, biyoremediasyon uygulamalarında alternatif yöntem olarak sideroforların hücre dışı sentezi ile elde edilen biyolojik demir nanopartiküllerin kullanılabileceğini kanıtlanmıştır.

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, topraktan izole edilmiş olan mikroorganizmaların siderofor üretim kapasiteleri araştırılarak, siderofor üreten mikroorganizmalardan en uygun olanı seçilip kimliklendirilmesinin ardından, optimum siderefor üretimi gerçekleştirilmesi sağlanarak, siderofor süpernatantı ile Fe_2O_3 muamele edilmesiyle birlikte biyolojik demir nanopartikül sentezlenmiştir. Karakterizasyonu sağlanan biyolojik demir nanopartiküllerin, belirlenmiş konsantrasyonda arsenik içeren sudaki ağır metal giderimi araştırılmıştır.

Tez kapsamında, siderofor üretici mikroorganizmanın belirlenmesi amacıyla Tokat Kemalpaşa bölgesinden ve Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesinin bazı bölgelerinden alınan toprak örnekleri MM9 besiyerinde zenginleştirilerek 27 saf koloni elde edilmiştir. Elde edilen saf kolonilerin gram boyama ile morfolojik incelemeleri gerçekleştirilmiş ve siderofor üretim kapasiteleri araştırılmak üzere CAS (Chrome azurol sulfonate) metodu uygulanmıştır. 37° sıcaklıkta 2 gün inkübasyon sonucunda CAS agarda turuncu zon gözlemlenen örnekler pozitif sonuç olarak değerlendirilerek, CAS metodu (1500 μl süpernatant + 300 μl CAS boyası + 20 μl sülfosalik asit) uygulanmış ve UV-Spektrofotometre OD_{630} 'da absorbans değerleri ölçülmüştür. Absorbans değerleri ve renk değişimleri incelendiğinde gram boyamada gram (-) basil olduğu gözlemlenen 4 numaralı mikroorganizmanın, CAS metodu sonucu mor renk olduğu ve 0,410 absorbans değeri verdiği görülmüş ve CDLIM (Chemically Defined Low-Iron Medium) besiyerinde siderofor üretim kapasitesi araştırılmıştır. CDLIM besiyerine inoküle edilen 4 numaralı mikroorganizmanın CAS metodu tamamlandıktan sonra $[(\text{Ar} - \text{As})/\text{Ar}] \times 100$ formülü uygulanarak %65 siderofor üretimi gerçekleştirdiği görülmüştür. Ayrıca CAS metodu sürecinde örneklerin, turuncu ve mor renge dönüştüğü gözlemlenmiş, tez kapsamında iki farklı sideroforun araştırılmasına karar verilmiştir.

Siderofor üretiminin gerçekleştirildiğine emin olunduktan sonra siderofor üretici mikroorganizmanın kimliklendirilmesi gerçekleştirilmiştir. 16s RNA gen dizi analizi gerçekleştirilen 4 numaralı mikroorganizmanın, %99.8 benzerlik göstererek *C. turicensis* sp. olduğu kesinleştirilmiştir ve tez kapsamında BHC04 suşu olarak adlandırılmıştır. Tanılanan *C. turicensis* bakterilerinin maksimum siderofor üretim kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla iki farklı siderofor için, optik yoğunluk (OD), sıcaklık, pH, FeCl_3 ,

karbon ve azot optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Turuncu renk gözlemlenen 1. Sideroforun optimum koşullarının, 400 nm optik yoğunlukta, 37 °C sıcaklıkta, pH 8.5'te, 0 µl FeCl₃ konsantrasyonunda, karbon kaynağı olarak gliserol, azot kaynağı olarak amonyum klorür (NH₄Cl) olduğu belirlenmişken, mor renk gözlemlenen sideroforun optimum koşullarının, 580 nm optik yoğunlukta, 37 °C sıcaklıkta, pH 6.5'te, 0 µl FeCl₃ konsantrasyonunda, karbon kaynağı olarak gliserol, azot kaynağı olarak amonyum klorür (NH₄Cl) olduğu belirlenmiştir. Optimizasyon sürecinde *C. turicensis* BHC04 suşundan elde edilen sideroforların FeCl₃ stresinde üremeye devam ettiği gözlemlenmiştir. Ayrıca tüm optimizasyon deneylerinde, literatürde desteklendiği gibi biyofilm oluşumu da gözlemlenmiştir.

Optimizasyon öncesi siderofor üretim yüzdesi %65 iken, optime edilen koşullarda siderofor üretimi gerçekleştirildiğinde 1. Sideroforun üretim yüzdesi %5 artarak %70'e ulaştığı, 2. Sideroforun üretim yüzdesi %29 artarak %94'e ulaştığı görülmüştür. %94 üretim yüzdesine ulaşılan 2. Sideroforun büyük ölçekli üretimi gerçekleştirilmesinin ardından liyofilizatör cihazında liyofilize edilerek konsantre olması sağlanmıştır. CDLM besiyerinde üretimi sağlanan sideroforun karbon kaynağında kullanılan gliserol kaynaklı liyofilizasyon süresinin normale göre uzun sürdüğü ve sonucunda bir miktar gliserol kaldığı gözlemlenmiştir.

Konsantre olmuş siderofor örnekleri 1 ml metanolde çözündürülmesinin ardından büret yardımıyla Sephadex LH-20 dolgulu kolona yüklenerek saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. 50 fraksiyon toplanarak tamamlanan saflaştırma işleminin ardından CAS metodu uygulanmış ve hem renk değişimleri hem de OD₅₈₀'de absorbans ölçümleri değerlendirildiğinde pembe renkli olan ve yüksek absorbans piki veren 5 – 20. fraksiyonlar birleştirilmiştir. Saflaştırılmış sideroforun tipini belirlemek amacıyla Arnov ve Csáky, karakterizasyonunu belirlemek amacıyla, HPLC, FTIR ve ¹H-NMR analizleri yapılmıştır.

Katekolat tipi sideroforların tayini için gerçekleştirilen Arnov testi sonucunda siderofor birim yüzdesinin %76 olduğu, hidroksamat sideroforların tayini için gerçekleştirilen Csáky testi sonucunda siderofor birim yüzdesinin %48 olduğu görülmüştür. 28. Saat sideroforunun mor renk olması katekolat siderofora işaret olduğu için sonuç ile uyumludur. Fakat Csáky testinin pozitif çıkması 18. Saatte gözlemlenen hidroksamat tipi

sideroforun yeniden üretildiğini ancak zaman ve ortam koşulları sebebiyle parçalandığını düşündürmektedir.

Siderofor karakterizasyonunu belirlemek amacıyla gerçekleştirilen Ters Faz HPLC analizi sonucunda, saflaştırılmış olan sideroforun katekolat analogu olan 2,3-DHBA standartı ve hidroksamat ailesine ait desferrioksamin içeren desferal standartı ile eşleşme görülmemiştir. Ancak, 4.1 ve 11.4 dakikalarda görülen ayrılmalar farklı tür siderofor olabileceğini düşündürmektedir. FTIR spektrumları incelendiğinde, katekolat ve hidroksamat tipi siderofor varlığını destekleyecek bölgelerde spektrumlar görünse de, bu piklerin inoküle edilmemiş CDLM besiyeri ile örtüşmesi ve gliserol pikinin altında kalan piklerin ayırt edilememesi sebebi ile FTIR analizi kesin sonuç vermemiştir. Fakat 1410.67 cm^{-1} de görülmüş olan spektrum, aromatik grubu temsil ettiği için katekolat siderofor varlığına işaret etmektedir. $^1\text{H-NMR}$ spektrumları incelendiğinde ise, aromatik bölgenin $-\text{OH}$ piki ile kaplanması sebebiyle katekolat tipi siderofor varlığı kanıtlanamamıştır. Alifatik bölge olan 1.05 ppm, 1.16 ppm, 1.29 ppm, 1.45 ppm, 2.05 ppmde zayıf pikler görülmüştür, bu da hidroksamat tipi sideroforun var olabileceğini düşündürse de tam olarak kanıtlanamamıştır.

Karakterizasyon sonucunda gliserolün girişim etkisi nedeni ile 2020/108 numaralı Bilimsel Araştırma Projesi kapsamında katekolat tipi siderofor ürettiği bilenen ve varlığı kanıtlanmış olan *L. plantarum* BHC03 suşu ile biyolojik demir nanopartikül (FeNP) sentezlenmiştir. BHC03 süpernatantı ile Fe_2O_3 muamelesi ile sentezlenen biyolojik demir nanopartiküllerin optimum optik yoğunluğu, sıcaklığı, zamanı ve pH'ı belirlenmiştir. Biyolojik FeNP'lerin 350 nm optik yoğunlukta absorbans verdiği, 36°C sıcaklıkta, 60. Ve 80. Saatte ve pH 8.5'te optimum sonuç verdiği görülmüştür. Ayrıca FeNP'lerin kiremit renginde ve zayıf ferromanyetik özellikte olduğu anlaşılmıştır. Optimum şartları belirlenen biyoloji FeNP'lerin karakterize edilmek üzere, aynı şartlar altında 60. Saat ve 80. Saat nanopartikülü üretilmiştir.

Sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyonunu sağlamak için SEM, EDX, FTIR, XRD ve Zeta potansiyel ölçüm analizleri gerçekleştirilmiştir. 60. Saat FeNP'lerin 80-200 nm çaplarında agromelere küresel yapıda olduğu, 80. Saat FeNP'lerin ise 90-250 nm çaplarında yine agromelere küresel yapıda olduğu görülmüştür. Her iki FeNP'nin EDX analizinde Fe, O ve C varlığı kanıtlanmıştır. (C varlığı siderofor kaynaklı olduğu

düşünülmektedir) Her iki FeNP'nin FTIR sonuçları incelendiğinde, katekolat bölgelerinde ve Fe_2O_3 karakteristik bölgelerinde görülen spektrumlar siderofor ile üretilen biyolojik demir nanopartikülün başarıyla sentezlendiğini kanıtlamıştır. XRD spektrumları değerlendirildiğinde 60. Saat FeNP'lerinin ortalama çapın 86 nm olduğu, 80. Saat FeNP'lerinin ortalama çapın 67 nm olduğu belirlenmiştir. Ayrıca her iki FeNP'nin de hekzagonal ve kristal yapıda olduğu anlaşılmıştır. Ancak 80. Saatteki FeNP'de 33-40° aralığında amorf yapılar da gözlemlenmiştir. Analizde şiddetin azaldığı ve ufak çaplı kaymalar olduğu tespit edilmiştir. Zeta potansiyel ölçümü yapıldığında, 60. Saat nanopartikülün zeta potansiyelinin -43.9 mV olduğu, 80. Saat nanopartikülünün -35 mV olduğu görülmüştür. Karakterize edilmiş FeNP'ler değerlendirilerek 60. Saat FeNP ile arsenik giderimi araştırılmıştır.

Eşit miktarda arsenik içeren su örneklerine, farklı konsantrasyonlarda eklenen biyolojik FeNP'lerin arsenik miktarını ne ölçüde değiştirdiği araştırılmıştır. Arsenik ile biyolojik FeNP muamelesini takiben inkübasyon sonucunda ICP analizi gerçekleştirilmiş ve FeNP miktarı arttıkça arsenik miktarının azaldığı görülmüştür. Böylelikle, siderofor + FeNP kompleksinin arsenik gideriminde başarılı olduğu kanıtlanmıştır.

6. REFERANSLAR

- 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 Science, 5(4): 546-552.
- Acer Ö., 2014. Petrolle kirlenmiş topraklardan petrolü parçalayan bakterilerin izolasyonu ve karakterizasyonu. Doktora Tezi, sayfa 25.
- Ackrill P, Ralston AJ, Day JP, Hodge KC., 1980. Successful removal of aluminium from patient with dialysis encephalopathy. Lancet. 1980 Sep 27;2(8196):692-3.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2007. Toxicological profile for Arsenic, Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Ahmed E. and Holmström S. J. M. 2014. Siderophores in environmental research: roles and applications. Microbial Biotechnology 7(3), 196–208.
- Akçay F. A. ve Avcı A. 2018. Bakteriyel Yollarla Metal Nanopartiküllerin Sentezi. Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 6(4): 408-414, 2018.
- Ali S. S. and Vidhale N.N. 2013. Bacterial Siderophore and their Application: A review Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci 2(12): 303-312.
- Anastas, P.T. and Warner, J.C., 2000. Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford University Press, New York.
- Apaydın A., 2005, Sanayiden Kaynaklanan Toprak Kirliliğinin Araştırılması: Samsun-Tekkeköy Bölgesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 4-6.
- Arabi M., Ostovan, A., Ghaedi, M., Purkait, M. K., 2016. Novel strategy for synthesis of magnetic dummy molecularly imprinted nanoparticles based 65 on functionalized silica as an efficient sorbent for the determination of acrylamide in potato chips: optimization by experimental design methodology, Talanta, 154 526-532.
- Arnou, L. E., 1937. Colorimetric Determination of the components of 3,4 dihydroxyphenyl alaninetyrosine mixtures. Journal of Biological Chemistry, 118, 531–537.
- Arze, R. S., Parkinson, I. S., Cartilidge, N. E. F., Britton, P. and Ward, M. K. 1981. Reversal of aluminium dialysis encephalopathy after desferrioxamine treatment. Lancet. 2, 1116.
- Asamudo, N.U. – Daba, A.S. – Ezeronye, O.U. 2005. Bioremediation of textile effluent using *Phanerochaete chrysosporium*. In *African Journal of Biotechnology*, vol. 4, no. 13, pp. 1548–1553.
- Atlas R. M. 2004. Handbook of Microbiological Media. Üçüncü baskı, sayfa 951.
- Aydın B., 2014. *Brevibacillus laterosporus* Türündeki Siderofor Üretiminin Belirlenmesi ve Civa, Nikel, Kobalt, Demir Ağır Metalleri Varlığındaki Değişimi. Yüksek Lisans Tezi. Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze.

- Bahadar M.M.S., Jamal A., Faisal M.A.M., 2011. Iron oxidenanoparticles, Nanomaterials.
- Başok N., 2019. Fe₃O₄ Kaplı Aktif Karbon İle Arsenik Giderimi, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, sayfa 32.
- Bayrak A., 2012. Manyetik Nano Parçacıkların (Mnp) Kontrollü Sentezi Ve Yüzey Modifikasyonu İle Polimerleşme Tepkimelerinde Kullanılmaları. Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, sayfa 18.
- Bhateria, R., Singh, R. 2019. A review on nanotechnological application of magnetic iron oxides for heavy metal removal. Journal of Water Process Engineering,31:100845.
- Benz, G., Schroder, T., Kurz, J., Wunsche, C., Karl, W.,Steffens, G., Pfitzner, J., Schmidt, D. 1982. Konstitution der Desferriform der Albomycine d1, d2 and e. Angew. Chem. 94, 552-553 and Suppl. 1322-1335.
- Bergeron L., Burne R.A., 2001. “Roles of fructosyltransferase and levanase-sucrase of *Actinomyces naeslundii* in fructan and sucrose metabolism”, Infection and Immunity, 69, 5395–5402.
- Beşergil B., 2015. Enstrümantal Analiz Temel İlkeler Kitabı, IR Spektrumlar; Organik Fonksiyonel Grupların Tanımlanması (definition of functional groups) Bölümü.
- Beykaya M. ve Çağlar A. 2016. Bitkisel Özütler Kullanılarak Gümüş-Nanopartikül (AgNP) Sentezlenmesi ve Antimikrobiyal Etkinlikleri Üzerine Bir Araştırma, AKÜ FEMÜBİD 16 (2016) 035403 (631-641).
- Bharucha, U. D., Prajapati, V. S., Patel, K. C. And Trivedi, U. B. 2011. Catecholate Type Of Siderophore Production By *Enterobacter* Sp. Ub4 Isolated From The Rhizospheric Soil Of Alfalfa Plant. Journal of Cell and Tissue Research Vol. 11(3) 2967-2971.
- Bickel, H., Mertens, P., Prelog, V., Seibl, J., Walser, A. 1966. Über die Konstitution von Ferrimycin A1. Tetrahedron Suppl. 8/I, 171-179.
- Bissen, M., Frimmel, F.H. 2003. Arsenic–A review Part I: occurrence, toxicity, speciation, mobility. Acta Hydrochim. Hydrobiol. 1, 9-18. Brandhuber, P., Amy, G. 1998. Alternative methods for membrane filtration of arsenic from drinking water. Desalination. 117, 1-10. Brookins, D.G. 1988. Eh-pH diagrams for geochemistry. Springer-Verlag. Berlin.
- Bogner, A., Thollet, G., Basset, D., Jouneau, P.H. and Gauthier, C., 2005. Wet STEM: a new development in environmental SEM for imaging nano-objects included in a liquid phase, Ultramicroscopy, 104: 290-301. Doi: 10.1016/j.ultramic.2005.05.005.
- Bolade O. P., Williams A. B., Benson N. U., 2019. Green synthesis of ironbased nanomaterials for environmental remediation: A review, Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management.
- Boos, W., Eppler, T. 2001. Prokaryotic binding protein-dependent ABC transporters. In Microbial Transport Systems. Winkelman, G. (ed.). Weinheim: Wiley-VCH, pp. 77–114.

- Bouby, M. – Billard, I. – Maccordick, J. 1998. Complexation of Th (IV) with the siderophore pyoverdine A. In *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 273, pp. 206–210.
- Boukhalfa, H., Crumbliss, A.L., 2002. Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *BioMetals* .15: 325–339.
- Braud, A., Hannauer, M., Milsin, G.L.A., Schalk, I.J., 2009. The *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity. *Journal of Bacteriology*. 191(11): 3517–3525.
- Braun V, Pramanik A, Gwinner T ve ark., 2009. Sideromycins: tools and antibiotics. *Biomaterials* 2009;22:3-13.
- Breidbach, T., Scory, S., Krauth-Siegel, R.L., Steverding, D. 2002. Growth inhibition of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* by the iron chelator deferoxamine. *Int J Parasitol.* 32(4), 473 - 9.
- Brevard C., Granger P. 1981. *Handbook of High Resolution Multinuclear NMR*, p. 229, Ed. Young D.A. Seigler D.S., Wiley.
- Burton, M.O., Sowden and Lochhead, A.G. 1954. The isolation and nature of the terregens factor. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 32, 400- 406.
- Can M.M., Coşkun M., Fırat T., 2012. A comparative study of nanosized iron oxide particles; magnetite (Fe₃O₄), maghemite (γ-Fe₂O₃) and hematite (α-Fe₂O₃), using ferromagnetic resonance, *Journal of Alloys and Compounds*, Volume 542, 2012, Pages 241-247.
- Cantor, C.R. and Schimmel, P.R., 1980. *Techniques for the study of biological structure and function*, WH Freeman and Co., Oxford.
- Cao, R.-b., Chen, X.-q., Shen, W.-h., Long, Z., 2011. A facile route to synthesize nano-hematite colloid. *Materials Letters*, 65(21), 3298-3300.
- Capon R.J., Stewart M., Ratnayake R., Lacey E., Gill J.H., 2007. Citromycetins and bilains A–C: new aromatic polyketides and diketopiperazines from Australian marine-derived and terrestrial *Penicillium* spp, *Journal of Natural Products*, 70, 1746-1752.
- Carey, F. A and Sundberg, R. J., 2007. *Advanced Organic Chemistry Part A: Structure and Mechanisms*, Fifth Edition, USA: Springer Science + Business Media LLC, 518.
- Carranza P., Hartmann I., Lehner A., Stephan R., Gehrig P., Grossmann J., Barkow-Oesterricher S., Roschitzki B., Eberl L., Riedel K. 2009. Proteomic profiling of *Cronobacter turicensis* 3032, a food-borne opportunistic pathogen. *Proteomics* Jul;9(13):3564-79.
- Carroll C.S., and Moore M. M., 2018. Ironing out siderophore biosynthesis: a review of non-ribosomal peptide synthetase (NRPS)-independent siderophore synthetases. *Critical Reviews In Biochemistry And Molecular Biology*, Vol. 53, No. 4, 356–381.
- Carvalho C. C. C. R. and Fernandes P., 2014. Siderophores as “Trojan Horses”: tackling multidrug resistance. June 2014 ,Volume 5, Article 290 page; 2.

- Chaiham, M., Chunnaleuchanon, S., Kozo, A., Lumyong, S. 2008. Screening of rhizobacteria for their plant growth promoting activities. J. KMITL Sci. Tech 8, 18-23.
- Chaitanya.K, Mahmood.S., Ranakaasar, Sunil K. 2014. Polymer producing bacteria showing siderophore activity with chrome azurol S (CAS) agar plate assay. International Journal of Scientific and Research Publications, Volume 4, Issue 12, December 2014.
- Chaturvedi V.K., Kushwaha A., Maurya S., Tabassum N., Chaurasia H., Singh M.P., 2020. Wastewater Treatment Through Nanotechnology: Role And Prospects, Restoration of Wetland Ecosystem: A Trajectory Towards a Sustainable Environment, 227–247.10.1007/978-981-13-7665-8_14.
- Chauhan, R. P. S., Gupta, C. and Prakash, D., 2012. Methodological advancements in green nanotechnology and their applications in biological synthesis of herbal nanoparticles, International Journal of Bioassays, 1(7): 6-10.
- Chen, Y., Jurkewitch, E., Bar-Ness, E., Hadar, Y., 1994. Stability constants of *pseudobactin* complexes with transition metals. Soil Science Society of America Journal, 58, 390–396,.
- Chenu, J.W., Cox, J.M. 2009. *Cronobacter* ('*Enterobacter sakazakii*'): current status and future prospects. Letters in Applied Microbiology, 49: 153-159.
- Chua, A.C., Ingram, H.A., Raymond, K.N. and Baker, E. 2003. Multidentate pyridinones inhibit the metabolism of nontransferrin-bound iron by hepatocytes and hepatoma cells. European Journal of Biochemistry. 270, 1689- 1698.
- Coico R., 2005. Gram staining. Curr Protoc Microbiol. Page 22.
- Corbari, L., Cambon-Bonavita, M.-A., Long, G. J., Grandjean, F., Zbinden, M., Gaill, F. and Compère, P., 2008. —Iron oxide deposits associated with the ectosymbiotic bacteria in the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata*, Biogeosciences. 5 (5): 1295-1310. Doi: 10.5194/bgd-5-1825-2008.
- Cordero, OX., Ventouras, L., DeLong, EF., Polz, MF., 2012. Public good dynamics drive evolution of iron acquisition strategies in natural bacterioplankton populations. vol. 109 | no. 49 | 20063.
- Cornell R.M. ve Schwertmann U. 2003. The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses.
- Crosa J.H., Walsh C.T., 2002. Genetics ve assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66(33), 223-49.
- Csàky, T. Z., 1948. On the estimation of bound hydroxylamine in biological materials. Acta. Chern. Scand. 2, 450-454.
- Das VL, Thomas R, Varghese RT, Soniya EV, Mathew J, Radhakrishnan EK. 2014. Extracellular Synthesis of Silver Nanoparticles by the *Bacillus Strain* CS 11 Isolated from Industrialized Area. 3 Biotech, 4(2): 121-126.
- Das, S., Barooah, M. 2018. Characterization of siderophore producing arsenic-resistant *Staphylococcus* sp. strain TA6 isolated from contaminated groundwater of

- Jorhat, Assam and its possible role in arsenic geocycle. BMC Microbiology volume 18, Article number: 104.
- Dave B.P., Dube H.C., 2000, "Detection and chemical characterization of siderophores of De MeloPereira, G.V., Coelho, B.D.O., Junior, A.I.M., Thomaz-Soccol, V., Soccol, C.R., 2018.
- Davidson AL, Nikaido H. 1991. Purification and characterization of the membrane-associated components of the maltose transport system from *Escherichia coli*. J Biol Chem. 1991 May 15;266(14):8946-51. PMID: 2026607.
- Devatha, C. P., & Thalla, A. K. 2018. Green synthesis of nanomaterials. In Synthesis of inorganic nanomaterials (pp. 169-184).
- Dhandapani P, Maruthamuthu S, Rajagopal G. 2012. Bio-Mediated Synthesis of TiO₂ Nanoparticles and its Photocatalytic Effect on Aquatic Biofilm. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 110: 43-49.
- Dietrich S., Chandras S., Georgi C., Thomas S., Makarov D. ve ark., 2006. Design, characterization and magnetic properties of Fe₃O₄-nanoparticle arrays coated with PEGylated-dendrimers. Materials Chemistry and Physics 132 (2012) 292–299.
- Doble, D. M. J., Melchior, M., Sullivan, B., Siering, C., Xu, J., Pierre, V. C., Raymond, K. N. 2003. Toward Optimized High-Relaxivity MRI Agents: The Effect of Ligand Basicity on the Thermodynamic Stability of Hexadentate Hydroxypyridonate/Catecholate Gadolinium(III) Complexes Inorg. Chem. 42, 4930-4937.
- Doniach, S., 2001. —Changes in biomolecular conformation seen by small angle X-ray scattering, Chem Rev., 101: 1763-1778. Doi: 10.1021/cr990071k.
- Du J, Yi TH. 2016. Biosynthesis of Silver Nanoparticles by *Variovorax guangxiensis* THG-SQL3 and Their Antimicrobial Potential. Materials Letters, 178: 75-78.
- Durán N, Marcato PD, Durán M, Yadav A, Gade A, Rai M. 2011. Mechanistic Aspects in the Biogenic Synthesis of Extracellular Metal Nanoparticles by Peptides, Bacteria, Fungi, and Plants. Applied Microbiology and Biotechnology, 90(5): 1609-1624.
- Eisendle M., Schrettl M., Kragl C., Muller D., Illmer P., Haas H., 2006. The intracellular siderophore ferricrocin is involved in iron storage, oxidative-stress resistance, germination ve sexual development in *Aspergillus nidulans*. Eukaryot Cell. 5, 1596-1603.
- Elad, Y., and Baker, R. 1985. Influence of trace amounts of cations and siderophore-producing pseudomonads on chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum*. Ecol. Epidemiol. 75, 1047- 1052.
- Elbeshehy EK, Elazzazy AM, Aggelis G. 2015. Silver Nanoparticles Synthesis Mediated by New Isolates of *Bacillus* Spp., Nanoparticle Characterization and Their Activity Against Bean Yellow Mosaic Virus and Human Pathogens. Frontiers in Microbiology, 6: 1-13.
- Erer F., 2019. Bazı Sübstitüe Aromatik İmin Bileşiklerinin Sentezi Ve Yapı Analizleri. Yüksek Lisans Tezi, syf. 12.

- Espinosa, A., Corato, R.D., Kolosnjaj-Tabi, J., Flaud, P., Pellegrino, T., Wilhelm, C., 2016. ACS Nano 10, 2436–2446.
- Farahmandjou, M., and Soflaee, F. 2015. Synthesis and characterization of α -Fe₂O₃ nanoparticles by simple coprecipitation method. Phys. Chem. Res. 3(3):191–196.
- Faraji, M., Yamini, Y. and Rezaee, M., 2010. Magnetic nanoparticles: synthesis, stabilization, functionalization, characterization, and applications, Journal of the Iranian Chemical Society, 7(1): 1-37.
- Fariq A., Khan T., and Yasmin A., 2017. Microbial synthesis of nanoparticles and their potential applications in biomedicine. J. Appl. Biomed., vol. 15, no. 4, pp. 241– 248.
- Farmer J.J., Asbury M.A., Hickman F.W., Brenner D.J., 1980. The *Enterobacteriaceae* study group, *Enterobacter sakazakii*: A new species of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. Int. J. Syst. Bacteriol., 30, 3, 569-584.
- Feng, L.; Cao, M.; Ma, X.; Zhu, Y.; Hu, C., 2012. Superparamagnetic high-surface-area Fe₃O₄ nanoparticles as adsorbents for arsenic removal. J. Hazard. Mater. 217–218, 439–446.
- Ferguson, A.D., Koedding, J., Walker, G., Bos, C., Coulton, J.W., Diederichs, K., Braun, V. and Welte, W. 2001. Active transport of an antibiotic rifamycin derivative by the outer-membrane protein FhuA. Structure (Camb.). 9 : 707–716.
- Francis, J., Madinaveitia, J., Macturk, H., 1949. Isolation from Acid-Fast Bacteria of a Growth-Factor for *Mycobacterium johnei* and of a Precursor of Phthiocol. Nature 163, 365–366.
- Franco, A. A., Hu, L., Grim, C. J., Gopinath, G., Sathyamoorthy, V., Jarvis, K. G., Lee, C., Sadowski, J., Kim, J. & other authors 2011. Characterization of putative virulence genes on the related RepFIB plasmids harbored by *Cronobacter spp.* Appl Environ Microbiol 77, 3255– 3267.
- Franco, A. A., Kothary, M. H., Gopinath, G., Jarvis, K. G., Grim, C. J., Hu, L., Datta, A. R., McCardell, B. A. & Tall, B. D. 2011. Cpa, the outer membrane protease of *Cronobacter sakazakii*, activates plasminogen and mediates resistance to serum bactericidal activity. Infect Immun 79, 1578– 1587.
- Gehring A.M, Mori I, Perry R.D, Walsh C.T. 1998. The nonribosomal peptide synthetase HMWP2 forms a thiazoline ring during biogenesis of yersiniabactin, an iron-chelating virulence factor of *Yersinia pestis*. Biochemistry. 37: 11637–11650.
- Gehring A.M, Mori I, Walsh C.T., 1998. Reconstitution and characterization of the *Escherichia coli* enterobactin synthetase from EntB, EntE, and EntF. Biochemistry. Feb 24;37(8):2648-59.
- Ghosh, P., Rathinasabapathi, B., Teplitski, M., Ma LQ. 2015. Bacterial ability in AsIII oxidation and AsV reduction: relation to arsenic tolerance, P uptake, and siderophore production. Chemosphere. 138:995–1000.
- Gibson F, Magrath D. 1969. The isolation and characterization of a hydroxamic acid (aerobactin) formed by *Aerobacter aerogenes* 62-I. Biochim Biophys Acta. 192:175–184.

- Glick, B.R., Patten, C.L., Holguin, G. and Penrose, D.M. 1999. Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria. Imperial College Press. London.
- Goldstain, A., 1997. Handbook of Nanophase Materials, Marcel Dekker Inc, New York.
- Grim, C.J., Kothary, M. H., Gopinath, G., Jarvis, K.G., Jean-Gilles Beaubrun, J., McClelland M., Tall, M., Franco, A.A. 2012. Identification and Characterization of *Cronobacter* Iron Acquisition Systems. Appl Environ Microbiol. 2012 Sep; 78(17): 6035–6050.
- Grim, C. J., Kotewicz, M. L., Power, K. A., Gopinath, G., Franco, A. A., Jarvis, K. G., Yan, Q. Q., Jackson, S. A., Sathyamoorthy, V., 2013. Pan-genome analysis of the emerging foodborne pathogen *Cronobacter* spp. suggests a species-level bidirectional divergence driven by niche adaptation. BMC Genomics 14, 366.
- Gupta, V., Gupta, A. R. and Kant, V., 2013. Synthesis, characterization and biomedical application of nanoparticles, Science International, 1(5): 167-174. Doi: 10.5567/sciintl.2013.167.174.
- Güney, E., 2014. *Bacillus* Sp. Türlerinde Siderofor Üretimi Ve *Bacillus Cereus* Dsm 4312'De Siderofor Üretiminin Optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, sayfa 64.
- Gysin, J., Crenn, Y., Pereira, S. L., Breton, C., 1991. Siderophores as anti parasitic agents. US patent. 5, 192-807
- Hall, J.B., Dobrovolskaia, M.A., Patri, A.K. and McNeil, S.E., 2007. Characterization of nanoparticles for therapeutics, Nanomedicine (London), 2: 789-803. Doi: 10.2217/17435889.2.6.789.
- Hamdan, H., Weller, D., Thomashow, L. 1991. Relative importance of fluorescens siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4-80R. Applied and Environmental Microbiology 57(11), 3270-3277.
- Hammamchi H., 2019. Biyolojik Yollar İle Sentezlenen Organik/İnorganik Nanopartiküllerin Biyoaktivitelerinin Belirlenmesi Ve Tedavi Amaçlı Kullanımları.
- Harikrishnan H, Shine K, Ponmurugan K, Moorthy IG, Kumar RS 2014. In Vitro Eco-Friendly Synthesis of Cadmium Sulfide Nanoparticles Using Heterotrophic *Bacillus cereus*. Journal of Optoelectronic and Biomedical Materials, 6(1): 1-7. ISSN: 2066-0049.
- Harwood, L. M. and Claridge T. D. W., 2007. Introduction to Organic Spectroscopy, Oxford ; Oxford University Press, 24.
- Hasany, S.F., Ahmed, I., J, R., Rehman, A., 2012. Nanosci. Nanotechnol. 2, 148–158.
- Hershko C., 2002. Role of Iron Chelation Therapy in Thalassemia Major. 2002; 19(2): 121-126
- Holden V.I., Bachman M., 2015. Diverging roles of bacterial siderophores during infection. Biology Metallomics : integrated biometal science
- Holinsworth B., Martin J., 2009. Siderophore production by marine-derived fungi. BioMetals, 22(12), 625-632.

- Hu QP, Xu JG, 2011. A simple double-layered chrome azurol S agar (SDCASA) plate assay to optimize the production of siderophores by a potential biocontrol agent *Bacillus*. *Afr J Microbiol Res* 5:4321–4327
- Hu, Y., Wang, R., Wang, S., Ding, L., Li, J., Luo, Y., Wang, X., Shen, M., Shi, X., 2016. *Sci. Rep.* 6, 28325.
- Hughes, M.F. 2002. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol. Lett.* 133:1–16.
- Ianoul, A. and Johnston, L.J., 2007. Near-field scanning optical microscopy to identify membrane microdomains. *Methods Mol. Biol.*, 400: 469-480.
- Inomata, T., Murase, T., Ido, H., Ozawa, T., Masuda, H. 2014. Gold Nanoparticles Modified with Artificial Siderophore-Iron(III) Ion Complexes: Selective Adsorption and Aggregation of Microbes Using “Coordination Programming”. *The Chemical Society of Japan. Chem. Lett.*, 43, 1146–1148.
- Isabelle J. Schalk, Gaëtan L.A., Brillet M.K., 2012. Structure, Function and Binding Selectivity and Stereoselectivity of Siderophore–Iron Outer Membrane Transporters. Chapter Two, page; 39.
- Iversen, C., N. Mullane, B. Mccardel, B.D. Tall, A. Lehner, S. Fanning, R. Stephan and H. Joosten. 2008. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. dublinensis subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. lausannensis subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. lactaridi subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 58: 1442-1447.
- Jang H., Gopinath G.R., Negrete F., Weinstein L., Lehner A., Fanning S., Tall B.D., 2020. Chapter 15. *Cronobacter* spp. In: Morris J.G., editor. *Foodborne Infections and Intoxications*. 5th ed. Elsevier, Inc.; Cambridge, MA, USA.
- Jaradat, Z.W., Ababneh, Q.O., Saadoun, I.M., Samara, N.A., Rashdan, A.M. 2009. Isolation of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from infant food, herbs and environmental samples and the subsequent identification and confirmation of the isolates using biochemical, chromogenic assays, PCR and 16S rRNA sequencing. *BMC Microbiology*, 9: 225-236.
- Jaradat, Z.W., Al Mousa, W., Elbetieha A., Al Nabulsi, A., D Tall, B. 2014. *Cronobacter* spp.--opportunistic food-borne pathogens. A review of their virulence and environmental-adaptive traits. *J Med Microbiol* 2014 Aug;63(Pt 8):1023-1037.
- Jaradat, Z.W., Rashdan, A.M., Ababneh, Q.O., Jaradat, S.A., Bhunia, A.K. 2011. Characterization of surface proteins of *Cronobacter muytjensii* using monoclonal antibodies and MALDI-TOF Mass spectrometry. *BMC Microbiology*, 11: 148-161.
- Jayaseelan C, Rahuman AA, Kirthi AV, Marimuthu S, Santhoshkumar T, Bagava A, Rao KB. 2012. Novel Microbial Route to Synthesize ZnO Nanoparticles Using

- Aeromonas hydrophila* and Their Activity Against Pathogenic Bacteria and Fungi. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 90: 78-84.
- Jena S, Das B, Bosu R, Suar M, Mandal D. 2015. Bacteria Generated Antibacterial Gold Nanoparticles and Potential Mechanistic Insight. *Journal of Cluster Science*, 26(5): 1707-1721. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10876-015-0869-7>.
- Jin, J., Yang, F., Zhang, F., Hu, W., Sun, S., Ma, J., 2012. *Nanoscale* 4, 733–736.
- Johnstone, T.C., Nolan, E.M., 2015. *Daltons Trans.* 44, 6320–6339.
- Joseph, S., & et al., 2012. Comparative analysis of genome sequences covering the seven *Cronobacter* species. *PLoS One*, vol. 7, no. 11, pp. e49455.
- Joseph, S., Sonbol, H., Hariri, S., Desai, P., McClelland, M., Forysthe, S.J. 2012. Diversity of the *Cronobacter* genus as revealed by multilocus sequence Typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 50 (9): 3031-3039.
- Joshi, H. – Dave, R. – Venugopalan, V.P. 2014. Pumping iron to keep fit: modulation of siderophore secretion helps efficient aromatic utilization in *Pseudomonas putida* KT2440. In *Microbiology*, vol. 160, pp. 1393–400.
- Karakoç V., 2013. Arsenik Baskılanmış Nanopartiküllerle Çevre Sularından Arsenik Uzaklaştırılması, Doktora Tezi, sayfa 75,76.
- Karataş R., 2013. Toprak, Bitki Ve Su Örneklerinin Alımı Ve Laboratuvara Taşınma Teknikleri. Yüksek Lisans Tezi. Sayfa, 16.
- Keating TA, Marshall CG, Walsh CT. 2000. Reconstitution and characterization of the *Vibrio cholerae* vibriobactin synthetase from VibB, VibE, VibF, and VibH. *Biochemistry*. 39:15522–15530.
- Keel, C., Voisard, C., Berling, C. H., Kahir, G., and Defago, G. 1989. Iron sufficiency is a prerequisite for suppression of tobacco black root rot by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 under gnotobiotic conditions. *Phytopathology*. 79, 584-589.
- 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.
- Kharisov B.I., Rasika Dias H.V., Kharissova O.V., Manue IJime nez-Pe rez V., Olvera Pe rez B., Mun oz Flores B., 2012. Iron-containing nanomaterials: Synthesis, properties, and environmental applications, *RSC Adv.* 2 9325– 9358.
- Kızıldaş H. 2021. Orange G'nin Sulu Çözeltilerden Uzaklaştırılması için α -Fe₂O₃ Nanopartiküllerinin Adsorban Olarak Kullanılması; Adsorpsiyon, Kinetik ve Termodinamik Özellikleri. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi* Sayı 21, S. 43-52.
- Kloepper, J.W., Leong, J., Teinize, M and Schroth, M.N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plantgrowth promoting rhizobacteria. *Nature*. 286, 885-886.
- Klug, H.P. and Alexander, L.E., 1974. *X-ray Diffraction Procedures for Poly-crystallite and Amorphous Materials*, 2nd ed., Wiley, New York.
- Ko H.S., Tindwa H., Jin R.D., Lee Y.S., Hong S.H., Hyun H.N., Nam Y., Kim K.Y. 2011. Investigation of Siderophore production and Antifungal activity against

- Phytophthora capsici as related to Iron (III) nutrition by Lysobacter antibioticus HS124. Korean J. Soil Sci. Fert. 44(4), 650-656.
- Konetschny-Rapp S, Jung G, Meiwes J, Z€ahner H. 1990. Staphyloferrin A: a structurally new siderophore from staphylococci. Eur J Biochem. 191:65–74.
- Konz, D., and Marahiel, M.A. 1999. Production of a polyketide natural product in nonpolytases generate structural diversity? *Chem. Biol.*,6, R39–R48.
- Körçoban S., 2020. Toprak İzolatı Bacillus Sp. Türlerinde Siderofor Optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Sayfa 15.
- Kucerova, E., Joseph, S., Forysthe, S. 2011. The *Cronobacter* genus: ubiquityand diversity. Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, 3: 104-122.
- Lameiras, P., Boudesocque, L., Mouloungui, Z., Renault, J.H., Wieruszeski, J.M., Lippens, G., Nuzillard, J.M. 2011. Glycerol and glycerol carbonate as ultraviscous solvents for mixture analysis by NMR. Journal of Magnetic Resonance, Volume 212, Issue 1, 2011, Pages 161-168, ISSN 1090-7807.
- Lampis S, Zonaro E, Bertolini C, Bernardi P, Butler CS, Vallini G. 2014. Delayed Formation of Zero-Valent Selenium Nanoparticles by Bacillus mycoides Sete01 as A Consequence of Selenite Reduction Under Aerobic Conditions. Microbial Cell Factories, 13(1): 35. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-35>.
- Lateef, A., Ojo SA, Akinwale AS, Azeez L, Gueguim-Kana EB, Beukes LS. 2015. Biogenic Synthesis of Silver Nanoparticles Using Cell-Free Extract of *Bacillus safensis* LAU 13: Antimicrobial, Free Radical Scavenging and Larvicidal Activities. Biologia, 70(10): 1295-1306.
- Lesuisse, E., Blaiseau P.L., Dancis A., Camadro J.M., 2001. Siderophore uptake and use by the yeast Saccharomyces cerevisiae. Microbiology, 147, 289-298.
- Lewin, 1984. How microorganism transport Iron. Science. 225, 401-402.
- Li, X., Honghao, Y., Xiangxin, X. 2016. Extraction of Iron from Vanadium Slag Using Pressure Acid Leaching. Procedia Environmental Sciences, 31, 582-588.
- Lim, S.F. Zheng, Y.M. Chen, J.P. 2009. Organic arsenic adsorption onto a magnetic sorbent. Langmuir, 25, 4973–4978.
- Lin H, Fischbach MA, Liu DR, Walsh CT., 2005. In vitro characterization of salmochelin and enterobactin trilactone hydrolases IroD, IroE, and Fes. J Am Chem Soc. 2005 Aug 10;127(31):11075-84.
- Litwin, C. M., and Calderwood, S. B. 1993. Role of iron in the regulation of virulence genes. Clin. Microbiol. Rev. 6, 137-149.
- Liu, Y. M. 2005. TCE Dechlorination Rates, Pathways, and Efficiency of Nanoscale Iron Particles with Different Properties. *Environ. Sci. Technol.*, 39, 1338-1345.
- Liu, D., Li, C., Zhou, F., Zhang, T., Zhang, H., Li, X., Duan, G., Cai, W. & Li, Y., 2015. Rapid synthesis of monodisperse Au nanospheres through a laser irradiation -induced shape conversion, self-assembly and their electromagnetic coupling SERS enhancement, Sci. Rep., 5: 7686.
- Loper, J. E., and Buyer, J. S. 1991. Siderophores in microbial interactions of plant surfaces. Mol.Plant-Microbe Interact. 4, 5-13.

- Loper J., Bender C, Rangaswamy V., 1999. Polyketide Production By Plant-Associated Pseudomonads. *Annu Rev Phytopathol.* 1999; 37:175-196. doi: 10.1146/annurev.phyto.37.1.175. PMID: 11701821.
- Louden BC, Haarmann D, Lynne A.M. 2011. Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *J Microbiol Biol Educ.*;12(1):51–3.
- Luna, C., Cuan-Guerra, A. D., Barriga-Castro, E. D., Núñez, N. O., and Mendoza-Reséndez, R. 2016. Confinement and surface effects on the physical properties of rhombohedral-shape hematite (α -Fe₂O₃) nanocrystals. *Mater. Res. Bull.* 80:44–52.
- Magnusson, M.D., Malm, J. K., Bovin, J. and Samuelson, L., 1999. "Gold nanoparticles: production, reshaping, and thermal charging", *J. Nanoparticle Res.*, 1: 243-251.
- Mahimairaja, S., Bolan N. S., Adriano D. C., Robinson B., 2005. Arsenic contamination and its risk management in complex environmental settings. *Advances in Agronomy*, 86, 1-82.
- Maiti D., Sujatha Devi P., 2015. Selective formation of iron oxide and oxyhydroxide nanoparticles at room temperature: Critical role of concentration of ferric nitrate, *Materials of Chemistry and Physics*. 154-144-151.
- Mandal B. K, Suzuki K T. Arsenic round the world: a review *Talanta* 58 (2002) 201–235.
- Mandal M., Kundu S., Ghosh S. K., Panigrahi S., Sau T. K., Yusuf S.M., Pal T., 2005. *Journal of Colloid and Interface Science* 286, 187–194.
- Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K. and Kim, S.K., 2014. Actinobacteria mediated synthesis of nanoparticles and their biological properties: a review, *Crit. Rev. Microbiol.*, 28: 1-13.
- Marahiel, M.A, Essen L.O. 2009. Nonribosomal peptide synthetases: mechanistic and structural aspects of essential domains. 1st ed. New York (NY): Elsevier Inc.; Chapter 13.
- Markus, J., Mathiyalagan, R, Kim, YJ, Abbai, R, Singh, P, Ahn, S, Yang, DC. 2016. Intracellular Synthesis of Gold Nanoparticles with Antioxidant Activity by Probiotic *Lactobacillus Kimchicus* DCY51 T Isolated from Korean Kimchi. *Enzyme and Microbial Technology*, 95: 85-93.
- Matschullat, J., 2000. Arsenic in the geosphere a review *The Science of the Total Environment* 249. 297]312.
- Mc Loughlin, T., Quinn, J., Bettermann, A., Bookland, R. 1992. *Pseudomonas cepacia* suppression of sunflower. *Pseudomonas cepacia*. Wilt fungus and role of antifungal compounds in controlling the disease. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(3), 1760-1763.
- McGrath, S.P., Chaudri, A.M., Giller, K.E., 1995. Long-term effects of metals in sewage sludge on soils, microorganisms and plants. *J. Ind. Microbiol.* 14(2), 94- 104.
- Meiwes, J, Fiedler HP, Haag H, Z€ahner H, Konetschny-Rapp S, Jung G. 1990. Isolation and characterization of staphyloferrin A, a compound with siderophore activity from *Staphylococcus hyicus* DSM 20459. *FEMS Microbiol Lett.* 67:201–205.

- Messenger, A.J.M. ve Ratledge, C. 1985. Siderophores. In: Moo-Young M (ed) Comprehensive biotechnology, vol 3. pp. 275–294. Pergamon Press. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67(4), 593–656.
- Miethke, M., and Marahiel, M. A. 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 71, 413–451.
- Mirzaei, A., Kamal, J., Babak, H., Seyyed, H., Maryam, B., Salvatore, L., Bonavita, A., and Giovanni, N. 2016. Synthesis and Characterization of Mesoporous α -Fe₂O₃ Nanoparticles and Investigation of Electrical Properties of Fabricated Thick Films. Processing and Application of Ceramics, 10(4), 209-217.
- Modi, P. Kaur, A., Kaur, M. ve V.K. Kapoor, 2012. Siderophores: A Novel Approach for Iron Removal. Int.J. Uni. Pharm. Life Sci. 2: 628-636.
- Mohan D. and Pittman Jr. C.U., 2007. Arsenic removal from water/wastewater using adsorbents-A critical review, Journal of Hazardous Materials, 142, 1- 53.
- Mohanpuria P., Rana N.K., Yadav S.K., 2008. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. Journal of Nanoparticle Research. 10(3):507-517.
- Moore RE, Emery T. 1976. Nalpha-acetylfusarinines: isolation, characterization, and properties. Biochemistry. 15:2719–2723.
- Möllmann U, Heinisch L, Bauernfeind A, 2009. Siderophores as drug delivery agents: application of the “Trojan Horse” strategy. Biometals 2009;2:615- 24.
- Muller G., Raymond K. 1984. Specificity and mechanism of ferrioxamine mediated iron transport in *Streptomyces pilosus*. J. Bacteriol., 160 (1) pp. 304-312.
- Murugappan, R.M., Aravinth, A., Karthikeyan, M. 2011. Chemical and structural characterization of hydroxamate siderophore produced by marine *Vibrio harveyi*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, Volume 38, Issue 2, 1 February 2011, Pages 265–273.
- Nadagouda M. N., Speth T.F, Varma R. S., 2011. Microwave-assisted green synthesis of silver nanostructures, Accounts of Chemistry Research, 44 (7) 469–478.
- Namlı, H., 2017. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi, (21.08.2018), <http://w3.balikesir.edu.tr/~hnamli/>
- Narayanan KB, Sakthivel N. 2010. Biological Synthesis of Metal Nanoparticles by Microbes. Advances in Colloid and Interface Science, 156(1): 1-13.
- Nayak PS, Arakha M, Kumar A, Asthana S, Mallick BC, Jha S. 2016. An Approach Towards Continuous Production of Silver Nanoparticles Using *Bacillus thuringiensis*. RSC Advances, 6(10): 8232-8242.
- Neilands J.B., 1993. Arch. Biochem. Biophys. 302 (1) 1–3.
- Nel, A.E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E.M.V., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., Thompson, M., 2009. Nat. Mater. 8, 543–557.
- Novack, B. ve Bucheli, T.D., 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment, Environ. Pollut., 150: 5-22.
- Nriagu, J. et al. 2007. Arsenic in soil and groundwater: an overview. Trace Metals and other Contaminants in the Environment., 9: 3–60.

- Ojo SA, Lateef A, Azeez MA, Oladejo SM, Akinwale AS, Asafa TB, Beukes LS. 2016. Biomedical and Catalytic Applications of Gold and Silver-Gold Alloy Nanoparticles Biosynthesized Using Cell-Free Extract of *Bacillus safensis* LAU 13: Antifungal, Dye Degradation, Anti-Coagulant and Thrombolytic Activities. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 15(5): 433-442.
- Oropeza, S., Corea, M. Gomez-Yanez, C., Cruz-Rivera, C., Navarro- Clemente, J. J. M. E., 2012. Zero-valent iron nano particles preparation. *Mater. Res. Bull.* 2012, 47, 1478–1485.
- Ozan S., Maden S., 2010. Funguslarda Siderofor oluşumu. *Selçuk Tarım ve Gıda Bilim Dergisi*, 24, 118-124.
- Özkan G., 2009, Endüstriyel Bölge Komşuluğunda Kıyısal Kırsal Alandaki Hava Kalitesi; Muallimköy’de Partikül Maddede ve Topraktaki Ağır Metal Kirliliği, Yüksek Lisans Tezi, GYTE Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze, 9,12-22.
- Pal, S., Alocilj, E.C., 2010. *Biosens. Bioelectron.* 26, 1624–1630.
- Pan, C., Hu, B., Li, W., Sun, Y., Ye, H., Zeng, X., 2009. Novel and efficient method for immobilization and stabilization of beta-d-galactosidase by covalent attachment onto magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 61, 208–215.
- Parab, H., Jung, C., Woo, M.A. and Park, H.G., 2011. An anisotropic snowflake-like structural assembly of polymer-capped gold nanoparticles, *J. Nanopart Res.*, 13: 2173-2180.
- Parashar, U. K., Saxena, P. S. and Srivastava, A., 2009. Bioinspired synthesis of silver nanoparticles, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 4(1):159-166.
- Patel A.K., Maroti K. Deshattiwar, Bhushan L. Chaudhari, Sudhir B. Chincholkar, 2009. *Bioresource Technology* 100, 368–373.
- Patel N.P., Shimpi G.G., Haldar S. 2020. Evaluation of heterotrophic bacteria associated with healthy and bleached corals of Gulf of Kutch, Gujarat, India for siderophore production and their response to climate change factors. *Ecological Indicators* 113 , 106219.
- Payne S. M., 1994. Detection, isolation and characterization of siderophores methods. *Methods in Enzymology*, 235, 329-342.
- Pérez-Miranda S, Cabirol N, George-Téllez R, Zamudio-Rivera LS, Fernández FJ. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *J Microbiol Methods*. 2007 Jul;70(1):127-31.
- Philpott C.C., Protchenko O., 2008. Response to iron deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 7, 20-27.
- Pietrorangelo, A., 2002. Mechanism of iron toxicity. In Hershko, C (Ed). *Iron Chelation Therapy*. New York : Kluwer Academic / Plenum Publishers, vol. 509, pp. 19-43.
- Pluhacek T., et al., 2016. *Mass Spectrom. Rev.* 35 (1) (2016) 35–47.
- Pollack JR, Neilands JB. 1970. Enterobactin, an iron transport compound from *Salmonella typhimurium*. *Biochem Biophys Res Commun.* 38:989–992.
- Powell, P.E., Cline, G.R., Reid, C.P.P and Szaniszlo, P.J. 1980. Occurrence of hydroxamate siderophore iron chelators in soils. *Nature*. 287, 833-834.

- Prakash A, Sharma S, Ahmad N, Ghosh A, Sinha P. 2010. Bacteria Mediated Extracellular Synthesis of Metallic Nanoparticles. *International Research Journal of Biotechnology*, 1(5): 071-079.
- Quadri LE, Sello J, Keating TA, Weinreb PH, Walsh CT. 1998. Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin. *Chem Biol*. 5:631–645.
- Qurashi, A., Zhong, Z., Alam, M. W., 2010. Synthesis and photocatalytic properties of α -Fe₂O₃ nanoellipsoids. *Solid State Sciences*, 12, 1516-1519.
- Rajoriya, P., 2017. Green synthesis of silver nanoparticles, their characterization and antimicrobial potential, PhD Thesis, Sam Higginbottom University of Agriculture, Technology & Sciences, Allahabad, India. ID: 11PHBT108.
- Raju, M., Srivastava S., Nair, R.R., Raval, I.H., Halder, S., Chatterjee, P.B. 2017. Siderophore coated magnetic iron nanoparticles: Rational designing of water soluble nanobiosensor for visualizing Al³⁺ in live organism, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 97, Pages 338-344.
- Ramimoghdam D., Bagheri S., Hamid S., B., A., 2014. Progress in electrochemical synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 368, 207–229.
- Ranjbar, B., and Gill, P., 2009. Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses a review, *Chem. Biol. Drug Des.*, 74: 101- 120. Doi: 10.1111/j.1747-0285.2009.00847.x.
- Ratul. S., Nabaneeta, S., Robert. S.D. ve Lorelle, L.B. 2012. Microbial Siderophores. *J. Basic Microbiol.* 52 :1– 15 .
- Rezanka T., Palyzova A., Faltyskova H. and Sigler K., 2018. Siderophores: Amazing Metabolites of Microorganisms. *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 60.
- Robbel L., Knappem T. A., Linne U., Xie X., Marahiel M.A., 2010. Erythrochelin – a hydroxamate-type siderophore predicted from the genome of *erythraea Saccharopolyspora*. *The Febs Journal* ,Volume277, Issue3, Pages 663-676.
- Sah S. ve Singh R. 2015. Siderophore: Structural And Functional Characterisation – A Comprehensive Review. *Agriculture (Poľnohospodárstvo)*, 61, 2015 (3): 97–114.
- Salunke BK, Sawant SS, Lee SI, Kim BS. 2016. Microorganisms as Efficient Biosystem for the Synthesis of Metal Nanoparticles: Current Scenario and Future Possibilities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(5): 88.
- Sapsford, K.E., Tyner, K.M., Dair, B.J., Deschamps, J.R. and Medintz, I.L., 2011. Analyzing nanomaterial bioconjugates: A review of current and emerging purification and characterization techniques, *Anal. Chem.*, 83: 4453-4488. Doi: 10.1021/ac200853a.
- Schwabe R, Anke MK, Szymanska K, Wiche O, Tischler D., 2018. Analysis of desferrioxamine-like siderophores and their capability to selectively bind metals and metalloids: development of a robust analytical RP-HPLC method. *Research in Microbiology* xxx (2018) 1 – 10

- Schwyn, B., and Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* 160: 47–56.
- Seuk, C., Paulita, T., Baker, R., 1988. Attributes associate with increased bio- control activity of fluorescent *Pseudomonads*. *J. Plant Pathol.* 4(3), 218- 225.
- Sezen H. 2010. TiyoKolşikosid Tayininde Hızlı Sıvı Kromatografisi (Uplc) Yönteminin Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, syf 15.
- Shah M A and Ahmad T 2010. Principles of Nanoscience and Nanotechnology (New Delhi: Alpha Science).
- Sharma G., Kumar A., Naushad M., & Kumar A., 2018. Photoremediation of toxic dye from aqueous environment using monometallic and bimetallic quantum dots based nanocomposites, *Journal of Cleaner Production*, 172, 2919–2930.
- Shin, W.K., Cho, J., Kannan, A.G., Lee, Y.-S. and Kim, D.W., 2016. Crosslinked composite gel polymer electrolyte using mesoporous methacrylatefunctionalized SiO₂ nanoparticles for lithium-ion polymer batteries, *Sci. Rep.*, 6: 26332.
- Shipley, H. J., Engates, K. E., & Guettner, A. M., 2010. Study of iron oxide nanoparticles in soil for remediation of arsenic. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(6), 2387–2397. <https://doi.org/10.1007/S11051-010-9999-X>
- Shubayev, V.I., Pisanic, T.R., II, Jin, S., 2009. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 467–477.
- Sigel A, Sigel H, editors. *Volume 35 of Metal Ions in Biological Systems*. Marcel Dekker; New York: 1998. Iron Transport and Storage in Microorganisms, Plants and Animals.
- Singh, R., Shedbalkar U.U., Wadhwani S.A, Chopade BA. 2015. Bacteriogenic Silver Nanoparticles: Synthesis, Mechanism, and Applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(11): 4579-4593.
- Składanowski M, Wypij M, Laskowski D, Golińska P, Dahm H, Rai M. 2017. Silver and Gold Nanoparticles Synthesized from *Streptomyces* sp. Isolated from Acid Forest Soil With Special Reference to its Antibacterial Activity Against Pathogens. *Journal of Cluster Science*, 28(1): 59-79.
- Skoog, D.A. , Holler, F.J.. Nieman, T.A. 2007. (Çev.Ed.: Esmâ KILIÇ) Enstrümantal Analiz İlkeleri. Bilim Yayıncılık.
- Smith, B. C., 1996. Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Boca Raton : CRC Press, 1-2.
- Sneh, B., Dupler, M., Elad, Y., and Baker, R., 1984. Chlamydospore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. cucumerinum as affected by fluorescent and lytic bacteria from *Fusarium* suppressive soils. *Phytopathology*. 74, 1115-1124.
- Stachelhaus, T., Hüser, A., and Marahiel, M.A. 1996. Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chem. Biol.*, 3, 913–921.
- Stephan, R., Trappen, S.V., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., Vos P.D., Lehner A. 2007. *Enterobacter turicensis* sp.nov. and *Enterobacter helveticus* sp.nov., isolated from fruit powder. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57,820–826.

- Sulak M. 2021. Ege Bölgesinde Yetişen Antiviral *M. parviflora* L (Ebegümeçi) Bitkisi Kullanılarak Demir oksit (γ -Fe₂O₃) Nanopartiküllerin Sentezi ve Antibakteriyel Özelliklerinin İncelenmesi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 11(4): 2937-2946.
- Sundaram, P.A., Augustine, R. & Kannan, M., 2012. Extracellular biosynthesis of iron oxide nanoparticles by *Bacillus subtilis* strains isolated from rhizosphere soil. *Biotechnol Bioproc E* 17, 835–840.
- Sweeney RY, Mao C, Gao X, Burt JL, Belcher AM, Georgiou G, Iverson BL. 2004. Bacterial Biosynthesis of Cadmium Sulfide Nanocrystals. *Chemistry and Biology*, 11(11): 1553-1559.
- Şen N., 2013. Azit ve Nitro Grubu İçeren Organik Patlayıcı Maddelerin Termal Analiz Yöntemleri İle İncelenmesi Ve Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Kullanılarak Analiz Olanaklarının Araştırılması. Doktora Tezi, sayfa ; 30.
- Tang, C., Russell, P.J., Wilks, R.M., Rasko, J.E.J., Khatri, A., 2010. *Stem Cells* 28, 1686–1702.
- Tikariha, S., Singh S., Banerjee S., Vidyarthi A.S., 2012. Biosynthesis of Gold Nanoparticles, Scope and Application: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(6): 1603.
- Tiwari M, Jain P, Hariharapura RC, Narayanan K, Bhat U, Udupa N, Rao JV. 2016. Biosynthesis of Copper Nanoparticles Using Copper-Resistant *Bacillus cereus*, A Soil Isolate. *Process Biochemistry*, 51(10): 1348-1356.
- Tiwari, D. K., Behari, J. and Sen, P., 2008. Time and dose-dependent antimicrobial potential of Ag nanoparticles synthesized by top-down approach, *Current Science*, 95(5): 647-655.
- Topal, F., 2009. İçme Sularından Arsenik Giderimi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. İstanbul, 83s.
- Tripathi R.M., Bhadwal A.S., Singh P, Shrivastav A, Singh M.P., Shrivastav B.R., 2014. Mechanistic Aspects of Biogenic Synthesis of CdS Nanoparticles Using *Bacillus licheniformis*. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 5(2): 025006.
- Turgay, K., Krause, M., and Marahiel, M.A., 1992. Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Mol. Microbiol.*, 6, 2743–2744.
- Ünak, P., 2008. Imaging and therapy with radionuclide labeled magnetic nanoparticles. *Braz. arch. biol. technol.*, 51, n. special: pp.31-37.
- Van der Helm, D. and Winkelmann, G., 1994. Hydroxamates and Polycarboxylates as Iron Transport Agents (Siderophores) in Fungi. In: Winkelmann, G. and Winge, D.R., Eds., *Metal Ions in Fungi*, Marcel Dekker, Inc., New York, 39-98.
- Vértesy, L., Aretz, W., Fehlhaber, H.W., Kogler, H. 1995. Salimycin A-D, Antibiotoka aus *Streptomyces violaceus*, DSM 8286, mit Siderophor- Aminoglycosid-Struktur. *Helv.Chim. Acta*. 78, 46-60.

- Vinoba M., Bhagiyalakshmi M., Jeong S.K., Yoon Y., and Nam S. C., 2011. Capture and Sequestration of CO₂ by Human Carbonic Anhydrase Covalently Immobilized onto Amine-Functionalized SBA-15. *The Journal of Physical Chemistry*, 115 (41), 20209-2021.
- Von Gunten, H.R. ve Benes, P. 1995. Speciation of radionuclides in the environment. In *Radiochimica Acta*, vol. 69, pp. 1–29.
- Wang, B., Hai, J., Liu, Z., Wang, Q., Yang, Z., Sun, S., 2010. *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 4576–4579.
- Wang, B.D., Xu, C.J., Xie, J., Yang, Z.Y., Sun, S.H., 2008. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 14436–14437.
- Wang, S. C.N. Mulligan 2006. Occurrence of Arsenic Contamination in Canada: Sources, Behavior and Distribution. *Science of the Total Environment*. 366(2): 701–721.
- Wang, S.-B., Min, Y.-L., and Yu, S.-H. 2007. Synthesis and magnetic properties of uniform hematite nanocubes. *J. Phys. Chem. C*. 111(9):3551–3554.
- Wang, X., Stolwijk, J.A., Lang, T., Sperber, M., Meier, R.J., Wegener, J., Wolfbeis, O.S., 2012. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 17011–17014.
- Wang, Y. and Herron, N., 1991. Nanometer-sized semiconductor clusters: materials synthesis, quantum size effects, and photophysical properties, *J. Phys. Chem. A*, 95: 525-532.
- Wang, Y. and Xia, Y., 2004. Bottom-up and top-down approaches to the synthesis of monodispersed spherical colloids of low melting-point metals, *NanoLett.*, 4: 2047-2050.
- Wang J, Li J, Guo G, Wang Q, Tang J, Zhao Y, Qin H, Wahafu T, Shen H, Liu X, Zhang X., 2016. Silver-nanoparticles-modified biomaterial surface resistant to staphylococcus: new insight into the antimicrobial action of silver. *Sci Rep.* 2016 Sep 7;6:32699.
- Welch A.H., Lico M.S, Hughes J.L., 1988. Arsenic in Ground Water of the Western United States. *Groundwater*, Volume26, Issue3, page 333-347.
- Wilkinson, B., Micklefield, J.. 2009. Chapter 14. Biosynthesis of nonribosomal peptide precursors. *Meth Enzymol.* 458: 353–378.
- Winkelmann, G., 2002. Microbial siderophore mediated transport, *Biochemical Society Transactions*, 30, 691-696.
- Wooldridge, K.G., and Williams, P.H. 1993. Iron uptake mechanism of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 325- 348.
- Yağmur, F. Ve Hancı İ.H. 2002. Arsenik. cilt 11 , sayı 7 ; page 250.
- Yasin, S., Liu, L. and Yao, J. 2013. Biosynthesis of silver nanoparticles by bamboo leaves extract and their antimicrobial activity, *JFBI*, 6: 77.
- Yaşar, H., 2016. Bazı Salisaldehit Türevi İmin Bileşiklerinin Sentezi ve C=N Çift Bağlarının İndirgenme Reaksiyonlarının FTIR ile İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, 17.
- Yılmaz, S. Atalay, B. 2001. Termik santral uçucu küllerinde çinko iyonlarının adsorpsiyonu. Celal Bayar Üniversitesi, Kimya Bölümü.

- Zeng, H., Li, C., Luo, D., Zhang, J., Ding, Y., Chen, M., Yang, X., Lei, T., Wu, S., Ye, Q., Pang, R., Gu, Q., Wu Q. 2021. Novel phage vB_CtuP_B1 for controlling *Cronobacter malonaticus* and *Cronobacter turicensis* in ready-to-eat lettuce and powered infant Formula. Food Research International 143, 110255.
- Zhang, W. and Elliot, D.W., 2016. Applications of Iron Nanoparticles for Groundwater Remediation. RemediationSpring, 7-21.

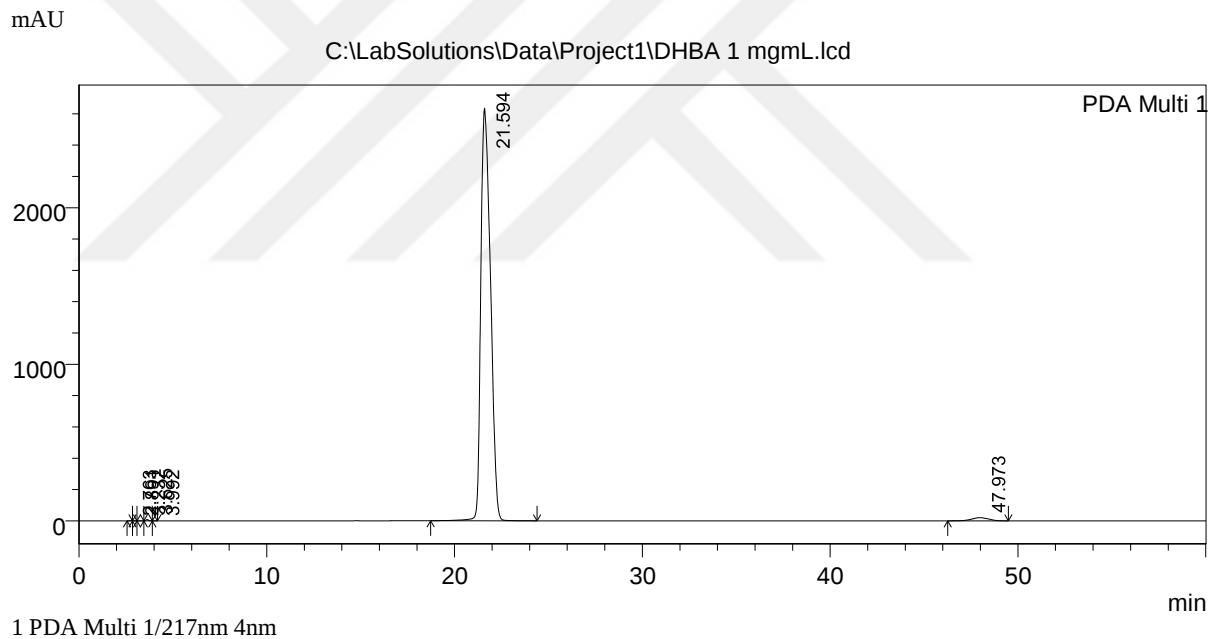


7. EKLER

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
Sample Name : DHBA 1 mgmL
Sample ID :
Tray# : 1
Vail # : 2
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : DHBA 1 mgmL.lcd
Method File Name : Desferal and DHBA.lcm
Batch File Name : Desferal ve DHBA Çalışması.lcb
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 3.6.2022 14:25:36
Data Processed : 7.6.2022 14:52:35

<Chromatogram>



PeakTable

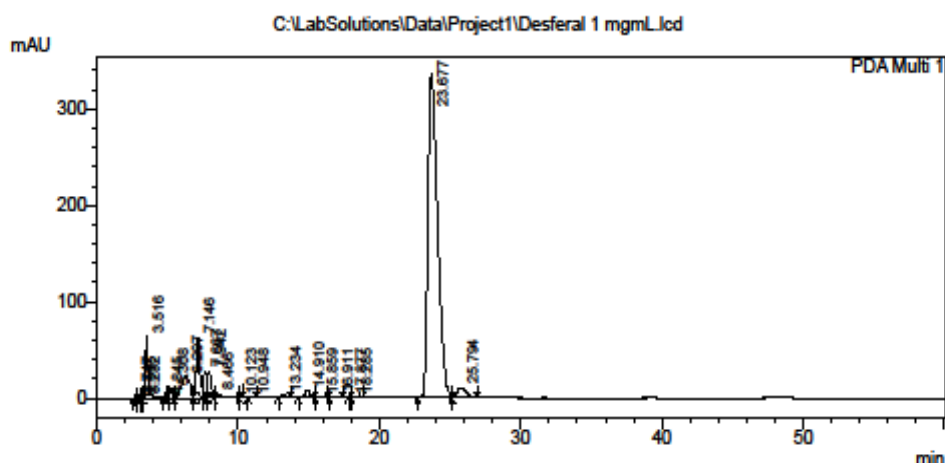
Ch1 217nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.763	10293	1068	0.011	0.040
2	2.891	9074	1036	0.009	0.039
3	3.232	6602	360	0.007	0.013
4	3.625	80343	8320	0.084	0.312
5	3.992	2142	212	0.002	0.008
6	21.594	94471559	2636090	98.541	98.822
7	47.973	1290231	20419	1.346	0.765
Total		95870245	2667504	100.000	100.000

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Project1\Desferal 1 mgmL.lcd
 Acquired by : Admin
 Sample Name : Desferal 1 mgmL
 Sample ID :
 Tray# : 1
 Vial # : 3
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : Desferal 1 mgmL.lcd
 Method File Name : Desferal and DHBA.lcm
 Batch File Name : Desferal ve DHBA Çalışması.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 3.6.2022 15:26:09
 Data Processed : 7.6.2022 14:52:10

<Chromatogram>



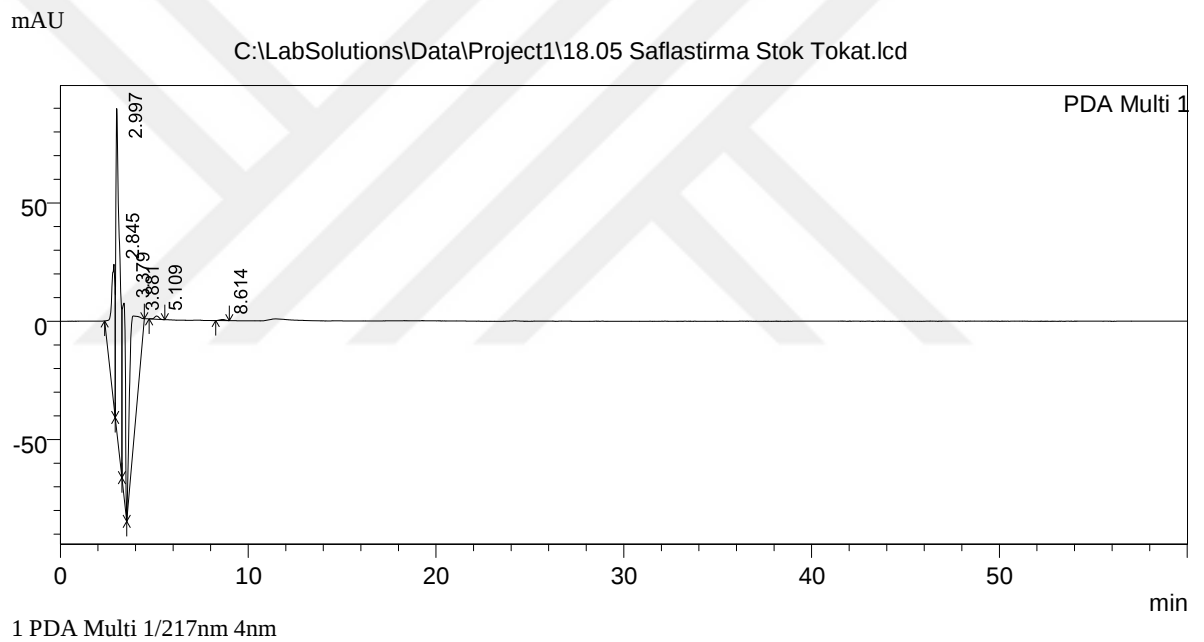
PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.747	13566	1539	0.066	0.266
2	2.995	9976	1167	0.049	0.201
3	3.232	13765	1250	0.067	0.216
4	3.516	853527	65184	4.154	11.249
5	4.845	1123	128	0.005	0.022
6	5.308	114174	9521	0.556	1.643
7	6.297	929679	22307	4.524	3.850
8	7.146	1071621	62359	5.215	10.762
9	7.667	444640	27577	2.164	4.759
10	7.942	464251	28111	2.259	4.851
11	8.466	172657	4294	0.840	0.741
12	10.123	1464	196	0.007	0.034
13	10.948	5961	376	0.029	0.065
14	13.234	53037	2534	0.258	0.437
15	14.910	176255	6875	0.858	1.186
16	15.859	10635	392	0.052	0.068
17	16.911	15214	535	0.074	0.092
18	17.877	1015	52	0.005	0.009
19	18.285	8427	300	0.041	0.052

C:\LabSolutions\Data\Project1\Desferal 1 mgmL.lcd

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
Sample Name : 18.05 Saflastirma Stok Tokat
Sample ID :
Tray# : 1
Vail # : 1
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : 18.05 Saflastirma Stok Tokat.lcd
Method File Name : Desferal and DHBA.lcm
Batch File Name : Desferal ve DHBA Çalışması.lcb
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 8.6.2022 14:14:36
Data Processed : 8.6.2022 16:10:52



PeakTable

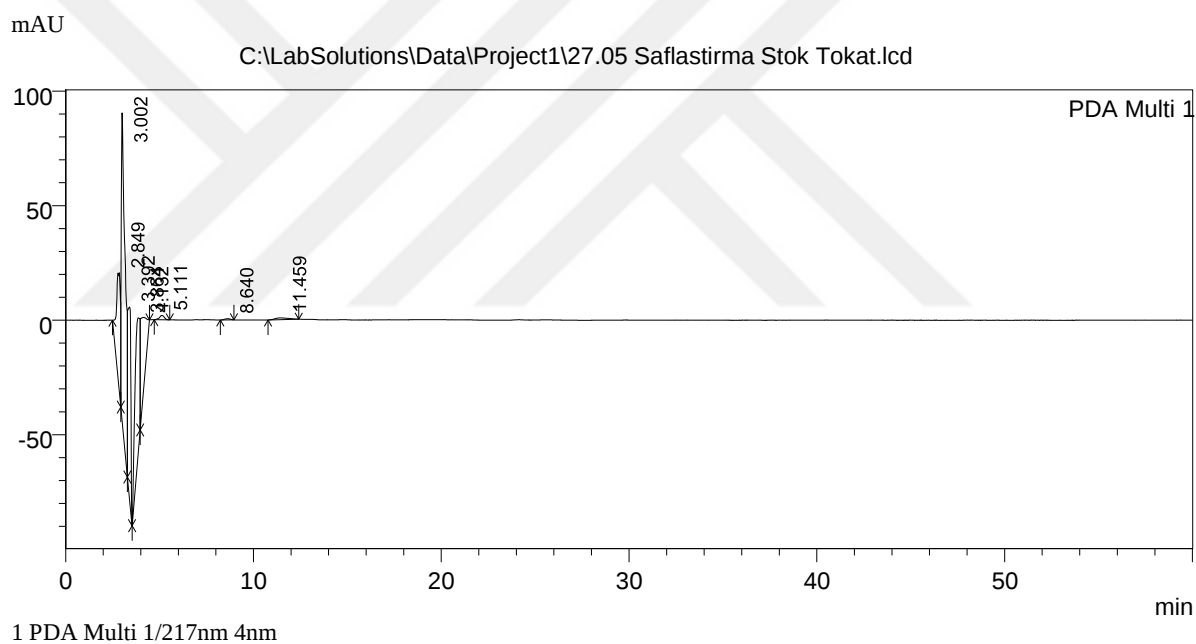
Ch1 217nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.845	941650	59124	16.454	17.754
2	2.997	2010720	135941	35.134	40.822
3	3.379	907656	81273	15.860	24.406
4	3.881	1830464	54854	31.984	16.472
5	5.109	23113	1353	0.404	0.406
6	8.614	9471	461	0.165	0.139
Total		5723074	333007	100.000	100.000

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
Sample Name : 27.05 Saflastirma Stok Tokat
Sample ID :
Tray# : 1
Vail # : 2
Injection Volume : 20 uL
Data File Name : 27.05 Saflastirma Stok Tokat.lcd
Method File Name : Desferal and DHBA.lcm
Batch File Name : Desferal ve DHBA Çalışması.lcb
Report File Name : Default.lcr
Data Acquired : 8.6.2022 15:15:08
Data Processed : 8.6.2022 16:15:11

<Chromatogram>



PeakTable

Ch1 217nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	2.849	726683	51312	12.995	14.079
2	3.002	1970470	134399	35.237	36.877
3	3.392	924561	83456	16.533	22.899
4	3.864	1158118	59046	20.710	16.201
5	4.132	724932	32989	12.964	9.052
6	5.111	35413	1892	0.633	0.519
7	8.640	11819	565	0.211	0.155
8	11.459	40088	795	0.717	0.218
Total		5592083	364455	100.000	100.000

8. ÖZGEÇMİŞ

