

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI



**DETERMINATION OF THE EFFECTS OF NANOPARTICLES
SYNTHESIS BY DIFFERENT METHODS ON
GERMINATION, GLUCOMANNAN CONTENT AND
ASSOCIATED MICROBIOME OF ANACAMPTIS LAXIFLORA
SEEDS**

Doktora Tezi

Ahmed Ismael Naqee AL-BAYATI

Danışman
Prof.Dr. İbrahim ÖZKOÇ

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.FEN. 1904.21.022 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Ahmed Ismael Naqee AL-BAYATI tarafından, **Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ** danışmanlığında hazırlanan **FARKLI YÖNTEMLERLE SENTEZLENEN NANOPARTÜKÜLLERİN ANACAMPTİS LAXİFLORA TOHUMLARININ ÇİMLENME, GLİKOMANNAN İÇERİKLERİ VE İLİŞKİLİ MİKROBİYOM ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ** başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 9.11.2023 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Yasemin ÖZDENER KÖMPE Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Metin AYDIN Ondokuz Mayıs Üniversitesi Kimya Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Tuba Yıldırım Amasya Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Cem Tolga GÜRKANLI Ordu Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ahmet TABAK
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

09 /11/ 2023..

Ahmed Ismael Naqee AL-BAYATI

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : FARKLI YÖNTEMLERLE SENTEZLENEN NANOPARTÜKÜLLERİN *ANACAMPTIS LAXIFLORA* TOHUMLARININ ÇİMLENME, GLİKOMANNAN İÇERİKLERİ VE İLİŞKİLİ MİKROBİYOM ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından

09.11.2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 7

Tek kaynak oranı : % 1 çıkmıştır.

09/11/ 2023.

Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ

ÖZET

FARKLI YÖNTEMLERLE SENTEZLENEN NANOPARTÜKÜLLERİN *ANACAMPTIS LAXIFLORA* TOHUMLARININ ÇİMLENME, GLİKOMANNAN İÇERİKLERİ VE İLİŞKİLİ MİKROBİYOM ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Ahmed Ismael Naqee AL-BAYATI

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyoloji Ana Bilim Dalı

Doktora, Kasım/2023

Danışman: Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ

Bu çalışmada, yeterince araştırılmamış bir alan olan *Anacamptis laxiflora* (Lam.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase tohum çimlenmesi, tohum gelişimi, glikomannan içeriği ve beraberindeki tohum mikrobiyomu üzerine nanopartiküllerin potansiyel etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, *Anacamptis laxiflora* tohumlarını kimyasal ve biyolojik olarak sentezlenmiş nanopartiküllerin üç konsantrasyonu (10, 50 ve 150 mg) farklı büyüme ortamlarına (katı, sıvı ve toprak) ilave edilerek kapsamlı değerlendirilmeler yapılmıştır. *Anacamptis laxiflora* tohumlarından izole edilen endofitik funguslardan dördünün nanopartikül üretebildiği belirlenmiş ve bu isolatlar, *Dactylonectria torresensis*, *Fusarium tricinctum*, *Alternaria alternata* ve *Alternaria tenuissima* olarak tanımlanmışlardır. Tohum çimlendirme çalışmaları, uygulamalar arasında ilgi çekici ve farklı yanıtları ortaya çıkarmıştır. Kimyasal nanopartiküller katı ortamda çimlenmeyi önleyici etkiler sergilerken, toprak ortamında olumsuz etkileri ihmal edilebilir düzeyde olmuştur. Buna karşılık, *Dactylonectria torresensis* aracılığıyla biyolojik olarak sentezlenmiş (yeşil sentez) olan Fe BNP1'leri 50 mg 'lık uygulaması katı ortamda çimlenme üzerinde olumlu bir etki göstermiş ve *Fusarium tricinctum* aracılığıyla biyolojik olarak sentezlenen Fe BNP6'leri toprak ortamında umut verici sonuçlar göstermiştir. İlginç bir şekilde, sıvı ortamın *Anacamptis laxiflora* tohumlarının çimlenmesi üzerine etkisi pek uygun olmamıştır. Glikomannan içeriğinin değerlendirilmesi konusunda, nanoparçacık maruziyetine verilen yanıtta önemli farklılıklar ortaya çıkmıştır. Özellikle FeBNP6'ler(50mg) ile işleme tabi tutulan katı ve toprak ortamlarda, glikomannan içeriğinde bir artış gözlenmiştir. 16S rRNA ve ITS rRNA genlerinin yüksek verimli dizilimi yoluyla gerçekleştirilen tohumla ilişkili mikrobiyal topluluğun analizi, uygulamalardan seçilen Fe BNP6'ler (50 mg)'nin rolü ve bunun tohum mikrobiyomu üzerindeki etkisi hakkında değerli bilgiler sağlamıştır. Bakteri topluluğu içinde, *Pseudomonas*, *Cellulomonas* ve *Chthoniobacter* dahil olmak üzere belirli cinslerin bolluğunda, Fe BNP1'ler (50 mg) varlığında artış gözlenmiştir. Bu bulgular aynı zamanda PICRUST aracı ile, bu nanopartiküllerin varlığında zenginleşen spesifik metabolik yollara da ışık tutmuştur. Funguslar arasında *Barnettozyma*, *Aspergillus*, *Didymella*, *Albifimbria* ve *Malassezia* gibi cinsler, özellikle spesifik yollara tepki olarak baskın ve oldukça bol miktarda oldukları ortaya çıkmıştır. Bu kapsamlı çalışma, nanopartiküller, *Anacamptis laxiflora* tohumları ve bunlarla ilişkili mikrobiyal topluluklar arasındaki karmaşık etkileşimleri anlamamıza katkıda bulunan öncül bir çalışmadır.

Anahtar Sözcükler: *Anacamptis laxiflora*, Glikomannan, Metagenomik, PICRUST, Demir Nanopartikülleri

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE EFFECTS OF NANOPARTICLES SYNTHESIS BY DIFFERENT METHODS ON GERMINATION, GLUCOMANNAN CONTENT AND ASSOCIATED MICROBIOME OF *ANACAMPTIS LAXIFLORA* SEEDS

Ahmed Ismael Nagee AL-BAYATI
Ondokuz Mayıs University
Institute of Graduate Studies
Department of Biology
Ph.D., November/2023
Supervisor: Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ

This study investigated the potential effects of nanoparticles on *Anacamptis laxiflora* (Lam.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase seed germination, seed development, glucomannan content, and the accompanying seed microbiome, which is an under-researched area. For this purpose, comprehensive evaluations were made by adding *Anacamptis laxiflora* seeds to three concentrations (10, 50, and 150 mg) of chemically and biologically synthesized nanoparticles to different growth media (solid, liquid, and soil). Four of the endophytic fungi isolated from *Anacamptis laxiflora* seeds were determined to be capable of producing nanoparticles, and these isolates were identified as *Dactylonectria torresensis*, *Fusarium tricinctum*, *Alternaria alternate*, and *Alternaria tenuissima*. Seed germination studies have revealed interesting and diverse responses among treatments. While chemical nanoparticles exhibited anti-germination effects in the solid environment, their negative effects in the soil environment were negligible. In contrast, 50 mg application of Fe BNP1 nanoparticles, biologically synthesized (green synthesis) through *Dactylonectria torresensis*, showed a positive effect on germination in solid media, and Fe BNP6 nanoparticles biologically synthesized through *Fusarium tricinctum* showed promising results in soil environment. Interestingly, the effect of a liquid medium on the germination of *Anacamptis laxiflora* seeds was unfavorable. Regarding the assessment of glucomannan content, significant differences emerged in the response to nanoparticle exposure. Glucomannan content was increased, especially in solid and soil media treated with FeBNP6 nanoparticles (50 mg). Analysis of the seed-associated microbial community performed through high-throughput sequencing of 16S rRNA and ITS rRNA genes provided valuable information on the role of FeBNP6 nanoparticles (50 mg) selected from treatments and its impact on the seed microbiome. Within the bacterial community, an increased abundance of certain genera, including *Pseudomonas*, *Cellulomonas*, and *Chthoniobacter*, was observed in the presence of FeBNP6 nanoparticles (50 mg). These findings also shed light on specific metabolic pathways that are enhanced in the presence of these nanoparticles via the PICRUSt tool. Among fungi, genera such as *Barnettozyma*, *Aspergillus*, *Didymella*, *Albifimbria*, and *Malassezia* were dominant and relatively abundant, especially in response to specific pathways. This comprehensive, pioneering study contributes to understanding the complex interactions between nanoparticles, *Anacamptis laxiflora* seeds, and their associated microbial communities.

Keywords: *Anacamptis laxiflora*, Glikomannan, Metagenomics, PICRUSt, Iron Nanoparticles

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgisi ve tecrübesi ile yol gösteren, yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ'a,

Tez çalışmam sırasında değerli bilgilerinden yararlandığım tez izleme komitesindeki değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Yasemin Özdener Kömpe ve sayın Prof. Dr. Metin Aydın'a,

Hem manevi hem de maddi desteğin sürekli kaynağı olan annem ve babam, sayın Ismae Naqee ve sayın Fawziya Abdulazeez'e,

Bu zorlu yolculuk boyunca sarsılmaz cesareti ve anlayışı bana sürekli güç ve motivasyon kaynağı olan eşime, Ghufraan Fadıl

Son olarak tezime PYO.FEN 1904.11.012 numaralı projeyle destek veren Ondokuz Mayıs Üniversitesi Proje Yönetim Ofisi'ne teşekkürlerimi sunarım

Ahmed Ismael Naqee AL-BAYATI

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Nanoteknoloji	5
2.1.1. Nanopartiküllerin Üretimine Yönelik Yaklaşımlar	9
2.2. Nanopartiküller Sentez Yöntemleri	10
2.2.1. Kimyasal Sentez	10
2.2.2. Nanopartiküllerin Yeşil Sentezi	12
2.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	18
2.3.1. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometresi (UV-vis spektroskopisi)	18
2.3.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	19
2.3.3. Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopi (FTIR)	20
2.3.4. X-Işını Kırınımı (XRD)	21
2.4. Demir oksit Nanopartiküllerin (Fe NP'lerin) Biyosentezi	22
2.5. Sürdürülebilir Tarımda Nanogübrelerin Uygulanması	24
2.5.1. Fe NP'lerin Uygulama Yöntemleri	24
2.6. Fe NP'lerinin Tohumlar Üzerindeki Etkisi	27
2.6.1. Tohum Uyarma Mekanizmaları	30
2.6.2. Karbohidratların Mekanizmaları	32
2.7. Glikomannan	33
2.7.1. Orkideler Glikomannan	34
2.8. Tohumlarla İlişkili Mikroplar	36
2.8.1. Bakteri	36
2.8.2. Funguslar	37
2.9. Metagenomik	38
2.9.1. Amplikon	40
3. MATERYAL VE YÖNTEM	43
3.1. Tohum Toplama Alanı	43
3.1.1. Tohumların Canlılık Testi	44
3.2. Endofitik Funguslar İzolasyonu ve Nanopartikül Sentezi	44
3.2.1. Tohumlardan Fungusların İzolasyonu	45
3.2.2. Mikonanopartiküllerin Sentezi	46
3.3. Nanopartiküllerin Kimyasal Sentezi	47
3.3.1. Sentezlenen Fe NP'lerin Karakterizasyonu	47
3.4. Fungusların Moleküler Tanımlaması	50
3.4.1. DNA Ekstraksiyonu	51
3.4.2. Agaroz Jel Elektroforez	53
3.4.3. ITS1-5.8S-ITS2 ile PCR Amplifikasyonu	53
3.4.4. ITS1-5.8S-ITS2 DNA Dizileme ve Sekans Verilerinin Analizi	55
3.5. Orkide Yetiştirme Ortamının Hazırlanması ve Sterilizasyonu	56
3.5.1. DeneySEL Uygulamalar	57
3.5.2. Orkide Tohumlarının Sterilizasyonu	58
3.5.3. İstatistiksel	58
3.6. Glikomannan İçerikleri	59

3.6.1. Kitte Kullanılan Reaktifler.....	59
3.6.2. Reaktif Çözeltilerinin/Süspansiyonlarının Hazırlanması.....	60
3.6.3. Örnek Çözeltilerin Hazırlanması	60
3.6.4. Enzimatik Kolorimetrik Reaksiyonlar	61
3.7. Nanopartiküller ve Tohum Mikrobiyomları	62
3.7.1. 16S rRNA ve ITS Genlerinin Dizilimi	62
3.7.2. Biyoinformatik.....	63
3.7.3. İstatistiksel Analiz.....	64
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	66
4.1. Canlılık Testi.....	66
4.2. Fungusların Tohumlardan İzolasyonu Ve Öncü Tuzların Biyoredüksiyonu	67
4.3. Fungusların Moleküler Teşhisi	69
4.3.1. Kültürlerin Morfolojik Özellikleri	69
4.3.2. DNA İzolasyonu ve PCR İşlemi	71
4.3.3. Filogenetik Analizler	72
4.4. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	77
4.4.1. UV-vis spektroskopisi.....	77
4.4.2. SEM	78
4.4.3. FTIR.....	85
4.4.4. XRD	87
4.5. Nanopartiküllerin Uygulamaları	91
4.5.1. Modifiye Yulaf Ortamı (Katı).....	91
4.5.2. Sıvı Yulaf Ortamı.....	96
4.5.3. Toprak Ortamı.....	98
4.6. Glikomannan İçerikleri	101
4.6.1. Modifiye Yulaf Ortamı	101
4.6.2. Sıvı Yulaf Ortamı.....	104
4.6.1. Toprak Ortamı.....	105
4.7. Tohumlardan DNA Ekstraksiyonu.....	107
4.7.1. Veri Kalitesi	108
4.7.2. Veri Hazırlığı	109
4.7.3. Bakterilerde Metagenomik Veriler	109
4.7.4. Funguslarda Metagenomik Veriler	122
5. SONUÇLAR.....	132
KAYNAKLAR	134
ÖZ GEÇMİŞ.....	153

SİMGELER VE KISALTMALAR

Fe NP'ler	: Demir nanopartikülleri
Au NP'leri	: Altın nanopartikülleri
Ag NP'leri	: Gümüş nanopartikülleri
Fe Kp'ler	: Kimyasal yöntemlerle sentezlenen iron nanopartikülleri
NpG'ler	: Nanogübreler
CTAB	: Setiltrimetilamonyum bromür
PGPR	: Bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler
PICRUSt	:Gözlemlenmeyen durumların yeniden inşası yoluyla toplulukların filogenetik araştırılması
°C	: Santigrat
CaCl ₂	: Kalsiyum kloru
H ₂ O	: Hidrojen dioksit
FeCl ₃	: Demir 3 klorür
KH ₂ PO ₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
K ₂ HPO ₄	: Dipotasyum hidrojen fosfat
MgSO ₄	: Magnezyum sülfat
NaOH	: Sodyum hidroksit
l	: Litre
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
PDA	: Patates dekstroza agar
PDB	: Patates dekstroza broth
RNase	: Ribonükleaz A
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA
TE	: Tris-EDTA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Nanopartiküllerin sentezinde kullanılan yaklaşımlar.....	10
Şekil 2.2 Mantar faaliyetleri yoluyla nanopartiküllerin ve nanominerallerin üretilmesinde rol oynayan temel süreçler. (Li vd, 2022).....	16
Şekil 2.3 Nanopartiküllerin hücre içi ve hücre dış nanopartiküllerin sentezi	17
Şekil 2.4 X-ışını Kırınımında Bragg Yasası	21
Şekil 2.5 Mg(OH) ₂ NP'lerin <i>Zea mays</i> Çimlenmesine Etkileri	32
Şekil 2.6 Glukomannan'ın kimyasal yapısı	35
Şekil 2.7 Molecular Markers: 16S rRNA and ITS.....	39
Şekil 3.1 <i>Anacamptis laxiflora</i> 'nin tohumun toplama sahasının coğrafi konumu	43
Şekil 3.2 Funguslar kullanılarak Fe NP'lerinin sentez prosedürü	45
Şekil 3.3 Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometresi	47
Şekil 3.4 FTIR Spectrum Bruker Tensor 27	48
Şekil 3.5 X-ışını kırınım cihazı (Rigaku Smart Lab modeli)	49
Şekil 3.6 Taramalı elektron mikroskobu (Jeol JSM7001F modeli).....	49
Şekil 3.7 Uygulama ve analiz adımları	56
Şekil 4.1 TZ ile muamele edilmiş tohumların görüntüsü, (A) canlı tohumlar (kırmızı), (B) canlı olmayan tohumlar (beyaz), (C) embriyosuz tohumlar (yarı saydam).	66
Şekil 4.2 Öncül tuzların biyoredüksiyonunun sonuçları. Pozitif reaksiyon gösteren funguslar koyu renkte gözükmetedir	68
Şekil 4.3 F1 ve F5 nolu fungal izolatların morfolojik özellikleri	69
Şekil 4.4 F6 ve F12 nolu fungal izolatların morfolojik özellikleri	70
Şekil 4.5 İzolatlara ait rDNA ITS PCR ürünleri	71
Şekil 4.6 <i>Dactylonectria torresensis</i> türünün ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç	73
Şekil 4.7 <i>Alternaria alternata</i> türünün ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç	74
Şekil 4.8 <i>Fusarium tricinctum</i> cinslerinin genetik bağlantısını gösteren filogenetik ağaç	75
Şekil 4.9 <i>Alternaria tenuissima</i> türüne ait ilişkileri gösteren filogenetik ağaç	76
Şekil 4.10 Demir oksit nanopartiküllerinin UV-Vis analizi ve absorpsiyon eğrileri	77
Şekil 4.11 Fe BNP1'lerin SEM Mikrografları ve EDX spektrumları.....	79
Şekil 4.12 Fe BNP5'lerin SEM Mikrografları ve EDX spektrumları.....	80
Şekil 4.13 Fe BNP6'lerin SEM Mikrografları ve EDX spektrumları.....	81
Şekil 4.14 Fe BNP5'lerin SEM Mikrografları ve EDX spektrumları.....	82
Şekil 4.15 Fe KNp'lerin SEM Mikrografları ve EDX spektrumları.....	83
Şekil 4.16 Fe BNP1, Fe BNP5, Fe BNP6 ,Fe BNP12'ler ve Fe KNp'lerin FTIR spektrumu .	86
Şekil 4.17 ICDD referansı ile karşılaştırıldığında Fe BNP1'lerinin XRD desenleri	87
Şekil 4.18 BNP5'lerinin XRD desenleri.....	88
Şekil 4.19 Fe BNP12'lerinin XRD desenleri	88
Şekil 4.20 ICDD referansı ile karşılaştırıldığında Fe BNP6'lerinin XRD desenleri	89

Şekil 4.21 ICDD referansı ile karşılaştırıldığında Fe KNp'lerinin XRD desenleri	90
Şekil 4.22 10 hafta muameleden sonra <i>Anacamptis laxiflora</i> protokormlarının (A) Kontrol (B) Fe BNp1 'de modifiye yulaf ortamındaki gelişme durumları	94
Şekil 4.23 Modifiye yulaf ortamındaki farklı uygulamaların çimlenme üzerine etkisini gösteren grafik	95
Şekil 4.24 Sıvı yulaf ortamındaki farklı uygulamaların çimlenme üzerine etkisini gösteren grafik.....	97
Şekil 4.25 Toprak ortamındaki farklı uygulamaların çimlenme üzerine etkisini gösteren grafik.....	100
Şekil 4.26 Modifiye yulaf ortamında protokormların glikomannan içeriğini gösteren grafik.....	103
Şekil 4.27 Sıvı yulaf ortamında protokormların glikomannan içeriğini gösteren grafik	104
Şekil 4.28 Toprak ortamında protokormların glikomannan içeriğini gösteren grafik	106
Şekil 4.29 Protokormlarından ekstrakte edilen toplam DNA'nın %1 agaroz jeldeki görüntüsü	107
Şekil 4.30 K ve FeBNp'lerle ilişkili bakteri topluluğunun F ve R dizilerinin FastQC Değerlendirmesi.....	108
Şekil 4.31 K ve FeBNp'lerle ilişkili fungus topluluğunun F ve R dizilerinin FastQC Değerlendirmesi.....	108
Şekil 4.32 Bakteriyel alfa çeşitliliğini gösteren grafik.....	110
Şekil 4.33 Bakteriyel mikrobiyotanın şube düzeyinde taksonomik bileşimi.....	112
Şekil 4.34 <i>Anacamptis laxiflora</i> protokormlarındaki bakteri topluluklarının filogenetik çeşitliliği.....	114
Şekil 4.35 Bakteriyel mikrobiyotanın cins düzeyinde taksonomik bileşimi.....	115
Şekil 4.36 Bacterial toplulukların hücresel süreç yolları, çevresel süreç yolları, genetik bilgi işleme yolları	119
Şekil 4.37 Bakteriyel toplulukların metabolizma yolları	121
Şekil 4.38 Fungusların alfa çeşitliliğini gösteren grafik	123
Şekil 4.39 Fungal mikrobiyotanın şube düzeyinde taksonomik bileşimi.....	124
Şekil 4.40 <i>Anacamptis laxiflora</i> protokormlarındaki fungus topluluklarının filogenetik çeşitliliği.....	125
Şekil 4.41 Fungal mikrobiyotanın cins düzeyinde taksonomik bileşimi	127
Şekil 4.42 <i>Anacamptis laxiflora</i> tohumlarının endofit fungus metabolik yolları.....	129
Şekil 4.43 Fungusların metabolik yollarının Kontrol grubu, FeBNF6 (nanopartikül) uygulamasındaki durumları	130

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1 Fungus kullanılarak Fe NP'lerin biyosentezi.....	23
Tablo 3.1 PDA ortamının hazırlanması	45
Tablo 3.2 Lizis tamponu hazırlama.....	50
Tablo 3.3 Tris tamponu hazırlama	50
Tablo 3.4 TE tamponu hazırlama.....	51
Tablo 3.5 TBE tamponu hazırlama	51
Tablo 3.6 1X TBE tamponu hazırlama	51
Tablo 3.7 PCR karışımı hazırlama.....	54
Tablo 3.8 PCR aşamaları	55
Tablo 3.9 Modifiye yulaf agar ortamı	56
Tablo 3.10 Uygulama açıklama kısaltmaları	58
Tablo 3.11 Yamazaki ve Miyoshi (2006) tarafından yapılan sınıflandırmaya göre tohum çimlenme aşamaları.	59
Tablo 4.1 Öncül tuzların biyoredüksiyonuyla ilgili sonuçlar. Olumlu sonuç veren funguslar + olarak gösterilmiştir	68
Tablo 4.2 Nanopartiküller sentezleyebileme özelliğine sahip fungusların rDNA-ITS dizilerinin GenBank'ta bulunan rDNA-ITS dizileri ile benzerlik yüzdeleri	72
Tablo 4.3 Numunelerin nanopartikül boyutu	84
Tablo 4.4 Modifiye yulaf ortamı uygulamalarının istatistiksel değerleri.....	95
Tablo 4.5 Modifiye yulaf ortamı uygulamaların istatistiksel değerleri.....	97
Tablo 4.6 Toprak ortamındaki uygulamaların istatistiksel değerleri	100
Tablo 4.7 Modifiye yulaf ortamında tohumların glikomannan içeriği.....	103
Tablo 4.8 Sıvı yulaf ortamında tohumların glikomannan içeriği.....	105
Tablo 4.9 Toprak ortamında tohumların glikomannan içeriği	106

1. GİRİŞ

Nanopartiküller, benzersiz fizikokimyasal özellikleri nedeniyle çok çekici bir araştırma konusu haline gelmiştir. Nanoteknolojinin ortaya çıkışı, nanopartiküllerin çeşitli alanlardaki potansiyel faydaları için kapsamlı bir şekilde çalışılmasıyla yeni bir bilimsel araştırma çağı başlatmıştır. Son yıllarda nanopartiküller, biyotıp, elektronik ve tarım da dahil olmak üzere çeşitli alanlardaki potansiyel uygulamalarından dolayı büyük ilgi görmüştür. Önemli araştırma alanlarından biri, nanopartiküllerin, bitkilerin, özellikle de tohumların büyümesi ve gelişmesi üzerindeki etkisidir. (Hano ve Abbasi, 2021).

Nanopartiküller içinde önemli bir uygulama örneğini oluşturan oksit nanopartiküllerin tohum çimlenmesi üzerindeki etkisi, tohumların, bitkilerin büyümesi ve gelişmesinde oynadığı kritik rol nedeniyle birçok araştırmacının ilgi konusu olmuştur. Tohum çimlenmesi, su alımı, enzimatik aktivasyon ve enerji üretimi gibi çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerin aktivasyonunu içeren karmaşık bir süreçtir. Bu işlemlerdeki herhangi bir rahatsızlık, tohum canlılığının azalmasına ve çimlenmenin gecikmesine veya engellenmesine neden olabilir. Bu da nihai olarak bitki büyümesini ve üretkenliğini etkileyebilir (Ali ve Elozeiri, 2017).

Demir oksit nanopartiküllerin (Fe NP'ler) tohum çimlenmesi ve bitki büyümesi üzerindeki olumlu etkileri hakkında birkaç çalışma rapor edilirken (Ali ve Elozeiri, 2017; do Espirito Santo Pereira vd, 2021), diğer bazı çalışmalarda olumsuz etkiler öne sürülmüştür (Kumar vd, 2015; Srivastava, 2014). Fe NP'lerin tohum çimlenmesi üzerindeki etkisinin, Fe NP'lerin tipi ve konsantrasyonu, tohum tipi ve çevre koşulları gibi çeşitli faktörlere bağlı olduğu gösterilmiştir. Fe NP'lerin tohum çimlenmesi ve bitki büyümesi üzerindeki etkisinin arkasındaki mekanizmaları daha iyi anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Alkhatib vd, 2021; Shelar vd, 2023).

Nanopartiküller, polisakkaritlerin sentezinde yer alan enzimlerin aktivitesini artırarak tohum büyümesini etkileyebilir. Alfa-amilazlar gibi enzimler, bitkilerde nişasta hidrolizinden sorumlu enzimdir. Pirinç tohumlarına Ag NP'ler uygulanması, α -amilaz aktivitesinde, çözünür şeker içeriğinde, aquaporin gen ekspresyonunda ve Reaktif Oksijen Türleri (ROS) üretiminde ilişkili değişikliklerle birlikte, çimlenme performansının ve fide gücünün artmasına yol açmıştır. Nişasta hidrolizinden

sorumlu enzim olan α -amilazın aktivitesini arttırdığı ve tohumlarda daha yüksek seviyelerde çözünür şeker içeriği ile sonuçlandığı bulunmuştur (Mahakham vd, 2017).

Tohumlara metal nanopartiküllerin uygulanması, diğer uygulanmalarla kıyasla daha yüksek bir galakturonik asit konsantrasyonu ile sonuçlanmıştır. Bu çalışmanın bulguları, tohumların metal nanopartiküller, özellikle bakır nanopartiküller ile uygulanmasının, bitki büyümesini ve polisakkaritlerin birikimini artırabileceğini düşündürmüştür. Bu sonuçlar, mahsul verimini artırmayı ve bitki türevli ürünlerin bileşimini değiştirmeyi amaçlayan tarımsal uygulamalar için potansiyel etkilere sahiptir. Ayrıca metal nanopartiküllerin kullanımının bitki büyümesinin teşvik edilmesi ve polisakkarit birikimin artırılması ile ilgili etkilerinin anlaşılması konusunda değerli bilgiler sağlamaktadır (Churilova vd, 2020).

Nanopartiküller, bitki hücreleri ile etkileşime girebilir ve gen ifadesinde değişikliklere yol açan sinyal yollarını tetikleyebilir. Gen ifadesindeki bu değişiklikler, absisik asit, gibberellinler, oksinler ve etilen sentezinde yer alan genlerin yukarı regülasyonuna yol açabilir. Tohumlar nanomalzeme içeren çözeltilerde belirli bir süre bekletildiğinde, bağlı nanopartiküller tarafından üretilen $\cdot\text{OH}$ radikalleri hücre duvarlarını gevşetmesi nedeniyle fide büyümesi uyarılır. Tohumların hazırlığında nanopartiküllerin kullanılması, çimlenmeyi ve bitkinin genel yaşam döngüsünün kurulmasını önemli ölçüde etkileyen tohum metabolizmasını ve sinyal yollarını değiştirmek için etkili bir yöntemdir (Berners-Lee vd, 2018).

Nanopartiküller ayrıca, artan polisakkarit sentezine yol açarak bitki büyümesini teşvik eden rizobakteriler (PGPR) aktivitesini artırarak tohum büyümesini etkileyebilir. PGPR, rizosferi kolonize edebilen ftohormonlar ve polisakkaritler gibi büyümeyi destekleyen maddeler üreterek bitki büyümesini destekleyen faydalı bakterilerdir. Nanopartiküller, PGPR'nin aktivitesini artırarak polisakkarit sentezinin ve bitki büyümesinin artmasına neden olabilir. Ag NP'lerinin bitkilerinde PGPR'nin aktivitesini, polisakkarit sentezini ve bitki büyümesini artırdığı görülmüştür (Gambino vd, 2015; Nawaz ve Bano, 2020) .

Nanopartiküllerin tohum çimlenmesi üzerindeki etkilerini araştıran birkaç çalışma olmasına rağmen, literatüre göre, Fe NP'lerin orkide tohumlarının

çimlenmesi üzerindeki etkisini spesifik olarak araştıran hiçbir çalışma yoktur.

Orkideler en popüler süs bitkilerinden biridir ve tohumları bahçecilik, gıda ve ilaç gibi çeşitli alanlarda kullanıldığından dolayı ekonomik değeri yüksektir. Glikomannan, orkide tohumlarında bulunan ve çeşitli faydalı özelliklere sahip doğal bir polisakkarittir. Bu nedenle, orkide tohumlarının glikomannan içeriğinin artırılması önemli ekonomik ve çevresel faydalar sağlayabilir (Kurt, 2017).

Orkide tohumları ayrıca diğer bitkilerden farklı olarak benzersiz bir çimlenme sürecine sahiptir ve bu da onları ilginç bir çalışma konusu haline getirir (Deb ve Imchen, 2011). Orkidelerin yetiştirilmeleri, orkide türlerinin genetik çeşitliliğini korumak ve geliştirmek için büyük ölçüde tohum çimlenmesine ve bitki çoğaltılmasına dayanır (Irawati, 2012). Bu nedenle, orkide tohumları üzerindeki herhangi bir olumsuz etkisinin yetiştirmesinde önemli ekonomik sonuçları olabilir.

Orkidelerin ekonomik önemlerinin yanı sıra bu bitkilerin ekolojik açıdan da önemli görevleri vardır. Orkideler birçok ekosistemin önemli üyeleridir, tozlaşma ve besin döngüsünde kilit roller oynarlar. Çevresel değişikliklere karşı duyarlılıkları nedeniyle sıklıkla ekosistem sağlığının göstergeleri olarak da kullanılırlar (Newman, 2009).

Öte yandan, tohumlara eşlik eden mikroorganizmalar topluluğu, tohumların çimlenmesinde ve bitki büyümesinde çok önemli bir rol oynar. Mikroorganizmalar topluluğu, besin alımını kolaylaştırarak, bitki patojenlerini baskılayarak ve bitki büyümesini teşvik eden maddeler üreterek tohum çimlenmesini teşvik edebilir ve bitki büyümesini iyileştirebilir (Kaur ve Sharma, 2021).

Özetle, orkidelerin ekonomik ve ekolojik önemi, orkide tohumlarının benzersiz çimlenme süreci ve bakteri topluluklarının tohumların çimlenmesi ve bitki büyümesindeki rolü göz önüne alındığında, Fe NP'lerinin orkide tohumlarının çimlenmesi üzerindeki spesifik etkilerinin araştırılması esastır. Bu araştırma, önemli bir bilgi boşluğunu dolduracak ve Fe NP'lerin glikomannan içeriği, ilişkili mikrobiyal topluluk üzerindeki etkilerini araştırarak, orkide tohumlarının çimlenmesini ve büyümesini iyileştirmede nanoteknolojinin potansiyel kullanımına ilişkin içgörü sağlayacaktır.

Bu çalışmanın amacı, Fe NP'lerin *Anacamptis laxiflora* tohumlarının çimlenmesi ve tohumlardaki glikomannan içeriği üzerindeki etkilerini araştırmakla

birlikte, metagenomik teknolojiyi kullanarak Fe NP'lerin orkide tohumlarıyla ilişkili mikrobiyal topluluk üzerindeki etkisini araştırmaktır.

Genel olarak bu alışma, Fe NP'lerin *Anacamptis laxiflora* tohumlarının çimlenmesi ve büyümesi üzerindeki etkisinin yanı sıra bunların ilişkili mikrobiyal topluluk üzerindeki etkileri hakkında değerli bilgiler sağlama potansiyeline sahiptir. Bu çalışmanın bulguları, nanoteknoloji kullanarak orkide tohumlarının çimlenmesini, büyümesini iyileştirmek, ve stratejiler geliştirmek için kullanılabilirken, aynı zamanda orkideler ve ilişkili mikrobiyal topluluk arasındaki simbiyotik ilişki de mikroorganizmaların oynadığı önemli rolün daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nanoteknoloji

Nanoteknoloji, maddenin atomik ve moleküler düzeyde kontrol edilmesi anlamına gelir. Kulağa bir miktar karmaşık gelse de gündelik hayatta nanoteknoloji ürünleri ile karşılaşma sıklığımız giderek artar. Bir metrenin milyarda biri ölçeğinde çalışan Nanoteknoloji, teknolojik ve endüstriyel sektör için malzeme iyileştirilmesi sayesinde devrim niteliğinde değişimlerin ortaya çıkmasına yardım eder. Nano malzemeler elektronik, manyetik ve optoelektronik, biyomedikal, ilaç, kozmetik, enerji, katalitik ve malzeme uygulamalarının yanı sıra savunma, ulaşım, gıda güvenliği ve ekoloji gibi farklı birçok alanda kullanılır. Akıllı nesneler yaratmak için malzemelerin moleküler yapısını değiştiren nanoteknoloji, bilim ve endüstri için devrim niteliğinde muazzam yeniliklere olanaklar sağlar. Kanseri hücreleriyle mücadele ederken hedef gözetilen parçacıklar, enerji tasarruflu ve hızlı mikroçipler, uzun ömürlü piller, bunlardan yalnızca birkaçıdır. Gıda ambalaj malzemelerinin kalitesini iyileştirmek ve raf ömürlerini uzatmak amacıyla polimerlerle birleştirilmiş gümüş nanoparçacıklar kullanılır. Gıdanın daha uzun süre dayanmasını sağlayan, tadını koruyan, gıdadaki biyolojik değişiklikleri tespit eden akıllı paketlenme, nanoteknolojinin önemli uygulamalarından biridir. Tarım işletmelerinde de gıda güvenliği için nanoteknolojiden faydalanılır. Nanoteknoloji mühendisliği geliştikçe, bilim insanları moleküler düzeyde yeni malzemeleri araştırma ve üretme yöntemleri geliştirmeye devam edebilir. Araştırmacılar, gelecekte nanoteknoloji kullanan ürünlerin sürdürülebilirlik, tarım, tıp ve robotik gibi alanlarda ilerleme sağlamasını beklemektedir. Giderek daha fazla endüstriyel alanda nanoteknolojiden faydalanılması ekonomik büyümeye katkı sağlayabilir. Yeni iş alanlarının ortaya çıkmasının yanı sıra iş süreçleri daha hızlı, daha verimli hale gelebilir (Mani ve Mondal, 2016).

Nanoteknolojinin tarihi, zanaatkarların çanak çömlek ve cam üzerinde dekoratif efektler yaratmak için altın nanopartikülleri (Au NP'leri) ve gümüş nanopartikülleri (Ag NP'leri) kullandıkları eski zamanlara kadar uzanabilir. Bununla birlikte, teknolojinin gelişmesiyle adeta bilim dünyasının trendi olmayı başaran nanoteknoloji, ilk kez Norio Taniguchi tarafından kullanılmıştır. Tarihi 1974 yılına dayanan nanoteknolojinin yaygınlaşması uzun yıllar almıştır. Nanoteknolojinin

babası olarak kabul edilen dünyaca ünlü Fizikçi Richard Feynman, 1959 yılında Kaliforniya Teknoloji Enstitüsü'nde verdiği bir konferansında “There’s Plenty of Room at the Bottom (Aşağıda Bir Sürü Yer Var)” başlıklı konuşmasını yaparak bilim dünyasında yeni bir sayfa açmıştır. Feynman bu konferansında her bir atomun ve molekülün ayrı ayrı kontrol edilebileceği bir sürecin yer aldığından bahsetmiştir. 1986 yılında ise Feynman dan etkilenen K. Eric Drexler nanoteknoloji terimini “Engines of Creation: The Coming Era of nanotechnology” adlı kitabında bahsetmiştir (Sudha vd, 2018).

Nano kelimesinin kökü Yunancadan gelmekte olup cüce anlamındadır. Günümüzde nano kelimesi bir ölçek olarak kullanılır ve 1 nanometre 1 metrenin milyarda birine tekabül etmektedir. Nanoteknoloji ise maddenin atomik, moleküler ve supramoleküler seviyede kontrolüdür. Bununla birlikte, nano boyutta yapılan çalışmaların bütününe ifade etmektedir. Yani bir diğer ifade ile, nanoteknoloji, çok küçük boyuttaki (1 ile 100nm boyutlarındaki) malzemelerin işlenmesidir. (Wei, 2006).

Günümüzde bilim insanları, fizik, kimya, biyoloji, bilgisayar, elektrik & elektronik, matematik, eczacılık, malzeme bilimi, tıp ve kozmetik vb. alanlarında nanoteknolojiyi kullanarak birçok çalışma yapmaktadır. Nanoteknoloji kullanılarak üretilen teknolojik ürünlerden bazıları şunlardır: Güneş pilleri, çok küçük boyutlu elektrik devre elemanları, çok küçük ölçekli modellemeler, ultraviole korumalı gözlükler, kuantum bilgisayarları, kendini temizleyen camlar, nano robotlar, nemlendiriciler, saç bakım ürünleri, güneş kremi vb. gibi. Ayrıca, nanoteknolojinin tarımda kullanımı, mahsul verimini ve üretimi artırma potansiyeli nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Örneğin, Fe NP’lerin gübre olarak kullanılması, besin kullanım verimliliğini artırdığı ve besin kaybını azalttığı, bunun da uygun maliyetli çevre dostu gübrelere yol açtığı görülmüştür (Rui vd, 2016).

Genel olarak nanoteknoloji, mevcut sorunlara yeni ve yenilikçi çözümler sunarak tarımda devrim yaratma potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte, tarımda nanopartiküllerin kullanımıyla ilişkili potansiyel riskler ve çevresel etkilere dikkat edilmelidir. Bu nedenle, nanomalzemelerin bitkiler ve çevre üzerindeki etkilerini tam olarak anlamak ve kullanımlarına yönelik uygun düzenlemeleri geliştirmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Gardea-Torresdey vd, 2014).

Tarımda nanoteknolojinin en umut verici uygulamalarından biri,

nanogübrelerin geliştirilmesidir. Nanogübreler, bitkilere besin iletiminin etkinliğini artırabilen, mahsul veriminin artmasına ve toprak sağlığının iyileştirilmesine yol açan nanopartiküllerden oluşur. Nanogübrelerin yavaş salınma özellikleri, çevre üzerindeki etkiyi en aza indirerek besin kaybını ve sızıntıyı da azaltabilir (Manjunatha vd, 2016).

Nano-gübreler konusunda yapılan pek çok çalışmada sahip oldukları geniş yüzey alanlarının yanı sıra bitkilerin yaprak ve kök gözenek boyutlarından daha küçük boyutlara sahip olduklarından temas ettikleri yüzeyden bitkiye geçişleri, besinlerin alımını daha kolay hale getirerek kullanım etkinliğini arttırdıkları belirtilmiştir. Nano-gübrelerin, bitkinin yaşam periyodu boyunca gelişime olumlu katkı sağlamasına yardımcı olmalarının temelinde bitki metabolizmasında yarattığı olumlu etkilerin, enzimsel ve hormonal düzeyde etki mekanizması ile değişken ve şiddetli atmosferik koşullara, biyotik-abiyotik strese ve hastalıklara karşı dirençli hale gelebildiği öne sürülmüştür. Toprakta nanopartikül uygulamalarıyla elverişli ve yeterli miktarda mikro element içeriği bulunabilir, böylece bitkilerin patojenlere karşı direnci de artabilir. Fakat bazı faktörler toprakta bulunan besin elementlerinin bitkiler tarafından alımı üzerinde olumsuz etki yaparak sınırlandırır. Alkalın topraklarda mikro besin elementlerinin bitki tarafından alınabilirliği azalmaktadır. Örneğin; toprak pH'sı bazikleştikçe topraklarda çinko, mangan ve demir biyo yararlanılabilirliği azalmaktadır. Bu elementlerin alımları kökler tarafından sınırlandırılarak bitki enfeksiyona açık hale gelmiş olur. Ghafariyan vd. (2013) tarafından yapılan bir sera denemesinde, süper paramanyetik Fe-NP'lerin düşük konsantrasyonlarının bile hidrofobik koşullar altında, soya fasulyesi yapraklarındaki klorofil içeriğini önemli ölçüde arttırdığını bildirmişlerdir. Böylelikle Fe-NP'lerin soya fasulyesinde demir kaynağı olarak kullanılabilir ve demir eksikliğinin klorotik belirtilerini azaltabileceği gösterilmiştir. Fe-NP'lerin 45 mg L⁻¹ konsantrasyonundaki kullanma etkisi Fe-EDTA'nın aynı dozdaki kullanım etkisinin bitkiye yaptığı etkilerinin benzer olduğu gözlenmiştir. Delfani vd (2014), bezelyede yaptıkları çalışmada 500 mg Fe-NP'ler L⁻¹'nin yapraktan uygulamasının, bitki başına bakla sayısını (%47 oranında), 1.000 tane ağırlığında (%7 oranında), Fe içeriğini (%34 oranında) ve klorofil içeriğini (%10 oranında) ise kontrole göre arttırdığını tespit etmişlerdir. Fe-NP'lerin uygulanması ile elde edilen ürün performansı, Fe tuzu ile elde edilen ürün performansından daha

fazla olmuştur. Fe-NP muamelesi altında olan bitkilerde sırasıyla %28, %4, %45 ve %12 artmıştır (Cinisli vd, 2019)..

Tarımda nanoteknolojinin bir başka potansiyel uygulaması, nanopestisitlerin geliştirilmesidir. Nanopestisitler, zararlıların kütikülüne nüfuz edebilen, etkinliğin artmasına ve uygulama oranlarının düşmesine yol açan nanopartiküllerden oluşur. Nanopestisitler, zararlıları kontrol etmek için gereken kimyasal miktarını en aza indirerek geleneksel pestisitlerin çevresel etkisini de azaltabilir (Joshi vd, 2019).

Nanoteknoloji, tarımda sulama sistemlerinin verimliliğini artırmak için de kullanılabilir. Nanosensörler, su israfını azaltabilen ve mahsul verimini artırabilen hassas sulamaya izin vererek toprak nem seviyesini izlemek için kullanılabilir. Nanomembranlar ayrıca, sulama suyundan kirleticileri filtrelemek için kullanılabilir, bu da kirlenme riskini azaltır ve toprak sağlığını iyileştirir (Yadav vd, 2023).

Tarımdaki potansiyel uygulamalarına ek olarak, nanoteknoloji, tohumların çimlenmesini ve büyümesini de etkileyebilir. Nanopartiküller, tohum kabuğunun fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirerek tohum çimlenmesini etkileyebilir. Bazı araştırmalar, belirli nanopartiküllerin uygulanması tohum çimlenmesini ve fide büyümesini artırabildiğini göstermiştir (do Espirito Santo Pereira vd, 2021).

Nanoteknolojinin tarımdaki potansiyel faydalarına rağmen, potansiyel riskleri ve çevresel etkileri konusunda da endişeler var. Örneğin, nanomalzemelerin kullanımı, toprakta veya yeraltı sularında nanopartiküllerin birikmesi gibi istenmeyen sonuçlara yol açabilir. Nanomalzemelerin bitkiler ve çevre üzerindeki etkilerini tam olarak anlamak ve kullanımlarına yönelik uygun düzenlemeleri geliştirmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Hong vd, 2013).

Diğer nanopartiküllerin yanı sıra Fe NP'leri tohum çimlenmesini ve büyümesini iyileştirebilir. Son araştırmalar, tohumların Fe NP'leri ile muamelesinin, çeşitli bitki türlerinde tohum çimlenmesini, kök uzamasını ve biyokütle üretimini artırabildiğini göstermiştir. Fe NP'leri ayrıca, su alımını ve toprağın su tutma kapasitesini artırarak bitkilerde kuraklık toleransını tetiklediği bildirilmektedir. Ayrıca, Fe NP'lerin, savunma ile ilgili genlerin ekspresyonunu indükleyerek patojenlere karşı bitki savunmasını iyileştirdiği görülmüştür (Banerjee vd, 2021).

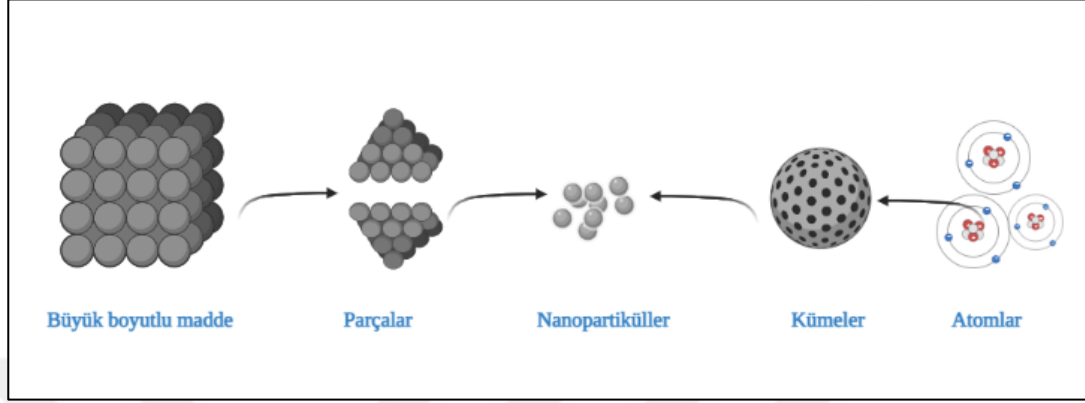
2.1.1. Nanopartiküllerin Üretimine Yönelik Yaklaşımlar

Yukarıdan aşağıya yönleme dahil edilen yöntemde dökme malzeme, dış mekanik veya kimyasal işlemlerin uyarılması nedeniyle nano ölçeğe indirilen küçük parçalara bölünmesi ilkesine dayanmaktadır. Yukarıdan aşağıya yöntem için kullanılabilecek yöntemlerin en yaygın örnekleri şunlardır: mekanik taşlama ve dağlama. Bu teknolojiler, geleneksel taşlama işlemlerinden daha fazla enerji tükettikleri için yüksek enerjili öğütücüler veya yüksek hızlı öğütücüler olarak da bilinir. (Şekil 2.1). Bu yaklaşım, doğal olarak sert ve kimyasal reaksiyonlara dirençli malzemeler için en uygun olanıdır. Yukarıdan aşağıya sentez için en sık kullanılan yöntemler arasında öğütme, litografi ve lazer ablasyonu yer almaktadır (Abid vd, 2022).

Yukarıdan aşağıya yönleme dahil edilen yöntemde dökme malzeme, dış mekanik veya kimyasal işlemlerin uyarılması nedeniyle nano ölçeğe indirilen küçük parçalara bölünmesi ilkesine dayanmaktadır. Yukarıdan aşağıya yöntem için kullanılabilecek yöntemlerin en yaygın örnekleri şunlardır: mekanik taşlama ve dağlama. Bu teknolojiler, geleneksel taşlama işlemlerinden daha fazla enerji tükettikleri için yüksek enerjili öğütücüler veya yüksek hızlı öğütücüler olarak da bilinir. Bu şekilde üretim, mikroskopik seviyeye ulaşmaya kadar daha büyük malzemelerden başlar. Buğdayın kuru toz öğütme yöntemi ve bu nedenle iyileştirilmiş su tutma kapasitesi bu yöntemin iyi bir örneği olabilir. Bir çalışmada, yeşil çay partiküllerinin 1000 nm'ye düşürülmesinin yeşil çayın sindirimini ve emilimini 15 arttırdığı ve bunun sonucunda oksijeni uzaklaştıran enzimlerin arttığı ve daha bilimsel ifadeyle antioksidan etkisinin arttığı bildirilmiştir (Machado vd., 2013).

Bir başka yaklaşım olan, Aşağıdan Yukarıya Sentez yaklaşımı, küçük moleküllerin veya atomların daha büyük yapılara birleştirilmesini içerir (Şekil 2.1). Bu yöntem, organik veya inorganik yapılar oluşturmak için atomların veya moleküllerin kullanımına dayanır. Karbon nanotüpleri, nanoyapıları bağlamak için biyolojik kuvvetlerin (DNA gibi) kendi kendini birleştirme özellikleri kullanılarak kontrol edilebilmektedir. Bu yöntemin uygulanması, atomik veya moleküler yapıları büyütmek için kimyasal reaksiyonlar kullanılarak parçacıkların oluşumu olarak tanımlanmaktadır. Gaz yoğunlaştırma teknolojisi, aşağıdan yukarıya bir yaklaşım kullanarak nano metalleri ve alaşımlarını üretmek için ilk yöntemdir. Kimyasal buhar kaplama, kimyasal buhar yoğunlaşması, sol jel ve sprej piroliz yöntemleri, yöntemin

iyi bilinen diğer üyeleridir (Jana vd, 2001). Çözelti ortamında nanopartikülleri sentezlemek için birçok klasik fiziksel ve kimyasal yöntem kullanılmıştır. Günümüzde, ucuz, çevre dostu ve toksik olmayan biyolojik yöntemleri içeren "yeşil nanoteknoloji" ortaya çıkmıştır (Bar vd., 2009). Ayrıca, klasik yöntem içinde çeşitli



Şekil 2.1 Nanopartiküllerin sentezinde kullanılan yaklaşımlar

yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları elektrokimyasal sentez, ters misel / mikroemülsiyon yöntemi, hidrotermal sentez, sonokimyasal çökeltme ve kimyasal indirgeme gibi tekniklerdir. Bu çalışmaların çoğunda elde edilen nano yapıların belirli bir boyut ve morfolojiye sahip olması amaçlanmıştır. Her ne kadar klasik sentez yöntemleri nanoparçacıkları istenen boyut ve morfoloji ile sentezlemek için kullanılabilse de, bu yöntemlerin eksikliklerinden dolayı yeşil nanoteknoloji daha ekonomik, daha basit ve toksik olmayan malzemeleri incelemek için kullanılmıştır. (Abid vd, 2022).

2.2. Nanopartiküller Sentez Yöntemleri

2.2.1. Kimyasal Sentez

Kimyasal sentez, nanopartikülleri üretmek için kullanılan popüler yöntemdir. Kimyasal sentez, kimyasal reaksiyonlarla nanopartiküllerin oluşumunu içerir (Schmidt, 2001). Süreç, öncül malzemenin seçimi ile başlar. Öncül malzeme sıvı, katı veya gaz formunda olabilir. Daha sonra, nanopartiküllerin oluşumuyla sonuçlanan kimyasal reaksiyonu tetikleyen bir indirgeyici madde ile karıştırılır (Swihart, 2003). İndirgeyici ajan, nanopartiküller oluşturmak için öncüye elektronlar sağlayan bir elektron donörü görevi görür. Kimyasal sentezle üretilen nanopartiküller tipik olarak tekdağılımdır, yani boyut ve şekil olarak tekdüzedirler (Hyeon, 2003).

Kimyasal sentez yönteminin avantajları ve dezavantajları vardır ve belirli bir

yöntemin seçimi, öncü malzemenin türüne, istenen boyut ve nanopartiküllerin şekline ve nanopartiküllerin uygulamasına bağlıdır (Hachem vd, 2022).

Kimyasal sentezin en önemli avantajlarından biri, boyutları ve şekilleri üzerinde yüksek derecede kontrol ile nanopartiküllerin üretimine izin vermesidir. Bu kontrol esastır, çünkü nanopartiküllerin özellikleri boyutlarına ve şekillerine bağlıdır. Örneğin, 10 nm çapındaki altın nanopartikülleri, 100 nm çapındaki altın nanopartiküllerinden farklı özellikler sergiler. Nanopartiküllerin boyutu ve şekli de kararlılıklarını, reaktivitelerini ve toksisitelerini etkiler (Khan vd, 2014).

Tek dağılımlı nanopartiküller üretebilme yeteneği, kimyasal sentezin bir başka avantajıdır. Tek dağılımlı nanopartiküller, boyut ve şekil bakımından tekdüzedir ve bu da onları ilaç verme ve görüntüleme dahil birçok uygulama için ideal kılar. Tek dağılımlı nanopartiküller ayrıca dar boyut dağılımlarına sahiptir, bu da hepsinin benzer boyutta olduğu anlamına gelir. Bu tekdüzelik, tekrar üretilebilirlik ve kalite kontrolü için önemli olan nanopartiküllerin özelliklerindeki değişkenliği azalttığı için önemlidir (Dave ve Gao, 2009).

Kimyasal sentez aynı zamanda ölçeklenebilir bir süreçtir, bu da büyük miktarlarda nanopartiküller üretmek için kullanılabileceği anlamına gelir. Bu ölçeklenebilirlik, büyük miktarlarda nanopartiküllerin gerekli olduğu endüstriyel uygulamalar için gereklidir. Kimyasal sentez kullanarak büyük miktarlarda nanopartiküller üretme yeteneği, aynı zamanda onu nanopartiküller üretmek için uygun maliyetli bir yöntem haline getirir (Chaudhary ve Chaudhary, 2018).

Kimyasal sentez, nanopartiküllerin sentezlenmesinde en sık kullanılan yöntemlerden biri olmakla birlikte dezavantajları da vardır. Nanopartiküllerin kimyasal sentezinin ana dezavantajlarından bazıları şunlardır (Modan ve PLĀIAŞU, 2020):

- Toksisite ve çevresel etki: Nanopartiküllerin kimyasal sentezi tipik olarak, insan sağlığı ve çevre üzerinde olumsuz etkisi olabilecek toksik ve tehlikeli kimyasalların kullanımını içerir. Örneğin hekzan ve toluen gibi solventlerin kullanımı hava kirliliğine ve su kirliliğine neden olabilir. Ayrıca sentez sürecinde kullanılan bazı kimyasalların insan hücreleri ve diğer canlı organizmalar üzerinde toksik etkileri olabilmektedir.
- Boyut ve şekil üzerinde kontrol eksikliği: Kimyasal sentezle üretilen

nanopartiküllerin boyutunun ve şeklinin kontrol edilmesi zor olabilir. Bu, nanopartiküllerin özelliklerini ve performansını etkileyebilecek geniş bir boyut dağılımına ve düzensiz şekillere neden olabilir.

- Büyütme zorluğu: Büyük ölçekli üretim için kimyasal sentez yöntemlerinin ölçeğini büyütmek zor olabilir, bu da nanopartiküllerin ticari potansiyelini sınırlayabilir.
- Yüksek maliyet: Kimyasal sentez, pahalı reaktifler ve ekipman gerektiren maliyetli bir süreç olabilir. Sürecin maliyeti, nanopartiküllerin erişilebilirliğini ve karşılanabilirliğini sınırlayabilir.
- Zaman alıcı olması: Nanopartiküllerin kimyasal sentezi, çok sayıda adım ve uzun reaksiyon süreleri gerektiren, zaman alıcı bir süreç olabilir. Bu, sentez işleminin etkinliğini ve üretkenliğini sınırlayabilir.
- Güvenlikle ilgili endişeler: Nanopartiküllerin kimyasal sentezi, özellikle toksik kimyasallarla çalışırken ve yüksek basınçlı veya yüksek sıcaklıktaki ekipmanları çalıştırırken, araştırmacılar ve çalışanlar için güvenlik riskleri oluşturabilir.
- Tehlikeli atık üretimi: Nanopartiküllerin kimyasal sentezi solventler, reaktifler ve yan ürünler dahil olmak üzere tehlikeli atık üretebilir. Bu atığın uygun şekilde bertaraf edilmesi maliyetli ve zorlu olabilir ve ayrıca olumsuz çevresel etkileri olabilir.

Sonuç olarak, araştırmacılar daha sürdürülebilir ve çevre dostu olan nanopartiküller üretmek için alternatif yöntemler araştırmaktadırlar. Böyle bir alternatif yöntem, nanopartiküllerin yeşil sentezidir.

2.2.2. Nanopartiküllerin Yeşil Sentezi

Geleneksel yöntemlerde karşılaşılan kısıtlamalar ve son yıllarda insan sağlığı ve çevre konularında artan bilinç, nanopartiküllerin üretimi için daha sürdürülebilir metotların geliştirilmesini beraberinde getirmiş ve sürdürülebilirlik hedefini karşılayan “yeşil nanoteknoloji” günümüzde oldukça ilgi çeken bir konuma gelmiştir. Yeşil nanoteknoloji, metal iyonlarının biyolojik organizmaların hücre içi-hücre dışı metabolitleri aracılığıyla indirgenmesi ve biyolojik polisakkaritlerle kaplanarak stabilizasyonlarının sağlanmasını hedefleyen bir yaklaşımdır.

Nanopartiküllerin yeşil sentezi için bitkiler, funguslar, bakteriler, virüsler, mikroalgler, aktinomisetler gibi biyolojik organizmaların hücre içi metabolitlerini içeren ham ekstreleri, veya saflaştırılmış enzim, pigment, polisakkarit gibi biyomolekülleri, indirgeyici ve stabilize edici ajan olarak kullanılabilir. Biyolojik organizmaların çoğunluğu sahip oldukları redüktaz enzimleri sayesinde metal tuzlarının hücre içerisinde depolanmasını ve detoksifikasyonunu gerçekleştirebilmektedir. Bu özellikleri ile hücre içine aldıkları metal iyonlarını indirgeyerek metal nanopartiküllere dönüştürebilmektedirler. Ayrıca redüktaz enzimlerini içeren ham ekstre ile veya saflaştırılmış redüktaz enzimleri ile hücre dışı ortamda da metal iyonlarının metal nanopartiküllere indirgenebilmesi mümkün olmaktadır. Geleneksel yöntemlere alternatif olarak, biyolojik sentez yaklaşımında indirgeyici, stabilize edici kimyasallara gerek duyulmadan nanopartikül sentezi mümkün olmaktadır. Böylece daha yüksek saflıkta, kimyasal kalıntı içermeyen, insan sağlığı ve çevre ile biyouyumlu, daha sürdürülebilir nanomalzemeler üretilmektedir (Multaf vd, 2023).

Yeşil sentez yöntemi ayrıca toksik kimyasallar kullanmadığı veya tehlikeli atık üretmediği için çevre dostudur. Yeşil sentez yöntemi, geleneksel yöntemlerle kolayca elde edilemeyen benzersiz özelliklere sahip nanopartiküller üretebilir. Örneğin, doğal ekstraktlar, nanopartikül sentezi için indirgeyici ajanlar ve stabilizatörler olarak hareket edebilen flavonoidler, alkaloidler ve terpenoidler gibi çeşitli ikincil metabolitler içerir. Bu bileşikler ayrıca nanopartiküllerin yüzey kimyasını değiştirerek onları daha kararlı ve biyouyumlu hale getirebilir (Kuppusamy vd, 2016).

Yeşil sentez yönteminin birçok avantajına rağmen, hala ele alınması gereken bazı zorluklar vardır. Temel zorluklardan biri, sentez sürecinde standardizasyon eksikliğidir. Bitki ekstraktları çeşitli sekonder metabolitler içerdiğinden, sentez süreci bitki ekstraktının türü, ekstraksiyon yöntemi ve ekstraktın konsantrasyonu gibi faktörlerden etkilenebilir (Gilbertson vd, 2015).

Diğer mikroorganizmalar arasında funguslar biyosentetik potansiyelleri bakımından öne çıkan organizmalardır. Son yıllarda funguslar içinde endofitik funguslara olan ilgi artmaktadır. Endofitik funguslar, herhangi bir ani, olumsuz etkiye neden olmadan canlı, bitkilerin iç dokularını kolonize eden mikroorganizmalardır. Endofitik funguslar, antikanser, antimikrobiyal ve diğer

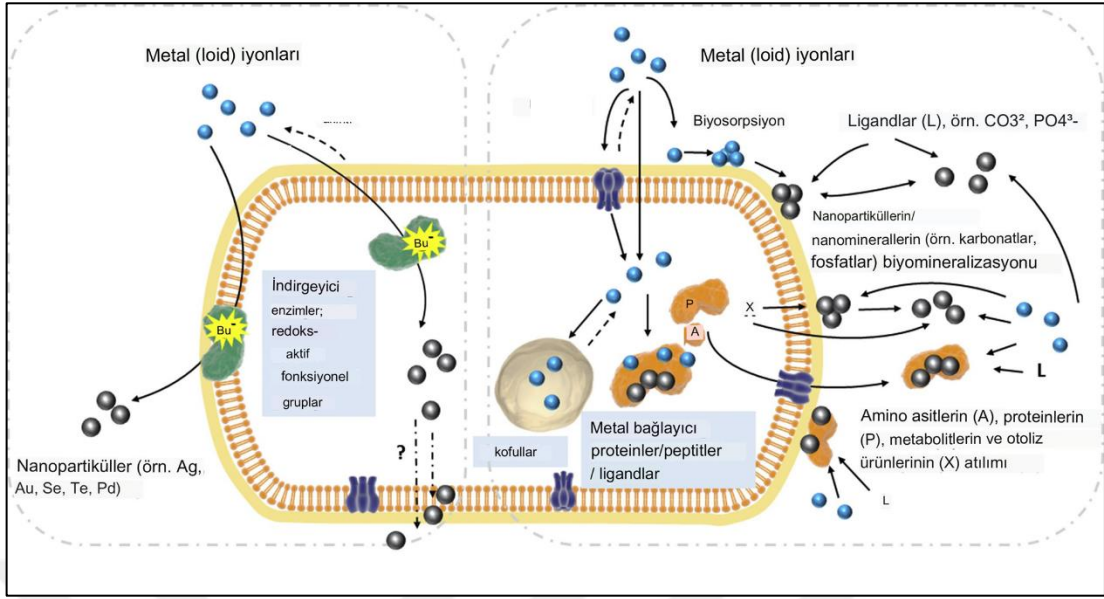
biyolojik aktivitelere sahip çeşitli yapısal olarak yeni aktif ikincil metabolitlerin önemli kaynakları olarak kabul edilmiştir (Bhardwaj ve Agrawal, 2014). Metal nanopartiküllerin endofitik funguslar aracılığıyla sentezi basitliği, hızlı sentez oranı ve çevre dostu nedeniyle büyük önem kazanmaktadır (Prasad vd, 2018).

2.2.2.1. Mikonanoteknoloji

Funguslar, karmaşık makromolekülleri hidrolize eden çok sayıda hücre dışı enzimi sentezleme yeteneğine sahip oldukları için tipik olarak ayrıştırıcı organizmalar olarak bilinen, doğada bulunan ökaryotik organizmalardır. Fungusların metabolik kapasitesi ve biyoproseslerdeki kullanımları, metalik nanopartiküller üreticileri olarak fungus uygulamalarına büyük ilgi uyandırmıştır (Pantidos ve Horsfall, 2014). Fungusların çoğu, yüksek duvar bağlama ve hücre içi metal alımı yeteneğine sahiptir (Bhardwaj vd, 2020). Metabolik mekanizmaları, hücre içi/hücre içi nanopartiküller sentezi durumunda olduğu gibi doğrudan veya salgılanan metabolitlerin aracılık ettiği hücre dışı nanopartiküller sentezi ile dolaylı olarak katılabilir (Guilger-Casagrande ve Lima, 2019). Bu nedenle, metal nanopartikülleri, sentez yoluna, hücre içi veya hücre dışı indirgeyici enzimlere ve biyomimetik mineralizasyona göre nano veya mezoyapılı olabilir. Bu olasılıklar, hücre toleransı ve metal biyobirikim kabiliyeti ile ilişkilidir (Gadd, 2021). Bu bağlamda, metal açısından zengin ortamlardan izole edilen fungus türleri, metal nanopartikülleri biyosentezi daha iyi bir kaynaktır (Bhargava vd, 2016).

Mikonanoteknoloji, mikoloji ve nanoteknoloji gibi iki farklı bilim disiplininin birleşiminden oluşan bir teknolojidir. Mikanoteknoloji, funguslar ve metabolitleri tarafından nanopartiküllerin üretilmesi, özellikle tıp alanında geniş uygulama alanı bulabilmektedir. Bu iki bilim disiplininin kombinasyonu, funguslardaki geniş çeşitlilik nedeniyle etkili olarak görülmektedir. Son zamanlarda nanoteknoloji araştırmaları, farklı kimyasal, fiziksel ve optik özelliklerinden dolayı metal ve metal oksit nanopartiküllerine odaklanmaktadır. Nano terimi, birçok bilimsel uygulamanın gelecekteki gelişimini umut eden büyüleyici bir kelime haline gelir. Şu anda, mikonanoteknoloji hızla büyüyen bir araştırma alanıdır; metal ve metal oksit nanopartiküllerinin sentezi için çok sayıda yöntem çevre dostu bir şekilde formüle edilmiştir. Bu biyolojik yöntemler, fungusların metal ve metal oksit nanopartiküller sentezi için bir araç olarak kullanılmasına olan ilgiyi arttırmıştır (Mahendra Rai vd, 2009).

Tüm bu mikroorganizmalar, özellikle funguslar tarafından metal ve metal oksit nanopartiküllerin gerçek oluşum mekanizması, birkaç olası mekanizma önerilmiş olsa da, belirli bir ikna edici mekanizma tanımlanmamıştır (Jeevanandam vd, 2016). En çok kabul edilen mekanizmalar, metal tuzlarının, funguslar tarafından salgılanan organik moleküller tarafından stabilize edilebilen elementel metale biyolojik olarak indirgenmesiydi. Önerilen diğer bir güvenilir mekanizma, sulu ortamın metal iyonlarının organizmaların hücre duvarının yüzeyine çoğunlukla elektrostatik etkileşim ile bağlandığı biyosorpsiyondur. Bu mekanizma, bazı mikroorganizmaların yabancı maddeye maruz kaldıklarında, metal iyonunu azaltan ve nanopartiküller oluşumuna yol açan enzimler veya metabolitler üretmeleri temel alınarak açıklanmıştır. Örneğin naftokinonlar ve antrakinonlar, indirgeyici ajan olarak görev yapan fungusların ürünleridir (Šebesta vd, 2022). Fungusların hücre duvarları ve hücre polisakkariti, metal iyonlarının elektrostatik etkileşimle hücre duvarında bulunan enzimlerdeki pozitif yüklü gruplara yakalanmasıyla başladığı metal iyonlarının indirgenmesinde önemli bir rol oynar. Hücrelerin içindeki metal iyonlarının enzimatik indirgenmesi, metal ve metal oksit nanopartiküllerinin oluşumuna yol açar . Ayrıca funguslardan salgılanan nitrat redüktazın etkisi de nanopartiküller sentezi için bir mekanizma olarak tartışılmıştır. Vurgulanan nokta, Fe iyonlarının Fe NP'lerine indirgenmesi sırasında, metal iyonlarının indirgenmesi için sadece enzimlerin değil, aynı zamanda bir elektron mekanizmasının da gerekliliğidir (Şekil 2.2) (Rai vd, 2021).



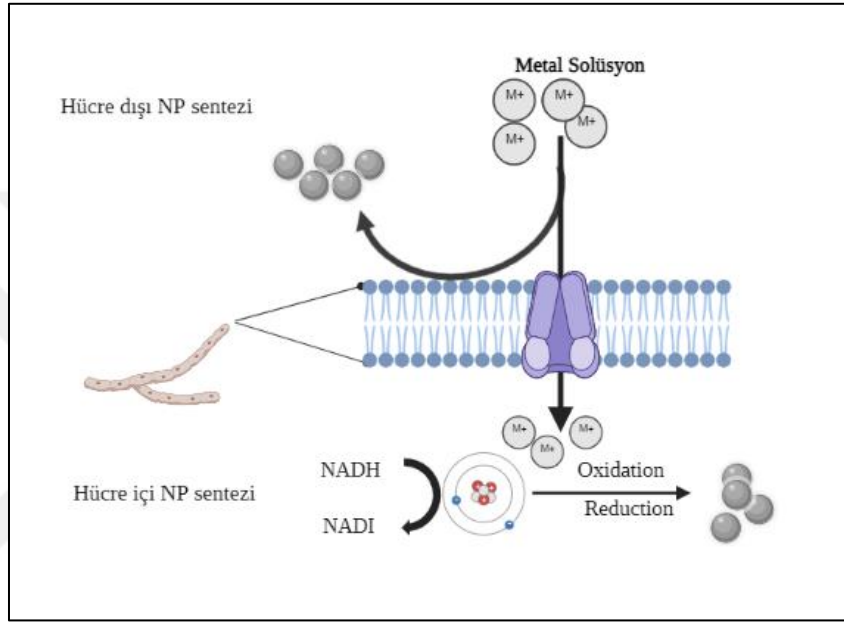
Şekil 2.2 Mantar faaliyetleri yoluyla nanopartiküllerin ve nanominerallerin üretilmesinde rol oynayan temel süreçler. (Li vd, 2022)

Funguslar, hem hücre içi hem de hücre dışı olarak nanopartikülleri sentezleme yeteneğine sahiptir (Pantidos ve Horsfall, 2014).

Hücre içinde metalik iyonlar, aktif hücresel pompalar (ATP-aracılı), ardından bu iyonları indirgeyen ve bazen onları kapatan enzimler aracılığıyla hücreye aktarılır. Son olarak, kapatma proteinleri, açık amin grupları ve sistein kalıntıları yoluyla nanopartiküllere (Şekil 2.3) bağlanarak yüzey yükünü nötralize eder. Kapatma proteinleri (Biyolojik yöntemlerle hazırlandığında nanopartiküllerin yüzeyine bağlanan proteinlerdir), diğer moleküller ile biyokonjugasyon için bir bölge olarak da önemli bir rol oynayan NP özelliklerinin aglomerasyonunun ve değiştirilmesinin önlenmesinde görev yapar. Protein kapakları, dahil edilen sürfaktanlar çok toksik olmadıkça, geleneksel yöntemlerde başka şekilde bulunmayan biyolojik olarak

sentezlenmiş nanopartiküllere stabilite sağlar. Ayrıca kararlılık, nanopartiküllerin toksisitesini azaltarak onları daha çevre dostu hale getirir (Annamalaia vd, 2021). Hücre dışı nanopartikül sentezi için iki olası yol vardır:

Birincisi, hücre içi senteze benzer. İyonlar, aktif taşıyıcılar aracılığıyla hücre zarından geçer ve ardından indirgeyici enzimler aracılığıyla nanopartiküllerin sentezi başlatılır. Proteinler, indirgeme işlemi sırasında nanopartiküllere bağlanır, onları aktif bölgeler aracılığıyla kapatır ve indirger. Bu nanopartiküller boyutlarını ve biçimlerini belirledikten sonra hücre dışına taşınırlar. Bu nedenle, bazı mikroorganizmalarda, nanopartiküllerin hücre içi ve hücre dışı sentezi aynı hücrede meydana gelebilir (Şekil 2.3) (Bhardwaj vd, 2020).



Şekil 2.3 Nanopartiküllerin hücre içi ve hücre dışı nanopartiküllerin sentezi

İkinci yol, indirgeyici proteinlerin hücre çözeltisine emisyonunu içerir. Bu, metalik iyonların varlığında çözeltinin pH'ındaki tüm değişikliğin bir sonucudur. Bu sinyali aldıktan sonra hücre, iyonları indirgeyen ve mineral nanopartikülleri sentezleyen oksidoredüktaz enzimleri yayar. Bu proteinler, yukarıda belirtildiği gibi stabilite ve ek özellikler ekleyerek nanopartikülleri kaplayabilir. Bu nedenle, mikroorganizma kültüründen elde edilen hücresiz süpernatant, yalnızca nanopartiküllerin biyosentezinden değil, aynı zamanda süpernatant boyunca dağılmasından da sorumlu olan biyomolekülleri içerir (Romero vd, 2018).

2.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

2.3.1. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometresi (UV-vis spektroskopisi)

UV-vis spektroskopisi, boyutlarına, şekillerine ve bileşimlerine güçlü bir şekilde bağlı olan benzersiz optik özellikleri nedeniyle nanopartiküllerin karakterizasyonu için yaygın olarak kullanılan güçlü bir analitik tekniktir. Bu teknik, araştırılmakta olan nanopartiküllerin boyut dağılımı, şekli ve bileşimi hakkında değerli bilgiler sağlayabilen elektromanyetik spektrumun ultraviyole ve görünür bölgelerinde ışık emiliminin ölçülmesini içerir (Paramelle vd, 2014).

Bu nanopartiküllerin boyutu nano ölçeğe yaklaştıkça, yüzeylerindeki serbest elektronların plazmonlar olarak bilinen toplu salınımları, elektromanyetik spektrumun görünür bölgesinde ışığın rezonans soğurulmasıyla sonuçlanan küçük bir hacimle sınırlı hale gelir. Bu rezonans, nanopartiküller yüzeyindeki elektromanyetik alanın önemli ölçüde artmasına neden olur; bu da, nanopartiküllerin ışığı dağıtma ve absorbe etme ve renkleri gibi benzersiz optik özelliklerine yol açar (Xia ve Halas, 2005).

SPR (Yüzey plazmon rezonansı) fenomeni, spektrumun görünür bölgesindeki metal nanopartiküllerin canlı renklerinden sorumludur. Örneğin, Au NP'leri boyutları 40-50 nm aralığındayken karakteristik bir kırmızı renk sergilerken (Aljabali vd, 2018), Ag-NP'ler boyutları 50-60 nm civarındayken sarı bir renk sergilerler (Ravindran vd, 2011). Bakır nanopartiküller ise boyutları 20-30 nm aralığında olduğunda karakteristik kırmızımsı kahverengi bir renk gösterirler (Kind vd, 2012). Küçük Fe NP'leri (boyutu 10 nm'den küçük) tipik olarak süperparamanyetiktir ve kahverengimsi bir renk sergilerken (Zhao vd, 2013), daha büyük Fe NP'leri (boyutu 20 nm'nin üzerinde) ferromanyetik olma eğilimindedir ve siyah görünebilirler (Lee ve Hyeon, 2012; Zhao vd, 2014).

ve UV-vis spektroskopisi bölgede geniş bir absorpsiyon spektrumuna sahiptir ve partikül boyutu arttıkça absorpsiyon zirvesi daha uzun dalga boylarına kayar. Fe NP'leri için absorpsiyon zirvesinin tam dalga boyu aralığı, partiküllerin boyutuna ve şekline ve ayrıca kaplamalarına veya işlevselliklerine bağlıdır. Genel olarak, Fe NP'lerin absorpsiyon zirvesi, morötesi bölgede yaklaşık 200 nm ile görünür spektrumun kırmızı bölgesinde 700 nm arasında değişebilir. Bununla birlikte, belirli

dalga boyları aralığı, nanopartiküllerin ve çevreleyen ortamın boyutuna ve şekline bağlı olacaktır.

Majeed vd (2021) tarafından yayınlanan bir çalışmada, Fe NP'leri birlikte çökeltme yöntemiyle sentezlenmiş ve UV-vis spektroskopisi ile karakterize edilmiştir. Fe NP'lerinin absorpsiyon spektrumları, Fe-O bağlarının karakteristik absorpsiyonuna karşılık gelen yaklaşık 310 nm'de bir tepe noktası göstermiştir. Araştırmacılar, bu zirvenin konumunu ve yoğunluğunu analiz ederek nanopartiküllerin boyutunu ve bileşimini belirleyebilmişlerdir

Başka bir çalışmada Fe NP'leri sol-jel yöntemiyle sentezlenmiş ve UV-vis spektroskopisi ile karakterize edilmiştir. Nanopartiküllerin absorpsiyon spektrumları, Fe₃O₄'ün karakteristik absorpsiyonuna karşılık gelen yaklaşık 362 nm'de bir tepe noktası sergilemiştir. Araştırmacılar, nanopartiküllerin boyutunu ve bileşimini belirlemek için bu bilgileri kullanabilmişlerdir (Subhan vd, 2016).

2.3.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

SEM, nanopartiküllerin karakterizasyonu için önemli araçtır. Parçacıkların yüzeyinin yüksek çözünürlüklü görüntülerini sağlayarak boyutlarının, şekillerinin ve morfolojilerinin belirlenmesine olanak tanımaktadır. SEM, numunenin yüzeyi boyunca odaklanmış elektron ışını tarayarak ve yüzeyden yayılan ikincil elektronları saptayarak çalışır. Elektronlar daha sonra numunenin yüzeyinin bir görüntüsünü oluşturmak için kullanılmaktadır (Inkson, 2016).

Enerji Dağıtıcı X-ışını spektroskopisi (EDX), nanopartiküllerin temel bileşimi hakkında ek bilgi sağlamak için genellikle SEM ile birlikte kullanılmaktadır. EDX, numunedeki elektronlar elektron ışını tarafından uyarıldığında yayılan karakteristik X-ışınlarını saptayarak çalışmaktadır. Bu X-ışınlarının enerjisini ve yoğunluğunu analiz ederek numunenin element bileşimini belirlemek mümkündür. Bu, nanopartiküllerin iç yapıları hakkında değil, yalnızca yüzeyleri hakkında bilgi sağladığı anlamına gelmektedir (Davies vd, 2022).

Kumar vd (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, *Aspergillus fumigatus* SEM kullanılarak sentezlenen Fe NP'lerinin morfolojisi karakterize edilmiştir. SEM görüntüleri, nanopartiküllerin küresel olduğunu ve 100 nm boyut aralığına sahip olduğunu göstermiştir.

Benzer bir çalışmada, *Neurospora crassa* fungusu kullanılarak Fe NP'lerini

sentezlenmiştir. Nanopartiküller, SEM ve EDX kullanılarak karakterize edilmiştir. SEM görüntüleri, nanopartiküllerin küresel olduğunu ve 10-30 nm boyut aralığına sahip olduğunu göstermiştir. EDX analizi, nanopartiküllerde demirin varlığını doğrulamış ve ayrıca oksijen ve karbonun varlığını ortaya koymuştur (A. Rana vd, 2020).

2.3.3. Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

FTIR, nanopartiküllerin karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılan bir analitik tekniktir. Kızılötesi radyasyonun bir numune tarafından soğurulmasının veya iletiminin ölçümünü içeren tahribatsız bir yöntemdir. FTIR, nanopartiküllerin kimyasal bileşimi, fonksiyonel grupları ve yüzey kimyası hakkında bilgi sağlayabilir(Eid, 2022).

FTIR prensibi, moleküllerin titreşim ve dönme enerji durumlarında değişikliklere neden olan kızılötesi radyasyonun moleküller tarafından soğurulmasına dayanmaktadır. Her kimyasal bağın, benzersiz olan ve bir numunenin kimyasal bileşimini tanımlamak için kullanılabilen belirli bir titreşim frekansı vardır. FTIR, radyasyon frekansının bir fonksiyonu olarak bir numune tarafından iletilen veya emilen kızılötesi radyasyonun yoğunluğunu ölçerek çalışmaktadır (Ismail vd, 1997).

Nanopartikül karakterizasyonunda, FTIR genellikle nanopartiküllerin yüzey kimyasını ve fonksiyonel gruplarını incelemek için kullanılmaktadır. Bunun nedeni, nanopartiküllerin yüzey kimyasının özelliklerinde ve davranışlarında önemli bir rol oynamasıdır. FTIR, reaktivitelerini ve yüzey özelliklerini anlamak için kullanılabilen nanopartiküllerin yüzeyindeki fonksiyonel gruplar hakkında bilgi sağlayabilir (Thevenot vd, 2008).

Sun vd (2014) tarafından yayınlanan bir çalışmada, yeşil çay ekstresi kullanılarak sentezlenen Ag NP'lerini karakterize etmek için FTIR kullanılmıştır. FTIR spektrumları, nanopartiküllerin yüzeyinde hidroksil, karboksil ve amin grupları gibi çeşitli fonksiyonel grupların varlığını göstermiştir. Bu bilgi, nanopartiküller sentezinin mekanizmasını anlamak ve biyomedikal uygulamalar için potansiyellerini değerlendirmek için kullanılmaktadır.

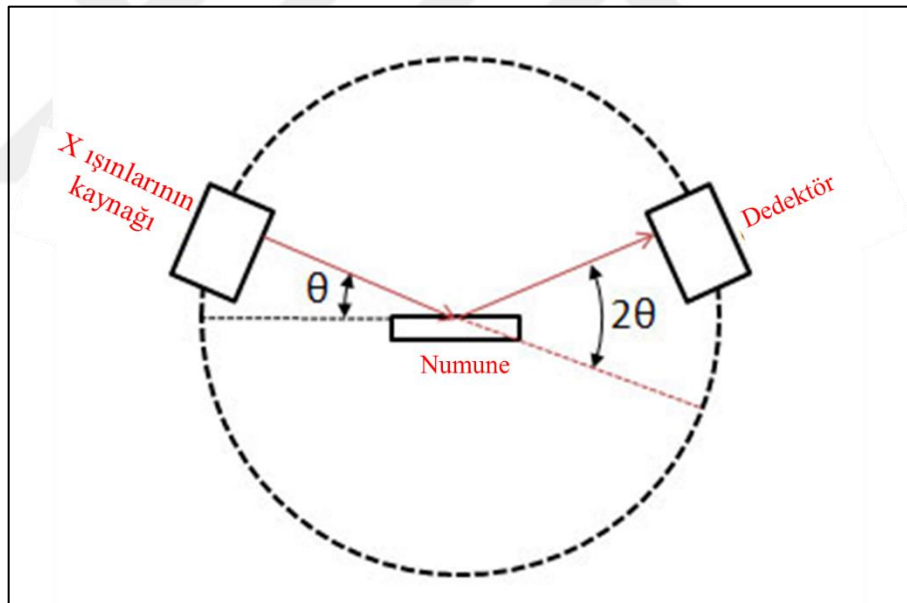
Mahdavi vd (2013) yayınlanan bir başka çalışmada, silika kaplı Fe NP'lerini karakterize etmek için FTIR kullanılmıştır. Önceki çalışmada olduğu gibi, FTIR

spektrumları nanopartiküllerin yüzeyinde hidroksil ve amin grupları gibi çeşitli fonksiyonel grupların varlığını göstermiştir. Bu bilgi, biyomedikal uygulamalar için nanopartiküllerin stabilitesini ve biyouyumluluğunu değerlendirmek için kullanılmaktadır.

Genel olarak, FTIR, nanopartiküllerin karakterizasyonunda değerli tekniktir. Özelliklerini ve davranışlarını anlamak için kullanılabilecek nanopartiküllerin kimyasal bileşimi ve yüzey kimyası hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır.

2.3.4. X-Işını Kırınımı (XRD)

XRD, nanopartiküller dahil olmak üzere malzemelerin kristalografik yapısını incelemek için kullanılan bir tekniktir. XRD' nin temel prensibi, X-ışını demeti kristal bir malzemeye yönlendirildiğinde, kristaldeki atomların X-ışınlarını farklı yönlerde dağıtmasıdır. Yapıcı girişim modeli detektör tarafından kaydederek malzemenin kristal yapısını belirlemektedir (Donnelly ve Boskey, 2011).



Şekil 2.4 X-ışını Kırınımında Bragg Yasası

X-ışınları malzeme üzerine yansıtıldığında, malzemedeki atomları kırar veya yansıtırlar. X-ışınlarının yansıma açısı, atomlar arasındaki mesafeye ve geliş açısına bağlıdır. X-ışınlarının yansıdığı açıları ölçerek, malzemedeki atomlar arasındaki mesafeleri belirleyebiliriz (Ali vd, 2022).

Bir malzemedeki atomlar arasındaki mesafe, X ışınlarının kırılacağı açıyı belirler ve bu açı, θ sembolü ile gösterilen Bragg açısı olarak adlandırılır. Bragg

açısı, $2\theta = n\lambda/d$ denklemi aracılığıyla, d sembolü ile temsil edilen atomlar arasındaki mesafe ve λ sembolü ile temsil edilen X ışınlarının dalga boyu ile ilişkilidir. n sayısı, kırınım sırasını temsil eden bir tamsayıdır (Şekil 2.4). X-ışını kırınım tepe noktalarının yoğunluğu, kırınımından sorumlu olan kristal yapıdaki atomların sayısı ile orantılıdır. Bu nedenle kırınım tepe noktalarının yoğunluğunu ölçerek numunenin kristal yapısını belirleyebiliriz (Jin vd, 2018).

XRD, nanopartiküllerin kristal yapısını ve faz saflığını belirlemede özellikle yararlıdır. Nanopartiküller, küçük boyutları ve yüksek yüzey alanları nedeniyle genellikle toplu muadillerinden farklı kristal yapılara sahiptir, nanopartiküllerin partikül boyutunu ve boyut dağılımını belirlemede de yararlıdır. XRD modelinde gözlenen tepe genişlemesi, numunedeki kristalli alanların boyutuyla ilişkilidir. Zirve genişlemesini analiz ederek, kristal bölgelerin boyutunu ve dolayısıyla nanopartiküllerin parçacık boyutunu hesaplamak mümkündür (Dieckmann vd, 2009).

2.4. Demir oksit Nanopartiküllerin (Fe NP'lerin) Biyosentezi

Nanopartiküllerin Funguslar tarafından sentezi ile ilgili literatürü gözden geçirirken, biyosentezin kullanılan başlangıç biyomateryali ilgili büyük değişkenlik derecesine sahip olduğu anlaşılabılır. Bazı yöntemlerde fungus biyokütlesi kullanırken, diğerlerinde fungus kültürü veya fungus biyokütle homojenatının hücresiz süzüntüsü kullanılmıştır. En yaygın olarak kullanılan yöntem, fungusların uygun bir büyüme ortamında büyütülmesini ve ardından fungus miselyumunun santrifüjleme ile ayrılmasını içerir. Miselyum daha sonra bir metal öncü tuzu ile karıştırılıp birkaç gün inkübe edildikten sonra, son çözelti filtre edilerek sentezlenmiş nanopartiküller içeren bir süspansiyon elde edilmektedir.

Başka bir yöntemde, fungusların uygun bir ortamda kültürü yapılmakta ve üretilen miselyum süzülmemektedir. Steril damıtılmış su ile iyice yıkandıktan sonra, fungus biyokütlesi steril damıtılmış suda dağıtılmakta ve 1-5 gün boyunca bir döner çalkalayıcıda inkübe edilmektedir. İnkübasyonun ardından hücresiz süzüntü toplanıp nanopartikülleri sentezlemek için bir demir öncü tuz karışımı ile işlenmektedir. Bazı çalışmalarda, nanopartiküller sentezi için fungus hücre süzüntüsü kullanılmış olup, bu yöntem zahmetli filtrasyon prosedürlerine ve pahalı ekipmanlara olan ihtiyacı ortadan kaldırdığı için en basit yöntem gibi görünmektedir (Prasad, 2017). Tablo 2.1, funguslar kullanılarak Fe NP'lerin sentezlenmesi için çeşitli yöntemleri özetlemektedir.

Son olarak, Fe NP'lerin biyotıp, çevresel iyileştirme, enerji üretimi ve tarım dahil olmak üzere çeşitli alanlarda geniş bir potansiyel uygulama yelpazesine sahip olduğunu belirtmekte fayda vardır.

Tablo 2.1 Fungus kullanılarak Fe NP'lerin biyosentezi.

Fungus Türü	NP Boyutu	Kaynaklar
<i>Aspergillus fumigatus</i>	28–33	(Nadeem vd, 2022)
<i>Penicillium fellutanum</i>	2-4 nm	(Alam vd, 2022)
<i>Aspergillus niger</i>	20-40 nm	(Chatterjee vd, 2020)
<i>Penicillium citrinum</i>	5-11 nm	(Shrivastava ve Pramanik, 2021)
<i>Aspergillus terreus</i>	15-40 nm	(Jeevanandam vd, 2016)
<i>Aspergillus oryzae</i>	100 nm	(Tarafdar ve Raliya, 2013)
<i>Penicillium spp</i>	3-10 nm	(Zakariya vd, 2022)
<i>Trichoderma viride</i>	20-60 nm	(Kalia vd, 2020)
<i>Trichoderma harzianum</i>	17-78 nm	(Akbar vd, 2022)
<i>Fusarium oxysporum</i>	20- 50 nm	(Bharde vd, 2006)
<i>verticillium sp</i>	100-400 nm	(Bharde vd, 2006)
<i>curvularia lunata</i>	20 nm	(Kaul vd, 2012)
<i>Aspergillus oryzae TFR9</i>	10- 24 nm	(Tarafdar ve Raliya, 2013)
<i>Aspergillus japonicus</i>	60-70	(Bhargava vd, 2014)
<i>Chaetomium globosum</i>	25 nm	(Kaul vd, 2012)
<i>A fumigatus</i>	42 nm	(Kaul vd, 2012)
<i>Aspergillus sp</i>	5-200	(Pavani ve Kumar, 2013)
<i>Alternaria altemata</i>	9 nm	(Mohamed vd, 2015)
<i>Aspergillus niger</i>	18-50 nm	(Abdeen vd, 2016)
<i>Trichoderma Asperellum</i>	18- 32 nm	(Mahanty vd, 2019)
<i>Fusarium incamatum</i>	15-55 nm	(Mahanty vd, 2019)
<i>phialemoniopsis ocularis</i>	6-22 nm	(Mahanty vd, 2019)
<i>Aspergillus nige BSC-1</i>	20- 40 nm	(Chatterjee vd, 2020)

2.5. Sürdürülebilir Tarımda Nanogübrelerin Uygulanması

Nanogübreler (NPG'ler), bitkiler tarafından besin mevcudiyetini ve alımını iyileştirme potansiyelleri nedeniyle son yıllarda dikkat çekmiştir. Ek olarak, son araştırmalar, nano demir oksidin tarımsal bir gübre olarak kullanımını araştırmış ve bunun bitki büyümesini ve toprak verimliliğini iyileştirmedeki faydalarını vurgulamıştır (Seleiman vd, 2020).

NPG'ler, besin içeriklerine göre üç türe ayrılabilir: makro NPG'ler, mikro NPG'ler ve nanopartikülat gübreler. Makro NPG'ler, nitrojen, fosfor ve potasyum gibi makro besinleri sağlamak için tasarlanmıştır. Mikro NPG'ler çinko, bakır ve demir gibi mikro besinler içerirken, nanopartikül gübreler, makro ve mikro besinlerin bir kombinasyonunu sağlayabilen farklı malzemelerin nano ölçekli parçacıklarından oluşur. NPG'ler, nanomateryalleri doğrudan gübre formülasyonlarına dahil ederek veya bunları polimerler, lipidler veya inorganik maddeler gibi çeşitli materyallerle kapsülleyerek veya kaplayarak üretilebilir (El-Saadony vd, 2021).

Fe NP'leri, onu geleneksel demir gübrelerine çekici bir alternatif yapan birkaç benzersiz özelliğe sahiptir. İlk olarak, Fe NP'leri, bitkiler için çözünürlüğünü ve biyoyararlanımını artıran yüksek bir yüzey alanı-hacim oranına sahiptir. İkinci olarak, Fe NP'leri yavaş salınan bir gübre görevi görerek demiri uzun bir süre boyunca kademeli olarak serbest bırakır, bu da etkinliğini artırır ve aşırı besin birikimi riskini azaltır. Son olarak, Fe NP'leri, belirli bitki dokularına veya toprak alanlarına dağıtımını hedeflemek, alımını iyileştirmek ve sızıntı veya akış nedeniyle kayıpları azaltmak için kullanılabilen manyetik özelliklere sahiptir (Iqbal, 2019).

2.5.1. Fe NP'lerin Uygulama Yöntemleri

Fe NP'leri bitkilere uygulamanın, tohum hazırlama, yaprak püskürtme, kök daldırma ve büyüme ortamına dahil etme dahil olmak üzere birkaç yöntemi vardır. Uygulama yönteminin seçimi, bitki türüne, büyüme ortamına ve amaçlanan uygulamaya bağlıdır.

2.5.1.1. Besin maddeleri ve agar içeren (katı ortam)

Bitki doku kültürü ve çoğaltmasında yaygın olarak kullanılır. Fe NP'lerin katı ortama eklenmesi, bitki dokularının büyümesini ve gelişimini iyileştirebilir. Fe NP'leri katı ortama dahil etme yöntemi, katılaşmadan önce besin-agar karışımına eklenen bir Fe NP'leri stok çözeltisinin hazırlanmasını içerir. Fe NP'leri katı

ortamdaki konsantrasyonu, bitki türüne ve amaçlanan uygulamaya bağlı olarak değişir (Adabavazeh vd, 2023).

Birkaç çalışma, Fe NP'lerin katı ortamda bitki büyümesi üzerindeki olumlu etkisini bildirmiştir. Lau vd (2020), besin agar ortamına 0.25, 2.5, ve 5 mg/L Fe NP'lerin eklenmesinin in vitro yetiştirilen domates fidelerinin büyümesini ve gelişimini önemli ölçüde iyileştirdiğini bildirmiştir. Araştırmacılar, gelişmiş büyümeyi, gelişmiş besin alımına ve Fe NP'lerin antioksidan aktivitesine bağlamaktadırlar. Benzer şekilde Irum vd (2020), besleyici-agar ortamına 20 mg/L Fe NP'lerin eklenmesinin pirinç kallus kültürlerinin büyümesini ve gelişimini önemli ölçüde iyileştirdiğini bildirmiştir. Bu çalışmada, artan büyümenin, gelişmiş fotosentetik aktivite ve besin alımından kaynaklandığını öne sürmüşlerdir.

2.5.1.2. Agarsız Besin İçeren Sıvı Besiyeri

Agar içermeyen besinler içeren sıvı ortamlar, hidroponik sistemlerde ve besin solüsyonlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Fe NP'lerin sıvı ortama eklenmesi, bitkilerin besin alımını ve büyümesini iyileştirebilir. Fe NP'lerin sıvı ortama dahil etme yöntemi, besin çözeltisine eklenen Fe NP'lerin stok çözeltisinin hazırlanmasını içerir. Fe NP'lerin sıvı ortamdaki konsantrasyonu, bitki türüne ve amaçlanan uygulamaya bağlı olarak değişir (Li vd, 2013).

Birkaç çalışma, Fe NP'lerin sıvı ortamdaki bitki büyümesi üzerindeki olumlu etkisini bildirmiştir. Konate vd (2018), besin çözeltisine 20 mg/L Fe NP'lerin eklenmesinin, hidrofonik sistemde yetiştirilen domates bitkilerinin büyümesini ve gelişimini önemli ölçüde iyileştirdiğini bildirmiştir. Araştırmacılar, gelişmiş büyümeyi gelişmiş fotosentetik aktiviteye, besin alımına ve su kullanım verimliliğine bağlamışlardır. Benzer şekilde, Konate vd (2018), besin çözeltisine 100 mg/L Fe NP'lerin eklenmesinin, hidrofonik sistemde yetiştirilen salatalık bitkilerinin büyümesini ve gelişimini önemli ölçüde iyileştirdiğini bildirmiştir. Bu çalışmada ise, gelişmiş büyümenin, gelişmiş besin alımı ve Fe NP'lerin antioksidan aktivitesinden kaynaklandığını öne sürmüşlerdir .

2.5.1.3. Toprak Ortamı

Toprak, tarımda en yaygın kullanılan büyüme ortamıdır ve toprağa Fe NP'lerin eklenmesi, bitkilerin besin mevcudiyetini ve büyümesini iyileştirebilir. Fe NP'leri toprağa dahil etme yöntemi, Fe NP'lerin doğrudan toprağa eklenmesini veya Fe NP'lerin kaplı gübrelerin kullanılmasını içerir (Bidi vd, 2021; Yang vd, 2020).

Çeşitli çalışmalar, Fe NP'lerin topraktaki bitki büyümesi üzerindeki olumlu etkisini bildirmiştir. Qu vd. (2022), toprağa 100 mg/kg Fe ONP'ler eklenmesinin mısır bitkilerinin büyümesini ve gelişimini önemli ölçüde iyileştirdiğini bildirmiştir. Bu çalışmada, gelişmiş büyümeyi, gelişmiş besin mevcudiyetine ve Fe NP'lerin antioksidan aktivitesine bağlamaktadırlar. Benzer şekilde, Peng vd (2020), toprağa 50 mg/kg Fe NP'lerin eklenmesinin rice bitkilerinin büyümesini ve gelişimini önemli ölçüde iyileştirdiğini bildirmiştir. Araştırmacılar, artan büyümenin, iyileştirilmiş besin alımı ve su kullanım verimliliğinden kaynaklandığını öne sürmektedirler.

Fe NP'lerin bitki büyümesi üzerindeki etkisi, bitki türleri, büyüme ortamı, Fe NP'lerin konsantrasyonu ve uygulama yöntemi dahil olmak üzere çeşitli faktörlere bağlıdır. Genel olarak, Fe NP'lerin besin alımını artırarak, oksidatif stresi azaltarak ve fotosentetik aktiviteyi iyileştirerek bitkilerin büyümesini ve gelişimini iyileştirdiği bildirilmiştir (Rizwan vd, 2019).

Geliştirilmiş besin alımı: Fe NP'lerin bitkiler tarafından nitrojen, fosfor ve potasyum gibi temel besinlerin alımını arttırdığı bildirilmiştir. Bu, besinlerin adsorpsiyonu için geniş bir yüzey alanı sağlayan Fe NP'lerin yüksek yüzey alanı-hacim oranına bağlanır. Ek olarak, Fe NP'lerin büyüme ortamındaki besin maddelerinin çözünürlüğünü ve mevcudiyetini iyileştirdiği ve bunun da bitkiler tarafından geliştirilmiş besin alımına yol açtığı bildirilmiştir (Elemike vd, 2019).

Azaltılmış oksidatif stres: Fe NP'lerin, ROS temizleyerek bitkilerde oksidatif stresi azalttığı bildirilmiştir. ROS, bitkilerde çeşitli metabolik süreçler sırasında üretilir ve hücre zarlarına, proteinlere ve DNA'ya zarar verebilir. Fe NP'lerin antioksidan özelliklere sahip olduğu ve ROS'u temizleyebildiği, oksidatif stresi azalttığı ve bitki büyümesini iyileştirdiği bildirilmiştir (Rizwan vd, 2019).

Geliştirilmiş fotosentetik aktivite: Fe NP'lerin bitkilerde fotosentez verimliliğini arttırdığı bildirilmiştir. Bu, dış manyetik alanla hizalanabilen ve bitki hücrelerinde kloroplastların yönünü iyileştirebilen Fe NP'lerin manyetik özelliklerine

atfedilir. Ek olarak, Fe NP'lerin, ışık emilimini artırarak ve flüoresan yoluyla enerji kaybını azaltarak bitkilerin ışık hasadı verimliliğini iyileştirdiği bildirilmiştir (Feng vd, 2022).

2.6. Fe NP'lerinin Tohumlar Üzerindeki Etkisi

Nanopartiküller, bitki türlerinin yanı sıra kimyasal bileşimlerine, reaktivitelerine, uygulama şekillerine, deney koşullarına, büyüklüklerine, konsantrasyonlarına bağlı olarak tohumların büyümesi ve gelişmesi üzerinde etkilere sahiptir. Spesifik olarak, nanopartikül'lerin tohum büyümesi ve gelişmesi üzerindeki yararlı etkilerini vurgulayan çok sayıda rapor bulunurken, bununla birlikte bazı çalışmalar Fe NP'lerin potansiyel toksisitesine odaklanmıştır (Rizwan vd, 2017).

Liu vd (2016) , Fe NP'lerin tarımsal verimliliği artırmak için etkili nano-gübreler olma potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir. Laboratuvarında hazırlanmış Cu, Zn, Mn ve Fe NP'lerinin düşük konsantrasyonlarının (<50 ppm) hidroponik ortamında marul (*Lactuca sativa*) tohumlarının çimlenmesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar, Cu NP'lerin Cu iyonlarına kıyasla biraz daha yüksek toksisiteye sahip olduğunu, Zn NP'lerin toksisitesinin ise Zn iyonlarınıninkine karşılaştırılabilir olduğu gösterilmiştir. Öte yandan, Fe NP'lerin iyonik muadillerine göre daha az toksik olduğu ve hatta marul fide büyümesini %12-54 oranında önemli ölçüde teşvik ettiği görülmüştür

Konate vd (2018), 21 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda (50, 500 ve 2000 mg/L) Fe NP'lerin and toplu Fe içeren hidroponik ortamda salatalık (*Cucumis sativus*) tohumlarını yetiştirmişlerdir. Düşük konsantrasyonda (50 mg/L), Fe NP'leri, kontrol grubuna göre biyokütle ve enzim aktivitelerinde azalmaya neden olmuştur. Ancak, Fe NP'lerin dozajının yüksek konsantrasyonunda (2000 mg/L) biyokütlenin yanı sıra antioksidan enzimler süperoksit dismutaz (SOD) ve peroksidaz (POD) açısından önemli artış gözlemlenmiştir. Bunun aksine, yüksek konsantrasyondaki toz halindeki kitlesel Fe biyokütle ve enzim aktiviteleri açısından fitotoksositeye neden olmuştur. Fitotoksosite, partikül özelliklerine (özellikle boyut ve agregasyon) göre değişmektedir. Partikül boyutu, nanomalzemelerin biyoyararlanımını etkileyebilen önemli faktördür ve çevredeki nanomalzemelerin maruziyetini ve zararlı etkilerini değerlendirirken dikkate alınmalıdır.

Pariona vd (2018) tarafından yapılan benzer bir çalışmada, turp tohumlarının

çimlenmesi ve gelişimi üzerinde etkili olan Fe NP'lerinin sentezi ve yüzey modifikasyonu yöntemini kullanmışlardır. Birlikte çökeltme yoluyla elde edilen ve sitrat ile modifiye edilen Fe NP'ler, turp kotiledonlarında (*Raphanus sativus*) turp sapı büyümesi ve artan demir konsantrasyonu üzerinde en büyük etkiyi göstermiştir. Bu çalışma, Fe NP'lerin tarımdaki potansiyel uygulamalarına ilişkin değerli bilgiler sağlanmakta ve nanopartiküllerin bitkilerle etkileşimlerinde sentez yöntemini ve yüzey modifikasyonunu anlamının önemini vurgulamaktadır .

Yadav vd (2019)'ının çalışmasında, Fe NP'lerini kaplama maddesi olarak nişasta (%10) kullanılmıştır. Tohum hazırlama işlemi, Nohut (*Cicer arietinum* L.) tohumlarına 4- 16 ug/ml arasında değişen 4 ug/ml'lik artışlarla farklı konsantrasyonlarda Fe NP'leri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan tohumlar havada kurutulmuş ve in vitro ve in vivo çimlenme ve fide büyümesini incelemek için kağıt havlu yöntemi kullanılmıştır. Yetiştirilen fideler, büyüme parametreleri açısından değerlendirilmiş ve önemli tohum çimlenme ve büyüme parametreleri gözlemlenmiştir. Burada, sürgün uzunluğu, kök uzunluğu, kök-gövde oranı, taze ve kuru ağırlık önemli göstergeler olarak kabul edilmiştir. Bu nedenle, elde edilen sonuçlar Fe NP'lerin optimize edilmiş doz seviyelerinin, düşük konsantrasyonlarda nohutta büyümeyi iyileştirme yardımcı gübre olarak kullanılabilme potansiyelini ortaya koymaktadır.

Kasote vd (2019), soğan özütü kullanılarak yeşil Fe NP'leri sentezi gerçekleştirmişlerdir. XRD ve TEM karakterizasyonları, biyosentezlenen Fe NP'lerin çapının 19-30 nm olduğunu ve düşük kristalin veya amorf yapıda olduğunu göstermiştir. Farklı Fe NP'leri konsantrasyonlarının (20, 40, 80 ve 160 mg L⁻¹) karpuz (*Citrullus lanatus*)'da tohum hazırlama (seed priming) etkisini incelenmiştir. Fe NP'ler ile tohum hazırlama, incelenen konsantrasyonlarda toksik etki oluşturmada tohum çimlenmesi, fidan gelişimi ve klorofil biyosentezinde, büyük ölçüde güvenli olduğu belirtilmiştir. Metabolomik çalışması, Fe NP'lerin hazırlama işlemlerinin karpuz fidanlarının metabolomunu etkilediği ve 12-oxo phytodienoik asit (OPDA) seviyesini önemli ölçüde değiştirdiği bulunmuştur.

Waqas (2022), Fe NP'lerin keten bitkilerinin tohumlarının uyarıcı ajanları olarak kullanılabilme potansiyelini ve su stresini azaltıcı etkilerini incelenmiştir. Tohumlar, farklı konsantrasyonlarda FeNP (0, 25, 50, 75 ve 100 ppm)'lerle muamele edilmiştir. Tohum uyarımı, bitkinin gövde çapı, gövde uzunluğu, yükseklik, taze

ağırlık ve kuru ağırlığını arttırmıştır. Malondialdehit ve hidrojen peroksidin seviyeleri, tohum uyarımı sırasıyla %66 ve %71 oranında azalmış ve antioksidan enzim süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POD) ve katalaz (CAT) aktivitesinde de sırasıyla %28, %56 ve %39 artış gözlemlenmiştir, Ek olarak Fe NP'lerin su stresini azaltma potansiyeli de ortaya konulmuştur.

Li vd (2021) , Fe NP'lerin *Pseudostellaria heterophylla* tohumlarının polisakkarit içeriği, büyümesi, verimi, kuru madde dağılımı, klorofil içeriği, fotosentetik özellikleri ve klorofil floresans parametreleri ve polisakkarit içeriği üzerindeki etkilerini incelemişler. Fe NP'leri (20-50 mg·L⁻¹) bitkinin yapraklarına püskürtme yapılarak uygulandığında, kök büyümesi, klorofil içeriği, polisakkarit içeriği ve fotosentetik hızı önemli ölçüde arttırılmıştır. Yüksek NP (100 mg·L⁻¹) dozlarında fitotoksik etki kaydedilmiştir .

Churilova vd (2020) , Fe , Co, and Cu NP'lerinin Kanola bahar bitkisinde polisakkarit birikimi üzerindeki etkisini incelemiştir. Ekimden önce, tohumlar 0.5 g / ha konsantrasyonda muamele edilmiştir. Kontrol grubuna göre monosakkaritlerin kantitatif içeriğinin değiştiği ve özellikle ekimden önce tohumlara Cu NP'lerinin uygulamasının yüksek konsantrasyonda galakturonik asit oluşumunu teşvik ettiği gözlemlenmiştir.

Nazarova (2022), optimal konsantrasyonda (hektar başına 1 g ekim oranıyla) kullanılan demir nanopulverlerinin üretkenlik ve fizyolojik ve biyokimyasal süreçler üzerindeki etkisini göstermektedir. Araştırma sonuçlarına dayanarak, demir nano tozunun, kışlık buğday tohumlarına ekimden önce uygulanma işlenmesinde oldukça etkilidir. Demir nano tozu, buğdayın köklerinde %0,7 polisakkarit birikimine, verimde %19,7, bin tane ağırlığında %7,5, tanecik sayısında %14,5 ve tanelerdeki gluten miktarında % 2,0'lik artışa neden olmuştur.

Tombuloğlu vd (2022), iki farklı Fe NP türünün (γ -Fe₂O₃-maghemit ve Fe₃O₄-manyetit) Arpa (*Hordeum vulgare* L.) üzerindeki etkinliğini ve akıbetini araştırmıştır. Tohumlar, 3 hafta boyunca hidroponik bir ortamda değişen dozlarda nanopartiküller (50, 100 ve 200 mg/L) ile muamele edilmiştir. Sonuçlar, γ -Fe₂O₃ ve Fe₃O₄ NP'lerin çimlenme oranını, bitki biyokütlesini ve pigmentasyonu önemli ölçüde iyileştirdiğini göstermiştir (P < 0.005). Artan nanopartiküllerin dozlarıyla, dokuların demir içeriği kademeli olarak artmış ve titreşen numune manyetometri (VSM) analizi ile doğrulandığı gibi translokasyonları gösterilmiştir. Bu sonuçlar, γ -

Fe₂O₃ ve Fe₃O₄ NP'lerin arpa büyümesini artırmak için önemli bir potansiyele sahip olduğunu ve ıslah programlarında nanogübre olarak kabul edilebileceğini göstermektedir. Ancak diğer canlı organizmalar üzerindeki bilinmeyen etkileri nedeniyle uygulamadan önce dikkatli olunmalıdır .

Fegn vd (2022), nanopartiküllerin buğday tohumları üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışma yapmıştır. Çalışmada, yüksek Fe NP konsantrasyonlarının (200 ve 500 mg/L) bitki büyümesini, fotosentezi ve solunumu iyileştirdiğini, yapraklardaki fotosentetik pigmentlerin içeriğini artırdığını ve yaprak Fe, P ve K içeriğini artırdığı bulunmuştur. Fe NP'ler ile tohum muamelesinin ayrıca askorbat peroksidaz aktivitesinin artmasına ve köklerde ve yapraklarda malondialdehit (MDA) içeriğinin azalmasına yol açarak bitkinin antioksidan savunma sisteminde bir iyileşmeye neden olduğu ifade edilmiştir. Fe NP'lerin ile işlem görmüş bitkilerde yaprak Fe, P ve K içeriğinde belirgin artışlar da gözlemlenmiştir. Bu verilere göre, Fe NP'lerin fotosentetik performansı ve Fe ve P'nin kullanılabilirliğini artırarak bitki büyümesini artırabileceği sonucuna varılmaktadır .

2.6.1. Tohum Uyarma Mekanizmaları

Nanopartiküllerin tohum büyümesini ve gelişimini etkilediği kesin mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılamamıştır, ancak etkilerini açıklamak için birkaç hipotez önerilmiştir. Nanopartiküller, fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkileşimler gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla tohum büyümesini etkileyebilir (Deshmukh vd, 2017). Nanopartiküllerin tohum büyümesini etkilediği mekanizmalardan bazıları şunlardır:

Fiziksel Etkileşimler: Nanopartiküller tohum yüzeyi ile etkileşime girebilir ve tohumun çimlenmesini ve büyümesini etkileyebilecek fiziksel özelliklerini değiştirebilir. Nanopartiküllerin yüzey alanı, tipik olarak tohum yüzeyinden birkaç kat daha büyüktür, bu da artan su emilimine ve tutulmasına yol açabilir. Bu, özellikle su mevcudiyetinin sınırlı olduğu kurak bölgelerde tohumların çimlenmesi ve büyümesi için avantajlı bir ortam sağlayabilir. Ek olarak, nanopartiküller, tohumun çevredeki toprak ve besinlerle elektrostatik etkileşimlerini etkileyebilecek yüzey yükünü değiştirebilir (Servin vd, 2015). Ag NP'lerin toprağın katyon değişim kapasitesini arttırdığı ve fideler için gelişmiş besin mevcudiyetine yol açtığı gösterilmiştir (Solanki vd, 2015). Benzer şekilde, karbon nanopartiküllerin, su tutma kapasitesini ve toprak verimliliğini iyileştirebilen toprak organik madde içeriğini de

arttırdığı bildirilmiştir (Das vd, 2018).

Kimyasal Etkileşimler: Nanopartiküller ayrıca tohum yüzeyi ile kimyasal olarak etkileşime girebilir ve kimyasal özelliklerini değiştirebilir. Nanopartiküller tohum ortamının pH'ını değiştirebilir, bu da tohum büyümesi için gerekli besin maddelerinin ve hormonların mevcudiyetini etkileyebilir. Bazı nanopartiküllerin, tohum ortamının pH'sını ve tohum çimlenmesini ve büyümesini arttırdığı gösterilmiştir. Çinko oksit nanopartiküllerinin toprağın pH'ını arttırdığı ve domates tohumlarının büyümesini teşvik ettiği rapor edilmiştir. Dahası, nanopartiküller toprağın besin bileşimini değiştirerek fosfor, nitrojen ve potasyum gibi temel besinlerin mevcudiyetini artırabilir (Faizan vd, 2021). Fe NP'lerin, toprakta fosfor mevcudiyetini arttırdığı ve fide büyümesini ve gelişimini arttırdığı gösterilmiştir (Zahedi vd, 2020).

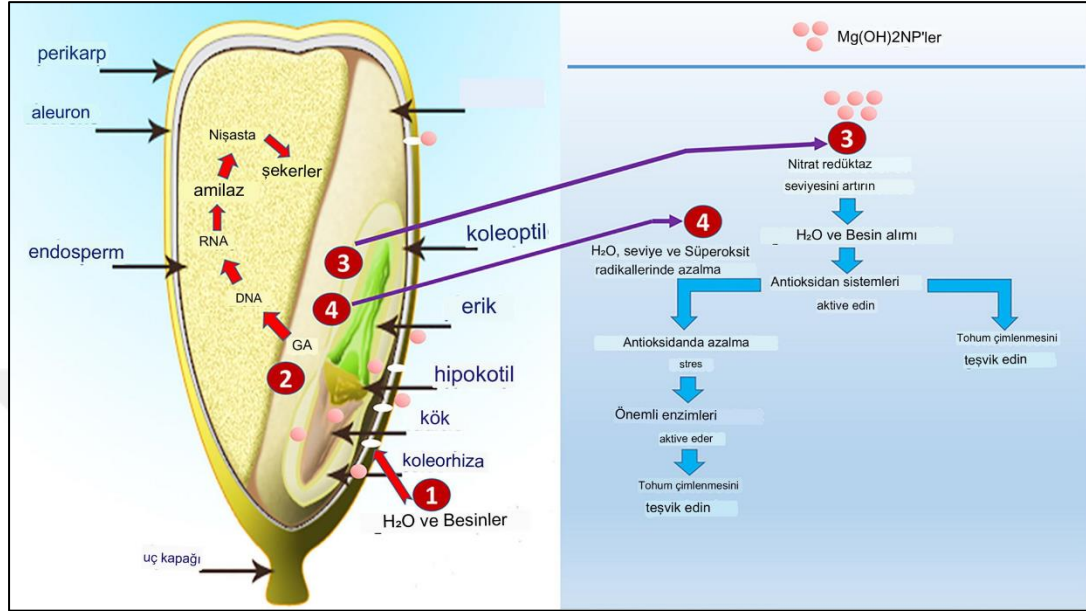
Biyolojik Etkileşimler: Nanopartiküller, hücre zarları ve organeller gibi tohumun biyolojik bileşenleri ile etkileşime girebilir. Bu, hücresel süreçleri değiştirerek ve hücresel fonksiyonları aktifleştirerek tohum büyümesini etkileyebilir. Nanopartiküller hücre zarının geçirgenliğini artırabilir, bu da besin ve su alımını artırabilir (Achari ve Kowshik, 2018). Benzer şekilde, nanopartiküller hücresel organellerin işlevini değiştirerek enerji üretimi ve metabolizmasının artmasına yol açabilir. Zn NP'leri, kloroplastların işlevini artırarak bitkilerin fotosentetik etkinliğini artırdığı gösterilmiştir (Rai-Kalal ve Jajoo, 2021). Ek olarak, nanopartiküller, tohum çimlenmesi ve büyümesinde yer alan enzimlerin ve proteinlerin aktivitesini etkileyebilir. Ag NP'ler, nişastayı şekere hidrolize eden ve tohum çimlenmesini artıran bir enzim olan amilazın aktivitesini arttırdığı rapor edilmiştir (Krishnakumar vd, 2018).

Hormonal Düzenleme: Nanopartiküller, tohum çimlenmesini ve büyümesini etkileyebilen bitkilerde hormonal dengeyi etkileyebilir (Nile vd, 2022).

Nanopartiküller, fide büyümesi için önemli olan büyüme hormonu oksin düzeylerini etkileyebilir. Bazı nanopartiküllerin, oksin seviyelerini, tohum çimlenmesini ve büyümesini arttırdığı bildirilmiştir (Syu vd, 2014).

Bunun aksine, diğer nanopartiküllerin oksin seviyelerini düşürdüğü ve tohum çimlenmesini ve büyümesini engellediği gösterilmiştir (Vankova vd, 2017). Ayrıca nanopartiküller, tohum çimlenmesi ve büyümesinin çeşitli yönlerini etkileyebilen

sitokininler, gibberellinler ve absisik asit gibi diğer hormonların seviyelerini etkileyebilir (Zhang vd, 2021). Şekil 2.5, $Mg(OH)_2$ NP'lerle işlenmiş *Z. mays* tohumlarının çimlenmesinde yer alan olası varsayımsal mekanizmaların şematik temsilini göstermektedir.



Şekil 2.5 $Mg(OH)_2$ NP'lerin *Zea mays* Çimlenmesine Etkileri

2.6.2. Karbohidratların Mekanizmaları

Nanopartiküllerin bitki metabolizmasını enzim aktivitesindeki ve hormon sinyallerindeki değişiklikler dahil olmak üzere çeşitli şekillerde etkilediği gösterilmiştir. Bu etkiler, şekerin sentezi ve birikimi dahil olmak üzere çeşitli metabolik yollarda değişikliklere yol açabilir (Nawaz ve Bano, 2020). Nanopartiküllerin polisakkarit içeriğini artırabilme yollarından biri, polisakkarit sentezinde yer alan enzimlerin aktivitesini arttırmaktır. Mahakham vd (2017) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, nanopartiküllere maruz kalmanın, pirinç bitkilerinde selüloz sentezinde yer alan enzimlerin aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir.

Nanopartiküller, artan polisakkarit sentezine yol açabilen PGPR aktivitesini artırarak tohum büyümesini dolaylı olarak etkileyebilir. PGPR, rizosferi kolonize edebilen ve fitohormonlar ve polisakkaritler gibi büyümeyi destekleyen maddeler üreterek bitki büyümesini destekleyen faydalı bakterilerdir. Nanopartiküller, PGPR'nin aktivitesini artırarak şeker sentezinin ve bitki büyümesinin artmasına neden olabilir. Ag NP'lerin, soğan bitkilerinde PGPR'nin aktivitesini arttırdığı, şeker

sentezini ve bitki büyümesini arttırdığı gösterilmiştir (Jahangir vd, 2020).

Nanopartiküllerin neden olduğu polisakkarit içeriğindeki artış, bitki büyümesi ve gelişimi üzerinde olumlu etkilere sahip olabilir. Polisakkaritler, hücre şeklini ve sertliğini korumanın yanı sıra hücreden hücreye iletişimi düzenlemede önemli roller oynamaktadır. Ek olarak polisakkaritler, biyotik ve abiyotik strese karşı koruma sağlayan bitki hücre duvarının ana bileşenleridir. Bu nedenle, nanopartiküllerin neden olduğu polisakkarit içeriğindeki artış, bitki stres toleransını ve genel üretkenliği artırabilir (Li vd, 2021).

Bakır oksit nano tozu ile muamele, kontrole kıyasla fiğ tohumlarındaki polisakkarit içeriğini sırasıyla %34 ve %25 arttırmıştır (Churilov vd, 2018). Fe NP'leri, buğday bitkisinde polisakkarit birikimini artırır ve tahıldaki gluten içeriğini ve kalite indeksini %2,0 arttırmıştır (Nazarova, 2022). Daha önce bahsedilen literatürler, belirli nanopartiküller türlerine maruz kalmanın bitkilerde belirli polisakkaritlerin içeriğini artırabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmalara dayanarak, nanopartiküllere maruz kalmanın bitkilerde glikomannan içeriğini de arttırabilmesi mümkündür. Bununla birlikte, bu hipotezi doğrulamak ve altta yatan mekanizmaları araştırmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

2.7. Glikomannan

Glikomannan, kabızlığı gidermek ve kolesterol seviyelerini düşürmeye yardımcı olmak gibi potansiyel sağlık yararları nedeniyle son yıllarda popülerlik kazanan bir diyet lifidir. Esas olarak β -(1→4)-bağlı D'den oluşan suda çözünmeyen polisakkarittir. β -(1→6)-glikozil bağlantıları yoluyla az miktarda dallanan mannoz ve D-glikoz birimleridir. D-mannozun D-glukoza oranı yaklaşık olarak 1.6:1'dir. Yan dallarında α -(1→6)-bağlı galaktoz birimleri bulunan glikomannan, galaktoglikomannan olarak adlandırılır. Glikomannanda dallanma derecesi yaklaşık %8'dir. Glikomannan suda çözünür ve yüksek moleküler ağırlığı ve su molekülleri ile hidrojen bağları oluşturma yeteneği nedeniyle oldukça viskoz çözeltiler oluşturur (Singh vd, 2018).

Glikomannan, diyet lifi yapan çeşitli özelliklere sahiptir. İlk olarak, oldukça viskozdur, yani büyük miktarlarda suyu emebilir ve sindirim sisteminde jel benzeri bir madde oluşturabilir. Bu, sindirim sürecini yavaşlatmaya ve tokluk hissini arttırmaya yardımcı olabilir, bu da iştahı azaltmaya ve kilo kaybını desteklemeye

yardımcı olabilir. Ek olarak, glikomannan tarafından oluşturulan jel benzeri madde, dışkıyı yumuşatarak ve kabartarak kabızlığın giderilmesine yardımcı olabilir. Glikomannan ayrıca bağırsaktaki safra asitlerine bağlanabilir, bu da safra asitlerinin kan dolaşımına yeniden emilmesini önleyerek kolesterol düzeylerini düşürmeye yardımcı olabilir (Wegh vd, 2022).

Birkaç çalışma, glikomannan'ın potansiyel sağlık yararlarını araştırmıştır. Onakpoya vd (2014) yayınlanan bir çalışma, sekiz hafta boyunca glikomannan takviyesinin, kalori kısıtlamalı bir diyet uygulayan aşırı kilolu veya obez bireylerde vücut ağırlığında, vücut kitle indeksinde (BMI) ve kolesterol seviyelerinde önemli düşüşler sağladığını göstermiştir. Yayınlanan bir başka çalışma, 12 hafta boyunca glikomannan takviyesinin, aşırı kilolu veya obez bireylerde vücut ağırlığında, BMI'de ve bel çevresinde önemli azalmalara yol açtığı bulunmuştur (Wood vd, 2007).

Potansiyel kilo kaybı faydalarına ek olarak, glikomannan'ın diğer bazı sağlık belirteçleri üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. edilmiştir Mirzababaei vd (2022) yayınlanan bir çalışma, 12 hafta boyunca glikomannan takviyesinin, tip 2 diyabetli bireylerde açlık kan şekeri seviyelerinde ve insülin direncinde önemli düşüşler sağladığı tesbit edilmiştir. Başka çalışma, dört hafta boyunca glikomannan takviyesinin hipertansiyonu olan bireylerde kan basıncında önemli düşüşlere yol açtığı belirlenmiştir (Mohammadpour vd, 2020).

Glikomannan öncelikle bir besin takviyesi olarak kullanılır ve genellikle bir kilo vermeye yardımcı olan bir madde olarak pazarlanmaktadır. Kapsüller, tabletler ve tozlar dahil olmak üzere çeşitli formlarda mevcuttur. Glikomannan, bir emülgatör ve koyulaştırıcı olarak işlev gördüğü bir gıda katkı maddesi olarak da kullanılır. Düşük yağlı ve düşük kalorili gıdalarda dokularını ve ağız rahatsızlıklarını iyileştirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (H. Zhang vd, 2020).

2.7.1. Orkideler Glikomannan

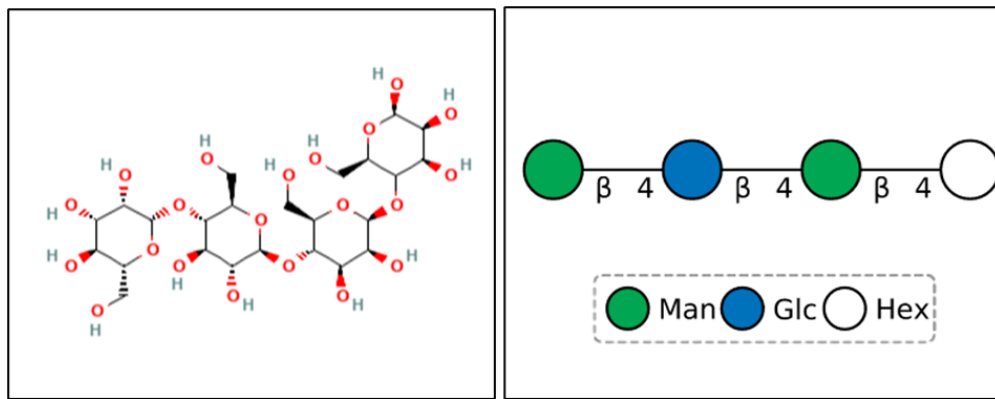
Glikomannan, *Orchis*, *Ophyris*, *Serapias*, *Platanthera* ve *Dactylorhiza* cinslerine ait bazı orkide türlerinin yumruları dahil olmak üzere çeşitli bitki kaynaklarından elde edilen doğal bir polisakkarittir. Orkide bitkileri, gıda uygulamalarında, parfümlerde, ilaçlarda ve süs bitkisi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Salep, glikomannan açısından zengin orkide türlerinin

yumrularından elde edilen popüler bir üründür (Turkmen vd, 2021).

Türkiye'de salep, çoğunluğu *Orchis*, *Ophrys* ve *Serapias* olmak üzere dokuz cinse ait 30 orkide türünden üretilmektedir. Salep orkidelerinin en yoğun olduğu bölgeler Kuzey Anadolu, Güney Anadolu, Güneydoğu Anadolu ve Doğu Anadolu'dur. Ticari salep çeşitlerinden Muğla, Kahramanmaraş ve Kastamonu salepleri kaliteli olarak kabul edilmektedir (TÜRKİŞ ve ERTÜRK, 2015).

Salep, geleneksel dondurma başta olmak üzere sertliği ile bilinen Kahramanmaraş tipi dondurmalarda stabilizatör olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Dondurmanın erimesini de geciktirir. Ayrıca kışın sıcak içecek olarak tüketilmekte ve ilaç yapımında hammadde olarak kullanılmaktadır. Salep, besleyici ve yatıştırıcı özelliğinden dolayı yıllardır kullanılmaktadır (Ece Tamer vd, 2006).

Orkide bitkilerinin kimyasal bileşimi, toplanma dönemi, bölge, tür gibi faktörlere bağlı olarak değişir. Salep'in en önemli bileşeni, bileşiminin %7-65'ini oluşturan glikomannandır. Diğer bileşenler arasında nişasta (%1-36), nem (%6-12), mineral madde (%0,2-6) ve azotlu bileşenler (%0,5-1) bulunur. Salepteki glukomannoz glikoz-mannoz oranı 1:2-3 ile 1:3,6 arasında değişmektedir (Şekil 2.6) (Vahid vd, 2011).



Şekil 2.6 Glukomannan'ın kimyasal yapısı

2.8. Tohumlarla İlişkili Mikroplar

Tohumların içinde ve üzerinde yaşayan mikroorganizmaların anlaşılması konusunda, tohumlar ve diğer bitki organlarıyla ilişkili bakteri, fungus ve oomycetes mikrobiyomları üzerine yapılan araştırmalar sayesinde son yıllarda önemli ölçüde ilerleme kaydedilmiştir. Önceki çalışmalar çoğunlukla kültüre dayalı tekniklere bağlı kalmış, ancak dizileme ve mikroskopi teknolojilerinin ortaya çıkmasıyla, tohum mikroplarının daha kapsamlı bir değerlendirmesi mümkün hale gelmiştir (Tkalec vd, 2022).

Tohum mikrobiyomlarını tartışırken, endofitik mikrobiyota ile epifitik mikrobiyota arasında ayırım yapmak önemlidir. Endofitik mikrobiyota, tohumların iç dokularında bulunan ve fidelere dikey olarak aktarılan mikrobiyal türleri ifade eder. Öte yandan, epifitik mikrobiyota tohumların yüzeylerini kolonize eder ve dikey veya yatay olarak bulaşarak iç dokulara girebilir veya girmeyebilir (Samreen vd, 2021).

Mikroorganizmalar bu iki durum arasında geçiş yapabildiğinden, endofitik ve epifitik mikrobiyota arasındaki ayırım biraz keyfidir. Bununla birlikte, endofitik mikrobiyotanın kaynağı genellikle epifitik mikrobiyotadan farklı olduğu için aralarında ayırım yapmak yararlıdır. Embriyo ve endosperm ile ilişkili mikropların dikey olarak iletilme olasılığı daha yüksekken, tohum kabuğu ile ilişkili mikropların çeşitliliği ve yatay olarak iletilme olasılığı daha yüksektir (K. L. Rana vd, 2020).

2.8.1. Bakteri

Tohumlarla ilişkili bakteriyel mikrobiyota hakkındaki mevcut anlayışımız önemli ölçüde derinlik kazanmıştır. Çalışmalar, tohumla ilişkili bakterilerin ağırlıklı olarak, dünya çapında toprak ve su ekosistemlerinde bol miktarda bulunan Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes ve Bacteroidetes filumlarına ait olduğunu göstermiştir. Bu, tohumların gelişimleri sırasında ve sonrasında bu bakteriyel taksonlarla karşılaşarak kolonizasyonlarına yol açtığını göstermektedir (Martinez-Rodriguez vd, 2019).

Çalışmalar, nanopartiküller dahil olmak üzere çevresel faktörlerin bakteri topluluğunu etkileyebileceğini göstermiştir. Çevresel faktörler, mikrobiyal toplulukların şekillenmesinde çok önemli bir rol oynar ve nanopartiküller, bakteri popülasyonlarının yapısını ve işlevini etkileyen ek faktörler olarak hareket edebilir (Ahmed vd, 2023).

Bir çalışmada nanopartiküller, tohumların bakteri topluluğu üzerinde olumlu bir etki göstermiştir. Bu, molibden (Mo) nanopartiküllerinin varlığının, tohumlarla

ilişkili bakterilerin bileşimini ve bolluğunu etkileyerek faydalı sonuçlara yol açtığını göstermektedir(Zhou vd, 2023).

Nanopartiküllerin mikrobiyal topluluklar üzerindeki etkilerinin, kullanılan nanopartiküllerin türü, konsantrasyonları, maruz kalma süreleri ve mevcut spesifik mikrobiyal türler gibi çeşitli faktörlerden etkilenebileceğini belirtmek gerekir. Farklı nanopartiküllerin farklı mikroorganizmalar üzerinde değişen etkileri olabilir. Bu alanda yapılacak daha fazla araştırma, bu etkilerin arkasındaki mekanizmaları aydınlatmaya ve en yararlı sonuçları veren belirli nanopartiküller tiplerini ve konsantrasyonlarını belirlemeye yardımcı olabilir.

2.8.2. Funguslar

Bitkilerin fungus simbiyontları, hastalığa neden olmak veya önlemek, çevresel stresörlere verilen tepkileri değiştirmek ve besin alımını kolaylaştırmak gibi, konukçularının gelişimini ve hayatta kalmasını önemli ölçüde etkiler. Bu etkiler nihayetinde uzun vadeli bitki topluluğu kompozisyonunu ve bunun ekosistem süreçlerindeki rolünü şekillendirir ve aynı zamanda sürdürülebilir tarım ve bitki korumaya katkıda bulunma potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte, tüm bitki dokularında mikobiyotanın kapsamlı bir araştırması henüz yapılmamıştır. Bu, fungus tohumu endofitlerinin (yani, tohum gelişimi, uyumluluk ve çimlenme yoluyla devam eden tohum dokularında bulunan funguslar) ve epifitlerin (yani tohum yüzeyinde/spermosferinde bulunan ve muhtemelen tohum yaşam döngüsü sırasında dönüşen funguslar) araştırılmasını içerir. Tohum fungusları, ebeveyn ve yavru bitkiler arasında dikey olarak bulaşabildikleri ve bitki mikobiyomunun ilk kolonistleri oldukları için özellikle ilgi çekicidir. Bu erken gelen türler, öncelikli etkiler yoluyla fide fungus topluluklarının bir araya gelmesini ve karşılığında fidelerin hayatta kalmasını ve sağlığını etkileyebilir. Bu nedenle, tohumların fungus topluluklarının karakterize edilmesi, fide sağlığı ve bitki topluluk yapısının itici güçleri hakkında yeni bilgiler sağlayabilir (Samreen vd, 2021)

Tohum funguslarıyla ilgili araştırmaların çoğu, seçilen besiyerinde iyi gelişen fungusları tercih ederek bir önyargı oluşturan kültüre dayanmaktadır. Bu tür yanlılığı en aza indirmek için, tohumlardaki fungusları tanımlamak için Yeni Nesil Dizileme (NGS) kullanılmış ve fungus topluluğu kalıpları hakkında daha yüksek çözünürlüklü veriler sağlanmıştır (Liu vd, 2022).

2.9. Metagenomik

Metagenomik, doğrudan toprak, su, bitki ve hatta insan bağırsağı gibi çevresel örneklerden elde edilen genetik materyalin analiz edilmesini içeren bir çalışma alanıdır. Araştırmacıların bu örneklerde bulunan mikrobiyal toplulukların genetik çeşitliliğini ve bileşimini incelemelerine olanak tanımaktadır(Wooley vd, 2010).

Bitki tohumları bağlamında metagenomik, tohumlarla ilişkili mikrobiyal toplulukları keşfetmek için kullanılabilir. Tohumlar, hem yüzeylerinde hem de içlerinde bakteri, fungus, virüs ve diğer mikroplar dahil olmak üzere çok çeşitli mikroorganizmaları barındırır. Tohum mikrobiyomu olarak bilinen bu mikrobiyal topluluklar, tohum çimlenmesinde, bitki büyümesinde ve genel bitki sağlığında çok önemli roller oynayabilir (Q. Chen vd, 2020).

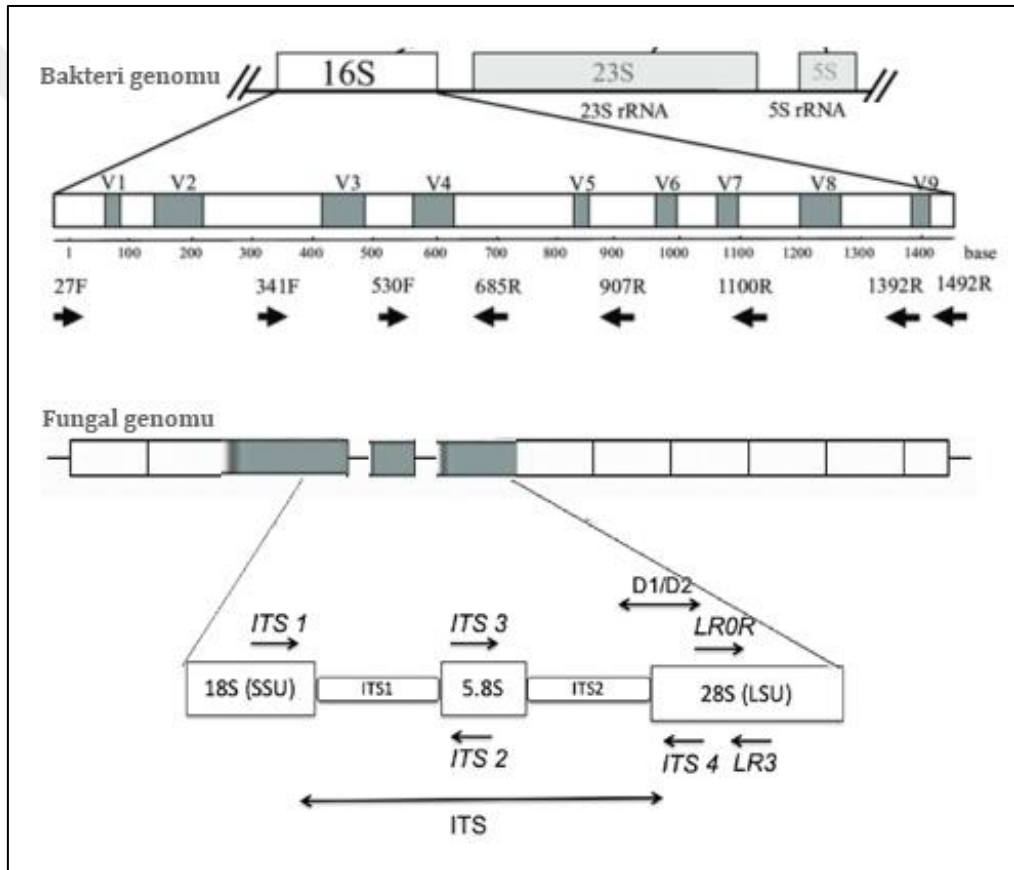
Tohum mikrobiyomlarının metagenomik analizi, tohum numunelerinden DNA veya RNA'nın ekstraksiyonunu ve genetik materyalin dizilenmesini içerir. Elde edilen diziler daha sonra mevcut mikroorganizma türlerini ve potansiyel fonksiyonlarını belirlemek için mevcut veritabanlarıyla karşılaştırılabilmektedir. Metagenomik, tohumla ilişkili mikroorganizmaların çeşitliliği, bolluğu ve etkileşimleri hakkında fikir verebilir ve araştırmacıların bitki gelişimi, besin alımı, hastalık direnci ve bitki fizyolojisinin diğer yönlerindeki rollerini anlamalarına olanak tanır (Busby vd, 2017). Ayrıca, metagenomik, tarımsal uygulamalara sahip olabilecek yeni mikroorganizmaların ve bunların genetik özelliklerinin keşfedilmesine yardımcı olabilir. Örneğin, tohumlarda bulunan faydalı mikroplar potansiyel olarak biyolojik gübreler, bitki patojenlerine karşı biyolojik kontrol maddeleri veya hatta endüstriyel veya farmasötik öneme sahip yeni enzimler veya metabolitlerin kaynakları olarak kullanılabilir (Pirttilä vd, 2021).

Metagenomik çalışmanın ilk adımı, çevresel örneğin toplanması ve hazırlanmasıdır. Örnekler toprak, su veya insan dışkı gibi çeşitli kaynaklardan toplanabilir ve örneğin türüne bağlı olarak farklı işleme yöntemleri gerektirebilir. Numune tipik olarak homojenleştirilir ve DNA ekstraksiyonundan önce daha büyük parçacıkları çıkarmak için filtrelendir (Kunin vd, 2008).

Ekstrakte edilen DNA daha sonra proteinler, RNA ve lipidler gibi kirleticileri uzaklaştırmak için saflaştırılır. Saflaştırılmış DNA, daha küçük parçalara bölünür ve dizilenebilen bir parça kütüphanesine dönüştürülür. Shutgun dizileme, ampikon

dizileme ve hedeflenen dizileme gibi farklı kütüphane hazırlama yöntemleri mevcuttur (Wooley vd, 2010).

Hazırlanan kütüphane daha sonra Illumina veya PacBio gibi yüksek verimli dizileme platformları kullanılarak dizilemeleri yapılır. Dizileme derinliği ve kapsamı, analizin amaçlarına bağlı olarak değişebilir. Ham dizileme verilerinin kalitesi kontrol edilir ve düşük kaliteli okumaları, adaptör dizilerini ve kirleticileri çıkarmak için filtrelenir. Ortaya çıkan yüksek kaliteli okumalar daha sonra konukçu DNA, ribozomal RNA ve diğer istenmeyen dizileri çıkarmak için önceden işlenir (J. Zhang vd, 2020).



Şekil 2.7 Molecular Markers: 16S rRNA and ITS

Ön işleme tabi tutulan okumalar daha sonra taksonomik ve işlevsel ek açıklamaları tanımlamak için NCBI, RDP, UNITE veya SILVA gibi referans veritabanlarında taranır. Bu amaçla BLAST, Kraken veya MetaPhlAn gibi çeşitli biyoinformatik araçlar mevcuttur. Açıklamalı veriler daha sonra çeşitli istatistiksel ve hesaplama araçları kullanılarak analiz edilir ve görselleştirilir. Sonuçlar, numunenin

mikrobiyal çeşitliliğini, topluluk yapısını ve fonksiyonel yeteneklerini anlamak için kullanılabilir (Chakoory vd, 2022).

2.9.1. Amplikon

16S rRNA ve ITS (Internal Transcription Spacer), bitkilerden ve bunlarla ilişkili mikrobiyomlardan elde edilenler de dahil olmak üzere mikrobiyal çeşitliliğinin analiz etmesini metagenomik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan belirteçlerdir (Rajendhran ve Gunasekaran, 2011)

16S rRNA : 16S rRNA geni, bakteri ve arke genomlarında bulunur ve değişken bölgelerle çevrelenmiş korunmuş bölgeler içerir. Bu değişken bölgeler, farklı mikrobiyal taksonları tanımlamak ve sınıflandırmak için dizilenebilir. Metagenomikte, 16S rRNA geni, bitki dokuları veya toprak gibi çevresel numunelerden amplifikasyon ve dizileme için hedeflenir. Elde edilen diziler, numunede bulunan farklı mikrobiyal grupların taksonomik bileşimini ve nispi bolluğunu belirlemek için bir referans veri tabanı ile karşılaştırılabilir. 16S rRNA metagenomik, bakteri ve arkeal çeşitlilik ve topluluk yapısı hakkında bilgi sağlar (Chaudhary vd, 2015).

ITS : ITS bölgesi, ökaryotlarda ribozomal RNA'nın küçük ve büyük alt birimlerini kodlayan korunmuş genler arasında bulunan bir ayırıcı dizidir. Metagenomikte fungus çeşitliliği analizi için yaygın olarak bir belirteç olarak kullanılır. 16S rRNA metagenomiklerine benzer şekilde, fungus çeşitliliğini ve topluluk yapısını değerlendirmek için ITS bölgesi bitki dokuları veya toprak gibi çevresel örneklerden çoğaltılır ve dizilenir. Elde edilen ITS dizileri, fungus taksonlarının taksonomik tanımlaması ve sınıflandırılması için UNITE veritabanı gibi bir referans veri tabanı ile karşılaştırılabilir (Abarenkov vd, 2018).

Çeşitli çalışmalar, tohumların üzerinde veya içinde bulunan mikroorganizmaları ifade eden tohumla ilişkili mikrobiyomu araştırmak için metagenomik kullanmıştır. Bu çalışmalar, tohumların, tohum çimlenmesini, fide gelişimini ve bitki sağlığını etkileyebilecek bakteri, fungus ve virüsler dahil olmak üzere çeşitli mikrobiyal toplulukları barındırdığını ortaya koymuştur (Links vd, 2014).

Bir çalışma, Ag-NP'ler buğdayın tohumla ilişkili mikrobiyal toplulukları üzerindeki etkisini incelemiştir. Araştırmacılar, bakteri topluluğu kompozisyonunu

analiz etmek için 16S rRNA geninin yüksek verimli dizilemesini kullanmışlardır. AgNP'lere maruz kalmanın, buğday tohumlarıyla ilişkili bakteriyel taksonların bolluğu ve çeşitliliğinde değişikliklere yol açtığını bulmuşlardır (Liu vd, 2017).

Başka bir çalışmada, titanyum dioksit nanopartiküllerinin (TiO₂-NP'ler) mısır tohumlarının çimlenmesi ve mikrobiyal toplulukları üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Araştırmacılar, tohumlarla ilişkili bakteri ve fungus topluluklarını incelemek için metagenomik analiz kullanmışlardır. TiO₂-NP'lere maruz kaldıktan sonra çimlenme oranındaki değişiklikleri ve mikrobiyal topluluk bileşimindeki kaymaları gözlemlemişlerdir (Ghoto vd, 2020).

Başka bir çalışma, Zn NP'leri ve Fe NP'leri yanı sıra bunların toplu muadillerinin pirinç büyümesi, tohum kalitesi ve pirincin rizosfer ortamındaki mikrobiyal topluluk üzerindeki etkisini değerlendirmiştir. Sonuçlara göre, düşük Zn NP'leri ve Fe NP'lerin konsantrasyonları (25 mg/kg) pirinç büyümesi, pigment içeriği, tane kalite parametreleri ve besin birikimi üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir. *Proteobacteria*, *Actinobacteria* ve *Planctomycetes* olarak. Çalışma ayrıca rizosfer ortamında streptomisin üretimi, karbon ve nitrojen fiksasyonu ve lignin degradasyonu ile ilgili mikroorganizmaların spesifik fonksiyonel gruplarının zenginleştiğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte, kitinin parçalanmasından, amonyak oksidasyonundan ve nitritin indirgenmesinden sorumlu olan mikrobiyal toplulukların azaldığı bulunmuştur (Afzal ve Singh, 2022).

Amplikon tabanlı metagenomik verilerin analizi için çeşitli yazılım paketleri geliştirilmiştir. Find Rapidly OTUs with Galaxy Solution (FROGS), kullanıcı dostu bir arayüz ve metagenomik analiz için bir dizi araç sağlayan, Galaxy platformuyla entegre olan böyle bir pakettir. FROGS, incelenen mikrobiyal topluluklar içindeki operasyonel taksonomik birimlerin tanımlanmasına izin veren ham dizi verilerinden OTU'lar oluşturmak için UCLUST ve VSEARCH gibi kümeleme algoritmaları kullanır (Escudié vd, 2018).

OTU'lar oluşturulduktan sonra FROGS, çeşitlilik analizi için seyreltme analizi, alfa çeşitliliği ve beta çeşitlilik analizi dahil olmak üzere bir dizi araç sunar. Paket ayrıca metagenomik veriler içinde mikrobiyal fonksiyon tahminleri oluşturmak için ribozomal gen veritabanlarını kullanan fonksiyonel tahmin araçları sağlar. Ek olarak, FROGS, kullanıcıların farklı örnekler arasındaki mikrobiyal topluluk yapısı ve işlevindeki farklılıkların önemini belirlemesine olanak tanıyan istatistiksel test

araçları sunmaktadır (AUER vd, 2011).

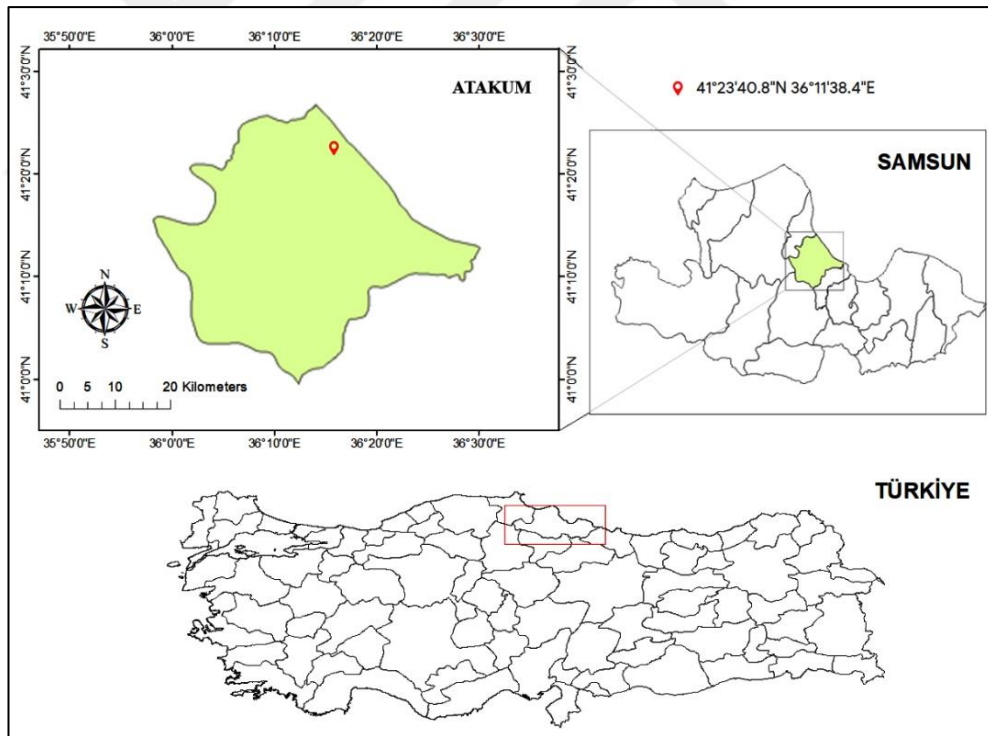
Genel olarak FROGS, amplikon tabanlı metagenomik verilerin analizi için kapsamlı bir çözüm sağlayan güçlü ve sezgisel bir yazılım paketidir. Galaxy platformuyla entegrasyonu, onu çok çeşitli kullanıcılar için erişilebilir kılar ve çeşitli araçlar, mikrobiyal toplulukların tanımlanmasına ve işlevsel özelliklerinin tahmin edilmesine olanak tanır. Bu nedenle FROGS, mikrobiyal ekoloji ve metagenomik alanındaki araştırmacılar için değerli bir araçtır(Escudié vd, 2018).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Tohum Toplama Alanı

Bu araştırmada kullanılan *Anacamptis laxiflora* tohumları, Şekil 3.1'te gösterildiği gibi 26 Temmuz 2021 tarihinde Samsun Atakum ilçesinden toplandı. Tohum kapsülleri toplandıktan sonra, her bir tohum kapsülü, neşter kullanılarak kapsül boyunca birkaç kesi yapılarak laboratuvarında açıldı. Tohumlar kapsülden çıkarıldıktan sonra havada kurutmak için bir parça temiz kağıt üzerine yerleştirildi ve iki gün boyunca kurumaya bırakıldı. Bunu takiben tohumlar, geçici depolama için dikkatli bir şekilde plastik kapaklı küçük cam şişelere aktarıldı. Tohumlar kullanım zamanı gelene kadar buzdolabında +4°C'de tutuldu. Genel olarak, araştırma için tohumların kalitesinin ve canlılığının korunmasını sağlamak için tohum toplama ve saklama prosedürü titizlikle gerçekleştirildi.



Şekil 3.1 *Anacamptis laxiflora*'nin tohumun toplama sahasının coğrafi konumu

3.1.1. Tohumların Canlılık Testi

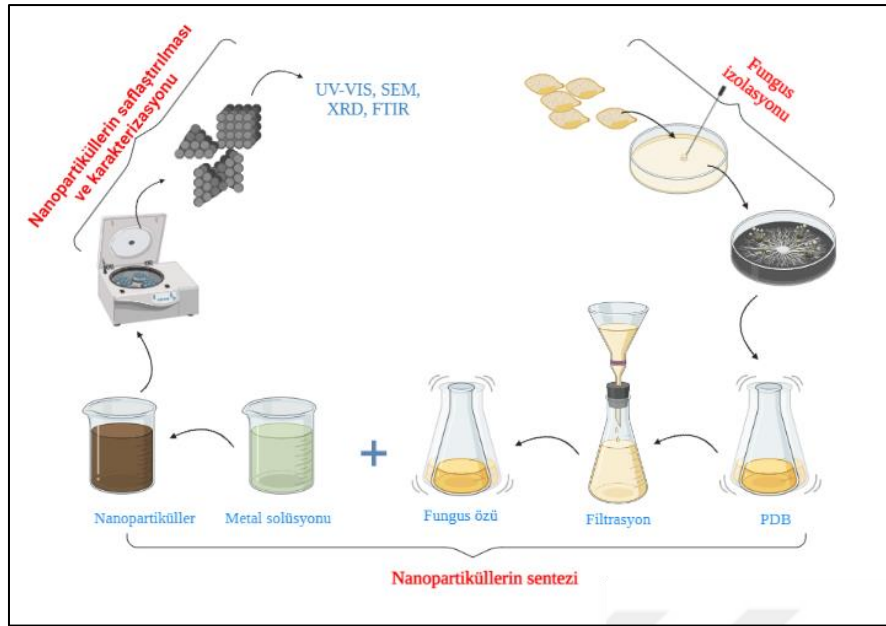
Tohum canlılık testi, tohum kalite değerlendirmesinde çok önemli bir adımdır ve tipik olarak tetrazolyum testi de dahil olmak üzere çeşitli yöntemler kullanılarak gerçekleştirilir. Çalışmamızda *Anacamptis laxiflora* tohumlarının canlılığını belirlemek için tetrazolyum testi kullanıldı.

İşleme başlamak için 1 gram tetrazolyum tuzunu 100 mililitre saf su'da eriterek %1'lik tetrazolyum solüsyonu hazırlandıktan sonra filtre ile sterilize edildi. Tohumlar daha sonra %70 etanol ile yüzey sterilizasyonu yapıldı ve saf su ile durulandıktan sonra steril kurutma kağıdı ile kurutuldu. Sterilizasyondan sonra, tohumlar 24 saat boyunca %1 tetrazolyum solüsyonunda bırakıldı.

Tetrazolium solüsyonu ile muamele işleminden sonra, bütünlüklerini sağlamak için tohumlar dikkatle tetrazolyum çözeltisinden çıkarıldı. Herhangi bir kalıntı solüsyonu uzaklaştırmak için, tohumlar saf su ile iyice durulandı. Tohum sayımı, tohumların renklerini ayırt ederek işlemi kolaylaştırmak için özel olarak tasarlanmış kullanıcı dostu bir arayüz sağlayan ImageJ yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Tohumların rengini görüntünün geri kalanından ayırmak için uygun bir eşik değerine ayarlandı. Bu süreç, istenmeyen unsurları ortadan kaldırdı ve bu şekilde doğru tohum sayımı sağlamış oldu (Ligterink ve Hilhorst, 2017).

3.2. Endofitik Funguslar İzolasyonu ve Nanopartikül Sentezi

Şekil 3.2, çalışmada kullanılan araştırma metodolojisini göstermektedir. Çalışmada, öncelikle *Anacamptis laxiflora* tohumlarından fungusların izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilmiş funguslardan elde edilen fungus ekstraktları, Fe NP'ler sentezlenmesinde kullanıldı. Ek olarak çalışmamızda, Fe NP'leri sentezleme ve ortaya çıkan nanopartiküllerin karakterizasyonunu gerçekleştirme kapasitesine sahip funguslar tanımlandı.



Şekil 3.2 Funguslar kullanılarak Fe NP'lerinin sentez prosedürü

3.2.1. Tohumlardan Fungusların İzolasyonu

Anacamptis laxiflora'nın tohumları dikkatlice toplandı ve yüzeylerinde mevcut olabilecek herhangi bir kir veya safsızlık izini ortadan uzaklaştırmak için iyice yıkandı. Tohumlar daha sonra bir dk %75 etanol ve ardından üç dk %1 NaClO ile muamele edilip üç kez saf su ile durulandı.

Daha sonra sterilize edilen tohumlar, fungusların gelişmesini sağlamak için oda sıcaklığında maksimum 48 saat büyümeye bırakıldı. Tohumlarda ortaya çıkan pelotonların potansiyel varlığı, nispeten yavaş büyüyen miselyum ve hifler gibi morfolojik özelliklerine göre izole edilecek örnekler belirlendi. Pelotonlar, steril bir iğne kullanılarak Patates Dekstroz Agar (PDA) ortamından dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve saf PDA plakaları daha sonra fungus büyümesini izlemek için 25°C'de 14 gün süreyle inkübe edildi. Saflaştırılan izolatlar PDA üzerinde alt kültürleri yapılarak daha sonra kullanılmak üzere saklandı.

Tablo 3.1 PDA ortamının hazırlanması

Karışım	miktarı
PDA	39g
Saf su	1000 ml

Tablo 3.1'deki miktarlara göre PDA damıtık su içinde çözünmesi sağlandıktan sonra solüsyon 121°C'de 20 dk otoklavlanarak sterilize edildi. PDA ortamının steril bir ortamda 50°C'ye kadar soğumasına izin verildi. Soğutulmuş ve sterilize edilmiş PDA ortamı daha sonra düz bir yüzeye yerleştirilen steril Petri kaplarına döküldükten sonra katılaşmaya bırakıldı.

3.2.1.1. Fungus Ekstraktlarının Hazırlanması

Fungus suşları, *Anacamptis laxiflora* tohumlarından izole edildikten sonra, 7 gün boyunca steril Patates Dekstroz Broth (PDB) ortamında kültürleri yapıldı. Kültür işleminden sonra, sıvı ortam, fungal miselyumu uzaklaşma ve saf süpernatant elde etme amacıyla filtre kağıdı kullanılarak süzüldü. Ardında elde edilen ekstrakt 5 dk 5.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj işlemi, ekstraktta kalan fungus hücrelerinin veya kalıntıların ayrılmasını ve ortadan kaldırılmasını kolaylaştırdı.

Bu şekilde hazırlanan fungus ekstraktları, fungus suşları tarafından PDB ortamında büyümeleri sırasında üretilen ikincil metabolitlerin ve biyoaktif bileşiklerin karışımını içermektedir. Saflaştırılan ekstraktlar daha sonra nanopartiküllerin sentezinde kullanıldı.

3.2.2. Mikonanopartiküllerin Sentezi

Fungus suşlarından elde edilen fungus ekstraktının 10 ml'si, 2:1 mM final konsantrasyonda ferrik triklorür (FeCl_3) ve ferrik diklorür (FeCl_2) tuzları içeren çözelti ile karıştırıldı. Bu reaksiyon, oda sıcaklığında 30 °C ve pH'sı $3,2 \pm 0,02$ olan sterilize edilmiş bir cam tüpünde 5 dk çalkalanarak gerçekleştirildi.

Reaksiyondan sonra Fe NP'leri, 12.000 rpm'de 15 dk santrifüj işlemine tabi tutularak ayrılımları sağlandı. Nanopartiküller, safsızlıkları gidermek amacıyla etanol ve üç kez saf su ile yıkandı. Son olarak, nanopartiküller, liyofilizatör kullanılarak kurutuldu. Fe NP'leri sentezleyebilen fungus suşlarının tanımlanması, reaksiyon karışımında renk değişiminin gözlemlenmesine dayalı olarak gerçekleştirildi. Fe NP'leri sentezi pozitif sonuç gösteren suşların tanımlanması amacıyla, morfolojik karakterler ve moleküllerin teknikleri kullanıldı. Ek olarak, Fe NP'lerinin, SEM dahil olmak üzere çeşitli analitik teknikler kullanılarak karakterizasyonları (UV–VIS spektroskopisi, XRD ve FTIR) yapıldı.

3.3. Nanopartiküllerin Kimyasal Sentezi

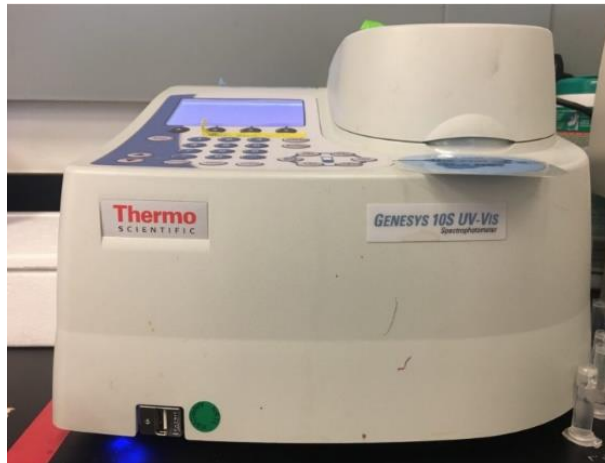
Fe NP'lerinin sentezi, Wu ve diğerleri, 2011'e göre FeCl_3 , ve FeCl_2 oluşan bir öncü karışım kullanılarak bir birlikte çökeltme yöntemiyle gerçekleştirildi. FeCl_3 solüsyonu FeCl_2 solüsyonu ile reaksiyona girerek Fe^{3+} ve Fe^{2+} iyonları üretir, bunlar daha sonra bir baz ile reaksiyona girerek bir çökelti oluşturur. Sodyum hidroksit (NaOH), bir NaOH çözeltisi oluşturmak üzere saf su'da çözülür.

Daha sonra Fe^{3+} ve Fe^{2+} çözeltilerine NaOH çözeltisi damlatılarak kimyasal reaksiyon başlatıldı ve manyetik karıştırıcı kullanarak karışım 30 dk çalkalandı. Sonuç olarak Fe NP'lerinden oluşan kömür benzeyen koyu renkli bir çökelti elde edildi.

3.3.1. Sentezlenen Fe NP'lerin Karakterizasyonu

3.3.1.1. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometresi (UV-vis spektroskopisi)

Bu araştırmanın sonuçlarını analiz etmek için UV-Görünür Spektrofotometresi (Thermo Evolution 220 UV-Visible Spectrophotometer) kullanılmıştır. Sentezlenen, gümüş nanopartiküllerin (Fe NP'ler) varlığını doğrulamak için 200-900 nm dalga boyu aralığında ayarlandı. Şekil 3.3, nanopartiküllerin özelliklerini analiz etmek için kullanılan UV-Vis spektroskopi cihazını gösterdi.



Şekil 3.3 Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometresi

3.3.1.2. Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopi (FTIR)

FTIR (Perkin Elmer Spectrum Two FTIR), iki polimer arasındaki kimyasal bağlar gibi hidrojellerin kimyasal yapısını belirlemek ve iki polimer arasında çapraz bağlanma oluşumunu doğrulamak için kullanıldı. 4000-400 cm^{-1} arasında tarama yapıldı. Analizlerde kullanılan cihaz Şekil 3.4'te gösterildi.



Şekil 3.4 FTIR Spectrum Bruker Tensor 27

3.3.1.3. XRD (X-Işını Kırınımı)

Saf PVA, PVA/keçiboynuzu gamı hidrojel, LBG/PVA/AgNP hidrojel membranlarının X-ışını kırınımı (XRD) desenleri X-ışını difraktometresinde kaydedildi. XRD ölçümleri, bir X-ışını kırınım skalası (RIGAKU SMART LAB, Japan) ile CuK α radyasyonu ve sıfır arka plan numune tutucuları kullanılarak 40 kV ve 30 mA'da gerçekleştirildi. 2 θ 'de yapılan tarama, oda sıcaklığında 0° ila 80° aralığındaydı. Şekil 3.5, nanoparçacık karakterizasyonu için kullanılan XRD cihazını gösterdi.



Şekil 3.5 X-ışını kırınım cihazı (Rigaku Smart Lab modeli)

3.3.1.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Sentezlenen Fe NP'ler morfolojisini, boyutunu ve temel bileşimini karakterize etmek için SEM ve EDX kullanıldı. Az miktarda Fe NP'leri SEM tutucusuna aktarıldıktan sonra ince altın tabakası ile kaplandı. Fe NP'lerin yüzey morfolojisinin yüksek çözünürlüklü görüntülerini üreten SEM cihazında elektron ışını radyasyonuna tabi tutuldu (Şekil 3.6). Fe NP'lerin boyut dağılımı, görüntü analiz yazılımı kullanılarak çok sayıda parçacığın boyutu ölçülerek SEM görüntülerinden belirlendi. Fe NP'lerin ortalama boyutu ve boyut dağılımı, görüntü analizinden elde edilen veriler kullanılarak hesaplandı.



Şekil 3.6 Taramalı elektron mikroskobu (Jeol JSM7001F modeli)

EDX analizi için de, SEM analizinde kullanılan numunenin aynısı kullanıldı. Numune, elektron ışını radyasyonuna tabi tutuldu ve numune tarafından yayılan X-ışınları, Fe NP'lerin temel bileşimini belirlemek için tespit edildi ve analiz edildi. SEM görüntüleri ve EDX spektrumları, sentezlenen Fe NP'lerin diğer demir oksit nanopartikülleri ile daha fazla karakterizasyonu ve karşılaştırılması için de kullanıldı.

3.4. Fungusların Moleküler Tanımlaması

Nanopartiküller üretme yeteneğine sahip fungusları tanımlamak için moleküler teknikler kullandı. DNA izolasyonunda gerekli tüm stok çözeltiler hazırlandı ve belirli koşullar altında sakladı.

Tablo 3.2 Lizis tamponu hazırlama

Bileşen	Hacim/Ağırlık
Saf su	70 mL
100 mM Tris-HCl pH 8.0	14 mL
20 mM EDTA	2 mL
1.4 M NaCl	15 mL
CTAB	2 g
Saf su (ayar)	-
Son Hacim	100 mL

Tablo 3.3 Tris tamponu hazırlama

Bileşen	Hacim/Ağırlık
Saf su	70 mL
1 M Tris-HCl pH 8.0	1 mL
Saf su (ayar)	-
Son Hacim	100 mL

Tablo 3.4 TE tamponu hazırlama

Bileşen	Hacim/Ağırlık
Saf su	70 mL
0.5 M EDTA pH 8.0	2 mL
0.5 M Tris-HCl pH 8.0	0.2 mL
Saf su (ayar)	-
Son Hacim	100 mL

Tablo 3.5 TBE tamponu hazırlama

Bileşen	Hacim/Ağırlık
10x TBE Tamponu	100 mL
Saf su (ayar)	900 mL
Son Hacim	1000 mL

Tablo 3.6 1X TBE tamponu hazırlama

Bileşen	Hacim/Ağırlık
Tris	108 g
Borik Asit	55 g
Saf su	900 mL
0.5 M EDTA pH 8.0	40 mL
Saf su (ayar)	-
Son Hacim	1000 ml

3.4.1. DNA Ekstraksiyonu

DNA izolasyon aşamalarında kullanılmak üzere izolatların kuru misellerini elde etmek için hazır olarak temin edilen standart PDB (Patates Dekstroz Broth) (Oxoid) besiyeri hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyeri 100 ml'lik erlenlere 30 ml olacak şekilde dökülmüştür. Pamuk ve alüminyum folyo ile kapatılıp otoklavda steril edilmiştir. Bir sonraki gün PDA besi ortamında geliştirilen taze fungus kültüründen PDB besi ortamına aşılama yapılmıştır. PDB ortamına aşılanmış ve çalkalayıcılı su banyosunda oda sıcaklığında 1 hafta inkubasyona bırakılmıştır. Sıvı besiyerinde üreyen fungus miseli dezenfekte edilmiş bir pens yardımıyla içinde katlanmış halde

steril kurutma kağıtları bulunan petriye transfer edilmiştir. Bu şekilde fungus miseli kurutma kağıtları arasında iyice kurutulmuştur. Miseller steril eppendorf tüplere yerleştirilerek liyofilizator kurutma cihazında kurutulup toz haline gelinceye kadar ezilmiştir. DNA izolasyonu aşamasına kadar steril 1.5 ml'lik eppendorflar içinde -200C'de saklanmıştır.

1) Toz haline getirilmiş örneklerden 20-30 mg kuru fungus miseli 2 ml reaksiyon tüplerine transfer edilmiştir. 2) Reaksiyon tüplerine 2-3 adet küçük homojenizasyon boncuğu (0,4 mm) ve 1 ml CTAB (100 ml CTAB/NaCl çözeltisi hazırlamak için 4.1 g NaCl tartılarak 90 ml ddH₂O içerisinde çözülmüştür. Bu çözeltinin içerisine 10 g CTAB (Sigma, Steinheim, Almanya) eklendikten sonra otoklavlanmış ve karıştırılarak CTAB'ın çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra çözelti ddH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır) buffer ilave edilmiştir. Vortekslenerek (Fisons SGP-010J) 2 dakika homojenize edilmiştir. Daha sonra fungus materyallerinin pudra şekline dönüşüp dönüşmediği kontrol edilmiştir. Gerekirse tekrar homojenize edilmiştir. 3) İyice karıştırıldıktan sonra 650C'de 30 dakika boyunca su banyosunda inkübe edilmiştir. Örnekler su banyosundan aldıktan sonra 5000 rpm'de, 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. 4) Bu işlem sonucunda tüplerde iki tabaka görülmüştür. Bunlardan biri alt kısma çökelmiş organik kısım, üst tabakada ise su, DNA ve diğer polisakkaritleri içeren kısımdır. Süpernatant (DNA'nın bulunduğu kısım) 1,5 ml'lik yeni tüplere dikkatli bir şekilde transfer edilmiştir. 5) 1 ml kloroform/isoamilalkol ve 2 µl RNase ilave edilmiştir. 2 dakika boyunca vortekslenerek iyice karıştırılmıştır. Tüpler daha sonra 13.000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra süpernatant 1,5 ml'lik tüplere transfer edilmiştir. 6) Tekrar 1 ml kloroform/isoamilalkol 2 eklenerek 2 dakika boyunca vortekslenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Tüpler daha sonra 13.000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant (DNA'nın bulunduğu kısım) 1,5 ml'lik yeni tüplere transfer edilmiştir. 7) 2/3 hacminde soğuk isopropanol eklenip, iyice karıştırıldıktan sonra 30 dakika boyunca 200C'de buzdolabında çökelmeye bırakılmıştır. 8) 10 dakika boyunca 13.000 rpm'de santrifüj edilerek DNA tüpün altına çökdikten sonra üst kısım hızlı bir şekilde uzaklaştırılmıştır. 9) Tüplerdeki tüm etanol uzaklaştırıldıktan sonra DNA'lar desikatörde kurumaya bırakılmıştır. İyice kuruduktan sonra DNA'yı korumak amacıyla üzerine 50 µl TE eklenmiş ve buzdolabında saklanmıştır (Siromyatnikov vd, 2016; Pascual vd, 2000).

3.4.2. Agaroz Jel Elektroforez

Agaroz jel elektroforez tekniği, DNA fragmanlarının görüntülenmesi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışmada, funguslardan izole edilen DNA'nın varlığı bu teknik kullanılarak doğrulandı. Agaroz jeli, moleküler bir elek görevi görerek daha küçük DNA parlarının jel içinde daha büyük olanlara göre daha hızlı ve daha uzağa geçmesine izin verir.

Agaroz jeli hazırlamak için 0,3 g agaroz 30 ml 1 X TBE tamponu ile karıştırılarak mikrodalgada berrak bir çözelti elde edilinceye kadar karıştırılarak ısıtıldı. Çözelti daha sonra 50°C'ye soğutulduktan sonra elektroforez tepsisine döküldü. Jel oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı ve katılaştıktan sonra taraklar çıkarıldı. Jel daha sonra sadece jel seviyesini geçecek şekilde 1 X TBE tampon çözeltisi ile dolduruldu.

Fungus örneklerinden izole edilen DNA'yı görselleştirmek için, agaroz jelin oyuklarına yüklenen karışımın konsantrasyonları dikkatlice hazırlandı. Toplam 3 l DNA, 1.7 l saf su, 0.3 l Gel Red (10 mg/ml stok) ve 1 l yükleme tamponu karıştırılıp gele yüklendikten sonra, jel yaklaşık 30-45 dk boyunca sabit bir voltajda elektroforeze tabi tutuldu.

Elektroforezden sonra, agaroz jel bir Transillminatr kullanılarak UV ışığı altında görselleştirildi. DNA fragmanları, jelde farklı bantlar olarak gözlendi ve daha küçük fragmanlar, daha büyük fragmanlara göre jelin tabanına daha yakın göründü. DNA fragmanlarının mevcudiyeti ve boyutu, izole edilmiş DNA'nın boyutunun tahmin edilmesi için bilinen fragman boyutlarına sahip bir standart DNA markerı ile karşılaştırıldı.

3.4.3. ITS1-5.8S-ITS2 ile PCR Amplifikasyonu

Fe Nps sentezleme yetenekleri nedeniyle dört endofitik fungus izolatu seçildi. Endofitik fungus izolatından seçilen 28 izolatın saf olarak elde edilmiş DNA rneklerinin ITS1-5.8S-ITS2'i kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için iki primer (ITS-5 ve ITS-4) kullanılmıştır (White vd, 1990). PCR işlemleri 0.2 ml'lik PCR tüplerinde Thermal Cycler (Primus 25)'da yapılmıştır. Stok solüsyonlar kontaminasyon riskini azaltmak amacıyla küçük miktarlarda (25-100 l) steril eppendorflara bölünerek kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır. dNTP karışımı (her biri 25 mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP) (promega), Primer ITS5

(GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) ve Primer ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Qiagen) (White vd, 1990), 5 X Taq tampon (Promega) ve MgCl₂ (Promega) buz üzerinde çözülmüş ve vortekslenmiştir. Reaksiyon hazırlama süreci buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Protokölde belirtildiği gibi malzemeler buz özerinde reaksiyon tüpünde çözülmüş ve vortekslenmiştir. (Akın Mutlu, 2014). Taq DNA polimeraz (Promega) ise enzim ekleme aşamasına kadar - 20°C’de tutulmaya devam edilmiştir. PCR karışımı aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır:

Tablo 3.7 PCR karışımı hazırlama

Bileşen	Hacim/Ağırlık
PCR Master Mix (2X)	25 µL
İleri Primer (1 µM)	1 µM
Geri Primer (1 µM)	1 µM
Kalıp DNA	1 µg
Saf su (ayar)	-
Son Hacim	50 µL

PCR Master 2X Termoscientific Mix, kalıp DNA ve primerler hariç, Taq DNA polimeraz, dNTP'ler ve PCR için gerekli diğer bileşenleri içeren konsantre bir solüsyondur. Her numune için reaksiyon karışımının toplam hacmi 50 ul idi. Ana karışımı hazırlamak için reaksiyon için gerekli malzemeler, Taq DNA polimeraz ve kalıp DNA hariç örnek sayısı ile çarpıldı. Nihai karışım, soğutulmuş steril bir Eppendorf tüpüne aktarıldıktan sonra vortekslendi. Sonra buz üzerinde bekletilen her bir PCR tüpüne 49 µl Master mix eklendi. Negatif kontrol tüpü herhangi bir kalıp DNA olmadan hazırlandı. PCR tüpleri Thermal Cycler’a yerleştirilerek ve herhangi bir gecikme olmadan CYC programı (BNRHI) uygulandı. PCR işlemi 30 döngü olarak gerçekleştirildi (Tablo 3.8).

Tablo 3.8 PCR aşamaları

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre
Başlangıç	94°C	3 dk
Denatürasyon		
Denatürasyon	94°C	1 dk
Yapışma	49°C	2 dk
Uzatma	74°C	3 dk
Son Uzatma	72°C	7 dk

Genel olarak, bu adımlar, fungus izolatlarının DNA'sının ITS1-5.8S-ITS2 bölgesinin amplifikasyonu sağladı.

3.4.4. ITS1-5.8S-ITS2 DNA Dizileme ve Sekans Verilerinin Analizi

Endofitik fungusların ITS1-5.8S-ITS2 gen bölgesi, ITS5 ve ITS4 primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. Daha sonra elde edilen amplifikasyon ürünleri, her numuneden 2 µL alınıp 100bp DNA marker ile %1 agaroz jel üzerinde yürütüldükten sonra görüntülendi.

ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ürünlerini içeren PCR örnekleri MacroGen firmasına gönderildi dizilemeleri yapıldıktan sonra farklı formatlarda tarafımıza gönderildi.

NCBI veritabanından endofitik fungusların yakından ilişkili ITS gen dizilerini elde edildikten sonra filogenetik analiz yürütmek için veri seti oluşturuldu. Dizileri BioEdit programını kullanarak hizalandı ve hataları manuel olarak da düzeltildi. Daha sonra MEGA 6.06 programında Neighbour-Joining algoritması ve program tarafından önerilen baz değişim modeli kullanarak filogenetik ağaçlar oluşturuldu.

3.5. Orkide Yetiştirme Ortamının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Steril koşulları ve deneyin doğruluğunu sağlamak üzere birkaç hazırlık aşaması gerçekleştirildi. Deneyde şekil 3.7 gösterdiği gibi üç farklı ortam (katı ortam- Modifiye yulaf agar ortamı, sıvı ortam- modifiye yulaf sıvı ortamı ve toprak ortamı) kullanıldı.



Şekil 3.7 Uygulama ve analiz adımları

Tablo 3.9 Modifiye yulaf agar ortamı

Malzeme	Miktar/ Konsantrasyon
Ca(NO₃)₂·4H₂O	0,2 g
KH₂PO₄	0,2 g
KCl	0,1 g
MgSO₄	0,1 g
Yeast extract	0,1 g
Saf su	1000 ml
Sakkaroz (Şeker)	2 g
Yulaf	3,5 g
Agar	10%

Katı ortamının Hazırlanması:

1. Yukarıdaki bileşenleri saf suda biraraya getirildikten sonra NaOH çözeltisi kullanarak pH'ı 5,5-5,7 olacak şekilde ayarlandı.
2. Hazırlanan karışımına 2 gram sakkaroz ve 3,5 gram yulaf ezmesi ilave edildi.
3. Ardından %10'luk agar eklendi.
4. Karışımı otoklavda 121°C'de 25 dk sterilize edildi.
5. Sterilizasyondan sonra besiyerini steril petri kaplarına döküldükten sonra katılaşması beklendi.

Sıvı ortamı hazırlanması:

1. Tablo 3.9 'deki malzemelerden agar hariç diğer kimyasal bileşenler kullanılarak karışım hazırlandı.
2. Karışıma sakkaroz ve yulaf ezmesi pH ayarlandıktan sonra ilave edildi.
3. Karışım otoklavda 121°C'de 25 dk sterilize edildi.
4. Sterilizasyondan sonra besiyeri steril flaskalara (erlenlere) aktarıldı.

Toprak ortamı hazırlama prosedürü:

1. Çalışmada toprak ortamı olarak Vermikompost toprağı kullanıldı (Girgin, 2018).
2. Vermikompost toprağı cam petri kaplarına aktarıldıktan sonra. otoklavda 121°C sıcaklıkta 15 dk süreyle sterilize edildi.
3. Deney sürecinde, haftada bir kez steril sıvı yulaf ortamı kullanılarak aseptik koşullarda toprak ortamı nemlendirildi.

Hazırlanan bu ortamlar, *Anacamptis laxiflora* tohumlarının yetiştirilmesi için kullanıldı.

3.5.1. Deneyisel Uygulamalar

1. Uygulamalar sırasında, birkaç nanopartikül oluşturuldu : Fe KNP'ler, FeBNp1'ler, FeBNP5'ler, FeBNP6'ler'ler, FeBNp12'ler.
2. Her bir muamelede ortamlara, yukarıda belirtilen nanopartiküller üç farklı konsantrasyonda eklenmiştir: 10 mg/L, 50 mg/L ve 150 mg/L.
3. Ortamlara , F1, F5, F6 ve F12 olarak tanımlanan dört farklı endofit fungus türü ile aşılandı.
4. (Fe KNP'ler+ F karışımı) ve /FeNBkarışımı + F karışımı)

Tablo 3.10 Uygulama açıklama kısaltmaları

Uygulama	açıklaması
Fe KNP'ler	Kimyasal olarak sentezlenmiş demir oksit nanopartikülleri
Fe BNP1'ler	F1 kullanılarak sentezlenen demir oksit nanopartikülleri
Fe BNP5'ler	F5 kullanılarak sentezlenen demir oksit nanopartikülleri
Fe BNP6'ler	F6 kullanılarak sentezlenen demir oksit nanopartikülleri
Fe BNP12'ler	F12 kullanılarak sentezlenen demir oksit nanopartikülleri
(Fe KNP'ler + F Karışımı)	Kimyasal olarak sentezlenmiş demir oksit nanopartikülleri ve (F1, F2, F3 ve F12) karışımı
(Fe BNP'ler _{Karışımı} + F Karışımı)	(Fe BNP1'ler, Fe BNP5'ler, Fe BNP6'ler ve Fe BNP12'ler) _{Karışımı} ve (F1, F2, F3 ve F12) karışımı

3.5.2. Orkide Tohumlarının Sterilizasyonu

Potansiyel olarak çalışmanın sonuçlarına müdahale edebilecek herhangi bir mikrobiyal kontaminasyonu ortadan kaldırmak için, orkide tohumları hazırlanan katı ve sıvı ortama ekilmeden önce yüzetsel sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Sterilizasyon işlemi iki aşamalı gerçekleştirildi. İlk olarak tohumların yüzeyini dezenfekte etmek için %70'lik etanol solüsyonunda 5 dk bekletildi. İkinci olarak, kalan kirleticileri de ortadan kaldırmak amacıyla tohumlar 10 dk boyunca %1'lik bir sodyum hipoklorit çözeltisi ile muamele edildi.

Toprak ortamına yerleştirilen tohumlar yüzey sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Bu işlem, %70 etanole 1 dakikalık daldırmayla başlayan, ardından %2,5 sodyum hipoklorite 2 dakikalık daldırıldı. Bu sterilizasyon adımlarından sonra tohumlar steril saf su ile beş kez durulandı.

3.5.3. İstatistiksel

Tohum sayımı ve istatistiksel analiz yapmak için, tohumlar incelendi ve 75 günlük bir inkübasyon süresinden sonra 20x büyütmede bir stereo mikroskop altında sayıldı. Petri kapları sayımı kolaylaştırmak için 2x2 cm lik karelere bölündü. 2016 yılında tohumların çimlenme aşamaları Yamazaki ve Miyoshi kriterlerine (Tablo

3.11) göre değerlendirildi.

Tablo 3.11 Tohum çimlenme safhaları (Yamazaki ve Miyoshi, 2006)

Çimlenme safhası	Belirteçler
Safha 0	Çimlenme yok. Embriyo büyümesi gözlemlenmez.
Safha 1	Ön-çimlenme safhası. Embriyo tohum kabuğunu enine doldurur.
Safha 2	Çimlenme safhası. Embriyo, tohum kabuğundan çıkıntı yaparak dışarı doğru büyümeye başlar.
Safha 3	Çimlenme safhası. Embriyo tohum kabuğundan çıkıntı yapar.
Safha 4	Rizoid safhası. Protokorm yüzeyinde rizoidler görülür.
Safha 5	Sürgün safhası. Protokormdan sürgün farklılaşır.

Tohum çimlenme yüzdelерinin hesaplanmasında Formül (1);

Çimlenme yüzdesi (%) = $\frac{\sum \text{Tohum sayısı (Aşama 2-5)} \times 100}{\sum \text{Tohum sayısı (Aşama 0-5)}}$

Tohum çimlendirmesinde etkileri denenen besiyerlerinden en etkili olanı belirlenip sonraki denemelere o besiyerinde devam edildi. Bu aşamada kullanılan besiyerleri Tablo 3.11.'de gösterilmektedir.

İstatistikî değerlendirmelerde ise kontrol grubuna oranla uygulamadan kaynaklanan büyüme parametreleri arasında bir farkın olup olmadığı varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. ANOVA uygulaması ardından $p < 0,05$ ve $p < 0,001$ önem dereceleri dikkate alınarak Tukey HSD testi uygulandı ve kontrole kıyasla istatistikî olarak farklı olan sonuçlar gösterildi. İstatistikî testler OriginPro 2023 programı kullanılarak gerçekleştirildi.(Mala vd, 2017) .

3.6. Glikomannan İçerikleri

Yetiştirilen tohumların glikomannan içeriğini ölçmek için bir enzimatik kolorimetrik deney kullanıldı.

3.6.1. Kıtte Kullanılan Reaktifler

Analizlerde, İrlanda'daki Megazyme International Ireland Limited'den (katalog numarası: K-GLUM) temin edilen ticari bir Glikomannan deney kiti kullanılarak

gerçekleştirildi. K-GLUM katalog numarasıyla tanımlanan kit, küçük şişelerde uygun şekilde paketlenmiş aşağıdaki reaktifleri içermektedir:

1. Şişe: Sodyum asetat tamponu (25 ml, 1 M, pH 4.5) ve sodyum azid (%0.02 w/v).
2. Şişe: TEA tamponu (12,5 ml, 1 M, pH 7,6), magnezyum klorür (100 mM) ve sodyum azid (%0,02 w/v).
3. Şişe: NADP⁺ (150 mg) ve ATP (440 mg).
4. Şişe: β -mananaz süspansiyonu (1.2 ml, 450 U/ml).
5. Şişe: β -Glukosidaz (100 U/ml) ve β -mannosidaz (100 U/ml) süspansiyonu (1,1 ml).
6. Şişe: Hekzokinaz (425 U/ml) ve glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (212 U/ml) süspansiyonu (1.1 ml).
7. Şişe: Fosfoglukoz izomeri (1000 U/ml) ve fosfomannoz izomeri (1000 U/ml) süspansiyonu (1.1 ml).
8. Şişe: D-glikoz ve D-mannoz standart solüsyonu (her biri 0,2 mg/ml).

3.6.2. Reaktif Çözeltilerinin/Süspansiyonlarının Hazırlanması

Şişe 1'in içeriği saf su ile 450 ml'ye seyreltildi, ardından saf su ile 500 ml'ye tamamlanmadan önce pH 4.5'e ayarlandı. Daha sonra 4 °C'de saklamadan önce mikrobiyal kontaminasyonu önlemek için iki damla toluen eklendi. Şişe 3'ün içeriği saf su (12 ml) içinde çözüldü ve -20°C'de polipropilen tüplerde saklandı. 2, 4, 5, 6, 7 ve 8 numaralı şişelerin içerikleri temin edildiği şekilde kullanıldı.

3.6.3. Örnek Çözeltilerin Hazırlanması

0.10 g *Anacamptis laxiflora* tozu dikkatlice tartıldıktan sonra temiz bir cam test tüpüne aktarıldı. Daha sonra test tüpüne 5 ml %80 (v/v) sulu etanol ilave edildi ve içerik iyice karıştırıldıktan sonra 85 - 90 °C'de 5 dk inkübe edildi. Bu inkübasyon süresinden sonra, ilave 5 ml %80 (v/v) sulu etanol ilave edildi ve karışım vorteks karıştırıcıda 10 dk karıştırıldı.

Nihai çözelti daha sonra 1500 g'de 10 dk santrifüjlendi ve elde edilen topak başka bir 5 ml %80 (h/h) sulu etanol içinde yeniden süspanse edildi ve 10 dk daha karıştırıldı. Bundan sonra solüsyon, sulu etanolü uzaklaştırmak için tekrar 1500 g'de 10 dk santrifüjlendi.

Nihai pelet daha sonra 8 ml 50 mM sodyum asetat tamponunda (pH 4.5)

yeniden süspanse edildi ve tam dağılımı sağlamak için bir vorteks karıştırıcı üzerinde kuvvetlice karıştırıldı. Test tüpü 30 saniye kaynar su banyosunda inkübe edildi ve daha sonra bir vorteks karıştırıcıda kuvvetlice karıştırıldı. Bu ısıtma ve karıştırma işlemi tekrarlandı ve test tüpü daha sonra glikomannan'ın tamamen hidratlanması için 4 dk kaynar su banyosunda inkübe edildi. Nihai karışım, 40 °C'de 5 dk sürekli olarak inkübe edilmeden önce bir vorteks karıştırıcı üzerinde tekrar kuvvetlice karıştırıldı.

Daha sonra test tüpüne 20 µl β-mananaz süspansiyonu eklendi ve içerik vorteks karıştırıcıda 30 saniye kuvvetlice karıştırıldı. Karışım daha sonra tam enzimatik sindirim sağlamak için 40 °C'de 60 dk inkübe edildi.

İnkübasyonun ardından solüsyon kantitatif olarak 200 ml'lik bir behere aktarıldı ve hacim saf su ile yaklaşık 70 ml'ye tamamlandı. Solüsyonun pH'ı daha sonra 1 M NaOH'in yavaş ilavesi ve ardından oda sıcaklığında 10 dk inkübasyon yoluyla dikkatli bir şekilde yaklaşık 12.5'e ayarlandı. Ardından 20 ml 200 mM sodyum fosfat tamponu (pH 6.5) ilave edildi ve çözeltinin pH'ı, 1 M hidroklorik asidin yavaş ilavesiyle 6.5'e ayarlandı. Çözelti daha sonra kantitatif olarak 100 ml'lik ölçülü bir şişeye aktarıldı ve işaretli kısma kadar hacim saf su ile tamamlandı.

3.6.4. Enzimatik Kolorimetrik Reaksiyonlar

Glikomannanın tam hidrolizini sağlamak için numune solüsyonu ve süspansiyon 5 karıştırıldıktan sonra 20 dk inkübe edildi. Ardından, hem numune hem de boş çözeltilere çözelti 2 (TEA tamponu) ve çözelti 3 (NADP+ ve ATP) eklendi. Üç (3) dakikalık inkübasyondan sonra, ilk absorbans okumaları (A1) 340 nm'de alındı. Süspansiyon 6 (hekzokinaz ve glikoz-6-fosfat dehidrojenaz) eklendi ve sabit okumalar (A2) elde edilene kadar her 2 dakikada bir absorbans okumaları alındı. Son olarak süspansiyon 7 (fosfoglukoz izomeraz ve fosfomannoz izomeraz) eklendi ve sabit okumalar (A3) elde edilene kadar her 2 dkda bir absorbans okumaları alındı.

$$\begin{aligned} &= \frac{\Delta A_{Glikomannan}}{6300} \times \frac{V}{1000} \times MW \times \frac{FEV}{v} \times \frac{100}{w} \times F \\ &= \Delta A_{glucomannan} \times 36.8 \end{aligned}$$

Bu değerler ve sağlanan denklem kullanılarak glikomannan içeriği (% w/w) hesaplanabildi.

3.7. Nanopartiküller ve Tohum Mikrobiyomları

Çalışmamızda tohumların içindeki mikrobiyal topluluğu araştırmak için toplam DNA elde edildi. Aşağıdaki protokol, toplam DNA ekstraksiyonu için izlediğimiz adımları özetlemektedir:

- 100 mg *Anacamptis laxiflora* tohumlarını havan ve tokmak kullanarak öğütüldü.
- Toz haline getirilmiş tohumları 1,5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- Tüpe 600 µL CTAB tamponu eklendikten sonra vorteksleyerek iyice karıştırıldı.
- Tüpe 12 µL proteinaz K eklendi ve birkaç kez alt üst ederek iyice karıştırıldı.
- Tüp ara sıra hafifçe karıştırarak 65°C'de 1 saat inkübe edildi.
- Tüpe eşit hacimde kloroform: izoamil alkol eklendi (örn. 600 µL numune için 600 µL).
- Tüp 10-15 saniye kuvvetlice karıştırdı ve oda sıcaklığında 12.000 x g'de 10 dk santrifüj edildi.
- Sulu katmanı (üst katman), interfaz ve organik katmanı geride bırakarak yeni bir 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- Tüpe eşit hacimde izopropanol eklendi (örn. 600 µL numune için 600 µL) ve birkaç kez ters çevirerek iyice karıştırıldı.
- Tüp 12.000 x g'de 10 dk 4°C'de santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı ve DNA peleti 1 mL %70 etanol ile yıkandı.
- Tüp 12.000 x g'de 5 dk 4°C'de santrifüj edildi ve peleti bozmadan süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
- DNA peleti oda sıcaklığında 10-15 dk kurutuldu.
- Tüp 65°C'de 10-15 dk ara sıra hafifçe karıştırarak inkübe ederek DNA peletini 50-100 µL TE tamponunda çözündü.
- DNA solüsyonunu bir sonraki kullanıma kadar -20°C'de saklandı.

3.7.1. 16S rRNA ve ITS Genlerinin Dizilimi

Bu çalışma, hem 16S rRNA hem de ITS genlerinin PCR amplifikasyonunu ve ardından Illumina'nın ana hatlarıyla belirtilen yönergelerine bağlı olarak Illumina® MiSeq protokolünü takip eden metagenomik dizileme kütüphanesinin hazırlanmasını içermektedir.

16S rRNA geninin amplifikasyonu için, özellikle V3-V4 bölgelerini hedeflemek üzere tasarlanan 341F/805R primer çifti kullanıldı. Bu primerler, Illumina sekanslama platformuyla uyumluluğu sağlamak için 5' ucunda Illumina sekanslama adaptörleri ile uyarlandı. Bu amaçla aşağıdaki primer dizileri kullanıldı:

- 341F: 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'
- 805R: 5'-ACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

ITS1-ITS2 bölgelerini amplifiye etmek için aşağıdaki primer dizileri kullanıldı:

- ITS1F: 5'-CTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'
- TS2: 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'

Amplikon kütüphanenin dizilimi, 2x300 eşleştirilmiş uç konfigürasyonu kullanılarak Illumina® MiSeq platformunda gerçekleştirildi. Ortaya çıkan dizileme verileri kapsamlı bir işleme ve ardından analize tabi tutuldu.

Bu dizileme protokolü, 2 x 100 bp okuma üreten Illumina HiSeq 2000 dizileyici kullanılarak Macrogen, Avrupa tesisinde titizlikle yürütüldü. Tüm adımlar katı akademik standartlara bağlı kalarak metagenomik dizileme sonuçlarının kesinliğini ve güvenilirliğini sağladı.

3.7.2. Biyoinformatik

Ham dizileme verilerinin analizinden elde edilen sonuçların doğruluğunu ve güvenilirliğini sağlamak için bir dizi ön işleme adımı gerçekleştirildi. İlk adım olarak, okumaların kalitesini değerlendirmek ve düşük kaliteli okumaları ve adaptör dizilerini filtrelemek için FastQC araçların kullanılmasını içeren kalite kontrol işlemleri gerçekleştirildi. Çift uçlu okumalar, Vsearch kullanılarak birleştirildi ve gürültü giderme ve primer/adaptörlerin çıkarılması, cutadapt kullanılarak gerçekleştirildi.

Ön işleme adımı tamamlandıktan sonra okumalar, SWARM kullanılarak 3'lük bir toplama mesafesiyle operasyonel taksonomik birimler (OTU'lar) halinde kümelendi. Bu, FROGS Remove kimera kullanılarak elde edildi.

Bir sonraki adımda, düşük frekansta meydana gelenler veya negatif kontrollerde bulunanlar gibi düşük kaliteli veya sahte OTU'ların çıkarılmasını içeren filtrelemeler yapıldı. Bu adım aynı zamanda bakteri olmayan veya fungus olmayan dizilerin ve istenen taksonomik seviyede açıklama eklenmemiş dizilerin

filtrelenmesini içermektedir. Bu amaçla FROGS OTU Filtreleri kullanıldı.

Son adım, Frogs Pipeline kullanılarak elde edilen bir referans veritabanına dayalı olarak OTU'lara taksonomik kimlik atamaktır. Bu pipeline, taksonomiye OTU'lara doğru bir şekilde atamak için farklı veritabanlarının ve algoritmaların bir kombinasyonunu kullanmaktadır. Standart BIOM biçiminde bir OTU ve ilişkilendirme tablosu oluşturmak için Silva and Unite veritabanlarına karşı kullanılarak OTU'lar açıklama eklendi. Bu adımın çıktısı, alfa çeşitlilik analizi, fonksiyonel profil oluşturma ve görselleştirme gibi aşağı akış analizi için kullanılabilen OTU'ların ve bunların taksonomik atamalarının bir tablosundan oluşmaktadır.

Galaxy payplayn, operasyonel taksonomik birimlerin (OTU'lar) göreceli bolluğuna dayalı olarak mikrobiyal bir topluluktaki işlevleri ve metabolik yol bolluklarını tahmin etmek için FROGSFUNC aracını kullandı. Bu payplayn, işlevsel tahminler için temel olarak hizmet etmesi için işaretleyici gen dizilerini 16S and ITS referans filogenetik ağacına yerleştiren Gözlemlenmeyen durumların yeniden inşası yoluyla toplulukların filogenetik araştırılmasını (PICRUSt) kullandı.

FROGSFUNC aracı dört ana adımı gerçekleştirdi. İlk olarak placeseqs aracı, işaretleyici gen dizilerini PICRUSt referans ağacına yerleştirdi. Ardından, kopya sayıları aracı, castor-R kullanan gizli durum tahminine dayalı olarak her bir OTU'nun işlev bolluğunu tahmin etti. Üçüncü adım olan işlevler aracı, tahmin edilen işlevleri topluluktaki OTU'ların göreceli bolluğuna göre ağırlıklandırdı. Son olarak, metabolik yollar aracı, işlev sayısı bolluğuna dayalı olarak MetaCyc/KEGG yolu bolluklarını çıkardı.

Bu pipeline, mikrobiyal toplulukların işlevsel profilini, işaretleyici gen dizilerini ve bunların göreceli bolluklarını kullanarak tahmin etmeye yönelik kapsamlı bir yaklaşım sağlamaktadır. Yöntem, metagenomik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmakta ve mikrobiyal topluluklarda mevcut olan potansiyel işlevlerin ve yolların ortaya çıkarılmasına yardımcı olabilmekte, ekolojileri ve potansiyel biyoteknolojik uygulamaları hakkında fikir vermektedir.

3.7.3. İstatistiksel Analiz

Mikrobiyal toplulukların yapısı, bileşimi ve çeşitliliği, FROGSSTAT Phyloseq (Galaxy Sürüm 4.0.1) araçlarında uygulanan PHYLOSEQ R paketi kullanılarak

analiz edildi. Mikrobiyal toplulukların endojen çeşitliliğini değerlendirmek için zenginliği indeksi, Shannon indeksi ve Simpson indeksi dahil olmak üzere alfa çeşitlilik indeksleri kullanıldı. Zenginliği indeksi, mikrobiyal topluluklarda bulunan türlerin sayısına ilişkin bir tahmin sağlarken, Shannon ve Simpson endeksleri, türlerin sayısını ve mikrobiyal topluluklardaki dağılımlarını hesaba katarak, eşdeğerliği veya homojenliği hesaplayarak çeşitliliği ölçmüştür. ggplot2 paketi, en bol bulunan türler için görselleştirmeleri ve filogenetik ağacı oluşturmak için kullanıldı. Başka bir yandan PICRUSt sonuçları STAMP aracı kullanılarak görselleştirildi.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

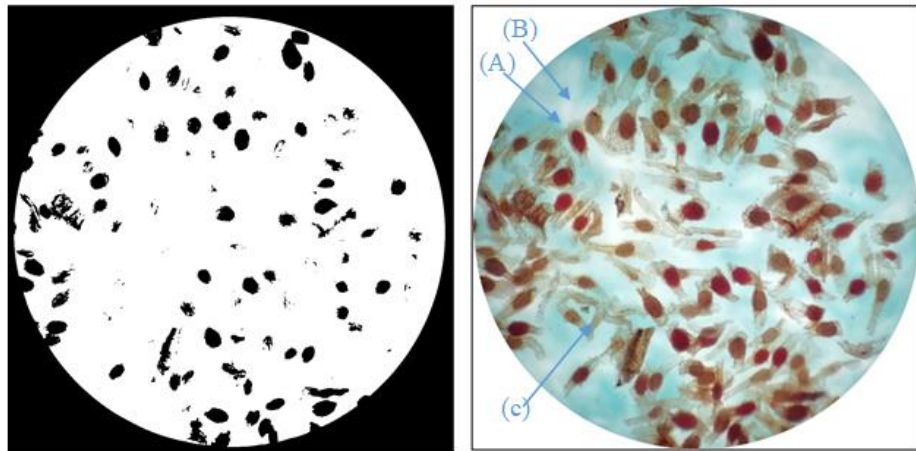
Bu çalışmada, çimlenme ortamına nanopartiküllerin dahil edilmesinin potansiyel faydalarını anlamak amacıyla, küllerinin orkide tohumlarının çimlenme süreci, glikomannan içeriği ve eşlik eden bakteri ve fungal toplulukları üzerine demir nanopartiküllerinin etkisi araştırılmıştır.

Araştırmamızın kritik bir yönü, biyolojik olarak hazırlanmış demir nanopartikülleri ve bunların kimyasal olarak sentezlenmiş benzerleri arasında karşılaştırmalı analizini içermektedir. Karşılaştırmalı yaklaşım, yukarıda belirtilen parametreler üzerindeki etkilerinde fark yaratmaktadır. Böylece orkide tohumu çimlenmesini arttırmada demir nanopartiküllerinin potansiyel uygulamalarının daha derinlemesine anlaşılmasına katkıda bulunacaktır.

Çalışmamıza başlamadan önce, *Anacamptis laxiflora* tohumlarının toplanması sağlanmış ve tohumların canlılığı değerlendirilmiştir.

4.1. Canlılık Testi

Anacamptis laxiflora tohumlarının kalitesi ve canlılığının değerlendirilmesi, araştırma çalışmalarında doğru ve güvenilir sonuçlar elde etmek için çok önemlidir. Bu çalışmada, tohumların bütünlüğünü ve denemeye uygunluğunu sağlamak için tohum toplama ve depolamayı etkileyen faktörlere büyük önem verilmiştir. Tohum canlılığını değerlendirmek için kullanılan yöntemlerden biri, tohumların sağlığı ve canlılığı hakkında değerli bilgiler sağlayan tetrazolyum testidir (Acemi ve Özen, 2019).



Şekil 4.1 TZ ile muamele edilmiş tohumların görüntüsü, (A) canlı tohumlar (kırmızı), (B) canlı olmayan tohumlar (beyaz), (C) embriyosuz tohumlar (yarı saydam).

Anacamptis laxiflora tohumları bir günlük süre boyunca tamamen karanlıkta tetrazolyum solüsyonunda bırakılmıştır. Bu süre sonunda tetrazolyum solüsyonları uzaklaştırılmış ve tohumlar saf su ile 3 kez yıkanmış ve daha sonra stereoskop mikroskobunda incelenmiştir. Tohumların canlılığının değerlendirilmesi, hücresel solunumla tetrazolyumun indirgenmesi nedeniyle kırmızı renklenme (canlı) gösteren tohumların sayılmasına dayanmaktadır. Kırmızı rengin olmaması ve/veya soluk pembe renkler, embriyonun öldüğünü veya canlılığının az olduğunu göstermektedir (Diantina vd, 2023). Morfolojik gözlemlere dayanarak, Şekil 4.1'te gösterildiği gibi tohumların yaklaşık %52'inin canlı olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan tohumların canlılığı, toplanan tohumların kaliteli ve deneylerde kullanılmaya uygun olduğunu göstermiştir.

4.2. Fungusların Tohumlardan İzolasyonu Ve Öncü Tuzların Biyoredüksiyonu

Çalışmamızda, *Anacamptis laxiflora* tohumlarından endofitik funguslar başarıyla izole edilmiştir. İzolasyonlar sonucunda 12 izolat elde edilmiş ve PDA besiyerine saf kültür olarak saklanmıştır. İzole edilen fungusların nanopartiküller üretme yeteneklerini deperlendirmek üzere PDB ortamında geliştirilmişlerdir.

PDB ortamında 12 günlük gelişmenin ardından, öncül tuzların biyolojik olarak indirgenme yeteneklerini test etmek için fungus ekstraktı kullanılmıştır. Fungus izolatları F1, F5, F6 ve F12, öncül tuzların biyoredüksiyonu bakımından pozitif sonuçlar vermiştir. Oda sıcaklığında 30 dakikalık inkübasyon ve çalkalamanın ardından, reaksiyon karışımında Fe NP'lerin oluşumunu gösteren gözle görülür bir renk değişikliği tesbit edilmiştir (Şekil 4.2). Öncül tuz kompleksini indirgeme potansiyeli en yüksek olan fungus izolatları, moleküler tanımlama için seçilmiştir.

Önceki çalışmalara göre, bir karışımın renginin siyaha dönüşmesi, fungusların sentezlediği Fe NP'lerin oluşumunun ön kanıtı olabilir (Priya vd, 2021). Örneğin, bir reaksiyon karışımına (F^{+2}, F^{+3}) fungus ekstaktı filtratının eklenmesi, açık soluk sarıdan siyahımsı kahverengiye bir renk değişimiyle sonuçlanmıştır, bu da Fe NP'lerin oluşumunu göstermiştir (Adeleye vd, 2020). Başka bir çalışmada, dört *Rhizopus stolonifer* izolatı, başlangıçtaki kahverengi renkten, Fe NP'lerin üretimini gösteren siyah bir renge doğru bir renk değişimi ile gösterilen pozitif sonuçlar vermiştir (Adeleye vd, 2020).

Ancak bu değişikliğin tek başına kesin bir doğrulama teşkil etmediğini vurgulamak önemlidir. Daha kapsamlı analiz ve titiz karakterizasyon, Fe NP'lerin kesin varlığını belirlemek için temel ön koşullardır (Saif vd, 2016).



Şekil 4.2 Öncül tuzların biyoredüksiyonunun sonuçları. Pozitif reaksiyon gösteren funguslar koyu renkte gözükmemektedir

Tablo 4.1 Öncül tuzların biyoredüksiyonuyla ilgili sonuçlar. Olumlu sonuç veren funguslar + olarak gösterilmiştir

F12	F11	F10	F9	F8	F7	F6	F5	F4	F3	F2	F1	C
+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-

Literatür incelendiğinde benzer çalışmalar olduğu görölmektedir. Örneğin Mahanty vd (2019), Hindistan'daki Sundarban mangrov ekosisteminden izole ettikleri ipliksi fungusların Fe NP'lerini sentezleme yeteneğini araştırmıştır. Bu çalışmada, test edilen 18 fungal izolattan 5'inin nanopartikülleri sentezleyebildiği tesbit edilmiştir. Rai vd (2023) ise, altı farklı fungus türünün altın nanopartiküllerini sentezleme yeteneklerini araştırmıştır. Araştırmacılar, nanopartiküllerin sentezinin, öncü tuzların konsantrasyonuna ve reaksiyon karışımının pH'sına ve ayrıca spesifik fungal türlerine bağlı olduğunu bulmuşlardır.

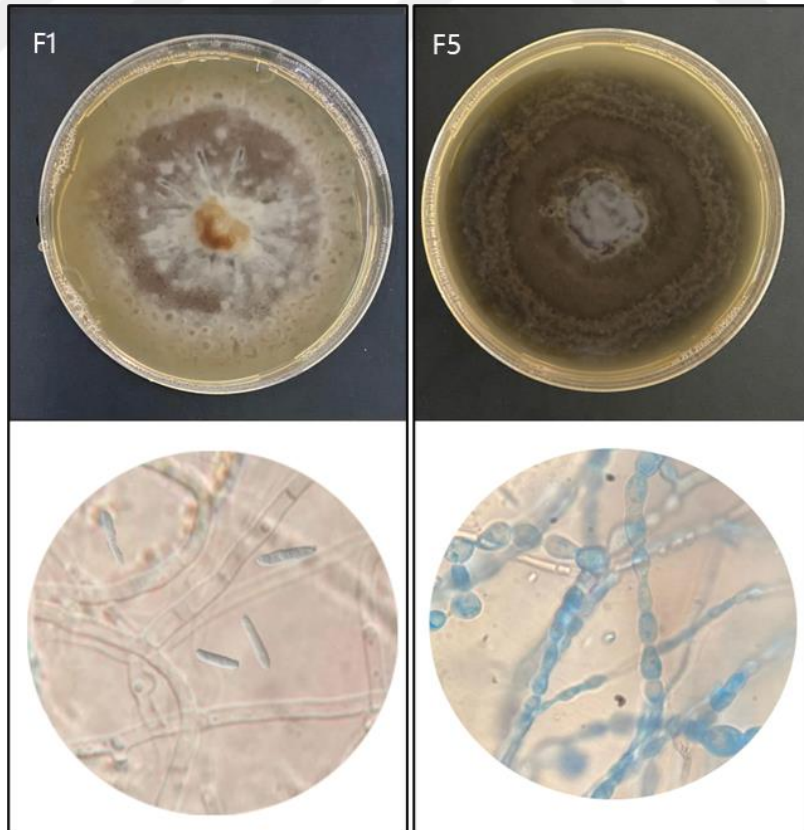
4.3. Fungusların Moleküler Teşhisi

4.3.1. Kùltürlerin Morfolojik Özellikleri

Nanopartikùl sentezi yeteneklerini gösteren dört fungal izolat tesbit edilmiş ve bu izolatlar geleneksel ve moleküler yöntemlerle karakterize edilmişlerdir. Karakterizasyonlar sonucunda bu 4 izolat *Dactylonectria torresensis* (F1), *Fusarium tricinctum* (F6), *Alternaria alternata* (F5) ve *Alternaria tenuissima* (F12)) olarak ilişkilendirilmişlerdir. Söz konusu izolatların morfolojik özelliklerini aşağıdaki şekilde değerlendirilmiştir.

Dactylonectria torresensis (F1): PDA plakalarında beyaz veya soluk koloniler halinde gelişen bu izolatın 1-3 bölmeli, bazen 4 bölmeye ulaşan makrokonidialara sahip olduğu bulunmuştur. Çalışmamızdaki *Dactylonectria torresensis*'in morfolojik özelliklerinin, Weber ve Entrop'un (2017) çalışmasında belgelenen bulgularla güçlü bir uyum içinde olduğu görülmüştür(Şekil 4.3).

Castañares vd (2011) çalışmasında, *Fusarium tricinctum* PDA besiyerinde yetiştirildiğinde hızlı bir miselyum büyümesi sergilediğı, yaşlandıkça yavaş yavaş

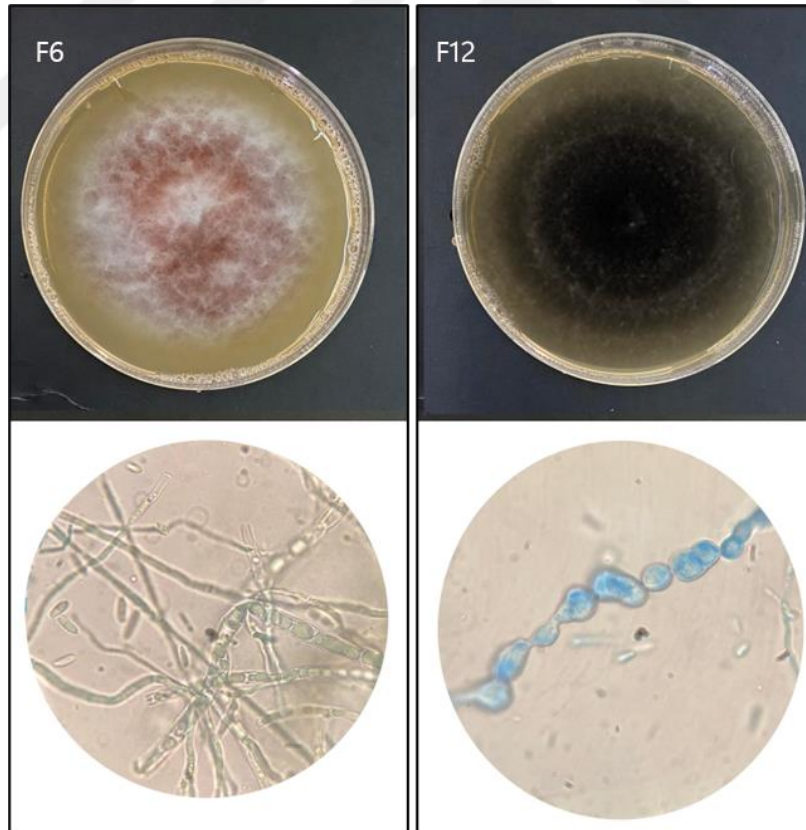


Şekil 4.3 F1 ve F5 nolu fungal izolatların morfolojik özellikleri

pembe bir renk tonuna dönüştüğü ve sonuçta kültür içinde kırmızı pigmentlerin oluştuğu gözlemlenmiştir. Ek olarak, fungusun mikrokonidilerinin bol miktarda olduğu, napiform, oval veya piriform şekiller aldığı ve septumsuz ya da bir septumlu olduğu bulunmuştur.

Dikkat çekici bir şekilde, F6 başlangıçta beyaz görünen koloni rengi, PDA plakalarında 7 günlük inkübasyondan sonra pembe renge dönüşerek tamamen aynı özellikleri sergilemiştir (Şekil 4.4).

Alternaria alternata F5 izolatları, oldukça farklı, dikkat çekici ve hızlı büyüme modelleri göstermiştir. Gelişmesi sırasında bu izolatlar, siyah-zeytin renginden siyah ve gri tonlarına kadar değişen benzersiz bir renk sergileyen koloniler oluşturmuştur. Ayrıca F5 izolatlarının dikkate değer bir özelliği, dallanma sergileyen konidial zincirler oluşturma yetenekleridir. Bu özellik, *Alternaria alternata*'nın tanımlayıcı özellikleriyle (Belisario vd, 2004) uyumlu olduğundan, bu türün tanımlanmasında ve sınıflandırılmasında önemlidir.



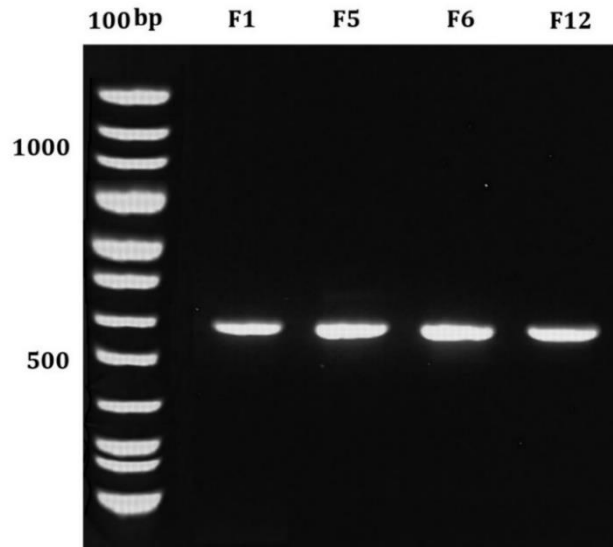
Şekil 4.4 F6 ve F12 nolu fungal izolatların morfolojik özellikleri

Benzer şekilde, *Alternaria tenuissima* F12 izolatu, Şekil 5' de gösterildiği gibi, F5 izolatıyla bazı ilgi çekici benzerlikleri paylaşmaktadır. Bu izolat da güçlü bir büyüme sergilemiş olup *Alternaria* türlerinin karakteristik özelliği olan çarpıcı siyah-zeytin ile siyah ve grimsi renkleri göstermiştir.

4.3.2. DNA İzolasyonu ve PCR İşlemi

Nanopartiküller üretebilen fungus türlerinin ilişkili olduğu türleri belirlemek amacıyla moleküler karakterizasyon yaklaşımından da yararlanılmıştır. CTAB yöntemi, nanopartiküller üretimi için pozitif sonuçlar sergileyen endofitik funguslardan DNA ekstrete etmek için kullanılmıştır. DNA izolatlarının amplifikasyonu, rDNA ITS bölgesini hedef alan ITS5 ve ITS4 primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Ortaya çıkan amplifikasyon ürünleri, 100 bp'lik bir DNA markörünün yanında bir agaroz jel üzerinde elektroforez ile görüntülenmiştir. Şekil 4.5, 650-800 baz çifti arasındaki PCR ürünlerini göstermektedir.



Şekil 4.5 İzolatlara ait rDNA ITS PCR ürünleri

Dizi bilgisi elde etmek üzere, PCR ürünleri dizileme için MacroGen'e gönderilmiş ve dizileme yapıldıktan sonra farklı dosya formatlarındaki ham dizi verileri tarafımıza gönderilmiştir. İki yönlü olarak dizilenmiş olan Ribozomal DNA'nın (rDNA) ITS bölgesinin, BioEdit yazılımı kullanılarak konsensus dizileri elde edilmiştir.

İzolatların taksonomik durumlarını değerlendirmek ve ilişkili olduğu taksonlar hakkında bilgi edinmek üzere BLAST analizi yapılmıştır. Bu analiz, izolatlarımızın ITS1-5.8S-ITS2 dizilerinin GenBank veri tabanında bulunan benzer dizilerle karşılaştırmasını içermektedir. Blast analizi sonucunda, izolatlarımız ve GenBank veri tabanında bulunan diziler arasında %98 ila %100 arasında değişen yüksek derecede benzerlik tesbit edilmiştir.

Blast analiz sonucunda (Tablo 4.2), dört izolatın (F1, F5, F6 ve F12) sırasıyla *Dactylonectria torresensis*, *Alternaria alternata*, *Fusarium tricinctum* ve *Alternaria tenuissima* ile benzerlik gösterdiği tesbit edilmiştir.

Tablo 4.2 Nanopartiküller sentezleyebileme özelliğine sahip fungusların rDNA-ITS dizilerinin GenBank'ta bulunan rDNA-ITS dizileri ile benzerlik yüzdeleri

Nanopartikül sentezlenebilen fungusları	Endofitik fungusların tür isimleri	GenBank No	BLAST % benzerlik değerleri
F1	<i>Dactylonectria torresensis</i>	MN817697	100%
F5	<i>Alternaria alternata</i>	MT446176	100%
F6	<i>Fusarium tricinctum</i>	MG274297	99%
F12	<i>Alternaria tenuissima</i>	ON074984	98%

4.3.3. Filogenetik Analizler

Nanopartiküllerin üretilmesi bağlamında, genetik benzerlikleri paylaştan ve bu nedenle benzer özellik ve davranışlara sahip olabilecek yakından ilişkili türleri tanımlamak üzere filogenetik ağaçlar kullanılabilir.

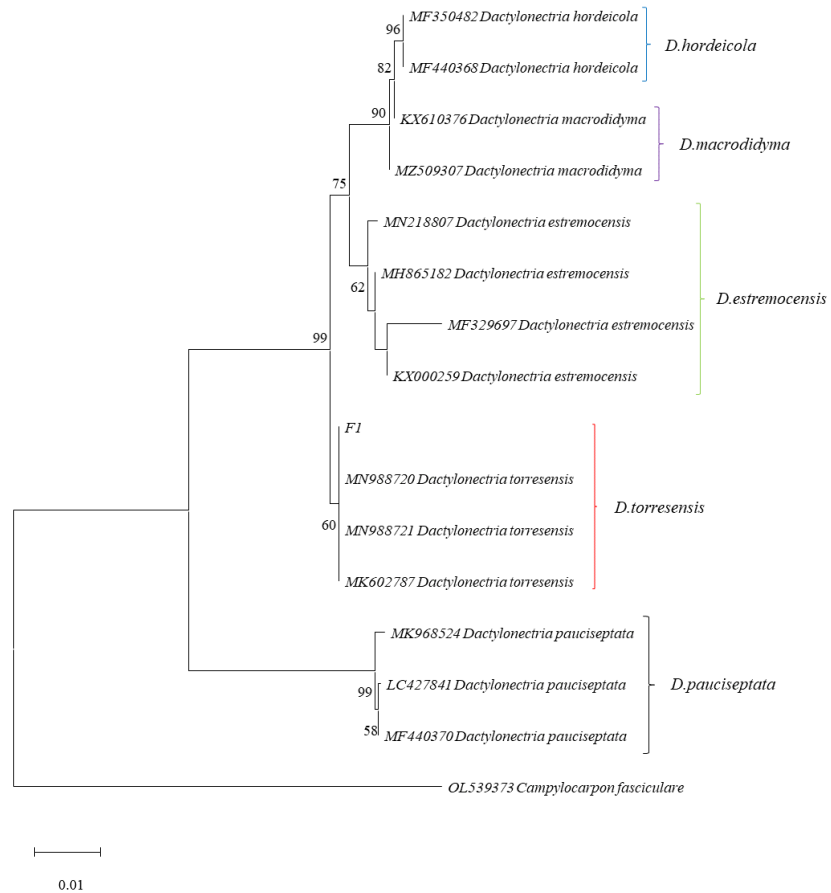
Çalışmamızda F1, F5, F6 ve F12 türlerinin nanopartiküller üretebildiği görülmüştür. Bu türler ve ilişkili oldukları diğer organizmalar arasındaki evrimsel ilişkileri inceleyerek, bu yeteneğe sahip olabilecek diğer yakın akraba türleri de belirleyebiliriz. Bu, potansiyel olarak hangi organizmaların nanopartikül üretebildiğine dair bilgimizi genişletebilir ve onları üretmenin yeni yollarının keşfedilmesine yol açabilir.

Filogenetik analizler için bir veri seti hazırlamak amacıyla, nanopartiküller sentezi için seçilen 4 izolata yakın benzerliği olan NCBI veri tabanından ITS

rDNA gen dizilerini belirlenmiş ve bu dizilerle birlikte veri setleri oluşturulduktan sonra dizileri hizalamak için ClustalX kullanılmıştır. İzolatlar arasındaki filogenetik ilişkileri araştırmak amacıyla, MEGA 6.06 programında Neighbour-Joining algoritması ve Jukes and Cantor (JC) ve Kimura 2-parametre modelleri kullanarak filogenetik ağaçlar üretilmiştir. Ağaçların istatistiksel güvenilirliğini değerlendirmek için 10000 tekrarlı bootstrap analizleri yapılmış ve ağaçlarda 50'nin üzerindeki değerler ağaçlarda kullanılmıştır.

4.3.3.1. *Dactylonectria torresensis*

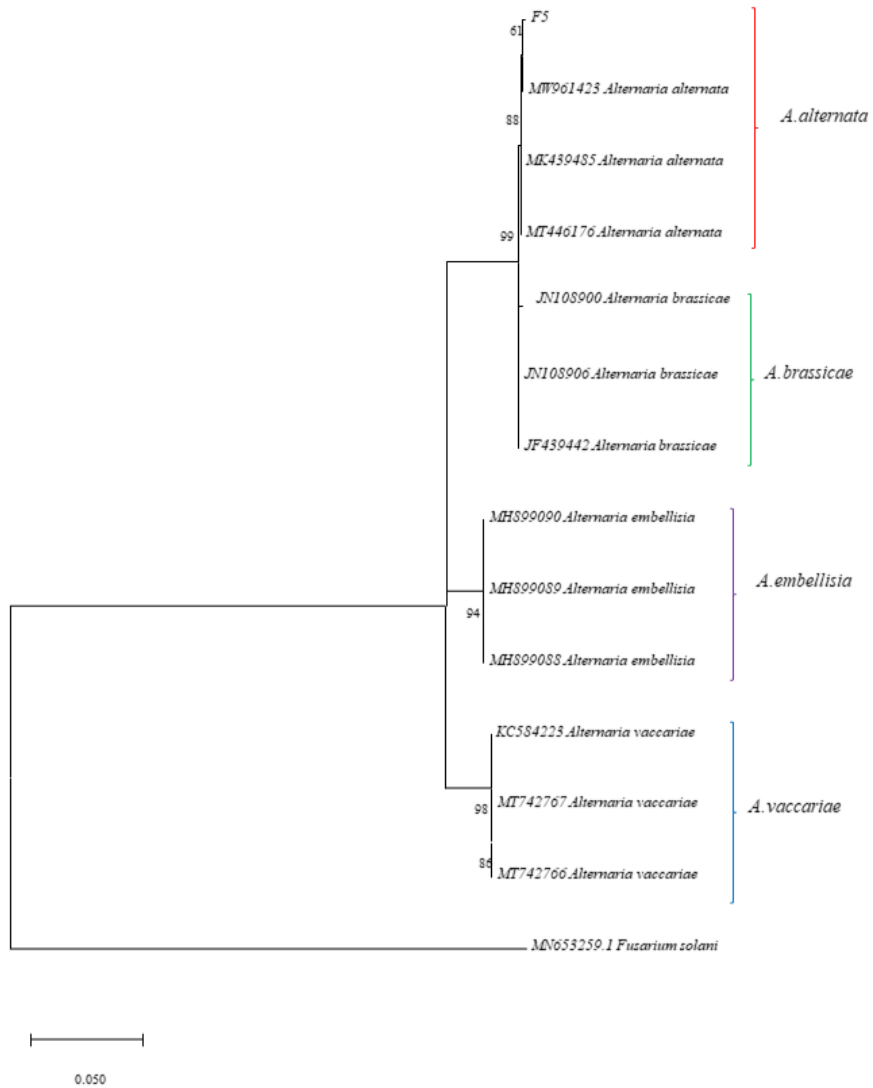
Şekil 4.6 'daki filogenetik ağaç incelendiğinde, F1 izolatı *Dactylonectria torresensis* ilişkili olduğu bulunmuştur. *Fusarium solani* ağacı köklendirmek üzere kullanılmıştır.



Şekil 4.6 *Dactylonectria torresensis* türünün ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç

4.3.3.2. *Alternaria alternata*

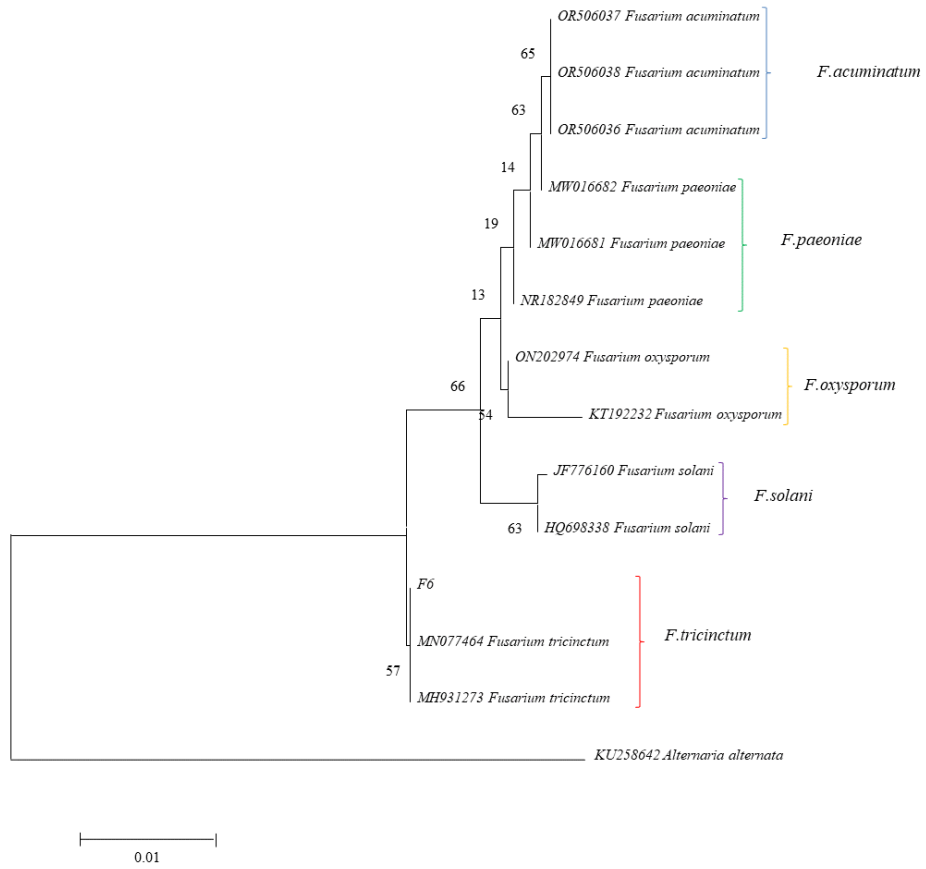
Şekil 4.7'de F5 izolatu, % 79 gibi bir bootstrep değeriyle genetik olarak MW961423 *Alternaria alternata* ile ilişkili bulunmuştur. Bu ilişkileri ortaya çıkarmak üzere, bu filogenetik analizde de *Fusarium solani* MN653259 outgrup olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.7 *Alternaria alternata* türünün ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç

4.3.3.3. *Fusarium tricinctum*

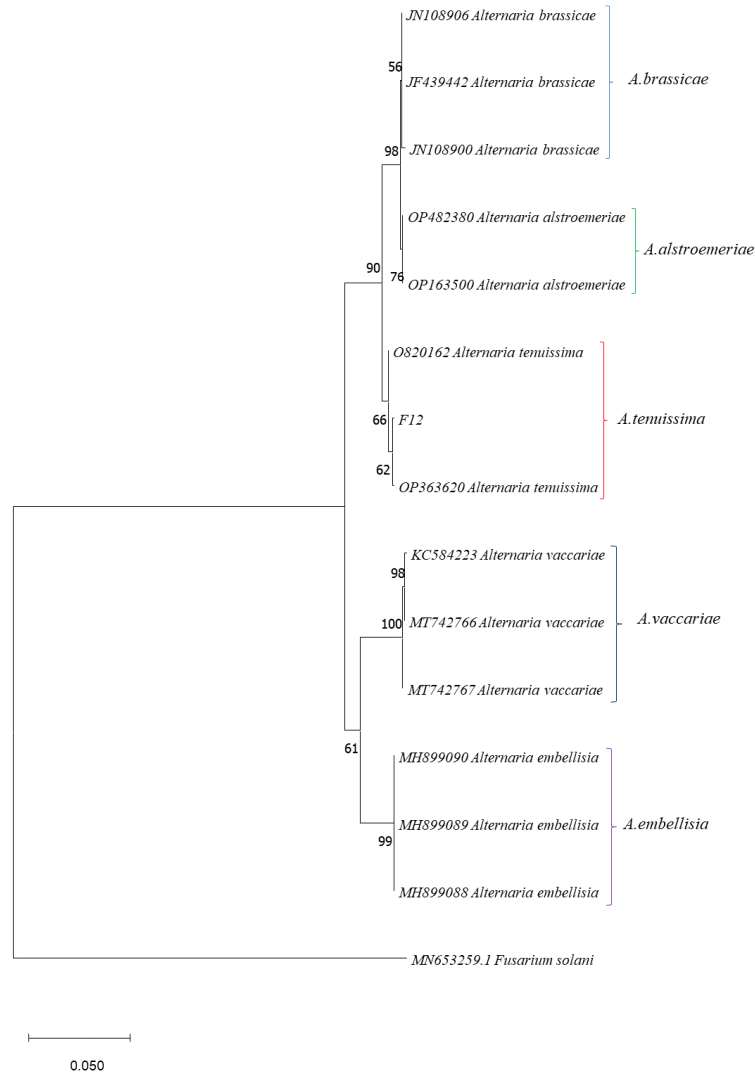
Şekil 4.8'teki filogenetik ağaç incelendiğinde, F6 nolu izolatin *Fusarium tricinctum* MN077464 ile yakından ilişkili olduğu görülmüştür. Bu filogenetik ağacı oluştururken, ağacı köklendirmek için KU258642 *Alternaria alternata* kullanılmıştır.



Şekil 4.8 *Fusarium tricinctum* cinslerinin genetik bağlantısını gösteren filogenetik ağaç

4.3.3.4. *Alternaria tenuissima*

F12 nolu izolatımızın filogenetik ilişkilerini belirlemek üzere oluşturulan ağaçta (Şekil 4.9), F12 nolu izolatımızın *Alternaria tenuissima* OP363620 ile ilişkili olduğu görülmüştür. Bu filogenetik analizde de *Fusarium solani* MN653259 outgrup olarak kullanılmıştır.

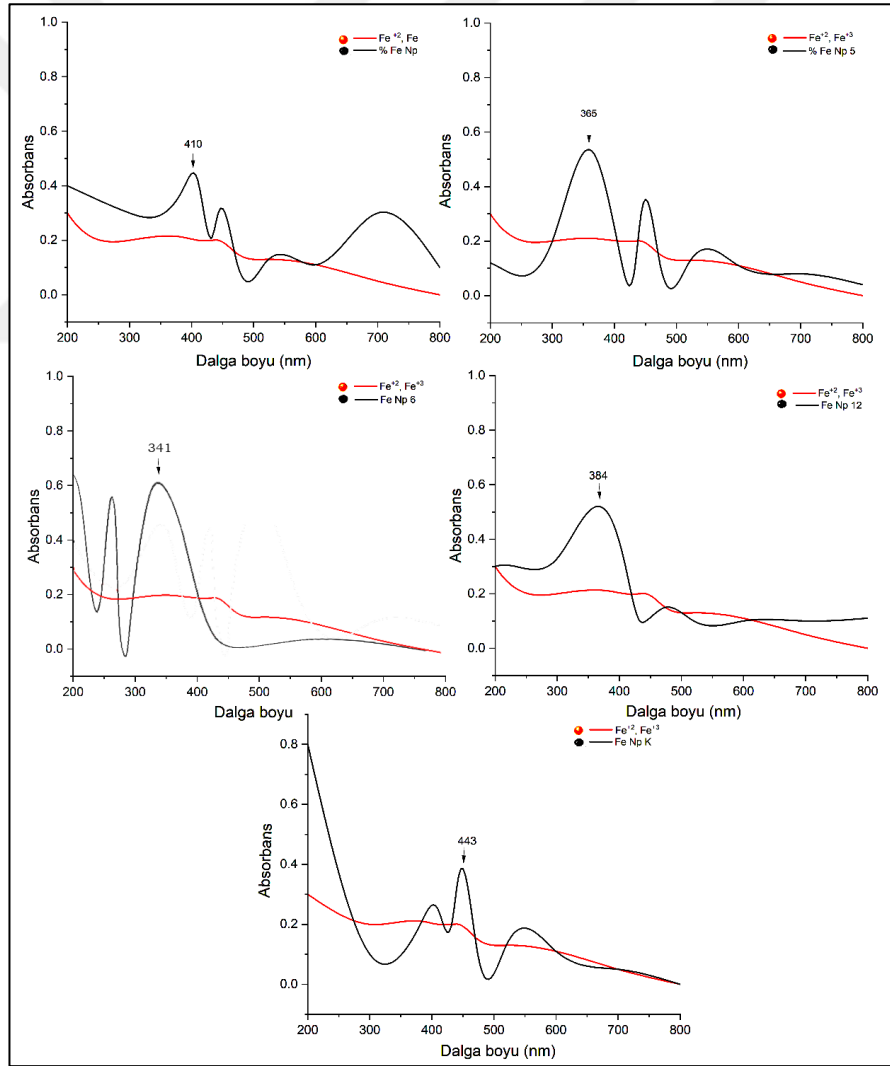


Şekil 4.9 *Alternaria tenuissima* türüne ait ilişkileri gösteren filogenetik ağaç

4.4. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.4.1. UV-vis spektroskopisi

Sentezlenen Fe NP'lerinin UV-vis spektroskopisi analizi, her numune için farklı absorpsiyon zirvesini ortaya çıkararak boyutları ve morfolojilerindeki farklılıkları göstermektedir. Fungus izolatları *Dactylonectria torresensis* (Fe BNP1'ler), *Alternaria alternata* (Fe BNP5'ler), *Fusarium tricinctum* (Fe BNP6'ler), ve *Alternaria tenuissima* (Fe BNP12'ler) kullanılarak üretilen nanopartiküller, sırasıyla 410 nm, 364 nm, 341 nm ve 384 nm dalga boylarında absorpsiyon tepe noktalarını, buna karşın kimyasal bir yöntem kullanılarak sentezlenen numune (Fe KNP'ler), 443 nm'de tek bir absorpsiyon zirvesi göstermiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Demir oksit nanopartiküllerinin UV-Vis analizi ve absorpsiyon eğrileri

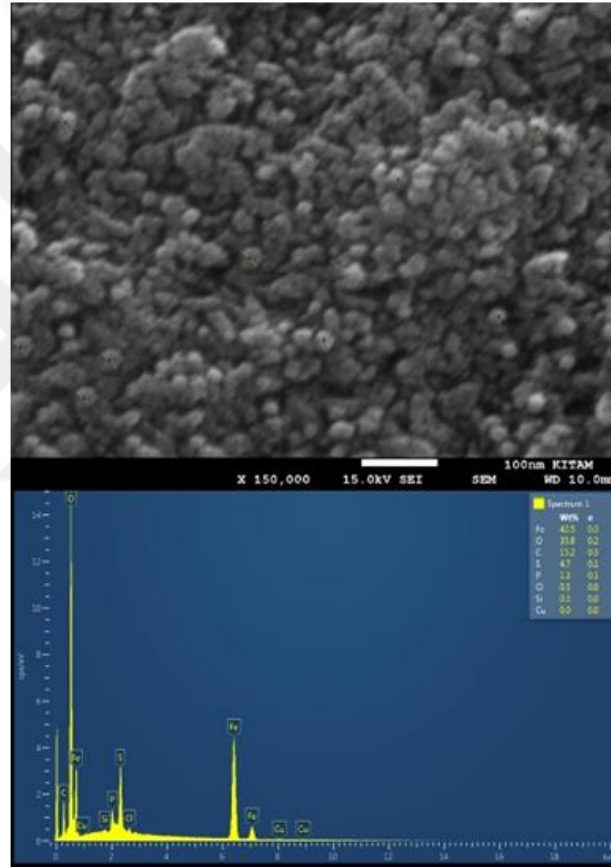
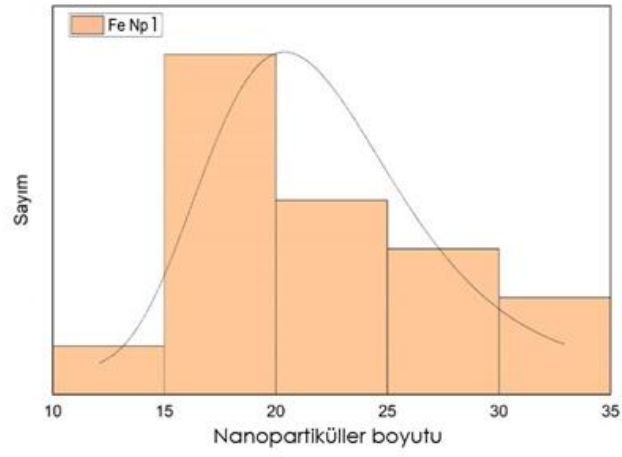
Sonuçta, UV-vis spektroskopisi incelemesinde 300-500 nm aralığında absorpsiyon tepe noktalarının ortaya çıkması, tüm numunelerde nanopartiküllerin oluşumunu göstermiştir. 300-500 nm aralığındaki UV-Vis spektrumu, Fe NP'lerin oluşumunu göstermektedir (Devatha vd, 2016). Örneğin, *Acacia nilotica* (Arap sakızı) ekstraktı kullanılarak Fe NP'lerin yeşil sentezi üzerine yapılan bir çalışmada, 450-550 nm aralığında UV absorpsiyonu Fe NP oluşumu doğrulanmıştır (Da'na vd, 2018). Fe₃O₄ nanopartiküllerinin fitokimyasal destekli sentezi üzerine yapılan bir başka çalışmada ise, 300-500 nm'de sürekli emilim göstererek Fe₃O₄ NP'lerin oluştuğu ifade edilmiştir (Khatun vd, 2022). Benzer şekilde, *Thymus vulgaris* L. tarafından üretilen biyosentezlenmiş Fe NP'lerin, yaklaşık 300-500 nm aralığında bir SPR tepe noktası göstermiştir (Yehia ve Ali, 2020). İstenilen aralıkta absorpsiyon tepe noktalarının varlığı, başarılı nanopartikül sentezinin bir göstergesi olarak hizmet edebilmekte ve SEM gibi tamamlayıcı karakterizasyon teknikleri ile doğrulanabilmektedir.

4.4.2. SEM

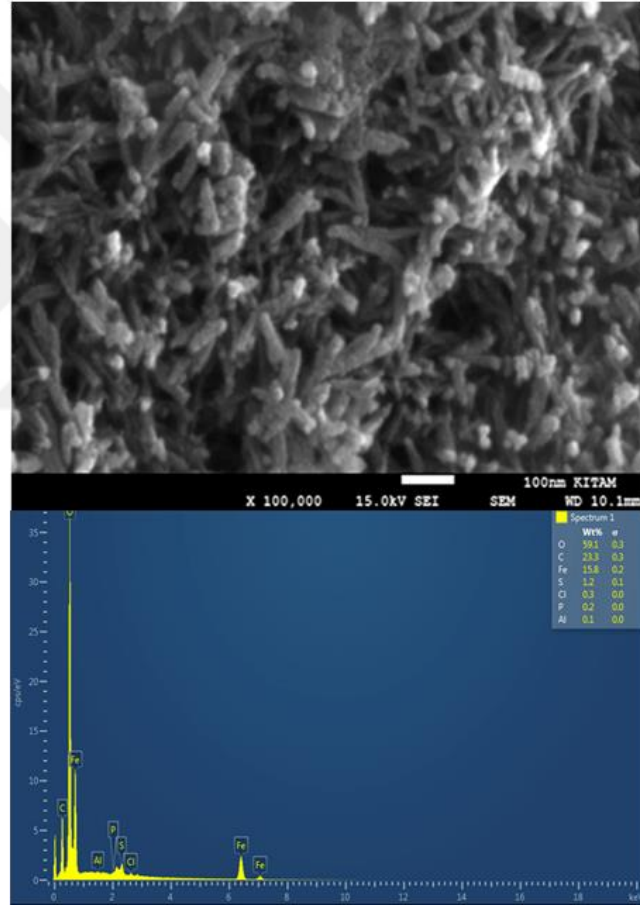
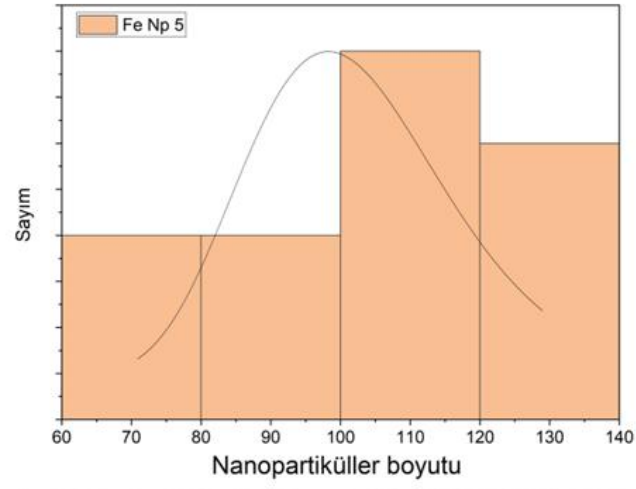
Dactylonectria torresensis 'den sentezlenen Fe BNP1'ler , SEM ve EDS analizi kullanılarak karakterize edilmiştir. SEM görüntüsü (Şekil (4.11) nanopartiküllerin, 15 K'da 15 ila 35 nm arasında değişen parçacık boyutuna sahip küresel bir morfolojiye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Nanopartiküllerin elementel bileşimini belirlemek için EDS analizi yapılmıştır. Fe, O, C ve S'nin ağırlık yüzdeleri sırasıyla %42,5, %25,2, %15,2 ve %4,7 olarak bulunmuştur.

Fe'nin varlığı, demir bazlı parçacıkların oluşumunu gösterirken, O'nun varlığı, oluşan Fe NP'lerle hava ve suyun reaksiyonu nedeniyle Fe NP'leri oluşumunun meydana geldiğini düşündürmektedir.

Alternaria alternata ekstraktından sentezlenen Fe BNP5'lerin SEM görüntüsü (Şekil 4.12), 100.000 kat büyütmede 70 ila 20 nm arasında (Tablo 4.3) değişen parçacık boyutu ayrıca NP'lerin amorf bir şekle sahip olduğunu göstermiştir.

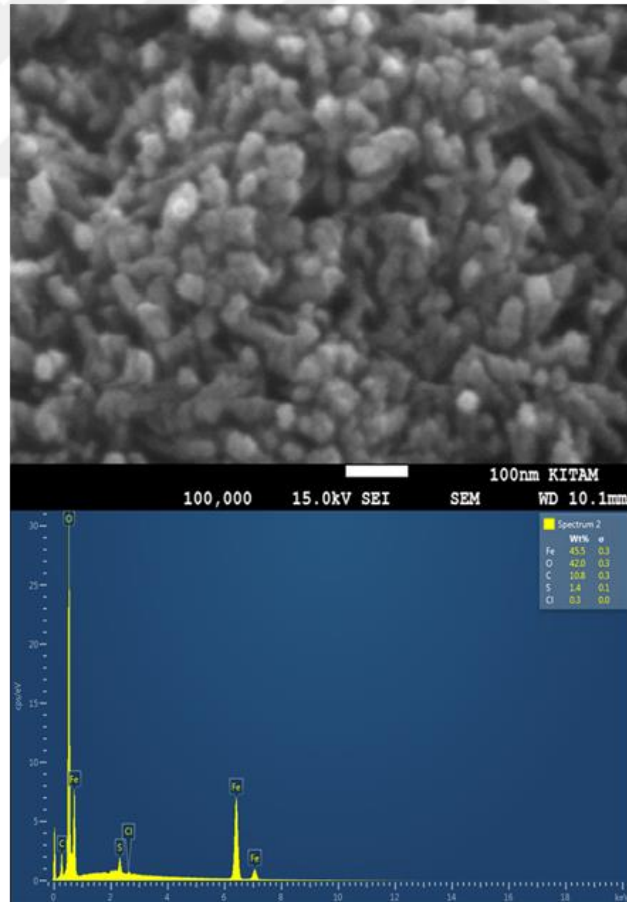
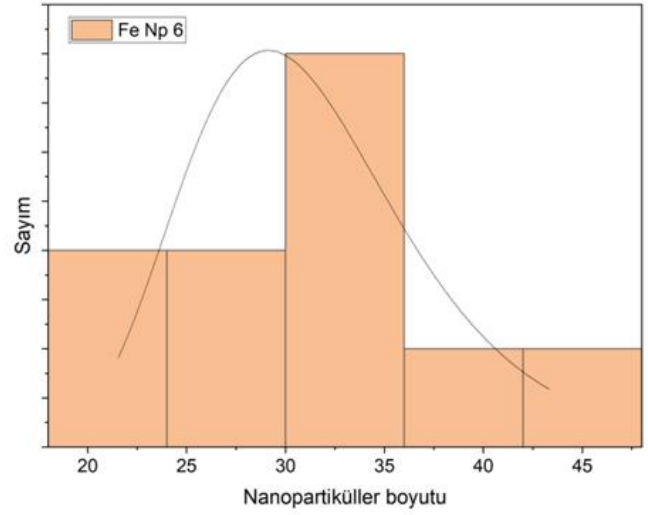


Şekil 4.11 Fe BNP1'lerin SEM Mikrografları ve EDX spektrumları.



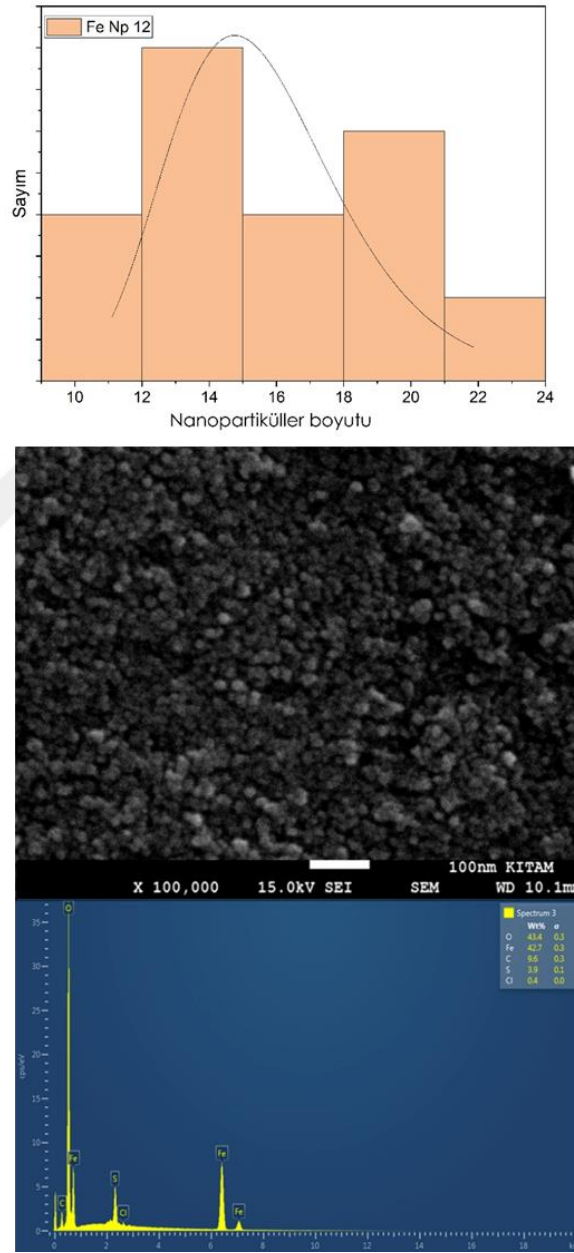
Şekil 4.12 Fe BNP5'lerin SEM Mikrografları ve EDX spektrumları.

Fusarium tricinctum ekstraktından sentezlenen Fe BNP6'lerinin SEM görüntüsünde 100.000 kat büyütmede 25 ila 40 nm arasında değişen bir parçacık boyutuna sahip olduğu ortaya koymuştur(Şekil 4.13).

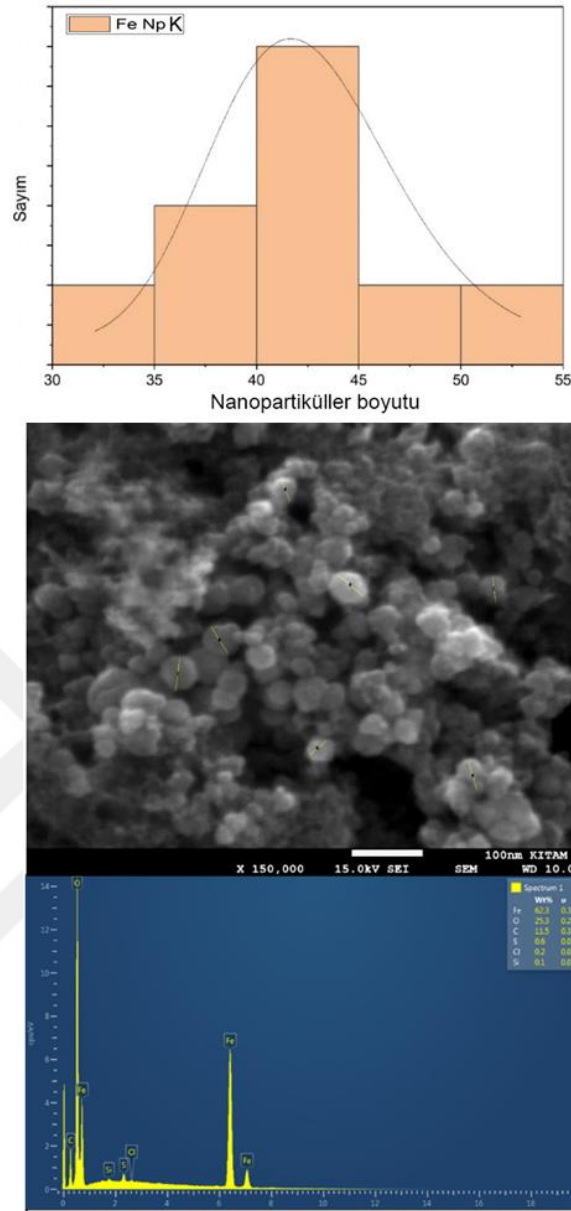


Şekil 4.13 Fe BNP6'lerin SEM Mikrografları ve EDX spektrumları.

Alternaria tenuissima ekstraktından sentezlenen Fe BNP12'lerinin SEM kullanılarak incelenmiş ve 100.000 kat büyütmede 12 ila 22 nm arasında değişen bir parçacık boyutuna sahip olduğu belirlenmiştir. Nanopartiküller küresel bir morfoloji sergilemiştir. İlginç bir şekilde, bu numunedeki nanopartiküllerin boyutu, diğer fungus özlerinden sentezlenen nanopartiküllere kıyasla daha küçüktür. EDS sonuçları (Şekil 4.14), nanopartiküllerdeki O, Fe, C ve S ağırlık yüzdelерinin sırasıyla %43,4, %42,7, %9,6 ve %3,9 olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.14 Fe BNP5'lerin SEM Mikrografları ve EDS spektrumları.



Şekil 4.15 Fe KNP'lerin SEM Mikrografları ve EDX spektrumları.

Fe KNP'leri kimyasal yöntemler kullanılarak sentezlenmiştir. Örnekleri analiz etmek için SEM kullanılmış ve 150.000 kat büyütme ile bakıldığında parçacık boyutu dağılımının 35 ila 50 nm arasında değiştiği ortaya çıkmıştır. Nanopartiküllerin, düzgün ve iyi tanımlanmış bir yapıya işaret eden küresel morfoloji sahip olduğu ortaya koyulmuştur (Şekil 4.15).

Nanopartiküllerin elemental analizi için EDS kullanılmıştır. Sonuçlar, nanopartiküllerin bileşiminin %62.3(Fe), %25.3 (O), %11.5 (C) ve %0.6 (S)'den oluştuğunu göstermiştir.

Tablo 4.3 Numunelerin nanopartikül boyutu

Nanopartikül Tipi	Boyut Aralığı (nm)
FeBNp1'ler	15 – 35
FeBNP5'ler	20 – 70
FeBNP6'ler'ler	25 – 40
FeBNp12'ler	12 – 22
Fe KNP'ler	35 – 55

Bu boyutların tümü (Tablo 4.3), tipik olarak 1 ila 100 nanometre arasında bir boyuta sahip parçacıkları ifade eden nano ölçekli aralık içerisinde (Guo vd, 2023).

Dactylonectria torresensis kullanılarak Fe NP'leri sentezine ilişkin mevcut literatürde herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Ancak çalışmamızda, (F1) türün Fe NP'lerin etkili bir şekilde sentezi konusunda dikkate değer bir kapasiteye sahip olduğunu gösterilmiştir. Bu sonuç, *Dactylonectria torresensis*'in nanoteknoloji alanında önemli olan nanopartiküllerin sentez ve uygulamalarında değerli olabilecektir.

Mohamed vd (2015) çalışmasında, *Alternaria alternata*'nın Fe NP'leri üretebildiği gösterilmiş olup, bu sonuç ilgili fungusun Fe NP'leri oluşturma yeteneğini doğrulayan bulgularımızla uygunluk göstermektedir.

Aslında funguslar arasında, çok sayıda çalışmanın yapıldığı (Rai vd (2021); (Win vd, 2021), *Fusarium tricinctum* nanopartiküllerin sentezinde önemli bir rol oynamakta olup bu tür çeşitli nanopartikül sentez yeteneğinin olduğu nanofabrika olarak düşünülebilir. Belirtilen sonuçlar, Şekil 4.12 ve Tablo 4.3'te gösterildiği gibi *Fusarium tricinctum*'un nano-demir nanopartikül üretme yeteneğini gösteren çalışmamıza benzerlik göstermektedir.

Birçok çalışmada, *Alternaria tenuissima* çinko oksit nanopartikülleri ve gibi diğer nanopartikül türlerini sentezlesinde rol onamıştır (Abdelhakim vd, 2020; Anwar vd, 2022). Ancak bu organizma ile Fe NP'lerin sentezi ve kullanımına dair herhangi bir rapor bulunmamaktadır. Çalışmamızda ise bu fungusların Fe NP'lerin sentez ve farklı amaçlarla kullanımları konusunda ilk verileri ortaya koymuştur.

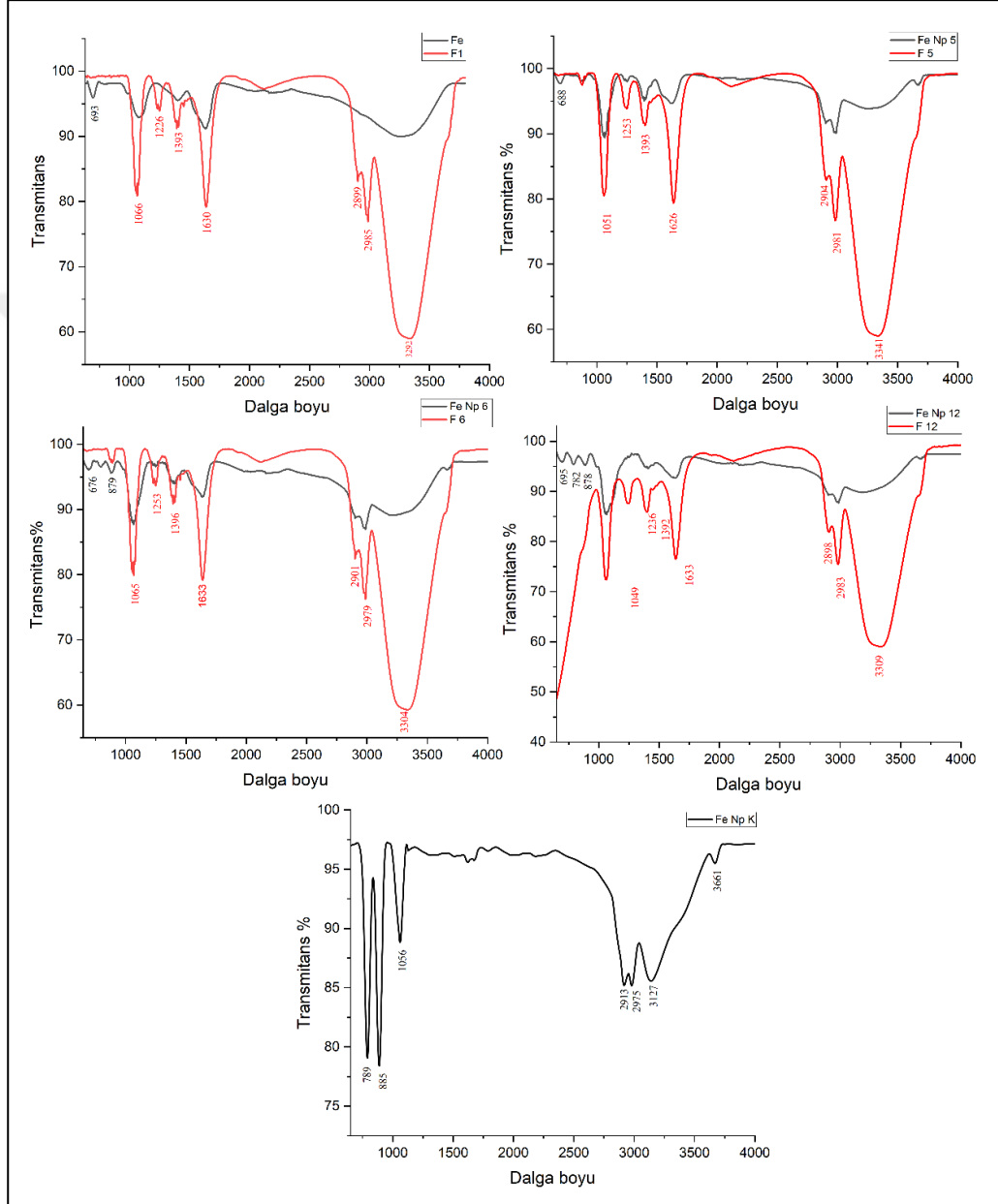
4.4.3. FTIR

Kimyasal bileşimleri ve yapıları hakkında fikir edinmek amacıyla biyolojik ve kimyasal olarak sentezlenmiş Fe NP'lerini analiz etmek üzere FTIR analizi kullanılmıştır. Analiz, her numune için belirli sayıda dalga ile belirli kimyasal işlevsel grupların varlığını gösteren birkaç absorpsiyon bandını ortaya çıkarmıştır (Şekil 4.16).

FTIR spektrum analizi, Fe BNP1'leri , Fe BNP5'leri, Fe BNP6'leri ve Fe BNP12'leri üzerinde gerçekleştirilerek yüzey bileşimlerine ilişkin önemli bilgiler ortaya koymuştur. Analiz edilen tüm nanopartiküllerde (Fe BNP1'lerinde 693 cm^{-1} , Fe BNP5'lerinde 688 cm^{-1} , Fe BNP6'lerinde 676 cm^{-1} ve Fe BNP12'lerinde 696 cm^{-1}) Fe-O esneme titreşim zirvesinin varlığı, yüzeylerinde demirin varlığını doğrulamıştır. Bu sonuçlar, Fe_2O_3 veya Fe_3O_4 gibi nanopartiküller boyunca tutarlı bir şekilde demir oksit bileşiklerinin oluştuğunu işaret etmektedir (Lesiak vd, 2019). Ek olarak, proteinlerin sentez sürecine katılımı, Fe BNP1'lerinde 1393 cm^{-1} , Fe BNP5'lerinde 1393 cm^{-1} , Fe BNP6'leride 1396 cm^{-1} ve Fe BNP12'lerinde 1392 cm^{-1} 'de gözlenen C=C'ün absorpsiyon bantları ile doğrulanmıştır (Ryu vd, 2022). Bununla birlikte, Fe BNP12'lerinde, nanopartiküller yüzeyleri üzerinde fonksiyonel grupların ve organik bileşiklerin varlığı, gözlemlenen ilgili piklerden açıkça görülmüştür. Fe BNP1'lerinde 1226 cm^{-1} 'deki C-O germe titreşim tepe noktaları ve Fe BNP12'lerinde 1633 cm^{-1} 'deki karbonil grup tepe noktaları, sentez sırasında veya yüzey değiştiriciler olarak C-O ve karbonil grupları içeren bileşiklerin dahil edildiğini düşündürmektedir. Ayrıca, Fe BNP5'lerinde (2904 cm^{-1} ve 2981 cm^{-1}), Fe BNP6'lerinde 2901 ve BNP12'lerinde ve 2979 cm^{-1} 'de gözlenen alkanların ve alkenlerin C-H gerilme titreşimleri, bu nanopartiküllerin yüzeylerinde organik bileşiklerin varlığını göstermiştir (Spectroscopy, 2013)

Fe KNP'lerinin yüzeylerinin kızılötesi spektrum analizi, numunede bulunan fonksiyonel gruplara atfedilebilecek birkaç absorpsiyon bandı ortaya çıkarmıştır.

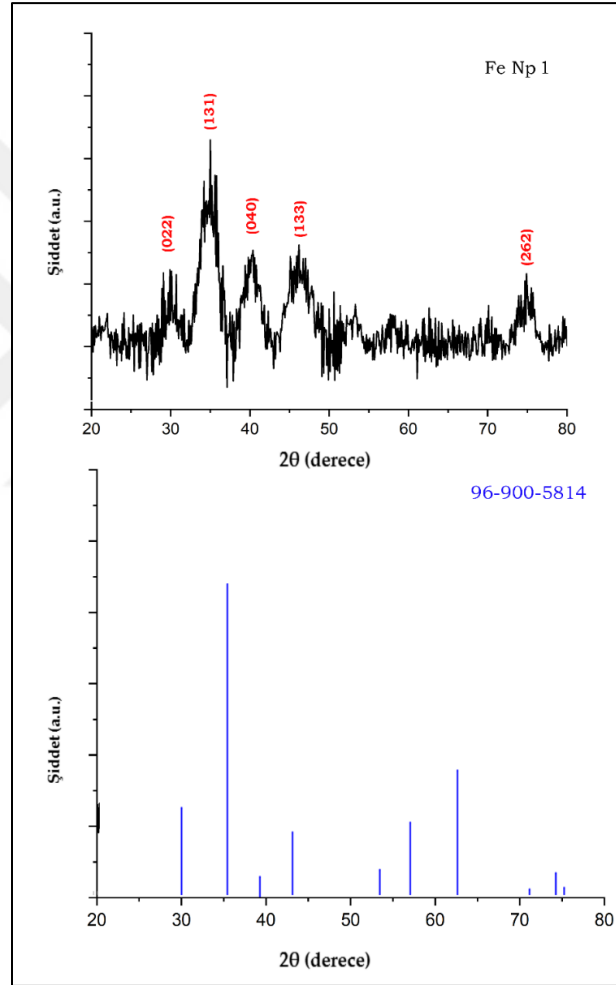
Spesifik olarak, 789 cm^{-1} ve 885 cm^{-1} 'deki absorpsiyon bantları, metal oksit bileşiklerinin, özellikle demir oksitin Fe-O varlığını göstermiştir. 885 cm^{-1} 'deki bant, Fe-O bükülme moduna dayalı olarak demir oksidin varlığını daha da doğrulamıştır (Lesiak vd, 2019).



Şekil 4.16 Fe BNp1, Fe BNp5, Fe BNp6 ,Fe BNp12'ler ve Fe KNP'lerin FTIR spektrumu

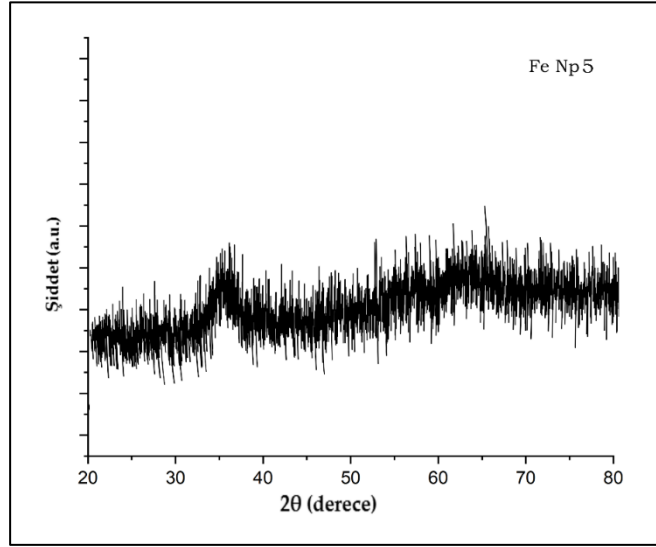
4.4.4. XRD

Şekil 4.17'de gösterilen Fe Np1'in XRD şablonu, farklı hkl değerlerine sahip (002), (131), (040), (133) ve (262) gibi birkaç farklı tepe noktasının varlığını ortaya koymuştur. Bu piklerden Miller indeksleri (hkl) (100), (002) ve (040)'a karşılık gelenler diğerlerine göre daha yüksek yoğunluk sergilemiştir. Bu daha yüksek yoğunluk, bu tepe noktalarının kırınım modeline daha önemli bir şekilde katkıda bulunduğunu göstererek numunedeki daha yüksek bolluklarını veya tercih edilen yönelimlerini göstermektedir.



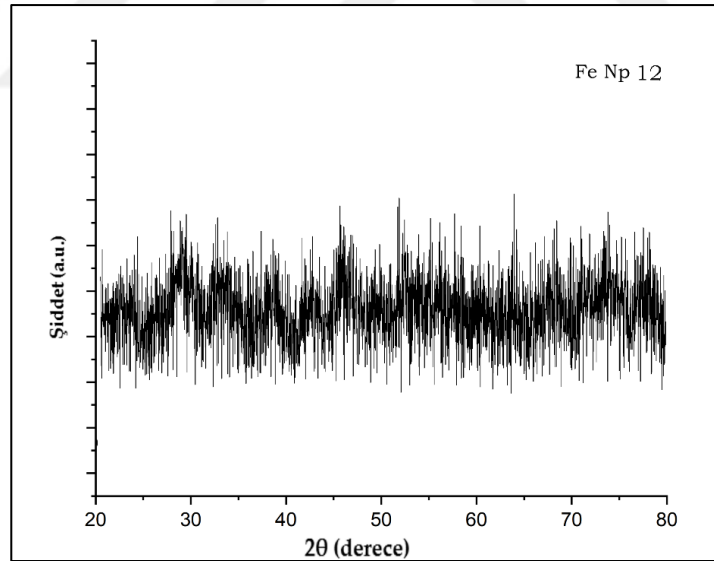
Şekil 4.17 ICDD referansı ile karşılaştırıldığında Fe BNp1'lerinin XRD desenleri

Şekil 4.17, Cu Ka radyasyonu kullanılarak elde edilen numune 1'in XRD modellerini göstermektedir. Bu modellerde, tozda bulunan Fe₃O₄ nanopartikülleri için kübik bir kristal yapıyla ve Uluslararası Kırınım Verileri Merkezi (ICDD) numarası 96-900-5814 ile uyumludur (JCPDS, 2019). Bu kübik yapı, önceki çalışmalarla ve Fe₃O₄ için bilinen kristalografik bilgilerle tutarlıdır.



Şekil 4.18 BNp5'lerinin XRD desenleri

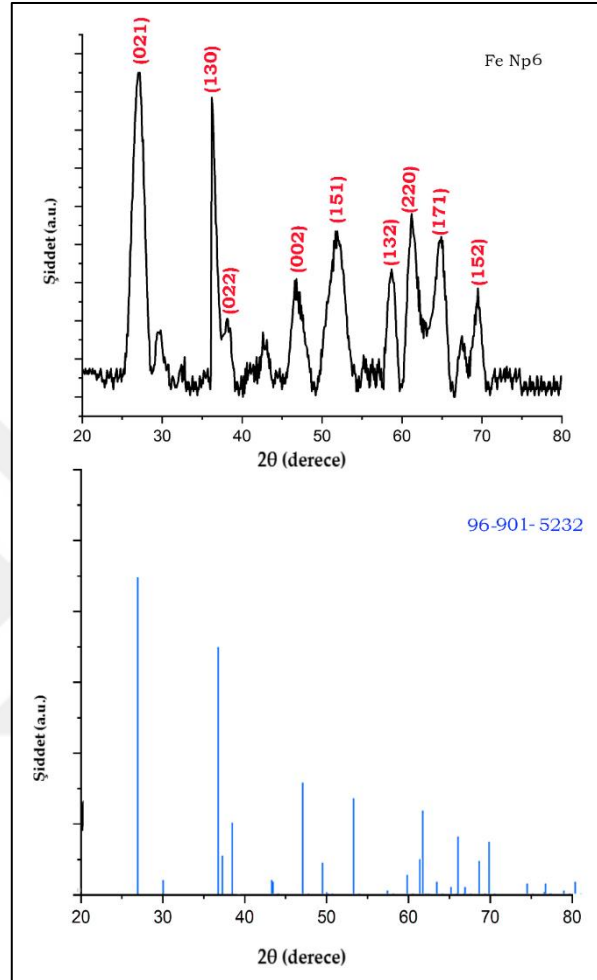
Fe Np 5 nanopartiküllerinin XRD analizi (Şekil 4.18), yeşil sentezlenmiş NP'lerin amorf bir yapıda ve farklı kırınım tepe noktalarının mevcut olmadığını ortaya çıkarmıştır.



Şekil 4.19 Fe BNp12'lerinin XRD desenleri

XRD modelinde dikkate değer bir özellik, 30° ile 40° arasında değişen 2θ değerleri etrafında geniş bir tepe noktasının varlığıdır. Bu geniş pik, reaksiyon ortamından kaynaklanan kaplanmış organik malzemelerin varlığına bağlanabilir.

Fe Np 5 örneğine benzer şekilde, Fe BNP 12 NP'lerinin XRD analizi, farklı tepe noktalarının olmadığını ortaya çıkarmıştır. Bu, sentezlenen Fe BNP 12 NP'lerinin da amorf bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 4.20).

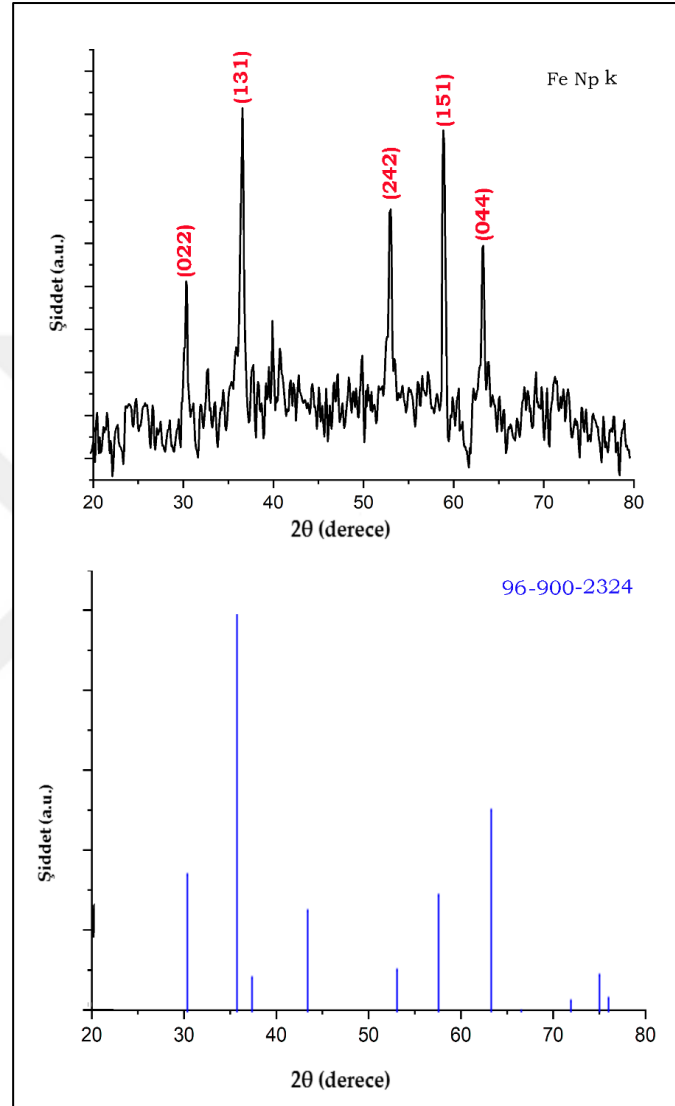


Şekil 4.20 ICDD referansı ile karşılaştırıldığında Fe BNp6'lerinin XRD desenleri

Şekil 4.19'da gösterildiği gibi Fe BNp6'nın XRD deseni, (021), (130), (022), (002), (151), (132), (220), dahil olmak üzere çeşitli hkl değerlerine sahip ayırt edici tepe noktaları (171) ve (152)) sergilemiştir. Bu fark edilebilir tepe noktaları, ICDD 96-901-5232 referans modeline yakından karşılık gelmiştir (JCPDS, 2019).

JCPDS referansı ile gözlemlenen eşleşme, FeBNp6'lerinin kristal yapısının, belirtilen referansla ilişkili bilinen kristalografik bilgilerle hizalandığını göstermiştir.

Deneyisel veriler ile referans modeli arasındaki bu uyum, FeBNP6'ler örneğinin kristal yapısını doğrulamış ve kristal kafesinin, belirtilen ICDD referansı için mevcut kristalografik bilgilerle tutarlı olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.21 ICDD referansı ile karşılaştırıldığında Fe KNP'lerinin XRD desenleri

Fe KNP'lerinin XRD analizi, (002), (131), (040), (242), (242) gibi hkl değerleri kullanılarak indekslenen nanopartiküller içindeki spesifik kristal düzlemlere karşılık gelen birkaç belirgin tepe noktalarının (151 ve 044) varlığını ortaya çıkarmıştır. Farklı tepe noktalarının bolluğu, Fe KNP'lerinin iyi tanımlanarak kristal yapıya sahip olduğunu göstermiştir.

Ayrıca, gözlemlenen kırınım modelinin bilinen kristalografik veri tabanıyla karşılaştırılması, 96-900-2324 koduyla yakın eşleşmeyi ortaya çıkarmıştır (JCPDS, 2019). Veri tabanıyla olan bu uyum, nanopartiküllerin kristal yapısının kübik nitelikte olduğunu doğrulamaktadır.

Çalışmamızın sonucunda, önemi giderek artan yeşil nanopartikül sentezi alanında *Dactylonectria torresensis* ve *Fusarium tricinctum*'un sentezi ve kullanımını ile ilgili umut verici sonuçlar ortaya çıkarılmış ve diğerlerinden farklı olarak bu iki türde spesifik kristal yapı gözlemlenmiş ve söz konusu partiküllerin etkili ajanlar olarak hizmet etme potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir.

Bu bulgular, söz konusu biyo-fabrikaların daha fazla araştırılmasına ve optimizasyonuna odaklanmış, belirli tarım ve teknolojik ihtiyaçları karşılayabilecek özel nanopartiküllerin geliştirilmesinin önünü açabilecektir. Bu alanda gelecekte yapılacak olan çalışmalar, büyüme koşullarının optimize edilmesine, kristal kontrolünün artırılmasına ve biyolojik olarak sentezlenmiş bu nanopartiküllerin tüm uygulama yelpazesinin araştırılmasına odaklanabilir.

4.5. Nanopartiküllerin Uygulamaları

4.5.1. Modifiye Yulaf Ortamı (Katı)

Fe NP'lerin çimlenme ortamına dahil edilmesi, kullanılacak nanopartikülün konsantrasyonu, hazırlama yöntemi, boyut ve kristal yapısı gibi faktörler tohum çimlenmesi üzerinde çeşitli etkiler yapabilmekte ve bu anlamda gözlenen sonuçlar farklılık göstermektedir.

Bazı çalışmalar Fe NP'lerin çimlenmeyi hızlandırabildiğini gösterirken, diğerleri daha yüksek konsantrasyonların çimlenmeyi yavaşlatabileceğini göstermiştir. Ancak bazı nanopartiküllerin fidelerde çimlenmenin engellenmesi veya fitotoksisite gibi yan etkileri bulunmaktadır. Genel olarak, Fe NP'lerin tohum çimlenmesi üzerindeki etkileri karmaşıktır ve tam olarak anlaşılabilmesi için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Çalışmamızda, yulaf ortamına farklı konsantrasyonlarda nanopartiküllerin eklenmesinin ve funguslara uygulanmasının tohum çimlenme oranı üzerinde farklı etkileri olduğunu göstermiştir. Nanopartikül sentez yönteminin ve kullanılan fungus türünün orkide çimlenme oranları üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu tesbit edilmiştir.

Yulaf ortamı bağlamında, tek yönlü ANOVA, özellikle 0,0001'den daha düşük olmak üzere son derece düşük bir p değeri göstermiştir. Bu sonuç, özellikle belirli çalışma koşulları altında katı ortamda tohum çimlenmesi üzerindeki etkileri açısından, karşılaştırılan gruplar arasında önemli farklılıkların varlığını güçlü bir şekilde ortaya koymuştur.

Tukey'in HSD testi, çeşitli faktörlerin tohum çimlenme oranları üzerindeki etkilerine dair ilgi çekici içgörülerini ortaya çıkarmıştır. Kimyasal olarak sentezlenen Fe KNP'ler durumunda, çimlenme oranları Kontrol grubunun değerinin altında veya çok yakınında olacak şekilde, tüm konsantrasyonlarda engelleyici bir etki göstermiştir. 10 mg Fe KNP'ler konsantrasyonunda çimlenme oranları, % 33'lik bir oranla Kontrol grubunun değerine yaklaşmıştır. Bununla birlikte, daha yüksek konsantrasyonlarda çimlenme oranlarında düşmeler görülmüş, bu sonuçlar da Fe KNP'lernin yüksek seviyelerdeki potansiyel engelleyici etkisini ortaya koymuştur.

Bu durumun aksine, funguslar kullanılarak biyolojik olarak üretilen nanopartiküller, tohum çimlenme oranları üzerinde farklı etkiler sergilenmiştir. 50 mg konsantrasyonda FeBNp1'ler, FeBNp5'ler ve FeBNp6'ler ile yapılan uygulamalar tohum gelişmesini uyarmış ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında çimlenme yüzdelerinde artışla sonuçlanmıştır. Çimlenme yüzdeleri sırasıyla $54,5 \pm 4,95$, $44 \pm 4,24$ ve $47,5 \pm 4,95$ olarak bulunmuştur. Ancak FeBNp12'ler 50 mg konsantrasyonunun tohum çimlenmesi üzerine olumsuz etkisi olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, daha yüksek bir konsantrasyonu (150 mg), tüm numunelerde tohum çimlenmesi üzerinde olumsuz bir etki göstermiş ve buna bağlı olarak da genel olarak çimlenme oranlarının azalmasına yol açmıştır.

Çeşitli çalışmalara göre 50 mg Fe NP'leri tohum çimlenmesinde olumlu sonuçlar göstermiştir. Örneğin, Fe NP'leri sulu çözeltisinin ayçiçeği tohumlarının çimlenmesi üzerindeki etkisini araştıran bir çalışma, Fe NP'lerin tohumların çimlenmesi üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Kornarzyński vd, 2020). Başka bir çalışmada, 20 ve 50 mg/L γ -Fe₂O₃ NP'leri ile muamele edilen mısır tohumlarının çimlenme indeksinin sırasıyla %27,2 ve %32,4 olduğu bulunmuştur (Guo vd, 2022).

Fe NP'lerin tohum çimlenmesini uyardığı kesin mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır, ancak çimlenmenin erken evresinde normal olarak

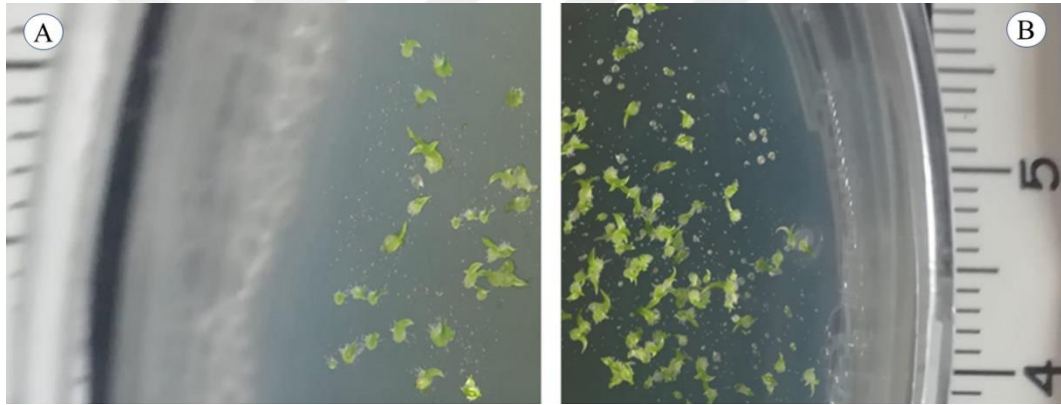
etkinleştirilen bazı metabolik süreçleri tetikledikleri düşünülmektedir (do Espirito Santo Pereira vd, 2021). Çimlenmenin gerçekleşebilmesi için orkide tohumlarının önce suyu emerek şişmesi, daha sonra tohum kabuğunun içini tamamen doldurması gerekir (Acemi, 2018). Olası bir mekanizma, amilazın uyarılması yoluyla su alımını ve nişasta bozulmasını artıran, tohum kabuğu üzerinde nanogözeneklerin oluşturulmasıdır. Nanopartiküller ayrıca hafif stres kaynaklı ajanlar veya ROS üreten ajanlar olarak ve nişasta parçalayıcı enzim aktivitesini arttırmak için nanokatalizörler olarak da görev yapabilir. Ek olarak, nanopartiküller bitki hücreleriyle etkileşime girebilir ve farklı hücre tiplerinde içselleşebilir, bu da tohum çimlenmesini ve fide büyümesini etkileyebilir (Shelar vd, 2021).

Farklı fungusların tohum çimlenmesi üzerindeki etkisinin araştırılması, farklı sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Fungus F1, $15,5 \pm 9,19$ 'lık bir çimlenme oranıyla sonuçlanarak engelleyici bir etki göstermiştir. F5, F6 ve F12 ise tohum çimlenmesi üzerinde sırasıyla $40 \pm 1,14$, $44 \pm 1,4$ ve $37, \pm 6,65$ oranlarıyla dikkate değer sonuçlar elde edilmiştir. Özellikle F6, test edilen funguslar arasında en önemli ortalama çimlenme oranı göstermiştir. Bu bulgular, tohum çimlenmesinin önemini vurgulamaktadır. Orkidelerin tohumdan yetiştirilmesi sürecinde kullanılan spesifik fungusların dikkate alınması önemlidir, çünkü bunların etkileşimleri çimlenme başarısını önemli ölçüde etkileyebilmektedir (Özdener Kömpe vd, 2022).

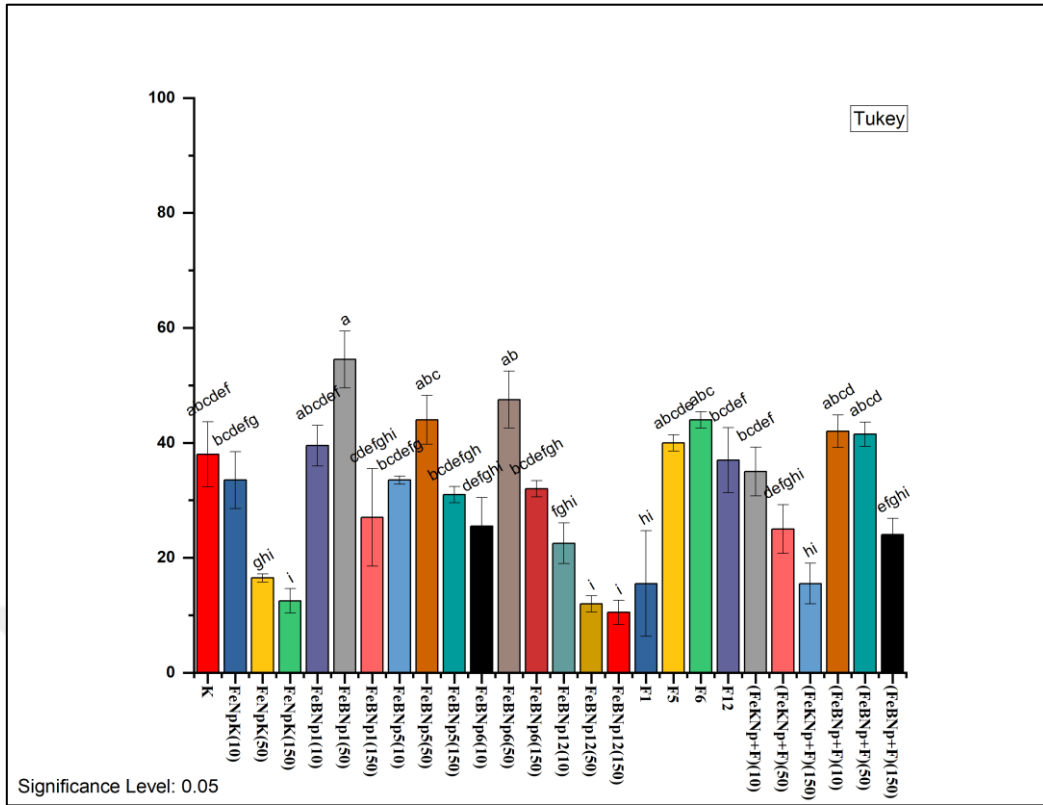
Son olarak, (Fe BNP'ler_{Karışımı} + F_{Karışımı}) karışımlarının tohum çimlenmesi üzerindeki birleşik etkilerini incelerken, farklı konsantrasyonlarda değişen derecelerde iyileşme ile olumlu etkiler gözlemlenmiştir. Buna karşılık (Fe KNP'ler + F_{Karışımı}) karışımlarının kombinasyonu, kontrol numunesindekine benzer etkiler göstermiştir. Bu sonuçlar, fungusların kimyasal olarak hazırlanmış nanopartiküllerin potansiyel toksik etkilerini ortadan kaldırma yeteneğine sahip olabileceğini düşündürmektedir. Özellikle ağır metallerden veya diğer toksik malzemelerden oluşan nanopartiküller, çevreye salındıklarında risk oluşturabilir. Fungusların, ağır metallerin neden olduğu toksisiteye direnmek için hayati tolerans mekanizmalarına sahip olduğu bulunmuştur (Amin vd, 2021). Birçok çalışmada funguslar, nanopartikülleri dönüştürme, etkisizleştirme veya tecrit etme yeteneklerinden dolayı iyileştirme çabalarında potansiyeli olan organizmalar

olarak değerlendirilmiştir (Adebayo vd, 2021). Funguslar nanopartikülleri hücre duvarlarına veya miselyumlarına adsorbe edebilir. Biyosorpsiyon olarak bilinen bu süreç, nanopartiküllerin fungus biyokütlesine fiziksel veya kimyasal bağlanmasını içermektedir. Bazı fungusların gümüş veya selenyum iyonları gibi toksik metal iyonlarını daha az toksik element formlarına indirgeme yeteneğine sahip olduğu bildirilmektedir (Jakubiak vd, 2014).

Bazı durumlarda mantarların nanopartiküllerin fitotoksisitesini azalttığı gösterilmiştir. Mısır bitkileriyle yapılan bir çalışmada, arbusk  ler mantarların çinko oksit nanopartiküllerinin (ZnO NP'ler) olumsuz etkilerini hafiflettiği ve bitkilerde Zn birikimini azalttığı bulunmuştur (Wang vd, 2016). Nane bitkileriyle yapılan çalışma da, fungusların bakır bazlı nanopartiküllerin/bileşiklerin fitotoksik etkilerini hafifletebildiğini göstermiştir (Apodaca, 2022).



şekil 4.22 10 hafta muameleden sonra *Anacamptis laxiflora* protokormlarının (A) Kontrol (B) Fe BNp1 ‘de modifiye yulaf ortamındaki gelişme durumları



Şekil 4.23 Modifiye yulaf ortamındaki farklı uygulamaların çimlenme üzerine etkisini gösteren grafik

Tablo 4.4 Modifiye yulaf ortamı uygulamalarının istatistiksel değerleri

Muamele	Ortalama ± SD	Etiket	Muamele	Ortalama ± SD	Etiket
Kontrol grubu (K)	38±5.65	abcdef	Fe BNP12(10 mg)	22.5±3.53	fghi
Fe NpK(10 mg)	33.5±4.94	fghi	Fe BNP12(50 mg)	12±1.41	i
Fe NpK(50 mg)	16.5±0.70	ghi	Fe BNP12(150 mg)	10.5±2.12	i
Fe NpK(150 mg)	12.5±2.12	i	F1	15.5±9.19	hi
Fe BNP1(10 mg)	39.5±3.53	abcdef	F5	40±1.41	abcdef
Fe BNP1(50 mg)	54.5±4.94	a	F6	44±1.41	abcd
Fe BNP1(150 mg)	27±8.48	defghi	F12	37±5.65	ab
Fe BNP5(10 mg)	33.5±0.70	bcdelfg	(Fe KNp + F) (10 mg)	35±4.24	bcdelfgh
Fe BNP5(50 mg)	44±4.24	abcd	(Fe KNp + F) (50 mg)	25±4.24	efghi
Fe BNP5(150 mg)	31±1.41	cdefgh	(Fe KNp + F) (150 mg)	15.5±3.53	ghi
Fe BNP6(10 mg)	25.5±4.94	efghi	(Fe BNP + F) (10 mg)	42±2.8	abcde
Fe BNP6(50 mg)	47.5±4.94	abc	(Fe BNP + F) (50 mg)	41.5±2.1	abcde
Fe BNP6(150 mg)	32±1.41	bcdelfgh	(Fe BNP + F) (150 mg)	24±2.82	bcdef

4.5.2. Sıvı Yulaf Ortamı

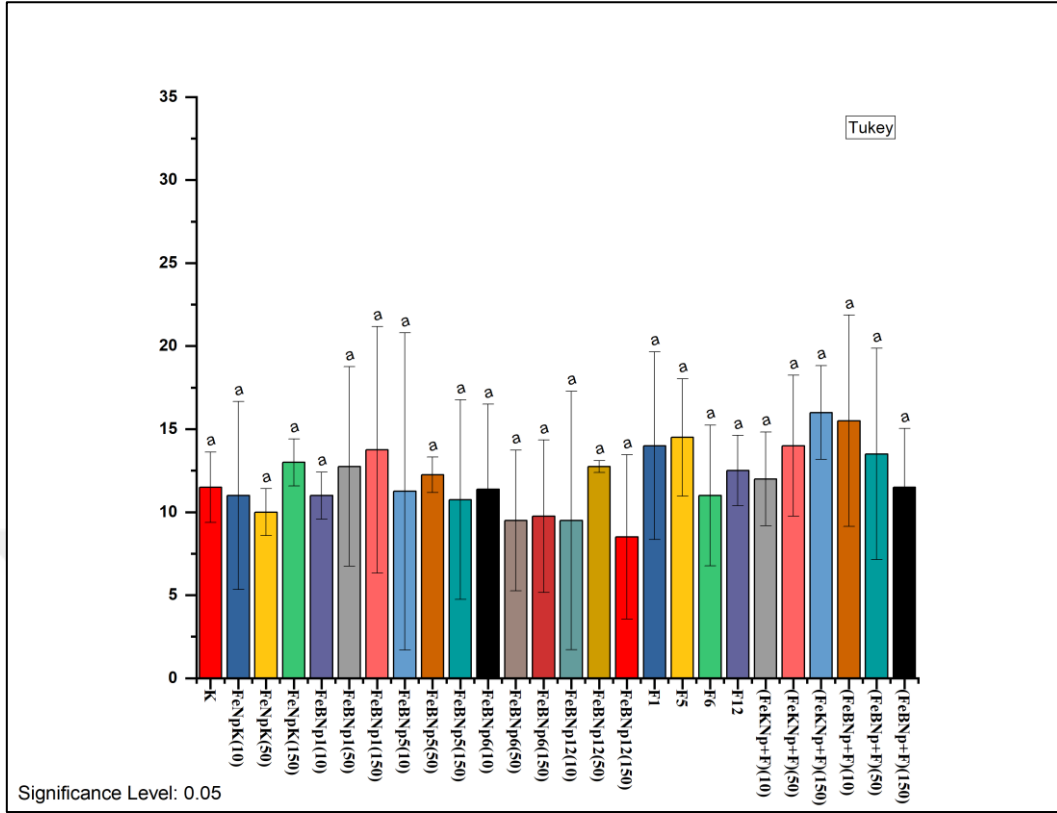
Elde edilen sonuçlar, sıvı ortamdaki işlemlerin *Anacamptis laxiflora* tohumlarının büyümesini teşvik etmede uygulamaya uygun olmadığını göstermiştir. Sıvı ortamın sağladığı özel koşullar, test edilen işlemlerle birleştiğinde, *Anacamptis laxiflora* tohumlarının çimlenmesini ve büyümesini etkili bir şekilde desteklememektedir.

Sıvı bir ortamda gerçekleştirilen deneyimiz bağlamında, hem tek yönlü ANOVA'dan hem de Tukey'in HSD'sini kullanan analizden elde edilen sonuçlar, nanopartiküllerin, fungusların veya bunların kombinasyonlarının tohum çimlenmesi üzerine etkisini destekleyen sınırlı kanıt olduğunu göstermiştir.

Tek yönlü ANOVA, 0,99781 gibi oldukça yüksek bir p değeri vermiştir; bu sonuç, çeşitli uygulama grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farkların bulunmadığını göstermektedir. Daha basit bir ifadeyle, bulgularımız, nanopartiküllerin, fungusların veya bunların kombinasyonlarının varlığının, test edilen spesifik koşullar altında bu sıvı ortam içerisinde tohum çimlenmesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığını işaret etmektedir.

Ayrıca, potansiyel grup farklılıklarını belirlemek için Tukey'in HSD'sini kullanan post hoc analizi yapılmıştır. Elde edilen ortalamalar ve standart sapmalar daha yakından incelendiğinde, önemli sayıda uygulama grubunun benzer ortalama değerler sergilediği ortaya çıkmıştır. Bu gözlem, anlamlı olmayan ANOVA sonucuyla kusursuz bir şekilde uyumludur. Çeşitli uygulama gruplarının incelenmesi, çoğunun birbirine yakın olduğunu ortaya koymaktadır. Standart sapmalara yansıyan bir miktar değişkenlik olsa da, bu farklılıklar istatistiksel anlamlılık eşiğine ulaşmamaktadır.

Bulgularımız, orkide tohumlarının sıvı kültürde yetiştirilmesi olasılığını öne süren Chu ve Tsai (2006) tarafından yürütülen çalışmayla çelişmiştir. Çalışmamızda, kontrol örneğinin olumsuz bir sonuç sergilemesi dikkat çekicidir ve bu durum bizi sıvı ortamın bu özel amaç için uygunluğunu sorgulamaya sevk etmiştir. Üstelik amaçlanan çimlenme oranları da düşük seviyede gerçekleşmiştir. Sonuçlardaki bu zıtlık seçilen ortamın farklılığından kaynaklanmış olabilir.



Şekil 4.24 Sıvı yulaf ortamındaki farklı uygulamaların çimlenme üzerine etkisini gösteren grafik

Tablo 4.5 Modifiye yulaf ortamı uygulamaların istatistiksel değerleri

Muamele	Ortalama ± SD	Etiket	Muamele	Ortalama ± SD	Etiket
Kontrol grubu (K)	11.5±2.12	a	Fe BNP12(10 mg)	9.5±7.7	a
Fe KNp(10 mg)	11±5.65	a	Fe BNP12(50 mg)	12.75±0.35	a
Fe KNp(50 mg)	10±1.41	a	Fe BNP12(150 mg)	8.5±4.94	a
Fe KNp(150 mg)	13±1.41	a	F1	14±5.65	a
Fe BNP1(10 mg)	11±1.41	a	F5	14.5±3.5	a
Fe BNP1(50 mg)	12.7± 6.01	a	F6	11±4.2	a
Fe BNP1(150 mg)	13.7±7.42	a	F12	12.5±2.1	a
Fe BNP5(10 mg)	11.2±9.54	a	(Fe KNp + F) (10 mg)	12±2.82	a
Fe BNP5(50 mg)	12.2±1.06	a	(Fe KNp + F) (50 mg)	14±4.24	a
Fe BNP5(150 mg)	10.7± 6.01	a	(Fe KNp + F) (150 mg)	16±2.8	a
Fe BNP6(10 mg)	11.3±5.12	a	(Fe BNP + F) (10 mg)	15.5±6.3	a
Fe BNP6(50 mg)	9.5± 4.24	a	(Fe BNP + F) (50 mg)	13.5±6.3	a
Fe BNP6(150 mg)	9.7±4.5	a	(Fe BNP + F) (150 mg)	11.5±3.5	a

Bunun dışında, sıvı ortamın ortalamanın altındaki performansının makul bir açıklaması, *Anacamptis laxiflora* tohumlarının çimlenme gereksinimleri ile sıvı ortamın sunduğu koşullar arasındaki uygunsuzluğa atfedilebilir. Çimlenme güçlüğü yaşayan Orkide tohumları için, sıvı ortam çimlenme sürecini başlatmak için kesin bir dizi çevresel faktör gerektirecektir. Bu aşamada kontrollü oksijen konsantrasyonları zorunludur. Ne yazık ki, sıvı ortam oksijen açısından zengin olmama eğilimindedir; bu koşullar tohumların gelişme kabiliyetine zarar verebilir.

4.5.3. Toprak Ortamı

Toprak ortamında tek yönlü ANOVA analizinin sonuçları, 0,0001'den düşük olduğu için oldukça anlamlı bir p değeriyle yulaf ortamında gözlemlenenlere benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuç, tohum çimlenmesi üzerinde belirgin etki olduğunu göstermiş ve incelenen çeşitli uygulamalar arasında çimlenme oranlarında gerçekten farklılıklar olduğunu doğrulamıştır.

Tukey'nin HSD testi, çeşitli faktörlerin toprak ortamındaki tohum çimlenme oranları üzerindeki etkisine ilişkin ilgi çekici bilgiler sağlamıştır. 10, 50 ve 150 konsantrasyonlardaki Fe KNP'ler nanopartikülleri, çimlenme üzerinde herhangi bir olumsuz etki sergilememiştir. Spesifik olarak, Fe KNP'ler(10 mg), Fe KNP'ler(50 mg) ve Fe KNP'ler(150 mg) sırasıyla $31,5 \pm 3,54$, $31 \pm 1,41$ ve $26,5 \pm 2,12$ çimlenme oranları vermiştir.

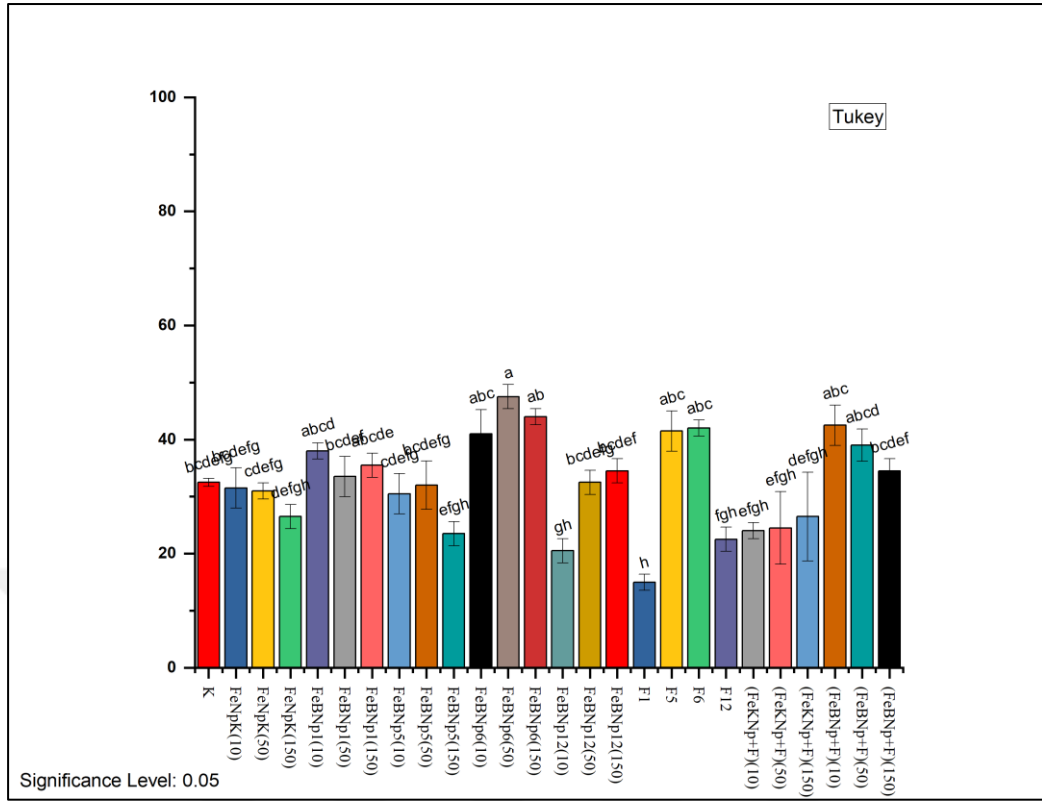
Buna karşılık, FeBNp1'ler(10 mg), FeBNp1'ler(50 mg) ve FeBNp1'ler(150 mg) gibi biyolojik olarak hazırlanmış Fe NP'leri, kimyasal olarak hazırlanmış benzerlerine kıyasla daha iyi çimlenme oranları göstermiştir. Bu sonuçlar, FeBNp1'ler(10 mg), FeBNp1'ler(50 mg) ve FeBNp1'ler(150 mg) için , sırasıyla $33,5 \pm 3,54$, $35,5 \pm 2,12$ ve $38 \pm 1,41$ olarak bulunmuştur. Bunların aksine, FeBNP5'ler(150 mg), FeBNP5'ler(10 mg) ($30,5 \pm 3,54$) ve FeBNP5'ler(50 mg) ($32 \pm 4,24$) ile daha düşük bir çimlenme oranı ($23,5 \pm 2,12$) elde edilmiştir. Bu bulgular, nanopartikül hazırlama yönteminin ve mantar katılımının, çimlenmeyi teşvik etmedeki etkinliğini değiştirebileceğini göstermektedir.

Toprak ortamında farklı fungus uygulamalarının etkisinin F1,F5, F6 ve F12 çimlenme oranlarına (sırasıyla $15 \pm 41,41$, $5 \pm 354,42 \pm 1.41$, $22,5 \pm 2.12$) çimlenme oranları sergilemiştir.

Fungusların nanopartiküllerle kombinasyonları yapıldığında karışık etkiler gözlemlenmiştir. (Fe KNp + F) (10 mg) ve (Fe KNp + F) (50 mg) gibi uygulamalar, $24 \pm 1,41$ ve $24,5 \pm 6,36$ 'lık benzer çimlenme oranları sergilenmiştir ve bu sonuç, iki faktör arasında potansiyel bir etkileşim olduğunu ortaya koymuştur. Bunun aksine, (Fe BNP + F) uygulamaları karışık sonuçlar vermiş ve (Fe BNP + F) (150 mg) nispeten yüksek bir çimlenme oranı ($42,5 \pm 3,54$) ile sonuçlanırken, (Fe BNP + F) (10 mg) daha düşük bir çimlenme oranı ($34,5 \pm 2,12$) göstermiştir. Bu bulgular, orkide tohum çimlenmesini etkilemede mantarlar ve nanopartiküller arasındaki etkileşimlerin karmaşıklığını vurgulamaktadır.

Bu gözlem, çimlenme başarısının salt nanopartikül konsantrasyonunun dışındaki faktörlerden etkilendiğini işaret etmektedir. Bununla birlikte, nanopartiküllerin spesifik özelliklerinin çok önemli bir rol oynadığı görülmektedir (Adhikari vd, 2021). Ayrıca nanopartikül boyutu ve kristal yapısı da etkili değişkenler olarak ortaya çıkmıştır. Boyutları 25 ila 45 nm arasında değişen ve eşkenar dörtgen kristal yapıya sahip nanopartiküller, çimlenme sonuçlarını şekillendirmede bu özelliklerin önemini güçlendirmiştir. Nanopartikül boyut ve şekillerinin orkide tohumlarının çimlenmesi üzerine etkisi konusunda herhangi bir çalışmaya ratlanmamış olmakla birlikte, farklı tohum çimlendirme çalışmalarında benzer sonuçlar elde edilmiştir (Sun vd, 2023).

Toprak ortamı, kimyasal olarak hazırlanmış nanopartiküllerle ilişkili potansiyel toksisiteyi azaltma konusunda dikkate değer bir yetenek göstermiştir. Toksik etkilerin iyileştirilmesiyle toprak ortamı, hem sıvı ortamda hem de agar içeren katı ortamda gözlemlenen olumsuz sonuçlardan farklı sonuçlar vermiştir. Dahası, çalışma biyolojik olarak hazırlanan nanopartiküllerle ilgili ilgi çekici bir eğilimi ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte, özellikle biyolojik olarak sentezlenen nanopartiküllerin yüksek konsantrasyonlarının (150 mg/mL) çimlenme üzerinde zararlı etkiler sergilediği görülmüştür. Ancak toprak ortamında bu tür olumsuz etkiler bariz bir şekilde görülmemiştir. Bu ilgi çekici olay, toprağın hem nanopartiküllerin hem de toprağın toksik etkilerine karşı koyma konusundaki eşsiz kabiliyetine atfedilebilir, bu da çimlenme süreçleri açısından toprağı çekici bir ortam haline getirebilir.



Şekil 4.25 Toprak ortamındaki farklı uygulamaların çimlenme üzerine etkisini gösteren grafik

Tablo 4.6 Toprak ortamındaki uygulamaların istatistiksel değerleri

Muamele	Ortalama ± SD	Etiket	Muamele	Ortalama ± SD	Etiket
Kontrol grubu (K)	32.5±0.71	bcdef	Fe BNP12(10 mg)	20.5±2.12	fg
Fe NpK(10 mg)	31.5±3.54	bcdef	Fe BNP12(50 mg)	32.5±2.12	bcdef
Fe NpK(50 mg)	31±1.41	bcdef	Fe BNP12(150 mg)	34.5±2.12	abcde
Fe NpK(150 mg)	26.5±2.12	cdefg	F1	15±1.41	g
Fe BNP1(10 mg)	38±1.41	abcd	F5	41.5±3.54	ab
Fe BNP1(50 mg)	33.5±3.54	bcdef	F6	42±1.41	ab
Fe BNP1(150 mg)	35.5±2.12	abcde	F12	22.5±2.12	efg
Fe BNP5(10 mg)	30.5±3.54	bcdef	(Fe KNp + F) (10 mg)	24±1.41	efg
Fe BNP5(50 mg)	32±4.24	bcdef	(Fe KNp + F) (50 mg)	24.5±6.36	defg
Fe BNP5(150 mg)	23.5±2.12	efg	(Fe KNp + F) (150 mg)	26.5±7.78	cdefg
Fe BNP6(10 mg)	41±4.24	ab	(Fe BNP + F) (10 mg)	42.5±3.54	ab
Fe BNP6(50 mg)	47.5±2.12	a	(Fe BNP + F) (50 mg)	39±2.83	abc
Fe BNP6(150 mg)	44±1.41	ab	(Fe BNP + F) (150 mg)	34.5±2.12	abcde

Organik madde, pH, iyonik kuvvet ve toprak mikroorganizmaları gibi toprak faktörleri, topraktaki NP'lerin kimyasal davranışlarını değiştirecektir. Fe NP'leri, organik madde ve kil parçacıkları da dahil olmak üzere diğer toprak parçacıklarını absorbe etme ve bunlara bağlanma yeteneklerini artıran yüksek bir yüzey alanına sahiptir. Bu bağlanma, Fe NP'lerin biyoyararlanımı üzerinde kayda değer bir etkiye sahip olabilir ve potansiyel olarak bitkilere yönelik toksisitelerini azaltabilir. Toprak bileşenlerine bağlanarak Fe NP'leri daha az hareketli hale gelebilir ve dolayısıyla bitkiler tarafından alınma veya yeraltı suyuna sızma olasılığı daha düşük olabilir (Fischer vd, 2022; Xu vd, 2022).

4.6. Glikomannan İçerikleri

4.6.1. Modifiye Yulaf Ortamı

Yulaf ortamındaki glikomannan içeriğine ilişkin elde edilen sonuçlar, çeşitli uygulamaların bileşen üzerindeki etkisine dair önemli bilgiler sağlamıştır. Kontrol grubu 6.97 ± 0.46 'lık nispeten düşük bir glikomannan içeriği sergilerken bu değer diğer uygulamaların etkilerini değerlendirmek için referans noktası görevi yapmıştır. FeBNp1'ler(50 mg), FeBNP5'ler(50 mg) ve FeBNP6'ler(50 mg) uygulamalarının tümü, kontrole kıyasla artan glikomannan içeriği göstermiştir. Bu sonuç, nanopartiküllerin 50 mg konsantrasyonunun orkide protokormunda glikomannan sentezini veya birikimini uyarabileceğini düşündürmektedir. En yüksek glikomannan içeriği FeBNP6'ler(50 mg) uygulanmasında gözlemlenmiş, bu sonuç da glikomannan üretimini artırma potansiyeline işaret etmektedir.

Bununla birlikte, F6 ve F12, kontrole kıyasla daha düşük glikomannan içeriği gösterilmiş olup söz konusu durum, bu özel fungus türlerinin yulaf ortamındaki glikomannan üretimi üzerinde baskılayıcı bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir. F6 kodlu fungusun, F12 kodlu fungusdan biraz daha yüksek bir glikomannan içeriğine sahip olduğunu belirtmekte fayda vardır, bu sonuç da fungusların etkilerindeki farklılıkları göstermektedir.

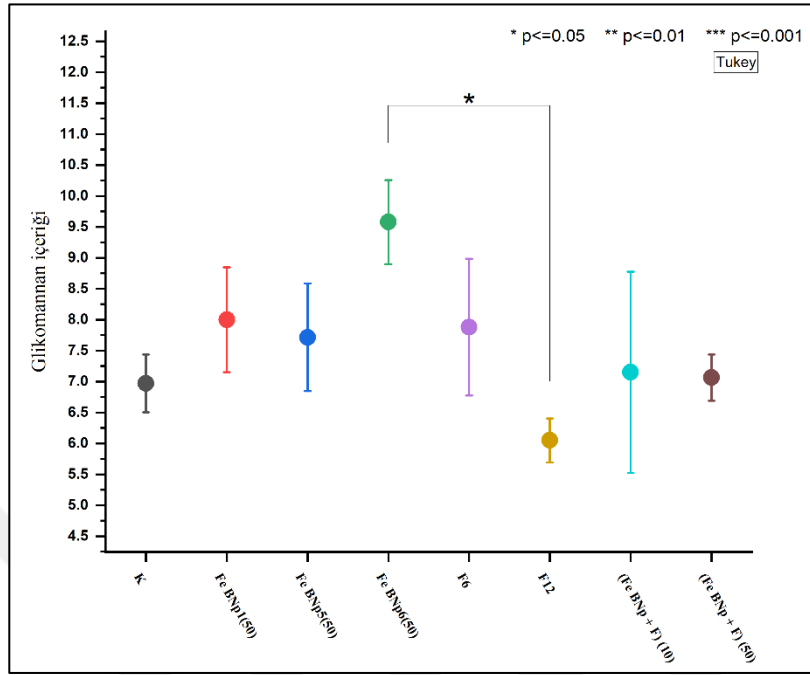
FeBNp ve fungusların farklı konsantrasyonlarda (10 ve 50) kombine uygulamaları, glikomannan içeriği üzerindeki etkileri farklı olmuştur. Her iki kombinasyonda da glikomannan içeriği seviyeleri kontrolün üzerinde olmasına rağmen etkileri benzer olmamıştır. (FeBNp + F) (10 mg) işlemi, (FeBNp + F) (50 mg) ile karşılaştırıldığında nispeten daha yüksek bir glikomannan içeriği göstermiştir. Bu sonuç, Fe NP'lerin ve funguslar arasındaki etkileşimin,

konsantrasyona bağlı olarak glikomannan üretimini farklı şekilde etkileyebileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda ortaya çıkan sonuçlar, üçgen yapıda ve 20-35 boyut aralığında karakterize edilen FeBNP6'ler nanopartiküllerinin yanı sıra küresel yapıda ve 15-30 boyut aralığında karakterize edilen FeBNP1'ler nanopartiküllerinin umut verici sonuçlar verdiğini göstermektedir. Katı ortamda belirtilen nanopartiküller tohumların hem çimlenmesini hem de glikomannan birikimini teşvik etmiştir (Şekil 4.26).

Belirtilen sonuçlar, nanopartiküllerin tohumların veya bitkilerin şeker içeriğini arttırmada benzer etkilerini gösteren önceki çalışmalarla uyumludur (Hasan vd, 2021; Li vd, 2023). Nanopartiküllerin şeker içeriğini etkileyebileceği mekanizmalardan biri, şeker metabolizmasında yer alan enzim aktivitesini etkilemesidir. AgNP'lerin ve FeO NP'lerin tohumlarda α -amilaz aktivitesini uyardığı rapor edilmiştir. α -Amilaz, nişastanın, tohum çimlenmesi ve erken fide büyümesi için gerekli olan çözünür şekerlere parçalanmasından sorumludur. Nanopartiküller, α -amilaz aktivitesini artırarak nişastanın şekere dönüşümünü teşvik edebilir ve bu da tohumlarda veya genç bitkilerde şeker içeriğinin artmasına yol açabilir (Afzal vd, 2021; Khan vd, 2021). Ayrıca nanopartiküllerin tohumlarda veya bitkilerde antioksidan savunma sistemlerini uyardığı bulunmuştur. SOD gibi artan antioksidan enzim aktivitesi, oksidatif strese karşı koruma sağlayabilir ve genel bitki sağlığını iyileştirebilir. Bu gelişmiş antioksidan aktivite, şekerin verimli kullanımına ve şeker metabolizması süreçlerinin korunmasına katkıda bulunabilir ve sonuçta daha yüksek şeker içeriğine yol açabilir (Ishtiaq vd, 2023; Zia-ur-Rehman vd, 2022).

Moleküler düzeyde, bitki biyokütlesinde bulunan glikomannan içeriğini arttırmak için tasarladıkları bir metodoloji yoluyla bu alanda kayda değer ilerleme kaydedilmiştir. Bu çığır açan başarı, belirli transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu kolaylaştırmak ve böylece bir glikomannan sentaz geni olan CSLA9'un aktivitesini arttırmak için bitkilerin genetik mühendisliğini içermektedir. Bu ustaca yaklaşım, CSLA9'un ifadesini artırarak bitki biyokütlesinde mevcut olan glikomannan düzeylerini etkili bir şekilde yükseltmektedir. Bu girişim, geniş bir uygulama yelpazesi için muazzam bir umut vaat etmektedir (de Vries vd, 2021; Gao vd, 2022).



Şekil 4.26 Modifiye yulaf ortamında protokormların glikomannan içeriğini gösteren grafik

Tablo 4.7 Modifiye yulaf ortamında protokormların glikomannan içeriği

Muamele	Glikomannan içeriği %
Kontrol grubu (K)	6.97±0.46
Fe BNP1(50 mg)	8±0.84
Fe BNP5(50 mg)	7.715±0.86
Fe BNP6(50 mg)	9.58±0.67
F6	7.88±1.1
F12	6.05±0.35
(Fe BNP + F) (10 mg)	7.15±1.62
(Fe BNP + F) (50 mg)	7.065±0.37

Araştırma bulgularımız ilgi çekici bir olguyu ortaya çıkarmış olup nanopartikül işlemine tabi tutulan tohumlardaki glikomannan içeriğinde dikkate değer bir artış sağlanmıştır. Bu ilgi çekici sonuç, bizi CSLA9 genlerinin aktivasyonu veya uyarılmasıyla ilgili potansiyel bağlantıyı keşfetmeye sevk etmektedir. Ancak bu korelasyonun daha derin araştırma gerektiren bir konu olmaya devam ettiğinin altını çizmek gerekir.

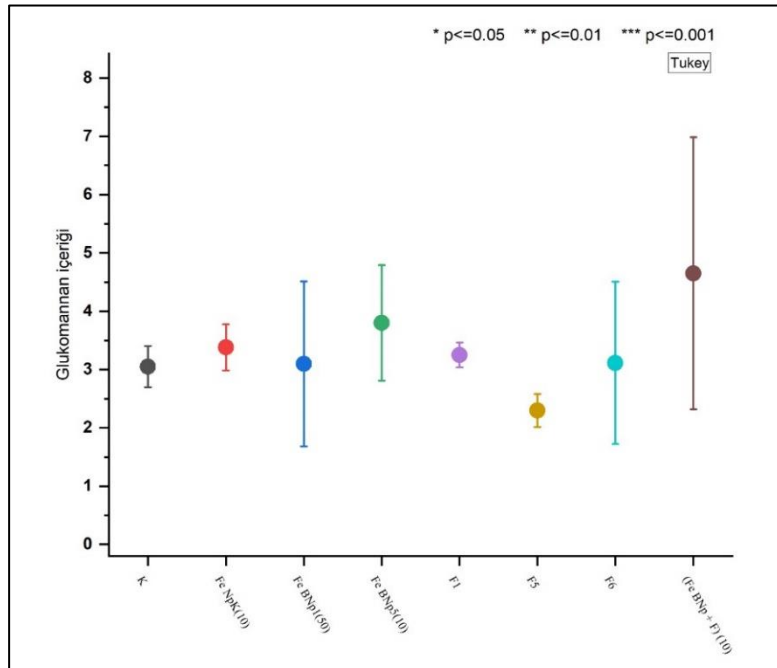
Farklı uygulamaların glikomannan içeriği nasıl etkilediğini anlamak, glikomannanın varlığını optimize etmeye yönelik stratejiler konusunda bilgi sağlayabilir. Ek olarak, bu bulgular nanopartiküller, funguslar ve bitki bileşenleri arasındaki karmaşık etkileşim hakkındaki bilgilerimize katkıda bulunmaktadır ve bu etkileşimin nanoteknoloji ve biyoteknoloji gibi alanlarda daha geniş etkileri olabilecektir.

4.6.2. Sıvı Yulaf Ortamı

Glikomannan içeriği ile ilgili olarak elde edilen sonuçlar, çimlenme yüzdesi ile aynı değerde olup, deneyde kullanılan sıvı ortamın başarılı tohum çimlenmesine yardımcı olmadığını göstermektedir. Sonuç olarak, glikomannan içeriği de düşük veya tatmin edici olmamıştır.

Bulgular, orkide tohumlarının uygun olmayan bir sıvı ortamda yetiştirilmesinin, nanopartiküllerin uygulanmasıyla birleştiğinde zıt sonuçlara yol açtığını gösteriyor. Bu farklılıkların istatistiksel veya niceliksel olarak önemli olmadığına dikkat etmek gerekir, bu sonuç da uygulamaların özel deney düzeneğinde glikomannan üretimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığına işaret etmektedir.

Elde edilen bu sonuçlar, tohum çimlenmesini ve buna bağlı metabolit üretimini teşvik etmek için uygun bir büyüme ortamı seçmenin ve yetiştirme koşullarını optimize etmenin önemini vurgulamaktadır.



Şekil 4.27 Sıvı yulaf ortamında protokormların glikomannan içeriğini gösteren grafik

Tablo 4.8 Sıvı yulaf ortamında protokormların glikomannan içeriği

Muamele	Glikomannan içeriği%
Kontrol grubu (K)	3.05±0.35
Fe KNP'ler(10 mg)	3.38±0.40
FeBNp1'ler(50 mg)	3.1±1.41
FeBNP5'ler(10 mg)	3.8±0.99
F1	3.25±0.21
F5	2.3±0.28
F6	3.11±1.39
(FeBNp+F)(10 mg)	4.65±2.33

4.6.1. Toprak Ortamı

Toprak ortamında yetiştirilen orkide tohumlarının glikomannan içeriğinin analizi, deneysel uygulamalar arasında önemli farklılıklar ortaya çıkarmış ve bunların etkilerine ilişkin değerli bilgiler sağlamıştır.

Taban çizgisini temsil eden kontrol grubu, 5.4±0.42'lik bir glikomannan içeriği sergilerken, 10 mg konsantrasyonda FeBNP6'ler nanopartikülleri uygulaması, glikomannan içeriğinde 5.3±0.28'de ılımlı bir azalma ile sonuçlanmıştır. FeBNP6'ler(50 mg) uygulaması, glikomannan içeriğinde 6.95 ±0.49'lık önemli bir artışla sonuçlanırken bu sonuç, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli bir iyileşmeyi temsil etmektedir. Buna karşılık, FeBNP6'ler(150 mg) uygulaması, 6.6±0.42'de kontrolünkine benzer glikomannan içeriğini göstermiştir.

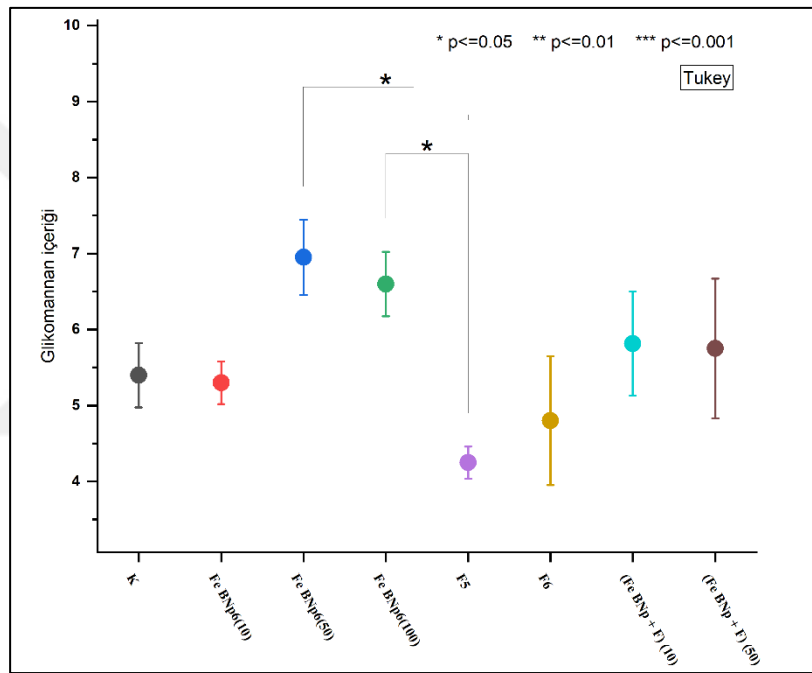
F5'in uygulanması, 4.25±0.21'lük bir glikomannan içeriği ile sonuçlanırken, F6, 4.8±0.84'lık biraz daha düşük bir içerik sergilemiştir. Daha da önemlisi, bu fungus uygulamaları arasındaki fark, pratik açıdan istatistiksel olarak anlamlı değildir.

FeBNp ve fungusların kombine uygulamalarına bakıldığında (FeBNp+F)_{karşımı} (10 mg), glikomannan içeriğinde 5.815±0.68 oranında önemli bir artışa neden olmuştur. Ancak (FeBNp+F)_{karşımı} (50 mg), 5.75±0.91'lik bir glikomannan içeriği sergilemiştir.

Bitkinin yaşı, gen ifadesi ve fiziksel yaralamalar dahil olmak üzere çeşitli faktörler glikomannan içeriğini etkileyebilir. Bir çalışmada Nurlela vd (2019) ise bitkiler yaşlandıkça glikomannan içeriğinde bir azalma gözlemlenmiştir. Buna karşılık, *Amorphophallus muelleri* üzerinde yapılan çalışma, tırnak makası kullanılarak yapılan fiziksel yaralamanın çimlenme oranında (%100) ve

glikomannan seviyelerinde artışla sonuçlandığını göstermiştir (Harjati vd, 2018). Ek olarak *Dendrobium catenatum* üzerinde yapılan bir çalışma, glikomannan biyosentezinde yer alan spesifik genlerin aşırı ekspresyonunun daha yüksek glikomannan seviyelerine yol açtığını göstermiştir (Qi vd, 2022).

Çalışmamızda Fe NP'leri kullanıldığında glikomannan seviyelerinin belirli oranlarda arttırıldığı gözlemlenmiştir. Bu artış, gen ifadelerindeki ve buna bağlı bir takım metabolik süreçlerle bağlantılı olabilir. Fe NP'leri glikomannan seviyelerini etkilediği spesifik mekanizmaları daha iyi anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.



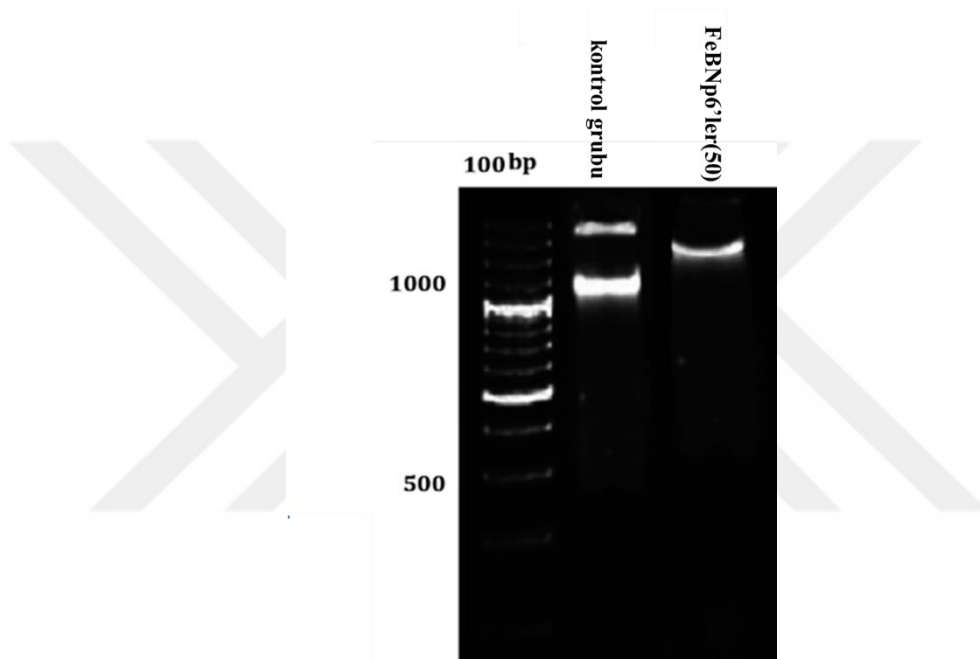
Şekil 4.28 Toprak ortamında protokormların glikomannan içeriğini gösteren grafik

Tablo 4.9 Toprak ortamında protokormların glikomannan içeriği

Muamele	Glikomannan içeriği%
Kontrol grubu (K)	5.4±0.42
FeBNP6'ler(10 mg)	5.3±0.28
FeBNP6'ler(50 mg)	6.95±0.49
FeBNP6'ler(150 mg)	6.6±0.42
F5	4.25±0.21
F6	4.8±0.84
(FeBNp+F)(10 mg)	5.815±0.68
(FeBNp+F)(50 mg)	5.75±0.91

4.7. Tohumlardan DNA Ekstraksiyonu

Nanopartiküllerin, tohumların çimlenme oranını arttırdığı ve yüksek düzeyde glikomannan üretimini teşvik ettiği çimlenmiş tohumlarla ilişkili mikrobiyal topluluk üzerindeki potansiyel etkileri araştırılmıştır. Birincil amaç, bu nanopartiküllerin mikrobiyal organizmalarla ilişkili olarak kullanılmasının güvenliğini tespit etmektir. Ek olarak, bu mikrobiyal varlıkların hem çimlenme sürecinde hem de gelişen tohumlardaki glikomannan içeriğinin artırılmasında oynadığı potansiyel rollerinin açıklaması amaçlanmıştır.

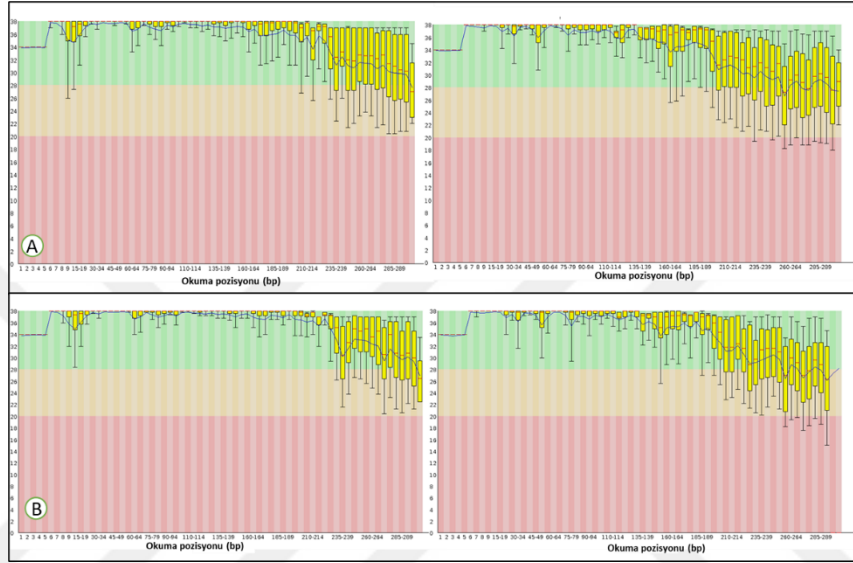


Şekil 4.29 Protokormlardan ekstrakte edilen toplam DNA'nın %1 agaroz jeldeki görüntüsü

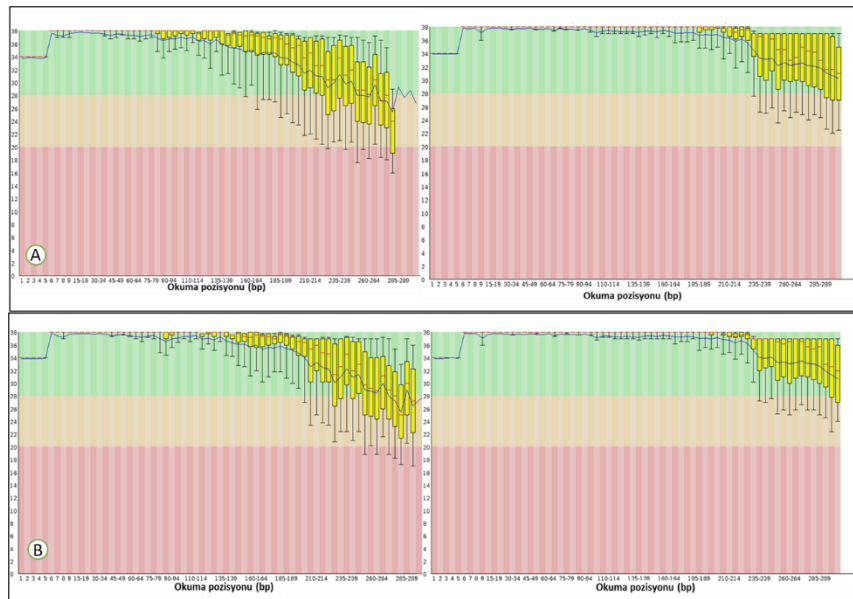
Deney prosedürü, kaydedilen en yüksek glikomannan seviyelerini gösterilen FeNp6'dan ve nanopartikül uygulanmayan Kontrol grubundan toplam DNA'nın ekstraksiyonunu içermektedir. DNA ekstraksiyonu, DNA'nın protokormlardan izole edilmesi için özel olarak tasarlanmış standartlaştırılmış bir protokol takip edilmiştir (Aboul-Maaty ve Oraby, 2019). Ekstraksiyon işleminin ardından elde edilen DNA örnekleri agaroz jel elektroforezi kullanılarak görüntülenmiştir. Jel elektroforezi sonuçları Şekil 4.29'da gösterilmektedir. Bu DNA numuneleri daha sonra metagenomik kütüphane yapmak üzere MacroGen'e gönderilmiştir.

4.7.1. Veri Kalitesi

MacroGen'den elde edilen ileri (F) ve geri (R) dizilerin kalite değerlendirmesi, FastQC programı kullanılarak yapılmıştır. Şekil 4.30 ve 4.31 dizilerin kalitesini göstermektedir. Ağırlıklı olarak yeşil ve sarı bölgelere düşen dizilerin gözlenen dağılımı, iyi ve kabul edilebilir kaliteyi göstermektedir. İllumina ile yapılan dizileme işlemini başarılı olduğunu ve verilerin sonraki biyoinformatik analizler için kullanılabilir (Sewe vd, 2022).



Şekil 4.30 K ve FeBNp'lerle ilişkili bakteri topluluğunun F ve R dizilerinin FastQC Değerlendirmesi



Şekil 4.31 K ve FeBNp'lerle ilişkili fungus topluluğunun F ve R dizilerinin FastQC Değerlendirmesi

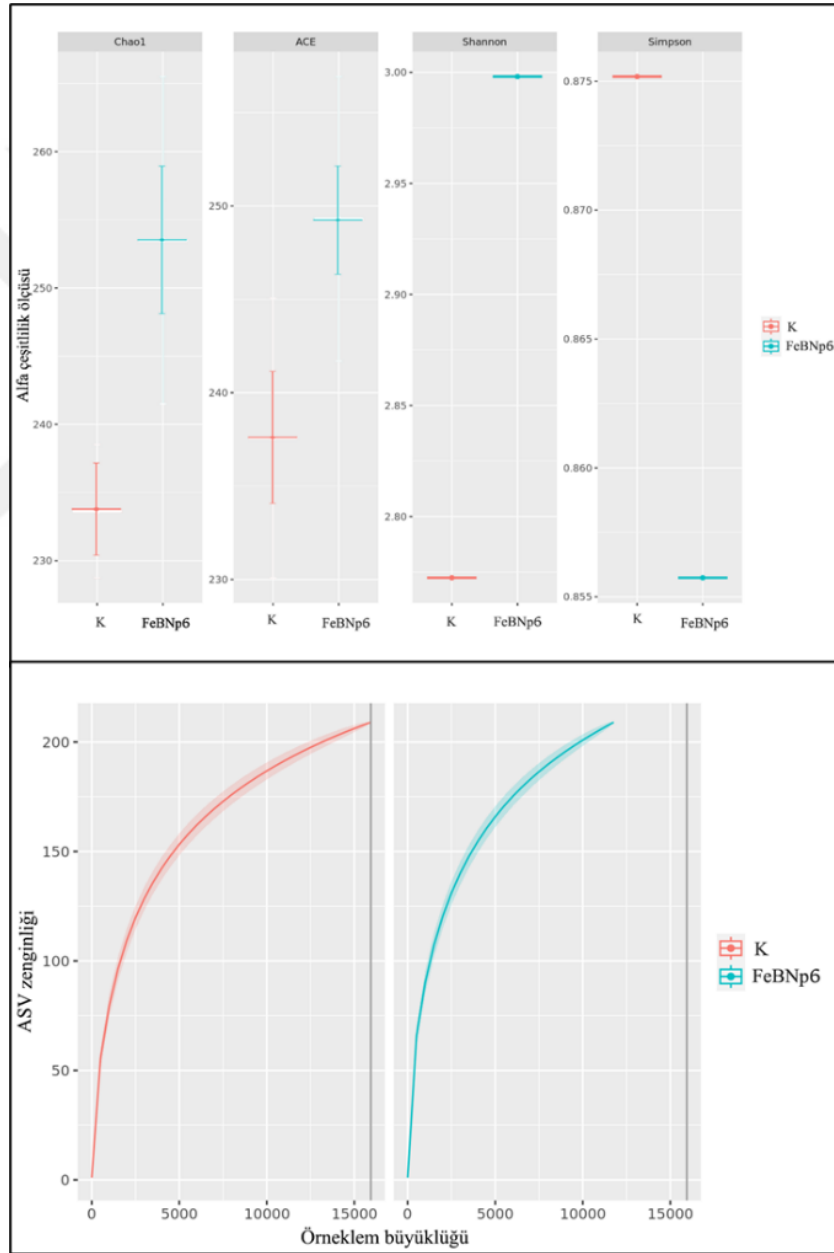
4.7.2. Veri Hazırlığı

Veri analizinin ilk aşaması, birkaç temel adımı kapsayan ham okumaların ön işlenmesini içermektedir. İlk adım, VSEARCH kullanılarak eşleştirilmiş dizilerin birleştirilmesini gerektirmiştir. Sonraki adım ise, Cutadapt aracı kullanılarak bağdaştırıcı dizilerin kaldırılmasını içermektedir. Daha sonra, kimerik dizileri tanımlamak ve atmak için VSEARCH bir kez daha kullanılmıştır. Kimeraları kaldırmanın yanı sıra, önceden işlenmiş okumalar, yinelenen dizileri ortadan kaldıran bir işlem olan dizi çoğaltma işleminden geçirilmiştir.

4.7.3. Bakterilerde Metagenomik Veriler

Tohum mikroflorasındaki alfa çeşitliliğinin değerlendirilmesi, çeşitli ekolojik ve tarımsal çalışmalarda çok önemli bir rol oynamaktadır. Hindistan’da tarım toprağında nanopartiküllerin bitki büyümesini teşvik eden bakteriler üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmada (Chavan ve Nandanathangam, 2019), Chao ve Shannon çeşitlilik indeksleri kullanılmıştır. Alfa çeşitliliğini değerlendiren bu endeksler, nanopartiküller uygulamasına yanıt olarak bakteri türlerinin çeşitliliğine ilişkin bilgiler sunarak, bu parçacıkların topraktaki mikrobiyal bileşimi nasıl etkilediğine ışık tutmaktadır. Tohum miktarının (örnek büyüklüğü) bakteri topluluğunun kompozisyonu üzerindeki etkisine odaklanan başka bir çalışmada, bakteri topluluklarının alfa çeşitliliğini belirlemek için Chao, Simpson ve Shannon çeşitlilik endeksleri kullanılmıştır. Bunu yaparak araştırmacılar, tohum miktarındaki (örnek boyutu) değişikliklerin bakteri türlerinin zenginliğini ve çeşitliliğini nasıl etkilediğini anlayabilmiş ve bakteri ekosisteminin kapsamlı bir resmine katkıda bulunmuşlardır(Q.-L. Chen vd, 2020). Yaygın olarak kullanılan ekolojik çeşitlilik ölçümleri olarak kabul edilen Shannon ve Simpson çeşitlilik endeksleri, birçok çalışmada tutarlı bir şekilde kullanılmıştır. Örneğin, ağır metallerin bakteri toplulukları üzerindeki etkileri üzerine yapılan başka bir çalışmada, bu indeksler toprak bakteri topluluklarının zenginliğini ve çeşitliliğini değerlendirmek için kullanılmıştır. Bunlar, ağır metal kirliliğinin bakteriyel ekosistem üzerindeki etkisinin ve potansiyel ekolojik sonuçların aydınlatılmasına yardımcı olmuştur (Su vd, 2023). Belirtilen endeksler, farklı ekosistemlerdeki türlerin zenginliğini ve çeşitliliğini ölçmek ve karşılaştırmak için değerli araçlar olarak hizmet ederek mikrobiyal çeşitliliğe ilişkin daha geniş bir anlayışa katkıda bulunmaktadır (Feranchuk vd, 2018).

Çalışmamızda elde edilen bulgulara, Kontrol grubu 93.159 diziden oluşurken, FeBNP6'ler örneğinin 98.452 diziden oluştuğu tesbit edilmiştir. Ön işleme adımlarını tamamladıktan sonra, toplam 40.460 okuma (ilk Kontrol grubunun %43'ünü temsil eder) ve 73.839 okuma (ilk FeBNP6'ler örneğinin %75'ini temsil eder) daha fazla analiz için tutulmuştur. Bu rakamlar, ön işleme adımlarının etkisini göstererek, sonraki analiz için yüksek kaliteli okumaların önemli bir kısmının tutulmasını sağlarken, ilk veri kümesinin azalmasına neden olmuştur (Şekil 4.32) .



Şekil 4.32 Bakteriyel alfa çeşitliliğini gösteren grafik

OTU'lar, Kontrol grubu ve FeBNP6'ler için %100'lük bir dizi benzerliği düzeyi ile tanımlanmıştır. Sekansları sınıflandırmak için bakteriler için Silva veri tabanı kullanılmıştır. Tohum mikroplarının alfa çeşitliliği, Şekil 4.32'te gösterilen Chao Shannon, Simpson endeksleri ve seyrekleşme eğrisi kullanılarak değerlendirilmiştir.

Kontrol grubu ve FeBNP6'ler için alfa çeşitliliği indekslerinin (Ace Chao , Simpson ve Shannon) sonuçları Şekil 4.32'de gösterilmiştir. Bu indeksler, her bir numune içindeki türlerin çeşitliliğini değerlendirmemizi sağlayan önemli ölçütlerdir. Ace indeksi, Kontrol grubu için 237.58 ve FeBNP6'ler numunesi için 249.318 değerleri sergilemiştir. Daha yüksek bir As değeri, daha fazla tür zenginliğini gösterir, bu da FeBNP6'ler örneğinin Kontrol grubuna kıyasla biraz daha yüksek sayıda tür barındırabileceğini düşündürmektedir. Benzer şekilde, tür zenginliğinin başka bir göstergesi olan Chao indeksi, Kontrol grubu için 233,625 ve FeBNP6'ler örneği için 253,5 değerleri göstermiştir. Ace indeksinde olduğu gibi, FeBNP6'ler numunesindeki daha yüksek Chao değeri, numune Kontrol grubuna kıyasla o numunede potansiyel olarak daha yüksek sayıda tür anlamına gelmektedir.

Öte yandan, türlerin düzgünlüğünü ölçen Simpson indeksi, Kontrol grubu için 0,87 ve FeBNP6'ler örneği için 0,85 değerlerini göstermiştir. Düşük Simpson değerleri, daha yüksek çeşitliliği göstermiş; bu sonuçta, FeBNP6'ler örneğinin, Kontrol grubuna kıyasla biraz daha yüksek tür dağılımı düzgünlüğüne sahip olabileceğini düşündürmüştür. Son olarak, aynı zamanda tür düzgünlüğünün bir göstergesi olan Shannon indeksi, Kontrol grubu için 2,772 ve FeBNP6'ler örneği için 2,998 değerlerini göstermiştir. Daha yüksek Shannon değerleri, daha yüksek çeşitliliği göstermektedir; bu sonuç, FeBNP6'ler örneğinin, Kontrol grubuna kıyasla daha eşit bir tür dağılımı sergileyebileceğini göstermiştir.

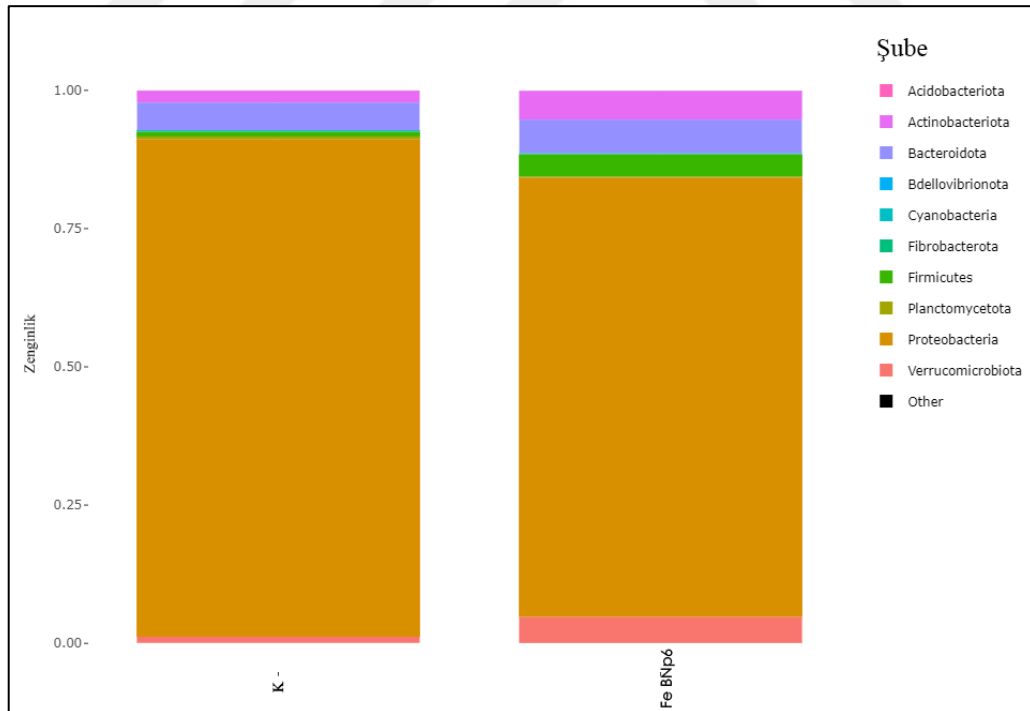
Çalışmamızdaki tohum mikroorganizmalarının (Chao-Shannon ve Simpson) endekslerini ve Şekil 3 ve 4'te gösterilen kıtlık (rarefaction) eğrisini kullanarak yapılan alfa çeşitlilik analizi, kayda değer bilgiler vermiştir. Bulgularımız, nanopartiküllerin eklenmesinin tohumlardaki mikrobiyal çeşitlilik üzerinde fark edilebilir bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Muamele edilen örneklerde Zhao-Shannon ve Simpson endekslerinin artan değerleri, hem bakteri hem de fungus türlerinin çeşitliliğinin daha yüksek olduğu anlamına gelir. Alfa

çeşitliliğindeki bu artış, kontrol örnekleriyle karşılaştırıldığında nanopartiküllere maruz kalan tohumlarda gelişen mikroorganizma çeşitliliğinin daha fazla olduğuna işaret etmektedir.

Bu bulguların tarım, çevre iyileştirme ve mikrobiyal toplulukların kritik bir rol oynadığı diğer alanlar için olumlu etkileri olabilir. Ayrıca, biyolojik nanopartiküllerin geleneksel kimyasal tedavilere karşı uygulanabilir ve çevre dostu bir alternatif olabileceğini öne sürdüğü için güvenlik yönü çok önemlidir. İlk sonuçlar umut verici olsa da, biyolojik nanopartiküllerin sürekli araştırılması ve sorumlu bir şekilde uygulanması, çevreyi ve insan sağlığını korurken potansiyel faydalarından yararlanmak için çok önemlidir.

4.7.3.1. Şube Ve Cins Seviyelerinde Orkide Bakteri Topluluğu

Taksonomik analizin, ilk 10 şube ve ilk 10 cinse odaklanarak şube ve cins taksonomik seviyelerinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 4-33). Tüm örneklerde, Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria ve Verrucomicrobia'nın baskın filum olduğu bulunmuştur. Proteobacteria, hem kontrol grubunda hem de FeBNP6'ler ile uygulama yapılan grupta en yüksek zenginliğini sergilenmiştir.



Şekil 4.33 Bakteriyel mikrobiyotanın şube düzeyinde taksonomik bileşimi

Ancak FeBNP6'ler grubu, Kontrol grubuna (%89,9) kıyasla biraz daha düşük Proteobacteria oranı (%79,40) göstermiştir. Tersine, Actinobacteria (%2,16 - %5,27), Bacteroidetes (%4,96 - %6,06), Firmicutes (%0,08 - %3,99) ve Verrucomicrobia (%1,18 - %4,74) Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında FeBNP6'ler örneğinde daha yüksek zenginliği göstermiştir.

FeBNP6'ler'da Acidobacteriota, Verrucomicrobiota ve Firmicutes gibi bazı filumların bolluğunun artması, Fe NP'lerin tohumlarla ilişkili bakteri topluluğunun bileşimi üzerindeki potansiyel etkisini göstermektedir.

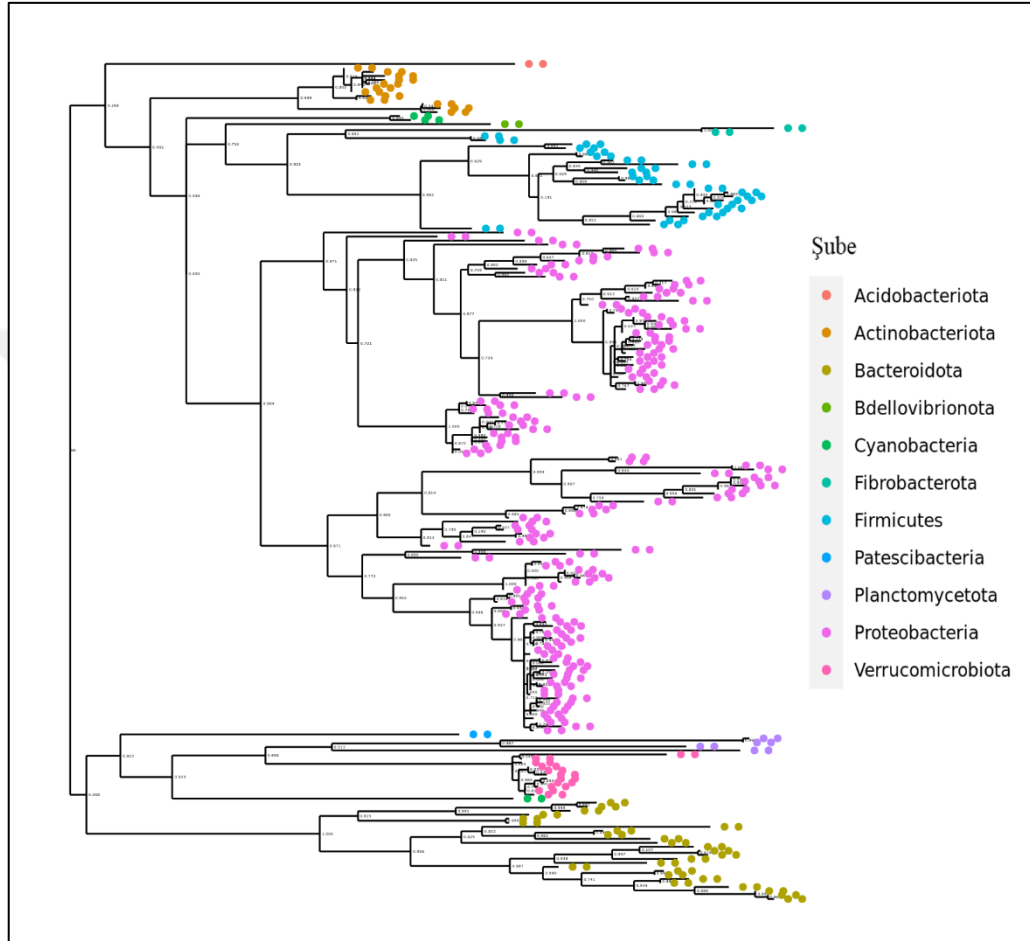
FeBNP6'ler nanopartiküllerinin varlığında *Asidobacteriota*, *Verrucomicrobiota* ve *Firmicutes* gibi belirli filumların artan bolluğu, bunların tohumla ilişkili bakteri topluluğunun bileşimi üzerindeki potansiyel etkilerini göstermektedir (Chavan ve Nandanathan, 2019; Frenk vd, 2013). Bu şubeler bitki sağlığı ve büyümesinde kritik roller oynamaktadırlar. Asidobakter toplulukları bitki-toprak ekosistemlerindeki nitrojen döngüsünün merkezinde yer almaktadır (Chavan ve Nandanathan, 2019). *Verrucomicrobia* üyeleri ve diğer rizosferle ilişkili şubeler, mısır kökleriyle faydalı bitki-mikrop etkileşimleri kurabilmektedirler (Aguirre-von-Wobeser vd, 2018). Rizosferin endofitik bölümünde baskın olan Firmicutes, rizosfer mikrobiyomuna önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Bu mikrobiyal topluluklar genel bitki sağlığı ve büyümesi için gereklidirler (Ha vd, 2021).

Şekil 4.34'deki renkli filogenetik ağaç, *Asidobacteriota*, *Actinobacteriota*, *Proteobakteriler*, *Cyanobacteria*, *Fibrobacterota*, *Bdellovibrionota*, *Planctomycetota*, *Bacteroidota*, *Verrucomicrobiota* ve *Patescibacteria* dahil olmak üzere çok çeşitli bakteri şubelerini sergileyerek *Anacamptis laxiflora* tohumları içindeki bakteri topluluğuna dair fikir vermiştir.

Bu filogenetik ağaçtan görüleceği gibi, en büyük ve yaygın grubunun Proteobacteria olduğu görülmekte ve diğer grupların ilişkileri ve dairesi değerlendirilmektedir.

Bu ilişkiler, paylaşılan ortak özellikler veya evrimsel mekanizmalar bağlamında bu dinamikleri daha iyi anlamak, çeşitli orkide türlerinde ve zaman içinde bu bakteri şubelerinin bileşiminde ve bolluğunda meydana gelen değişiklikleri izlemek ve birtakım süreçlerle ilişkilerini bağlantılandırmak bakımından önemli olacaktır. Bu tür araştırmalar, orkide tohumu mikrobiyomunun

stabilitesi ve esnekliği hakkında değerli bilgiler sağlayacak olup söz konusu veriler orkideler özellikle de karasal orkideler için öncül veriler olma özelliği taşımaktadır.

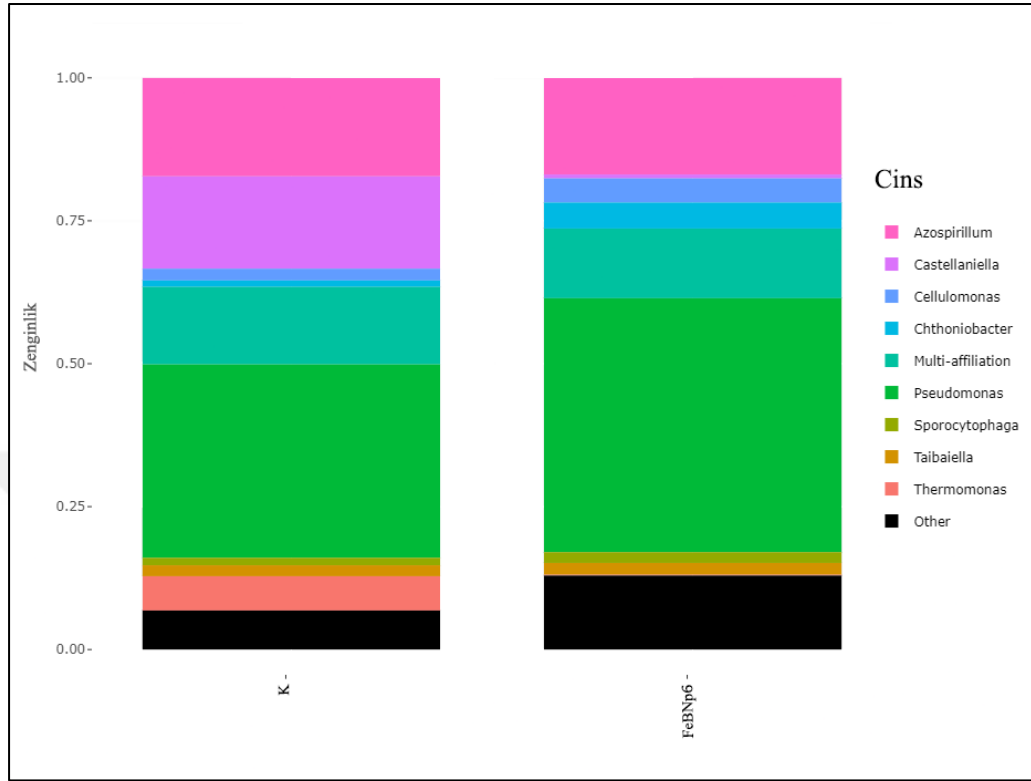


Şekil 4.34 *Anacamptis laxiflora* protokormlarındaki bakteri topluluklarının filogenetik çeşitliliği

Cins düzeyinde, çeşitlilikte daha da belirgin farklılıklar gözlenmiştir. FeBNP6'ler ile işlenmiş numunede *Pseudomonas* (%34,24 - %44,49), *Cellulomonas* (%1,95 - %4,52) ve *Chthoniobacter*'in (%1,17 - %4,74) K'ye kıyasla daha bol olduğu bulunmuştur. *Castellaniella* (%0,79 - %16,16) ve *Thermomonas* (%0,10 - %6,32) K'de FeBNP6'ler ile işlenmiş numuneye göre daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4.35).

Dikkat çekici bir şekilde, FeBNP6'ler nanopartiküller uygulamasının *Azospirillum*, *Sphingomonas*, *Sporocytophaga* ve *Taibaiella* cinsinin bolluğu üzerinde önemli bir etkisi olmamıştır. Bu cinsler, Kontrol grubu ile

karşılaştırıldığında FeBNP6'ler grubunda benzer veya yakından eşleşen zenginlik seviyeleri sergilemiştir.



Şekil 4.35 Bakteriyel mikrobiyotanın cins düzeyinde taksonomik bileşimi

FeBNP6'ler nanopartiküllerinin varlığı cins düzeyinde, *Pseudomonas*, *Cellulomonas* ve *Chthoniobacter* cinslerinde görüldüğü gibi tohumla ilişkili bakteri topluluğunun kompozisyonunu da etkilemektedir. *Pseudomonas*'ın tohum çimlenmesi üzerinde faydalı veya zararlı etkileri olabilir. Bazı *Pseudomonas* türleri, çimlenmeyi ve fide büyümesini artıran bitki büyümesini teşvik eden maddeler (PGPS) üretirken, diğerleri çimlenmeyi toksinlerle engelleyebilmektedir (Chahtane vd, 2018). Örneğin, *Pseudomonas putida*, tohum çimlenmesini ve kök büyümesini uyaran PGPR indol-3-asetik asidi (IAA) üretmektedir (Jin vd, 2022). Diğer çalışmalarda, orkide rizosferinde IAA üreten *Mycobacterium* türleri tanımlanmış ve buğday rizosferinde *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Cellulomonas*, *Mycoplasma* ve *Rahnella* rapor edilmiştir (Q.-L. Chen vd, 2020; Kumar vd, 2022).

Özellikle FeBNP6'ler uygulaması, PGPR olarak bilinen *Azospirillum*, *Sphingomonas*, *Sporocytophaga* ve *Taibaiella* gibi belirli cinslerin bolluğunu önemli ölçüde etkilememiştir. Bu PGPR cinsleri, onları FeBNP6'ler

nanopartiküllerinin varlığına karşı daha az duyarlı hale getiren mekanizmalara sahip olabilir ve bu da çevresel değişiklikler karşısında potansiyel dirençlerini vurgulamaktadır.

FeBNP6'ler uygulamasının tohumla ilişkili bakteri topluluğunda potansiyel olarak zararlı mikroorganizmaların varlığını azaltarak koruyucu bir etkiye de sahip olabileceğini göstermektedir. Bu dinamiklerin kapsamlı bir şekilde anlaşılması, Fe NP'lerin bitki büyümesi ve sağlığı üzerindeki olumlu etkilerinden yararlanırken potansiyel riskleri azaltmak için çok önemlidir. Bu etkileşimleri destekleyen mekanizmaları ve bunların bitki ekosistemleri üzerindeki kalıcı sonuçlarını incelemek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

4.7.3.1. Bakteri toplulukların fonksiyonel potansiyeli

PICRUSt'ı kullanarak mikrobiyal toplulukların tahminine dayalı fonksiyonel profilin çıkarılması, toprak bakterilerinin çoğunluğunu oluşturan kültürü yapılabilir ve kültürü yapılamayan bakterilerin rollerinin değerlendirilmesinde değerli bir araçtır. Bu teknik, mikrobiyal toplulukların işlevsel yeteneklerini tahmin etmek için 16S rRNA gibi işaretleyici gen dizilerinin kullanılmasını içermektedir (Langille vd, 2013; Oyewusi vd, 2021). Mikrobiyal toplulukların karmaşık dünyasında, hücresel süreç yolları, çevresel süreç yolları, genetik bilgi işleme ve metabolit yollar, hücrelerin birbirleriyle iletişim kurmasını ve etkileşime girmesini sağlamada çok önemli bir rol oynamaktadır (Huang vd, 2011; Wang ve Lei, 2018).

PICRUSt analizi, Kontrol grubu ve FeBNP6'ler'nın hepsinin bakteri popülasyonunda zenginleştirilmiş fonksiyonel profillere sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. PICRUSt analizi sonuçlarına göre, orkide tohumlarının nanopartiküllerle işlenmesi, K'ye kıyasla mikrobiyal toplulukların metabolik yollarında yer alan daha fazla sayıda gen, yol, birim, ortolog ve enzimin varlığına yol açmıştır. Çalışmamızda örneklerin ikisinde %1,00'i aşan göreceli bolluk sergilenmiş ve bunlardan 43 dominant yol olarak belirlenmiştir.

FeBNP6'ler grubunda, Kontrol grubugrubuna kıyasla hücresel süreç yollarının bolluğunda dikkate değer bir artış söz konusu olmuştur (Şekil 4.36 ve 4.37). Bu yollar, "Hücresel topluluk - prokaryotlar", "Biyofilm oluşumu", "Hücre büyümesi ve ölümü", "Hücre döngüsü - Caulobacter", "Hücre hareketliliği",

"Bakteriyel kemotaksi" ve "Apoptoz" gibi temel işlevlerini içermektedir. Bu sonuç, FeBNP6'ler grubundaki mikrobiyal toplulukların büyüme, hareket ve topluluk etkileşimleriyle ilişkili daha geniş bir hücrel aktivite yelpazesinde yer aldığını göstermektedir. İlginç bir şekilde, bu yollar arasında Kontrol grubunda daha fazla bolluk gösteren tek yol "Hücre hareketliliği"ydi. Spesifik olarak, "Hücre hareketliliği; Flagellar düzeneği" yolu, FeBNP6'ler grubuna kıyasla Kontrol grubunda daha belirgin olmuştur.

Hücrel süreç yolları, hücrel topluluk oluşumu, biyofilm gelişimi, çekirdek algılama- quorum sensing ve genetik materyal değişimi dahil olmak üzere çok çeşitli aktiviteleri kapsamaktadır. Bu yolların özellikle ilgi çekici yönlerinden biri, Fe iyonunun da aralarında bulunduğu dış faktörlere karşı tepki vermeleridir. Bunun, Fe'nin, hücrelerarası etkileşimde yer alan proteinlerin üretimini uyaran bir sinyal molekülü olarak hareket edebilmesi gerçeğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda FeBNP6'ler, mikrobiyal topluluklar içindeki hücrel süreç yollarının düzenlenmesinde önemli oyuncular olarak ortaya çıkmaktadır. Bu yollarda, özellikle FeBNP6'lerinin varlığında gözlenen artış, mikrobiyal topluluk içindeki metabolik aktivitelerde ve etkileşimlerde dinamik değişiklikler olduğunu göstermektedir. Bu fenomenin, Fe'nin bir sinyal molekülü olarak işlev görme yeteneğinden kaynaklandığı ve böylece hücreden hücreye iletişime katılan proteinlerin sentezini tetiklediği ileri sürülmektedir (Mense ve Zhang, 2006). Bu yolların en önemlileri arasında hücrel süreç yollarının sayısında önemli bir artış yaşandı. Bakteriler için kemotaksi, nanopartiküllerle tuzlanan numunedeki tüm yollar arasında en yüksekti. Kemotaksis, hücrelerin çevrelerindeki kimyasal değişimleri algılayıp daha uygun koşullara doğru hareket etme sürecidir (Wadhams ve Armitage, 2004).

Çevresel bilgi işleme ile ilgili yollar incelendiğinde "membran taşıma; bakteriyel salgı sistemi" yolunun FeBNP6'ler grubunda Kontrol grubuna göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç, FeBNP6'ler grubundaki mikrobiyal toplulukların, özellikle bakteriyel salgı sistemleri yoluyla, moleküllerin membranlar boyunca taşınmasını içeren süreçlere aktif olarak katıldığını göstermektedir (Caza ve Kronstad, 2013).

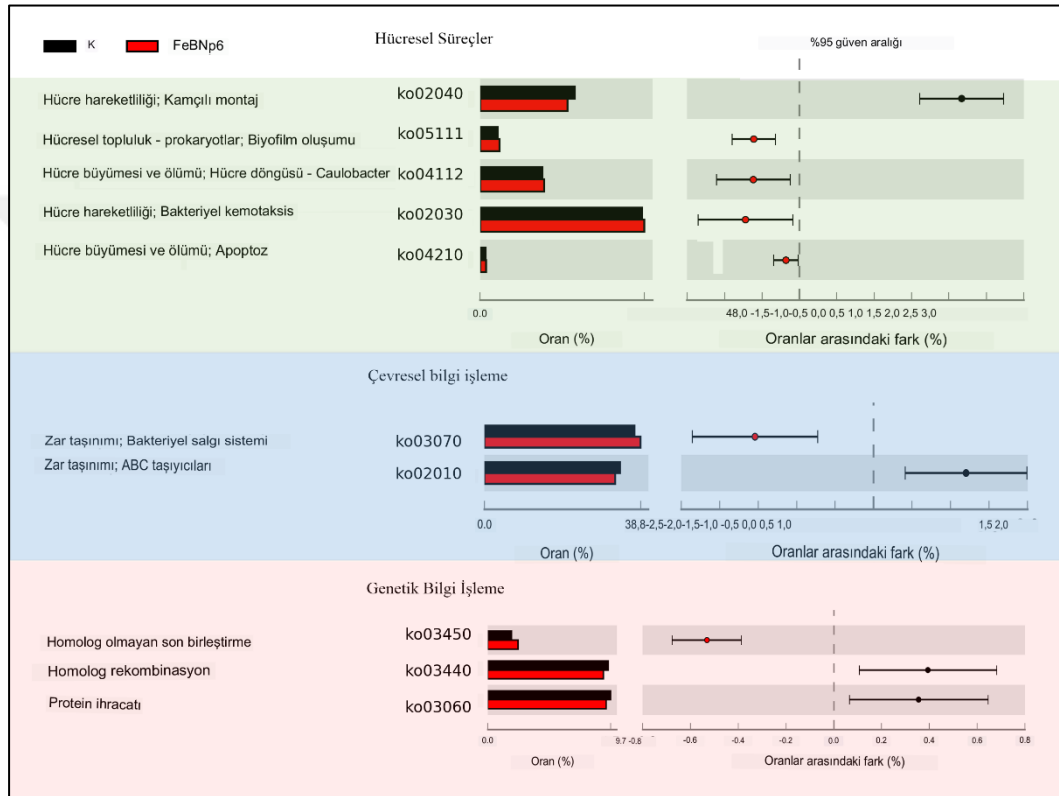
Bunun aksine, "membran taşıma; ABC taşıyıcıları" yolu, Kontrol grubunda daha yüksek bir bolluk göstermiştir. Bu sonuç, Kontrol grubunda ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcılarını içeren farklı tipte bir membran taşıma mekanizmasına vurgu yapıldığını göstermektedir. Bu taşıyıcılar, ATP'den elde edilen enerjiyi kullanarak çeşitli maddelerin hücre zarları boyunca taşınmasından sorumludur (Locher, 2009).

Çevresel süreçler iki önemli yolu içerir. Bu yollardan biri, bakteri hücrelerinden proteinlerin ve çeşitli moleküllerin dışarı aktarılması için önemli bir mekanizma olan bakteri salgılama sisteminin etrafında yoğunlaşır. Bu mekanizma bakterilerin toksinlerden ve zararlı maddelerden arınması için hayati öneme sahiptir. Bakteriyel salgı sistemi içinde, katlanmamış proteinleri bakteriyel membran boyunca taşıyan Sec yolu ve aktif demirin dış membran taşınmasını kolaylaştıran TonB'ye bağımlı yol dahil olmak üzere çeşitli yollar mevcuttur. Toplamda, substrat taşınması, proteinlerin hücre yüzeyinde açığa çıkarılması, pililerin birleştirilmesi ve daha fazlası gibi çeşitli hücresel işlemlerde yer alan 11 farklı salgı yolu (T1SS-T11SS) vardır (Tseng vd, 2009). Fe NP'ler varlığında bakteriler, bu nanopartikülleri hücreden uzaklaştırmak için bakteriyel salgı sistemi yolunun ekspresyonunu artırabilir. Bu savunma mekanizması bakterilerin nanopartiküllerin zararlı etkilerinden korunmasına yardımcı olur (Hajipour vd, 2021).

Çalışmada gözlemlenen ikinci yol, demir nanopartiküllerinin varlığının, membran taşınmasından sorumlu olan ABC taşıyıcı yolunun ifadesinde bir azalmaya yol açtığını ortaya çıkarmış. Bu, bakterilerin nanopartiküllere maruz kaldıklarında küçük molekülleri hücre zarı boyunca taşımada zorluklarla karşılaştığı anlamına gelmektedir. Aktivitedeki bu düşüş, nanopartiküllerin taşıyıcıları engellemesine veya hücre zarının bütünlüğünü tehlikeye atmasına bağlanabilir (Tanaka vd, 2018).

Genetik Bilgi İşleme ile ilişkili yollar incelenirken ortama nanopartiküllerin eklenmesinin belirli yolların bolluğunda azalmaya yol açtığı gözlemlenmiştir. Spesifik olarak, "homolog olmayan uç birleştirme", "homolog rekombinasyon" ve "protein ihracı-ihracatı" yollarının tümü, nanopartiküllerin varlığına yanıt olarak azalan bolluk sergilemiştir.

Bu, nanopartiküllerin tanıtılmasının mikrobiyal topluluklardaki genetik bilgi işleme mekanizmalarını etkilemiş olabileceğini düşündürmektedir. DNA onarımı ve rekombinasyonuyla ilgili yolların (homolog olmayan uç birleştirme ve homolog rekombinasyon) yanı sıra hücrelerden protein ihraç etmeyle ilgili yolların (protein ihracatı) nanopartiküllerin varlığında daha az aktif olduğu görüldü.



Şekil 4.36 Bacterial toplulukların hüresel süreç yolları, çevresel süreç yolları, genetik bilgi işleme yolları

Metabolizma yolları incelendiğinde ve Kontrol grubu ile kıyaslandığında, kaprolaktam bozunması, siyanoamino asit metabolizması, kloroalkan ve kloroalken bozunması, stiren bozunması, arginin ve prolin metabolizması, benzoat bozunması, limonen ve pinen bozunması, beta-Alanin metabolizması, glutatyon metabolizması, glisin, serin ve treonin metabolizması, triptofan metabolizması, ksenobiyotiklerin sitokrom P450 ile metabolizması, pentoz fosfat yolu, ansamisin biyosentezi, geraniol bozunması ve selenobileşik metabolizması dahil olmak üzere çeşitli yollarda kayda değer bir bolluk artışı gözlenmiştir (Şekil 4.37).

Bu bulgu, nanopartiküllerin eklenmesinin mikrobiyal topluluklar içindeki metabolik aktiviteleri etkilediğini göstermektedir. Bu yollar, kaprolaktam ve stiren gibi karmaşık bileşiklerin parçalanması, amino asitlerin ve ksenobiyotik metabolizması, pentoz fosfat yolu ve geraniol gibi yollar aracılığıyla farklı enerji kaynaklarının kullanılması ve ansamisinler gibi bazı bileşiklerin sentezi gibi çeşitli önemli süreçlerle ilişkilidir. Bu yolların bolluğunda gözlemlenen artış, nanopartiküller maruziyetine yanıt olarak meydana gelen potansiyel metabolik ayarlamalara işaret etmektedir.

Bakteri topluluğunun dahil olduğu metabolik süreçler, tohumlarda enerji üretimini arttırmada çok önemli bir rol oynar. Bitkiler çimlenme sürecini başlatmak için yeterli enerjiye ihtiyaç duyduğundan bu çok önemlidir. Ayrıca kaprolaktam, siyanoasit, kloroalkan, stiren, benzoat, limonen ve pinen gibi çeşitli bileşiklerin metabolizması bu artan enerji üretimine katkıda bulunabilir.

Enerji üretiminin yanı sıra arginin, prolin, glisin, serin, treonin ve triptofan metabolizmasından sorumlu metabolik yollar tohumlarda amino asit üretimini uyarabilir. Bu amino asitler, tüm hücrel yapıların temel bileşenleri olan proteinler için hayati yapı taşları görevi görür.

Dahası, ksenobiyotiklerin sitokrom P450, pentoz fosfat yolu ve ansamisin biyosentezi yoluyla metabolizması, tohumlardaki hormon üretimini artırabilir. Hormonlar bitkilerin büyüme ve gelişmesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Bitkinin dayanıklılığını daha da güçlendirmek için glutatyon gibi antioksidan amino asitler bitkinin serbest radikallerin neden olduğu hasardan korunmasında rol oynar.

Genel olarak çalışma, orkide tohumlarının FeBNP6'lerle işlenmesinin, Kontrol grubuna kıyasla mikrobiyal topluluklar içinde daha yüksek çeşitliliğe ve fonksiyonel yolların bolluğuna yol açtığını öne sürmektedir. Bu sonuç, nanopartiküllerin bu toplulukların metabolik yeteneklerini etkilemiş olabileceğini ve potansiyel olarak orkidelerin büyümesini ve sağlığını etkileyebileceğini göstermektedir.



Şekil 4.37 Bakteriyel toplulukların metabolizma yolları

4.7.4. Funguslarda Metagenomik Veriler

Fungus topluluğunun analizinden elde edilen sonuçlar, Kontrol grubunun 100,142 diziden, "FeBNP6'ler" örneğinin ise 93.159 diziden oluştuğunu ortaya koyulmuştur. Ön işleme adımlarını tamamladıktan sonra, toplam 79,838 okuma (ilk Kontrol grubunun %81'ünü temsil eder) ve 93,716 okuma (ilk FeBNP6'ler örneğinin %90'ini temsil eder) daha fazla analiz için tutulmuştur. Bu rakamlar, ön işleme adımlarının etkisini göstererek, sonraki analiz için yüksek kaliteli okumaların önemli bir kısmının tutulmasını sağlarken, ilk veri kümesinin azalmasına neden olmaktadır.

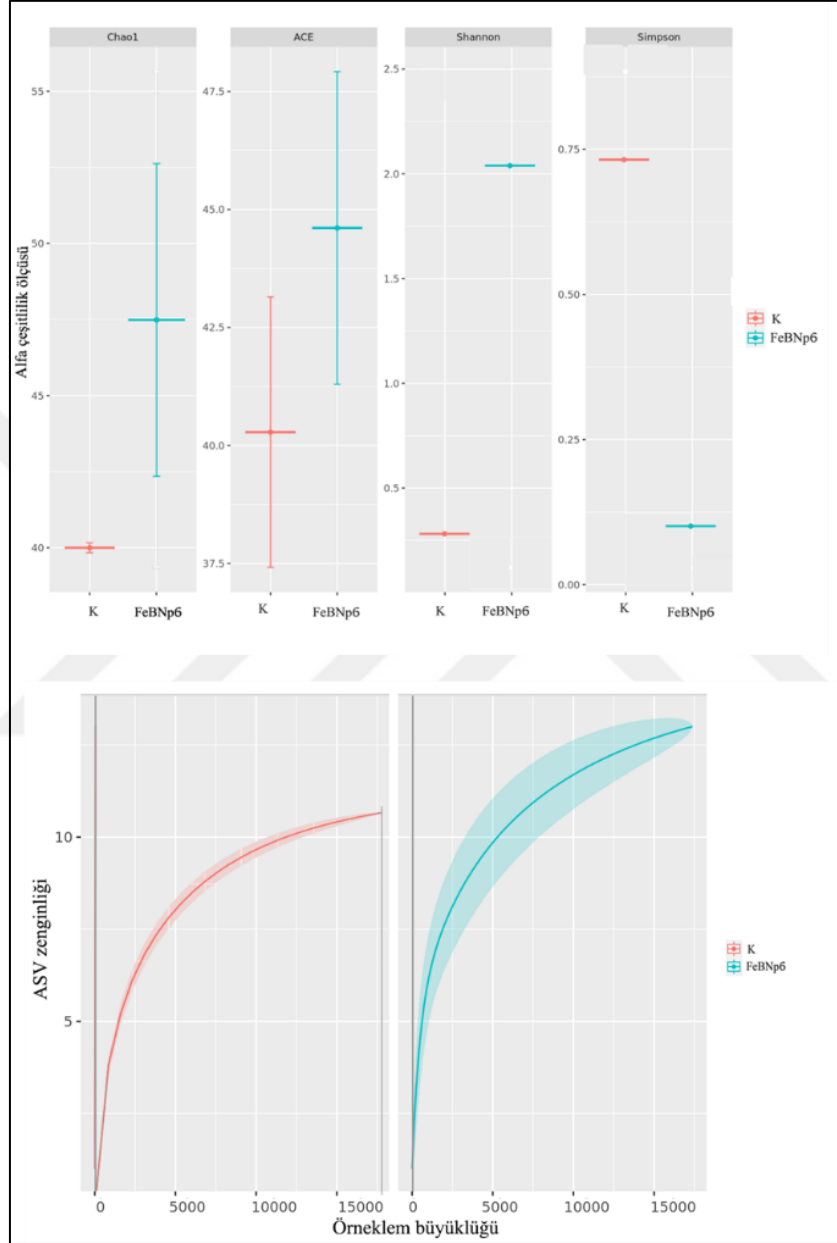
OTU'lar, Kontrol grubu ve FeBNP6'ler için %100'lük bir dizi benzerliği düzeyi ile tanımlanmıştır. Fungusları sınıflandırmak için UNITE veri tabanı kullanılmıştır. Tohum mikropalarının alfa çeşitliliği, Şekil 3'te gösterilen Chao, ACE, Shannona Simpson endeksleri ve seyrekleşme eğrisi kullanılarak değerlendirilmiştir.

Şekilde Kontrol grubu ve "FeBNP6'ler" için çeşitlilik indeksleri (Chao1, ACE, Shannon ve Simpson) sunulmaktadır. Kontrol grubu, 40,2'lik bir Chao1 değeri ve 41,5'lik bir ACE değeri göstermektedir, bu sonuç, nadir olanlar da dahil olmak üzere nispeten zengin bir tür çeşitliliğine işaret etmektedir. Benzer şekilde, "FeBNP6'ler" örneği daha yüksek Chao1 (47.3) ve ACE (44.3) değerlerini sergilemiştir; bu da muhtemelen nadir türleri de kapsayan, potansiyel olarak daha da zengin bir tür çeşitliliğine işaret etmektedir.

Shannon çeşitlilik indeksine geçerek, bir topluluktaki hem tür zenginliğini hem de eşitliği ölçer. Kontrol grubu, 0,2'lik bir Shannon indeksi sergilemekte, bu da bu örnekte sınırlı çeşitlilik ve eşitlik olduğunu göstermektedir. Bunun aksine, "FeBNP6'ler" örneği daha yüksek bir Shannon indeksi 2 sergilemekte, bu da daha fazla çeşitlilik ve daha dengeli tür dağılımı anlamına gelmektedir. Kontrol grubun örneği için Shannon endeksinin 0,2 olması, eşit olmayan bolluğa sahip birkaç türün hakim olduğu bir topluluğun göstergesi olabileceğinin belirtilmesi gerekmektedir.

Son olarak Simpson indeksi, rastgele seçilen iki bireyin aynı türe ait olma olasılığını değerlendirerek tür eşitliğini değerlendirmektedir. Kontrol grubu , 0,68'lik bir Simpson endeksini sergilemekte, bu sonuçta orta düzeyde bir çeşitlilik

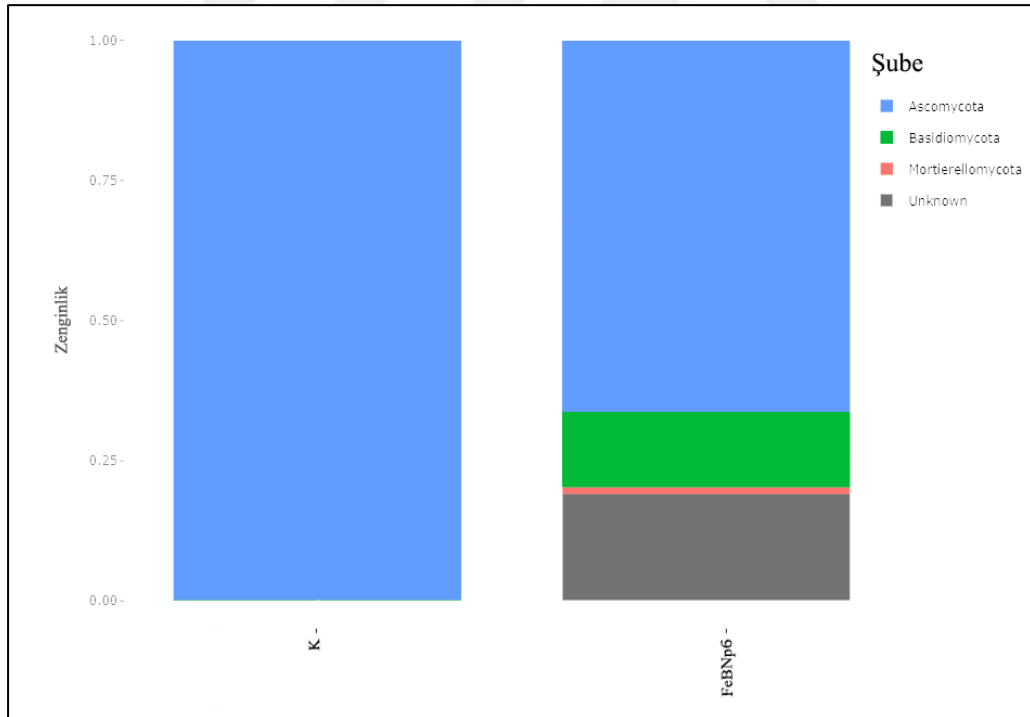
ve bazı türlerin nispeten daha yüksek hakimiyetine işaret etmektedir. Buna karşılık, "FeBNp6'ler" örneği 0,09'luk daha düşük bir Simpson indeksi sergilemektedir, bu da daha fazla çeşitliliğe ve daha adil tür dağılımına işaret etmektedir (Şekil 4.38).



Şekil 4.38 Fungusların alfa çeşitliliğini gösteren grafik

4.7.4.1. Şube ve cins seviyelerinde orkide fungus topluluğu

Gelişmiş moleküler tekniklerin uygulanması yoluyla, FeBNP6 nanopartiküllerinin fungus topluluklarının karmaşık yapısı üzerindeki potansiyel etkilerine ilişkin, özellikle Şube ve cins düzeyinde incelendiğinde değerli bilgiler toplanmıştır. FeBNP6 fungus ekosistemine dahil edilmesi, hem fiziksel hem de kimyasal ortamda belirgin değişikliklere neden olmuş ve sonuç olarak belirli fungus taksonlarının lehine seçici baskılar uygulamıştır. Bu karışıklığın göze çarpan bir sonucu, FeBNP6'ler ile muamele edilen deneysel numunede baskın asomisetlerin prevalansında %66,26'ya varan önemli azalmadır. FeBNP6'ler'nın tanıtılmasının, özellikle Basidiomycota ve Mortierellomycota olmak üzere iki taksonomik grubun ortaya çıkmasına yol açması dikkat çekicidir (Şekil 4.39). Bu gözlem, demir nanopartiküllerinin etkisine maruz kaldıklarında rekabetçi yeteneklerinde veya uyum sağlamalarında bir potansiyel olduğunu göstermiştir.

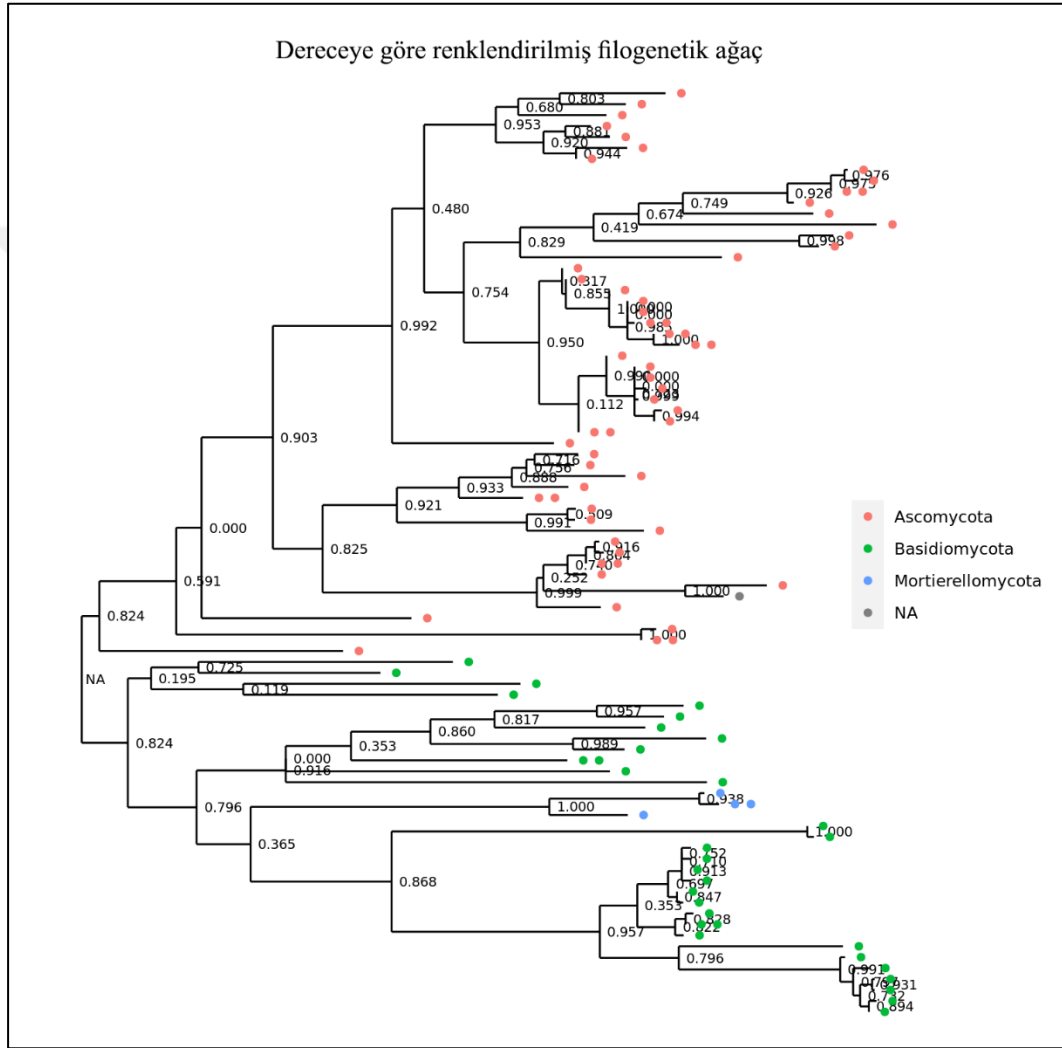


Şekil 4.39 Fungal mikrobiyotanın şube düzeyinde taksonomik bileşimi

Şekil 4.40'daki renkli filogenetik ağaç, *Anacamptis laxiflora* tohumlarındaki şube düzeyindeki mantar topluluğuna ilişkin değerli bilgiler vermiştir. Özellikle *Ascomycota*, ve *Basidiomycota* üyelerinin dominant ve

yaygın formlar olduğu görülmüş ve diğer gruplarla olan ilişkilerde söz konusu ağaçta gösterilmiştir.

Orkide tohumu fungal mikrobiyomu içindeki bu farklı fungal soyların evrimi ve bunların bir arada varlığını etkileyen spesifik mekanizmalar ve faktörleri ortaya çıkarmak ve orkidelerin gelişmeleri açısından bu verileri kullanabilmek için daha çok araştırma ve analize gerek duyulmaktadır.



Şekil 4.40 *Anacamptis laxiflora* protokormlarındaki fungus topluluklarının filogenetik çeşitliliği

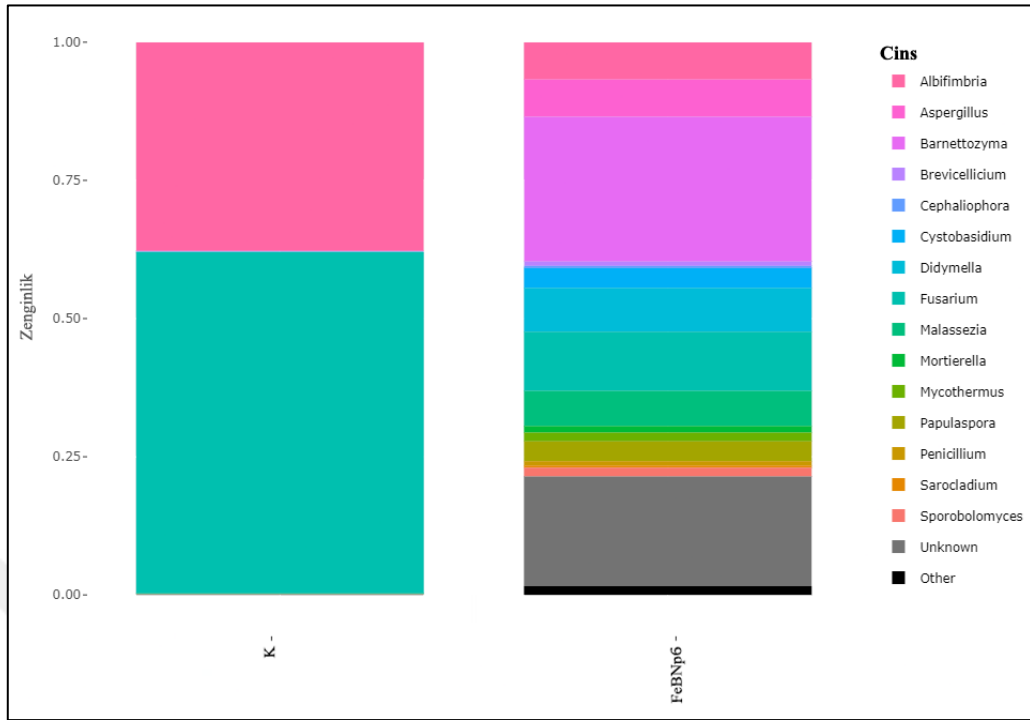
Kontrol grubunda fungus topluluğu, *Albifimbria* ve *Fusarium* olmak üzere iki cinsin baskınlığı ile karakterize edilmiştir. Özellikle *Fusarium*, fungus popülasyonunun önemli bir bölümünü (%61,17'sini) oluşturan olağanüstü bir yaygınlık sergilemiş ve bu da onun belirgin baskınlığının altını çizmektedir.

Albifimbria, topluluğun yaklaşık %37,67'sini oluştururken, hakim cinslerden biri olarak önem taşımaktadır.

Bununla birlikte, FeBNP6'ler ile muamele edilmiş numunedeki fungus topluluğu bileşimi, bazı farklılıklar sergilemiştir. *Barnettozyma* cinsi, topluluğun yaklaşık %26,19'unu temsil ederek ve diğer cinslere göre önemli bir bolluk sergileyerek en baskın tür olarak ortaya çıkmıştır. *Fusarium*, kontrole kıyasla azalmış olsa da, hâlâ topluluğun %10,71'ini oluşturmakta ve en bol bulunan ikinci tür olarak önemli bir varlığını sürdürmektedir.

Aspergillus, *Didymella*, *Albifimbria*, *Malassezia*, *Cystobasidium*, *Papulaspora*, *Mycothermus* ve *Sporobolomyces* cinsleri fungus topluluğu içinde bol miktarda bulunarak popülasyona sırasıyla %1,58, %7,74, %7,93, %6,63, %6,34, %3,57, %3,37, %1,58 ve %1,58 oranlarda katkıda bulunmuştur. Kolektif varlıkları, numunenin çeşitliliğini önemli ölçüde zenginleştirmiş olup bu sonuç, potansiyel olarak daha geniş bir yelpazedeki ekolojik nişlerin veya işlenmiş ortamdaki etkileşimlerin göstergesidir (Şekil 4.41).

Topluluğun dikkate değer bir kısmının (yaklaşık %19,32) "Bilinmeyen" kategorisine girmesi, karakterize edilmemiş veya yeni fungus taksonlarının potansiyel varlığını akla getirmektedir. Ek olarak, "Diğer" olarak etiketlenen farklı bir kategori, fungus topluluğunun %5,1'ini temsil etmektedir, bu da, muamele edilen numunede daha az miktarda bulunan ek cinslerin varlığına işaret etmektedir.



Şekil 4.41 Fungal mikrobiyotanın cins düzeyinde taksonomik bileşimi

FeBNP6 uygulamasına yanıt olarak fungus topluluğu içindeki cinslerin baskınlığı ve çeşitliliğinde gözlenen bu kaymalar, filum seviyesindeki daha geniş bulgularla uyumludur. Bu cinslerin değiştirilmiş bileşimi ve göreceli bolluğu, nanopartiküllerin, potansiyel olarak doğrudan etkileşimler yoluyla veya altta yatan çevresel koşulları değiştirerek fungus popülasyonlarını etkileyebileceği karmaşık yolları vurgulamaktadır.

Orkidelerde nanopartiküllerin fungal topluluğun yapısına yönelik metagenomik bir çalışma olmamasına karşın, bu taksonların, ağır metalle kirlenmiş toprağa karşı toleransları belgelenmiştir (Gajewska vd, 2022; Saraswathi vd, 2020). Gözlemlenen bu olgu, fungus topluluklarının iklimsel dalgalanmalar, ağır metal maruziyeti, konukçu bitki etkileşimleri ve pH seviyelerini kapsayan çok çeşitli çevresel değişkenlere duyarlılığının altını çizen yerleşik literatürle uyumludur. Bununla ilgili olarak, demir nanopartiküllerinden kaynaklanan Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonlarının varlığı, hidratlama ve Fe kümeleri halinde toplanma kapasitesini korur, böylece hidroksit iyonları (OH) üreterek toprak pH'nı etkiler ve aşağıda açıklandığı gibi potansiyel olarak toprak pH'ında bir azalmaya neden olur (Bai vd, 2018). Tao Zhang vd (2016) çalışması, (2006). Toprak özelliklerinin, özellikle pH'ın, farklı arazi kullanımı bağlamlarında ve ağır

metal kirliliğinin etkisi altında fungus topluluklarının yapısal ve bileşimsel özelliklerini şekillendirmede önemli roller oynadığı kesin olarak gösterilmiş olup bu durum, T Zhang vd (2016) araştırmalarıyla da doğrulanmıştır. Özellikle toprak pH'ındaki dalgalanmalar hem doğal hem de tarımsal ekosistemlerde özel bir öneme sahiptir ve Alzarhani vd (2019)'nın bulgularıyla da kanıtlandığı üzere fungus topluluğu dinamiklerini önemli ölçüde etkilemektedir.

Spesifik cinslerin FeBNP6 nanopartiküllerine nasıl tepki verdiğine dair bu incelikli anlayış, yalnızca ekolojik dinamikleri anlamamıza katkıda bulunmakla kalmamakta, aynı zamanda çeşitli ekosistemlere nanopartiküllerin girişinin potansiyel sonuçlarını dikkate almanın önemini de vurgulamaktadır. Gözlemlenen bu değişiklikleri yönlendiren temel mekanizmaları ve bunların ekosistem işlevleri ve hizmetleri üzerindeki potansiyel basamaklı etkilerini açıklamak için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

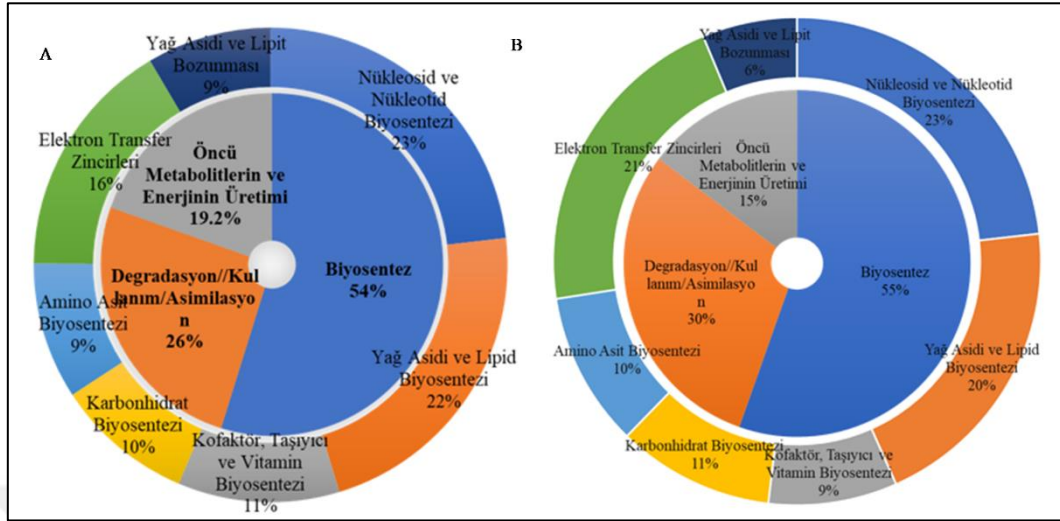
4.7.4.2. Fungal toplulukların fonksiyonel potansiyeli

FeBNP6'nın ile uygulanan *Anacamptis laxiflora* tohumları içindeki fungal mikrobiyomunun metabolik potansiyellerinin araştırılması, MetaCyc metabolik yol veri tabanına referansla açıklanan fonksiyonel profillerle gerçekleştirilmiştir.

Kontrol grubu ile FeBNP6'ler grubu arasında karşılaştırmalı bir analiz yapılmış ve fonksiyonel dağılımda farklılıklar görülmüştür. Spesifik olarak, kontrol grubunda "biyosentez" %54'ü, "öncü metabolitlerin ve enerjinin üretimi" %26'yı ve "bozunma/kullanım/asimilasyon" %19'u oluşturmuştur. Öte yandan FeBNP6'ler grubunda bu fonksiyonel kategoriler sırasıyla %55, %30 ve %15 oranında temsil edilmiştir. Bu bulgular FeBNP6'ler'nın tohumlarla ilişkili fungal mikrobiyomunun metabolik yolları üzerindeki potansiyel etkisini göstermektedir. (Şekil 4.42)

Kontrol ve FeBNP6'ler grupları arasındaki seviye2 karşılaştırmalı analizinde, spesifik yolaklarda incelikli farklılıklar görülmüştür. FeBNP6 uygulaması "Nükleosid ve Nükleotid Biyosentezini" yükseltirken, "Yağ Asidi ve Lipid Biyosentezi", "Kofaktör, Taşıyıcı ve Vitamin Biyosentezi" ve "Karbonhidrat Biyosentezi"ni orta derecede etkiliyor gibi görünmektedir. Özellikle "Elektron Transfer Zincirleri" yolu önemli bir gelişme sergilemiştir.

"Amino Asit Biyosentezi", azalan "Yağ Asidi ve Lipid Bozunması" ile tezat



Şekil 4.42 *Anacamptis laxiflora* tohumlarının endofit fungus metabolik yolları

oluşturacak şekilde hafifçe artmıştır.

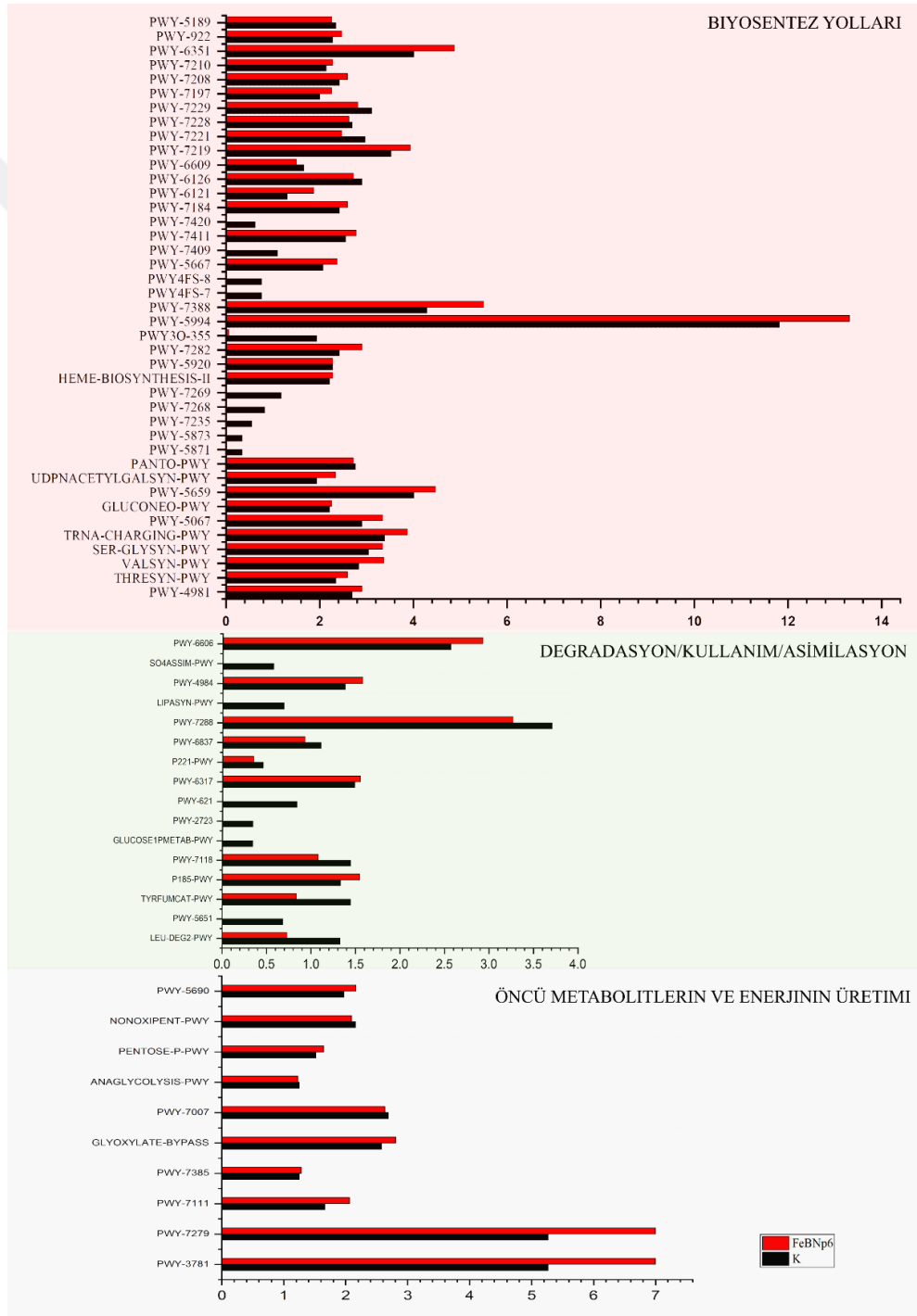
FeBNP6'ler nanopartiküllerinin *Anacamptis laxiflora* tohumlarının endofit fungus metabolik yolları üzerindeki etkisi bağlamında, SER-GLYSYN-PWY, TRNA-CHARGING-PWY, PWY-5067, VALSYN-PWY ve diğerleri gibi yollar artan aktivite göstermiştir (Şekil 4.43).

FeBNP6'ler nanopartiküllerinin ortamda varlığı, fungusların amino asit sentezi, RNA translasyonu ve nükleotid biyosentezi ile ilgili hücresel süreçlerin olası bir artışını göstermektedir. Bu düzenleme, nanopartiküllerin hücresel bileşenlerle etkileşimlerine, potansiyel olarak enzim aktivitelerini veya düzenleyici mekanizmaları etkilemesine bağlanabilir.

Ayrıca, PWY-6351 ve PWY-7219 gibi yalnızca FeBNP6'ler ile uygulama edilen grupta dikkate değer farklılıklar sergileyen yollar, fungus metabolizması üzerinde nanopartiküller kaynaklı etkilerin özgüllüğünün altını çiziyor. FeBNP6 ile uygulaması edilen grupta bu yolların daha yüksek bolluğu, glikoliz ve adenilosüksinat sentezi üzerinde hedeflenen bir etkiye işaret etmektedir. Bu özgüllük, nanopartiküller ile bu yollardaki anahtar enzimler, substratlar veya düzenleyici moleküller arasındaki doğrudan etkileşimlerden kaynaklanabilir.

Buna karşılık, FeBNP6'ler ile uygulaması edilen grupta Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında PWY-5871, PWY-5873, PWY-7235 ve diğerleri gibi belirli

yolların yokluğu veya azalmış varlığı, nanopartiküllerin engelleyici etkileri hakkında ilgi çekici soruları gündeme getirmektedir. Bu yollardaki azalan aktivite, enzim aktivitesinde, substrat mevcudiyetinde veya hücresel sinyal yollarında FeBNP6'ler'nın neden olduğu değişikliklerden kaynaklanabilir. Bu etkilerin moleküler temelini anlamak, nanopartiküllerin fungal metabolizmasını modüle etmesinin altında yatan mekanizmaların daha fazla araştırılmasını gerektirir.



Şekil 4.43 Fungusların metabolik yollarının Kontrol grubu, FeBNF6 (nanopartikül) uygulamasındaki durumları



5. SONUÇLAR

Bu çalışma, demir nanopartiküllerinin *Anacamptis laxiflora* tohumu çimlenmesi, glikomannan içeriği ve bunların çevredeki mikrobiyal toplulukla karmaşık ilişkileri üzerindeki etkilerine dair önemli bilgiler ortaya çıkarmıştır.

1. *Anacamptis laxiflora* tohumlarından izole edilen 12 fungustan dördü, özellikle *Dactylonectria torresensis*, *Alternaria alternata*, *Fusarium tricinctum* ve *Alternaria tenuissima*, Fe NP'ler sentezleme konusunda olağanüstü bir yetenek göstermiştir.
2. Nanopartiküllerin konsantrasyonu, boyutu ve kristal yapısı tohum çimlenmesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Özellikle FeBNp1'ler ile örneklendiği ve FeBNP5'ler ve FeBNP6'ler tarafından desteklenen küresel kristal yapıya sahip 25-45 boyut aralığındaki nanopartiküller, özellikle 50 mg konsantrasyonda katı ortamda çimlenme üzerinde olumlu etkiler sergilemiştir. Tersine, Fe KNP çimlenme üzerinde olumsuz bir etki göstermiştir.
3. Sıvı ortamın *Anacamptis laxiflora* tohumlarının çimlenmesi için uygun olmadığı bulunmuş ve nanopartiküller bu koşullar altında önemli bir etki göstermemiştir.
4. Toprak ortamında FeBNp1'ler (50 mg) ile işlem çimlenme oranını önemli ölçüde arttırmıştır.
5. Nanopartikül muamelesi varlığında glikomannan içeriği, özellikle FeBNP6'ler(50 mg), kayda değer bir artış sergilemiş.
6. FeBNP6'ler ile muamele edilen tohumlarla ilişkili mikrobiyal topluluğun araştırılması, hem bakteri hem de fungus topluluklarında yüksek glikomannan seviyelerini ve artan çeşitliliği ortaya çıkarmıştır. Bu uygulamanın, ilgili mikroorganizmalar üzerinde olumsuz etkiler yaratmadan güvenli bir kullanım gösterdiği dikkat çekicidir.

Son yıllarda nanomalzemeler özellikle tarımsal faaliyetlerde giderek yaygınlaşan uygulamalardır. Bu alanlardan biri de nanogübre uygulamalarıdır. Ancak özellikle tohumdan yetiştiriciliği son derece zor olan orkidelerin bu bağlamdaki potansiyellerinin değerlendirilmesi son derece önemlidir. Bu çalışma bu tip çalışmalar için bir başlangıç niteliğindedir. Bundan sonraki çalışmalarda farklı orkide türleri, farklı nanopartiküller ve konsantrasyonları, çevresel faktörlerin etkisi ve biyogüvenlik gibi hususlar dikkate alınmalıdır.



KAYNAKLAR

- Abarenkov, K., Somervuo, P., Nilsson, R. H., Kirk, P. M., Huotari, T., Abrego, N., and Ovaskainen, O. (2018). Protax-fungi: A web-based tool for probabilistic taxonomic placement of fungal internal transcribed spacer sequences. *New Phytologist*, 220(2), 517-525.
- Abdeen, M., Sabry, S., Ghozlan, H., El-Gendy, A. A., and Carpenter, E. E. (2016). Microbial-physical synthesis of Fe and Fe₃O₄ magnetic nanoparticles using *Aspergillus niger* YESM1 and supercritical condition of ethanol. *Journal of Nanomaterials*, 2016.
- Abdelhakim, H., El-Sayed, E., and Rashidi, F. (2020). Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles with antimicrobial, anticancer, antioxidant and photocatalytic activities by the endophytic *Alternaria tenuissima*. *Journal of Applied Microbiology*, 128(6), 1634-1646.
- Abid, N., Khan, A. M., Shujait, S., Chaudhary, K., Ikram, M., Imran, M., . . . Maqbool, M. (2022). Synthesis of nanomaterials using various top-down and bottom-up approaches, influencing factors, advantages, and disadvantages: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 300, 102597.
- Aboul-Maaty, N. A.-F., and Oraby, H. A.-S. (2019). Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 1-10.
- Acemi, A. (2018). Kitosan ile bazı bitki büyüme düzenleyicilerinin *Serapias vomeracea*'nin in vitro fizyolojisi üzerine etkilerinin karşılaştırılması.
- Acemi, A., and Özen, F. (2019). Optimization of in vitro asymbiotic seed germination protocol for *Serapias vomeracea*. *Eurobiotech Journal*, 3.
- Achari, G. A., and Kowshik, M. (2018). Recent developments on nanotechnology in agriculture: plant mineral nutrition, health, and interactions with soil microflora. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(33), 8647-8661.
- Adabavazeh, F., Pourseyedi, S., Nadernejad, N., and Razavizadeh, R. (2023). Hairy root induction in *Calotropis procera* and optimization of its phytochemical characteristics by elicitors. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 1-14.
- Adebayo, E. A., Azeez, M. A., Alao, M. B., Oke, A. M., and Aina, D. A. (2021). Fungi as veritable tool in current advances in nanobiotechnology. *Heliyon*, 7(11).
- Adeleye, T., Kareem, S., and Kekere-Ekun, A. (2020). Optimization studies on biosynthesis of iron nanoparticles using *Rhizopus stolonifer*. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering,
- Adhikari, K., Mahato, G. R., Chen, H., Sharma, H. C., Chandel, A. K., and Gao, B. (2021). Nanoparticles and their impacts on seed germination. *Plant Responses to Nanomaterials: Recent Interventions, and Physiological and Biochemical Responses*, 21-31.

- Afzal, S., Sharma, D., and Singh, N. K. (2021). Eco-friendly synthesis of phytochemical-capped iron oxide nanoparticles as nano-priming agent for boosting seed germination in rice (*Oryza sativa* L.). *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 40275-40287.
- Afzal, S., and Singh, N. K. (2022). Effect of zinc and iron oxide nanoparticles on plant physiology, seed quality and microbial community structure in a rice-soil-microbial ecosystem. *Environmental Pollution*, 314, 120224.
- Aguirre-von-Wobeser, E., Rocha-Estrada, J., Shapiro, L. R., and de la Torre, M. (2018). Enrichment of Verrucomicrobia, Actinobacteria and Burkholderiales drives selection of bacterial community from soil by maize roots in a traditional milpa agroecosystem. *PLoS One*, 13(12), e0208852.
- Ahmed, A., He, P., He, P., Wu, Y., He, Y., and Munir, S. (2023). Environmental effect of agriculture-related manufactured nano-objects on soil microbial communities. *Environment International*, 107819.
- Akbar, M., Haroon, U., Ali, M., Tahir, K., Chaudhary, H. J., and Munis, M. F. H. (2022). Mycosynthesized Fe₂O₃ nanoparticles diminish brown rot of apple whilst maintaining composition and pertinent organoleptic properties. *Journal of Applied Microbiology*, 132(5), 3735-3745.
- Alam, M. S., Naseh, M. F., Ansari, J. R., Waziri, A., Javed, M. N., Ahmadi, A., . . . Garg, A. (2022). Synthesis approaches for higher yields of nanoparticles. In *Nanomaterials in the Battle Against Pathogens and Disease Vectors* (pp. 51-82). CRC Press.
- Ali, A., Chiang, Y. W., and Santos, R. M. (2022). X-ray diffraction techniques for mineral characterization: A review for engineers of the fundamentals, applications, and research directions. *Minerals*, 12(2), 205.
- Ali, A. S., and Elozeiri, A. A. (2017). Metabolic processes during seed germination. *Advances in seed biology*, 2017, 141-166.
- Aljabali, A. A., Akkam, Y., Al Zoubi, M. S., Al-Batayneh, K. M., Al-Trad, B., Abo Alrob, O., . . . Evans, D. J. (2018). Synthesis of gold nanoparticles using leaf extract of *Ziziphus zizyphus* and their antimicrobial activity. *Nanomaterials*, 8(3), 174.
- Alkhatib, R., Alkhatib, B., and Abdo, N. (2021). Effect of Fe₃O₄ nanoparticles on seed germination in tobacco. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(38), 53568-53577.
- Alzarhani, A. K., Clark, D. R., Underwood, G. J., Ford, H., Cotton, T. A., and Dumbrell, A. J. (2019). Are drivers of root-associated fungal community structure context specific? *The ISME journal*, 13(5), 1330-1344.
- Amin, I., Nazir, R., and Rather, M. (2021). Nano-bioremediation: an innovative approach for remedying heavy metals using fungi. *J Bioremediat Biodegrad*, 12(487), 2.
- Annamalaia, J., Murugana, K., Shanmugamb, J., and Boopathyc, U. (2021). Mycosynthesis of silver nanoparticles: Mechanism and applications. *Green Synthesis of Silver Nanomaterials*, 391.

- Anwar, M. M., Aly, S. S., Nasr, E. H., and El-Sayed, E.-S. R. (2022). Improving carboxymethyl cellulose edible coating using ZnO nanoparticles from irradiated *Alternaria tenuissima*. *AMB Express*, 12(1), 1-11.
- Apodaca, S. A. (2022). *Insights on the Behavior of Nano-Copper in the Agroecosystem: Mycorrhizal Associations with Spearmint (Mentha spicata)* The University of Texas at El Paso].
- AUER, L., ESCUDIE, F., Bernard, M., Cauquil, L., Vidal, K., MARIADASSOU, M., . . . PASCAL, G. (2011). FROGS: find rapidly OTU with galaxy solution. *EMBnet. journal*, 17(1), 10-12.
- Bai, Y., Wang, Q., Liao, K., Jian, Z., Zhao, C., and Qu, J. (2018). Fungal community as a bioindicator to reflect anthropogenic activities in a river ecosystem. *Front Microbiol* 9: 3152. In.
- Banerjee, A., Sarkar, A., Acharya, K., and Chakraborty, N. (2021). Nanotechnology: an emerging hope in crop improvement. *Letters in Applied NanoBioScience*, 10(4), 2784-2803.
- Belisario, A., Maccaroni, M., Coramusi, A., Corazza, L., Pryor, B., and Figuli, P. (2004). First report of *Alternaria* species groups involved in disease complexes of hazelnut and walnut fruit. *Plant Disease*, 88(4), 426-426.
- Berners-Lee, M., Kennelly, C., Watson, R., and Hewitt, C. (2018). Current global food production is sufficient to meet human nutritional needs in 2050 provided there is radical societal adaptation. *Elementa: Science of the Anthropocene*, 6.
- Bharde, A., Rautaray, D., Bansal, V., Ahmad, A., Sarkar, I., Yusuf, S. M., . . . Sastry, M. (2006). Extracellular biosynthesis of magnetite using fungi. *Small*, 2(1), 135-141.
- Bhardwaj, A., and Agrawal, P. (2014). A review fungal endophytes: as a store house of bioactive compound. *World J. Pharm. Pharm. Sci*, 3(9).
- Bhardwaj, K., Sharma, A., Tejwan, N., Bhardwaj, S., Bhardwaj, P., Nepovimova, E., . . . Abd-Elsalam, K. A. (2020). Pleurotus macrofungi-assisted nanoparticle synthesis and its potential applications: a review. *Journal of Fungi*, 6(4), 351.
- Bhargava, A., Jain, N., Barathi L, M., Akhtar, M. S., Yun, Y.-S., and Panwar, J. (2014). Synthesis, characterization and mechanistic insights of mycogenic iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology for sustainable development*,
- Bhargava, A., Jain, N., Khan, M. A., Pareek, V., Dilip, R. V., and Panwar, J. (2016). Utilizing metal tolerance potential of soil fungus for efficient synthesis of gold nanoparticles with superior catalytic activity for degradation of rhodamine B. *Journal of Environmental Management*, 183, 22-32.
- Bidi, H., Fallah, H., Niknejad, Y., and Tari, D. B. (2021). Iron oxide nanoparticles alleviate arsenic phytotoxicity in rice by improving iron uptake, oxidative stress tolerance and diminishing arsenic accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 163, 348-357.
- Busby, P. E., Soman, C., Wagner, M. R., Friesen, M. L., Kremer, J., Bennett, A., . . . Dangl, J. L. (2017). Research priorities for harnessing plant microbiomes in sustainable agriculture. *PLoS biology*, 15(3), e2001793.

- Castañares, E., Stenglein, S. A., Dinolfo, M. I., and Moreno, M. V. (2011). *Fusarium tricinctum* associated with head blight on wheat in Argentina. *Plant Disease*, 95(4), 496-496.
- Ghafariyan, M. H., Malakouti, M. J., Dadpour, M. R., Stroeve, P., & Mahmoudi, M. (2013). Effects of magnetite nanoparticles on soybean chlorophyll. *Environmental science & technology*, 47(18), 10645-10652.
- Caza, M., and Kronstad, J. W. (2013). Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, 80.
- Chahtane, H., Nogueira Füller, T., Allard, P.-M., Marcourt, L., Ferreira Queiroz, E., Shanmugabalaji, V., . . . Lopez-Molina, L. (2018). The plant pathogen *Pseudomonas aeruginosa* triggers a DELLA-dependent seed germination arrest in *Arabidopsis*. *Elife*, 7, e37082.
- Chakoory, O., Comtet-Marre, S., and Peyret, P. (2022). RiboTaxa: combined approaches for rRNA genes taxonomic resolution down to the species level from metagenomics data revealing novelties. *NAR Genomics and Bioinformatics*, 4(3), lqac070.
- Chatterjee, S., Mahanty, S., Das, P., Chaudhuri, P., and Das, S. (2020). Biofabrication of iron oxide nanoparticles using manglicolous fungus *Aspergillus niger* BSC-1 and removal of Cr (VI) from aqueous solution. *Chemical Engineering Journal*, 385, 123790.
- Chaudhary, N., Sharma, A. K., Agarwal, P., Gupta, A., and Sharma, V. K. (2015). 16S classifier: a tool for fast and accurate taxonomic classification of 16S rRNA hypervariable regions in metagenomic datasets. *Plos one*, 10(2), e0116106.
- Chaudhary, V., and Chaudhary, R. (2018). Magnetic nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications. *Encyclopedia of nanoscience and nanotechnology*, 28, 153-183.
- Chavan, S., and Nadanathangam, V. (2019). Effects of nanoparticles on plant growth-promoting bacteria in Indian agricultural soil. *Agronomy*, 9(3), 140.
- Chen, Q.-L., Ding, J., Zhu, Y.-G., He, J.-Z., and Hu, H.-W. (2020). Soil bacterial taxonomic diversity is critical to maintaining the plant productivity. *Environment International*, 140, 105766.
- Chen, Q., Meyer, W. A., Zhang, Q., and White, J. F. (2020). 16S rRNA metagenomic analysis of the bacterial community associated with turf grass seeds from low moisture and high moisture climates. *PeerJ*, 8, e8417.
- Cinisli, K. T., Sevda, U. Ç. A. R., & DİKBAŞ, N. (2019). Nanomateriyallerin Tarımda Kullanımı. *Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences*, 29(4), 817-831.
- Chu, C.-Y., and Tsai, W.-T. (2006). Process for producing orchid seedlings by static liquid culture. In: Google Patents.
- Churilov, G., Polischuk, S., Kuznetsov, D., Borychev, S., Byshov, N., and Churilov, D. (2018). Agro ecological grounding for the application of metal nanopowders in agriculture. *International Journal of Nanotechnology*, 15(4-5), 258-279.

- Churilova, V., Churilov, G., Churilov, D., Polischuk, S., and Arapov, I. (2020). Effect of metal nanoparticles on the accumulation and structure of rapeseed carbohydrates. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*,
- Cote, L. J., Teja, A. S., Wilkinson, A. P., and Zhang, Z. J. (2002). Continuous hydrothermal synthesis and crystallization of magnetic oxide nanoparticles. *Journal of Materials Research*, 17, 2410-2416.
- Da'na, E., Taha, A., and Afkar, E. (2018). Green synthesis of iron nanoparticles by *Acacia nilotica* pods extract and its catalytic, adsorption, and antibacterial activities. *Applied Sciences*, 8(10), 1922.
- Das, P., Barua, S., Sarkar, S., Karak, N., Bhattacharyya, P., Raza, N., . . . Bhattacharya, S. S. (2018). Plant extract-mediated green silver nanoparticles: Efficacy as soil conditioner and plant growth promoter. *Journal of Hazardous Materials*, 346, 62-72.
- Dave, S. R., and Gao, X. (2009). Monodisperse magnetic nanoparticles for biodetection, imaging, and drug delivery: a versatile and evolving technology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1(6), 583-609.
- Davies, T. E., Li, H., Bessette, S., Gauvin, R., Patience, G. S., and Dummer, N. F. (2022). Experimental methods in chemical engineering: Scanning electron microscopy and X-ray ultra-microscopy—SEM and XuM. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 100(11), 3145-3159.
- de Vries, L., Guevara-Rozo, S., Cho, M., Liu, L.-Y., Renneckar, S., and Mansfield, S. D. (2021). Tailoring renewable materials via plant biotechnology. *Biotechnology for Biofuels*, 14, 1-33.
- Deb, C. R., and Imchen, T. (2011). Orchids of horticultural importance from Nagaland, India. *Pleione*, 5(1), 44-48.
- Deshmukh, R. K., Ma, J. F., and Bélanger, R. R. (2017). Role of silicon in plants. In (Vol. 8, pp. 1858): Frontiers Media SA.
- Devatha, C., Thalla, A. K., and Katte, S. Y. (2016). Green synthesis of iron nanoparticles using different leaf extracts for treatment of domestic waste water. *Journal of cleaner production*, 139, 1425-1435.
- Diantina, S., McGill, C., McCormick, A. C., Millner, J., Pritchard, H. W., and Nadarajan, J. (2023). Comparative Seed Cryopreservation of Indonesian and New Zealand Epiphytic And Terrestrial Orchids. *Cryoletters*, 44(4), 197-207.
- Dieckmann, Y., Colfen, H., Hofmann, H., and Petri-Fink, A. (2009). Particle size distribution measurements of manganese-doped ZnS nanoparticles. *Analytical chemistry*, 81(10), 3889-3895.
- do Espirito Santo Pereira, A., Caixeta Oliveira, H., Fernandes Fraceto, L., and Santaella, C. (2021). Nanotechnology potential in seed priming for sustainable agriculture. *Nanomaterials*, 11(2), 267.
- Donnelly, E., and Boskey, A. L. (2011). Mineralization. In *Vitamin D* (pp. 381-401). Elsevier.
- Ece Tamer, C., Karaman, B., and Utku Copur, O. (2006). A traditional Turkish beverage: salep. *Food Reviews International*, 22(1), 43-50.

- Eid, M. M. (2022). Characterization of Nanoparticles by FTIR and FTIR-Microscopy. In *Handbook of Consumer Nanoproducts* (pp. 1-30). Springer.
- El-Saadony, M. T., ALmoshadak, A. S., Shafi, M. E., Albaqami, N. M., Saad, A. M., El-Tahan, A. M., . . . Abd El-Mageed, T. A. (2021). Vital roles of sustainable nano-fertilizers in improving plant quality and quantity-an updated review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(12), 7349-7359.
- Elemike, E. E., Uzoh, I. M., Onwudiwe, D. C., and Babalola, O. O. (2019). The role of nanotechnology in the fortification of plant nutrients and improvement of crop production. *Applied Sciences*, 9(3), 499.
- Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., . . . Pascal, G. (2018). FROGS: find, rapidly, OTUs with galaxy solution. *Bioinformatics*, 34(8), 1287-1294.
- Faizan, M., Bhat, J. A., Chen, C., Alyemeni, M. N., Wijaya, L., Ahmad, P., and Yu, F. (2021). Zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) induce salt tolerance by improving the antioxidant system and photosynthetic machinery in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 161, 122-130.
- Feng, Y., Kreslavski, V. D., Shmarev, A. N., Ivanov, A. A., Zharmukhamedov, S. K., Kosobryukhov, A., . . . Shabala, S. (2022). Effects of iron oxide nanoparticles (Fe₃O₄) on growth, photosynthesis, antioxidant activity and distribution of mineral elements in wheat (*Triticum aestivum*) Plants. *Plants*, 11(14), 1894.
- Feranchuk, S., Belkova, N., Potapova, U., Kuzmin, D., and Belikov, S. (2018). Evaluating the use of diversity indices to distinguish between microbial communities with different traits. *Research in microbiology*, 169(4-5), 254-261.
- Fischer, J., Talal, G. D., Schnee, L. S., Otomo, P. V., and Filser, J. (2022). Clay types modulate the toxicity of low concentrated copper oxide nanoparticles toward springtails in artificial test soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 41(10), 2454-2465.
- Frenk, S., Ben-Moshe, T., Dror, I., Berkowitz, B., and Minz, D. (2013). Effect of metal oxide nanoparticles on microbial community structure and function in two different soil types. *PLoS One*, 8(12), e84441.
- Gadd, G. M. (2021). Fungal biomineralization. *Current Biology*, 31(24), R1557-R1563.
- Gajewska, J., Floryszak-Wieczorek, J., Sobieszczuk-Nowicka, E., Mattoo, A., and Arasimowicz-Jelonek, M. (2022). Fungal and oomycete pathogens and heavy metals: an inglorious couple in the environment. *IMA fungus*, 13(1), 1-20.
- Gambino, M., Marzano, V., Villa, F., Vitali, A., Vannini, C., Landini, P., and Cappitelli, F. (2015). Effects of sublethal doses of silver nanoparticles on *Bacillus subtilis* planktonic and sessile cells. *Journal of Applied Microbiology*, 118(5), 1103-1115.
- Gao, Y., Zhang, Y., Feng, C., Chu, H., Feng, C., Wang, H., . . . Chen, H. (2022). A chromosome-level genome assembly of *Amorphophallus konjac* provides insights into konjac glucomannan biosynthesis. *Computational and structural biotechnology journal*, 20, 1002-1011.

- Gardea-Torresdey, J. L., Rico, C. M., and White, J. C. (2014). Trophic transfer, transformation, and impact of engineered nanomaterials in terrestrial environments. *Environmental science & technology*, 48(5), 2526-2540.
- Ghoto, K., Simon, M., Shen, Z.-J., Gao, G.-F., Li, P.-F., Li, H., and Zheng, H.-L. (2020). Physiological and root exudation response of maize seedlings to TiO₂ and SiO₂ nanoparticles exposure. *BioNanoScience*, 10, 473-485.
- Gilbertson, L. M., Zimmerman, J. B., Plata, D. L., Hutchison, J. E., and Anastas, P. T. (2015). Designing nanomaterials to maximize performance and minimize undesirable implications guided by the Principles of Green Chemistry. *Chemical Society Reviews*, 44(16), 5758-5777.
- Girgin, H. N. (2018). *Immobilizing seeds of salep orchid growing in Anatolia to make them germable* [Yüksek lisans, TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ]. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Guilger-Casagrande, M., and Lima, R. d. (2019). Synthesis of silver nanoparticles mediated by fungi: a review. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 287.
- Guo, H., Liu, Y., Chen, J., Zhu, Y., and Zhang, Z. (2022). The effects of several metal nanoparticles on seed germination and seedling growth: a meta-analysis. *Coatings*, 12(2), 183.
- Guo, Y., Sun, H., An, M., Mabuchi, T., Zhao, Y., and Li, G. (2023). Prediction of water transport properties on an anisotropic wetting surface via deep learning. *Nanoscale*, 15(30), 12737-12747.
- Ha, J., Gao, Y., Zhang, R., Li, K., Zhang, Y., Niu, X., . . . Chen, Y. (2021). Diversity of the bacterial microbiome associated with the endosphere and rhizosphere of different cassava (*Manihot esculenta* crantz) genotypes. *Frontiers in microbiology*, 12, 729022.
- Hachem, K., Ansari, M. J., Saleh, R. O., Kzar, H. H., Al-Gazally, M. E., Altimari, U. S., . . . Kianfar, E. (2022). Methods of Chemical Synthesis in the Synthesis of Nanomaterial and Nanoparticles by the Chemical Deposition Method: A Review. *BioNanoScience*, 12(3), 1032-1057.
- Hajipour, M. J., Saei, A. A., Walker, E. D., Conley, B., Omid, Y., Lee, K. B., and Mahmoudi, M. (2021). Nanotechnology for targeted detection and removal of bacteria: opportunities and challenges. *Advanced Science*, 8(21), 2100556.
- Hano, C., and Abbasi, B. H. (2021). Plant-based green synthesis of nanoparticles: Production, characterization and applications. In (Vol. 12, pp. 31): MDPI.
- Harijati, N., Mastuti, R., Chairiyah, N., Roosdiana, B., and Rohmawati, S. A. (2018). Effects of seeding material age, storage time, and tuber tissue zone on glucomannan content of *Amorphophallus muelleri* Blume. *International Journal of Plant Biology*, 9(1), 7626.
- Hasan, M., Mehmood, K., Mustafa, G., Zafar, A., Tariq, T., Hassan, S. G., . . . Mahmood, N. (2021). Phytotoxic evaluation of phytosynthesized silver nanoparticles on lettuce. *Coatings*, 11(2), 225.
- Hong, J., Peralta-Videa, J. R., and Gardea-Torresdey, J. L. (2013). Nanomaterials in agricultural production: benefits and possible threats? *Sustainable nanotechnology and the environment: advances and achievements*, 73-90.

- Huang, T., Chen, L., Cai, Y.-D., and Chou, K.-C. (2011). Classification and analysis of regulatory pathways using graph property, biochemical and physicochemical property, and functional property. *PLoS One*, 6(9), e25297.
- Hyeon, T. (2003). Chemical synthesis of magnetic nanoparticles. *Chemical communications*(8), 927-934.
- Inkson, B. J. (2016). Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. In *Materials characterization using nondestructive evaluation (NDE) methods* (pp. 17-43). Elsevier.
- Iqbal, M. A. (2019). Nano-fertilizers for sustainable crop production under changing climate: a global perspective. *Sustainable crop production*, 8, 1-13.
- Irawati. (2012). Conservation of Orchids the Gems of the Tropics. In *Conservation of Tropical Plant Species* (pp. 171-187). Springer.
- Irum, S., Jabeen, N., Ahmad, K. S., Shafique, S., Khan, T. F., Gul, H., . . . Hussain, S. Z. (2020). Biogenic iron oxide nanoparticles enhance callogenesis and regeneration pattern of recalcitrant *Cicer arietinum* L. *Plos one*, 15(12), e0242829.
- Ishtiaq, M., Mazhar, M. W., Maqbool, M., Hussain, T., Hussain, S. A., Casini, R., . . . Elansary, H. O. (2023). Seed priming with the selenium nanoparticles maintains the redox status in the water stressed tomato plants by modulating the antioxidant defense enzymes. *Plants*, 12(7), 1556.
- Ismail, A. A., van de Voort, F. R., and Sedman, J. (1997). Fourier transform infrared spectroscopy: principles and applications. In *Techniques and instrumentation in analytical chemistry* (Vol. 18, pp. 93-139). Elsevier.
- Jahangir, S., Javed, K., and Bano, A. (2020). Nanoparticles and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) modulate the physiology of onion plant under salt stress. *Pak. J. Bot*, 52(4), 1473-1480.
- Jakubiak, M., Giska, I., Asztemborska, M., and Bystrzejewska-Piotrowska, G. (2014). Bioaccumulation and biosorption of inorganic nanoparticles: factors affecting the efficiency of nanoparticle mycoextraction by liquid-grown mycelia of *Pleurotus eryngii* and *Trametes versicolor*. *Mycological Progress*, 13, 525-532.
- Jana, N. R., Gearheart, L., and Murphy, C. J. (2001). Evidence for seed-mediated nucleation in the chemical reduction of gold salts to gold nanoparticles. *Chemistry of materials*, 13(7), 2313-2322.
- JCPDS. (2019). <https://www.icdd.com/>
- Jeevanandam, J., Chan, Y. S., and Danquah, M. K. (2016). Biosynthesis of metal and metal oxide nanoparticles. *ChemBioEng Reviews*, 3(2), 55-67.
- Jin, K., Jia, Y., Zhao, Z., Song, W., Wang, S., and Guan, C. (2018). Synthesis of chromium carbide nanopowders by microwave heating and their composition and microstructure change under gamma ray irradiation. *Molecules*, 24(1), 16.

- Jin, T., Ren, J., Li, Y., Bai, B., Liu, R., and Wang, Y. (2022). Plant growth-promoting effect and genomic analysis of the *P. putida* LWPZF isolated from *C. japonicum* rhizosphere. *AMB Express*, 12(1), 1-14.
- Joshi, H., Choudhary, P., and Mundra, S. (2019). Future prospects of nanotechnology in agriculture. *Int. J. Chem. Stud*, 7(2), 957-963.
- Kalia, A., Kaur, J., Kaur, A., and Singh, N. (2020). Antimycotic activity of biogenically synthesised metal and metal oxide nanoparticles against plant pathogenic fungus *Fusarium moniliforme* (F. fujikuroi).
- Kasote, D. M., Lee, J. H., Jayaprakasha, G., and Patil, B. S. (2019). Seed priming with iron oxide nanoparticles modulate antioxidant potential and defense-linked hormones in watermelon seedlings. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(5), 5142-5151.
- Kaul, R., Kumar, P., Burman, U., Joshi, P., Agrawal, A., Raliya, R., and Tarafdar, J. (2012). Magnesium and iron nanoparticles production using microorganisms and various salts. *Materials Science-Poland*, 30, 254-258.
- Kaur, J., and Sharma, J. (2021). Orchid root associated bacteria: linchpins or accessories? *Frontiers in Plant Science*, 12, 661966.
- Khan, A., Rashid, R., Murtaza, G., and Zahra, A. (2014). Gold nanoparticles: synthesis and applications in drug delivery. *Tropical journal of pharmaceutical research*, 13(7), 1169-1177.
- Khan, M. N., Li, Y., Khan, Z., Chen, L., Liu, J., Hu, J., . . . Li, Z. (2021). Nanoceria seed priming enhanced salt tolerance in rapeseed through modulating ROS homeostasis and α -amylase activities. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 1-19.
- Khatun, R., Mamun, M. S. A., Islam, S., Khatun, N., Hakim, M., Hossain, M. S., . . . Barai, H. R. (2022). Phytochemical-assisted Synthesis of Fe₃O₄ Nanoparticles and Evaluation of Their Catalytic Activity. *Micromachines*, 13(12), 2077.
- Kind, C., Weber, A., and Feldmann, C. (2012). Easy access to Cu₀ nanoparticles and porous copper electrodes with high oxidation stability and high conductivity. *Journal of Materials Chemistry*, 22(3), 987-993.
- Konate, A., Wang, Y., He, X., Adeel, M., Zhang, P., Ma, Y., . . . Kizito, S. (2018). Comparative effects of nano and bulk-Fe₃O₄ on the growth of cucumber (*Cucumis sativus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 165, 547-554.
- Kornarzyński, K., Sujak, A., Czernel, G., and Wiącek, D. (2020). Effect of Fe₃O₄ nanoparticles on germination of seeds and concentration of elements in *Helianthus annuus* L. under constant magnetic field. *Scientific reports*, 10(1), 8068.
- Krishnakumar, S., Janani, P., Mugilarasi, S., Kumari, G., and Janney, J. B. (2018). Chemical induced fabrication of silver nanoparticles (Ag-NPs) as nanocatalyst with alpha amylase enzyme for enhanced breakdown of starch. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 15, 377-383.
- Kumar, I., Mondal, M., and Sakthivel, N. (2019). Green synthesis of phyto-genic nanoparticles. In *Green synthesis, characterization and applications of nanoparticles* (pp. 37-73). Elsevier.

- Kumar, R., Swapnil, P., Meena, M., Selpair, S., and Yadav, B. G. (2022). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Approaches to alleviate abiotic stresses for enhancement of growth and development of medicinal plants. *Sustainability*, 14(23), 15514.
- Kumar, S., Patra, A., Datta, S., Rosin, K., and Purakayastha, T. (2015). Phytotoxicity of nanoparticles to seed germination of plants. *International Journal of Advanced Research*, 3(3), 854-865.
- Kunin, V., Copeland, A., Lapidus, A., Mavromatis, K., and Hugenholtz, P. (2008). A bioinformatician's guide to metagenomics. *Microbiology and molecular biology reviews*, 72(4), 557-578.
- Kuppusamy, P., Yusoff, M. M., Maniam, G. P., and Govindan, N. (2016). Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications—An updated report. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(4), 473-484.
- Kurt, A. (2017). Salep glukomannanın klarifikasyon ve deasetilasyonu: yapı-proses-özellik ilişkilerinin belirlenmesi.
- Langille, M. G., Zaneveld, J., Caporaso, J. G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J. A., . . . Knight, R. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature biotechnology*, 31(9), 814-821.
- Lau, E. C., Carvalho, L. B., Pereira, A. E., Montanha, G. S., Corrêa, C. G., Carvalho, H. W., . . . Yiu, H. H. (2020). Localization of coated iron oxide (Fe₃O₄) nanoparticles on tomato seeds and their effects on growth. *ACS Applied Bio Materials*, 3(7), 4109-4117.
- Lee, N., and Hyeon, T. (2012). Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2575-2589.
- Lesiak, B., Rangan, N., Jiricek, P., Gordeev, I., Tóth, J., Kövér, L., . . . Borowicz, P. (2019). Surface study of Fe₃O₄ nanoparticles functionalized with biocompatible adsorbed molecules. *Frontiers in chemistry*, 7, 642.
- Li, J., Chang, P. R., Huang, J., Wang, Y., Yuan, H., and Ren, H. (2013). Physiological effects of magnetic iron oxide nanoparticles towards watermelon. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 13(8), 5561-5567.
- Li, J., Ma, Y., and Xie, Y. (2021). Stimulatory effect of Fe₃O₄ nanoparticles on the growth and yield of *Pseudostellaria heterophylla* via improved photosynthetic performance. *HortScience*, 56(7), 753-761.
- Li, Q., Liu, F., Li, M., Chen, C., and Gadd, G. M. (2022). Nanoparticle and nanomineral production by fungi. *Fungal Biology Reviews*, 41, 31-44.
- Li, Y., Xi, K., Liu, X., Han, S., Han, X., Li, G., . . . Gong, S. (2023). Silica nanoparticles promote wheat growth by mediating hormones and sugar metabolism. *Journal of Nanobiotechnology*, 21(1), 2.
- Ligterink, W., and Hilhorst, H. W. (2017). High-throughput scoring of seed germination. *Plant Hormones: Methods and Protocols*, 57-72.

- Links, M. G., Demeke, T., Gräfenhan, T., Hill, J. E., Hemmingsen, S. M., and Dumonceaux, T. J. (2014). Simultaneous profiling of seed-associated bacteria and fungi reveals antagonistic interactions between microorganisms within a shared epiphytic microbiome on Triticum and Brassica seeds. *New Phytologist*, 202(2), 542-553.
- Liu, G., Zhang, M., Jin, Y., Fan, X., Xu, J., Zhu, Y., . . . Qian, H. (2017). The effects of low concentrations of silver nanoparticles on wheat growth, seed quality, and soil microbial communities. *Water, Air, & Soil Pollution*, 228, 1-12.
- Liu, J., Yang, Y., Xu, Z., Wang, Q., Liu, B., and Wu, Y. (2022). Characteristics of Fungal Communities and Internal Mildew Occurrence during the Stages of Planting and Storing of Sunflower Seed in China. *Microorganisms*, 10(7), 1434.
- Liu, R., Zhang, H., and Lal, R. (2016). Effects of stabilized nanoparticles of copper, zinc, manganese, and iron oxides in low concentrations on lettuce (*Lactuca sativa*) seed germination: nanotoxicants or nanonutrients? *Water, Air, & Soil Pollution*, 227, 1-14.
- Locher, K. P. (2009). Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1514), 239-245.
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*(63), e3998.
- Lu, A. H., Salabas, E. e. L., and Schüth, F. (2007). Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(8), 1222-1244.
- Mahakham, W., Sarmah, A. K., Maensiri, S., and Theerakulpisut, P. (2017). Nanoprimer technology for enhancing germination and starch metabolism of aged rice seeds using phytosynthesized silver nanoparticles. *Scientific Reports*, 7(1), 8263.
- Mahanty, S., Bakshi, M., Ghosh, S., Chatterjee, S., Bhattacharyya, S., Das, P., . . . Chaudhuri, P. (2019). Green synthesis of iron oxide nanoparticles mediated by filamentous fungi isolated from Sundarban mangrove ecosystem, India. *BioNanoScience*, 9, 637-651.
- Mahdavi, M., Ahmad, M. B., Haron, M. J., Gharayebi, Y., Shameli, K., and Nadi, B. (2013). Fabrication and characterization of SiO₂/(3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles for lead (II) removal from aqueous solution. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 23, 599-607.
- Mahendra Rai, M. R., Alka Yadav, A. Y., Bridge, P., and Aniket Gade, A. G. (2009). Myconanotechnology: a new and emerging science. *Applied mycology*, 258-267.
- Mahmoud, A. W. M., Ayad, A. A., Abdel-Aziz, H. S., Williams, L. L., El-Shazoly, R. M., Abdel-Wahab, A., and Abdeldaym, E. A. (2022). Foliar application of different iron sources improves morpho-physiological traits and nutritional quality of broad bean grown in sandy soil. *Plants*, 11(19), 2599.

- Majeed, S., Danish, M., Mohamad Ibrahim, M. N., Sekeri, S. H., Ansari, M. T., Nanda, A., and Ahmad, G. (2021). Bacteria mediated synthesis of iron oxide nanoparticles and their antibacterial, antioxidant, cytocompatibility properties. *Journal of Cluster Science*, 32, 1083-1094.
- Mala, B., Kuegkong, K., Sa-Ngiaemsri, N., and Nontachaiyapoom, S. (2017). Effect of germination media on in vitro symbiotic seed germination of three Dendrobium orchids. *South African Journal of Botany*, 112, 521-526.
- Mani, P. K., and Mondal, S. (2016). Agri-nanotechniques for plant availability of nutrients. *Plant nanotechnology: principles and practices*, 263-303.
- Manjunatha, S., Biradar, D., and Aladakatti, Y. R. (2016). Nanotechnology and its applications in agriculture: A review. *J farm Sci*, 29(1), 1-13.
- Martinez-Rodriguez, A., Macedo-Raygoza, G., Huerta-Robles, A. X., Reyes-Sepulveda, I., Lozano-Lopez, J., García-Ochoa, E. Y., . . . White, J. F. (2019). Agave seed endophytes: ecology and impacts on root architecture, nutrient acquisition, and cold stress tolerance. *Seed Endophytes: Biology and Biotechnology*, 139-170.
- Mense, S. M., and Zhang, L. (2006). Heme: a versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to MAP kinases. *Cell research*, 16(8), 681-692.
- Mirzababaei, A., Zandkarimi, R., Moradi, S., Rasaei, N., Amini, M. R., Pourreza, S., . . . Mirzaei, K. (2022). The effect of Glucomannan on fasting and postprandial blood glucose in adults: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 21(1), 1055-1063.
- Modan, E. M., and PLĂIAȘU, A. G. (2020). Advantages and disadvantages of chemical methods in the elaboration of nanomaterials. *The Annals of "Dunarea de Jos" University of Galati. Fascicle IX, Metallurgy and Materials Science*, 43(1), 53-60.
- Mohamed, Y., Azzam, A., Amin, B., and Safwat, N. (2015). Mycosynthesis of iron nanoparticles by *Alternaria alternata* and its antibacterial activity. *African Journal of Biotechnology*, 14(14), 1234-1241.
- Mohammadpour, S., Amini, M. R., Shahinfar, H., Tijani, A. J., Shahavandi, M., Ghorbaninejad, P., . . . Shab-Bidar, S. (2020). Effects of glucomannan supplementation on weight loss in overweight and obese adults: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Obesity Medicine*, 19, 100276.
- Mutaf, T., Çalışkan Bilgin, G., Öncel, S., & Elibol, M. (2023). Metal nanopartiküllerin mikroalgler aracılığı ile yeşil sentezi. *Su Ürünleri Dergisi*.
- Nadeem, M., Khan, R., Shah, N., Bangash, I. R., Abbasi, B. H., Hano, C., . . . Nadhman, A. (2022). A review of microbial mediated iron nanoparticles (IONPs) and its biomedical applications. *Nanomaterials*, 12(1), 130.
- Nawaz, S., and Bano, A. (2020). Effects of PGPR (*Pseudomonas* sp.) and Ag-nanoparticles on enzymatic activity and physiology of cucumber. *Recent patents on food, nutrition & agriculture*, 11(2), 124-136.

- Nazarova, A. (2022). Effect of iron nanopowder on the physiological resistance of winter wheat to low temperatures. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science,
- Newman, B. (2009). *Orchids as indicators of ecosystem health in urban bushland fragments* [Murdoch University].
- Nile, S. H., Thiruvengadam, M., Wang, Y., Samynathan, R., Shariati, M. A., Rebezov, M., . . . Xiao, J. (2022). Nano-priming as emerging seed priming technology for sustainable agriculture—recent developments and future perspectives. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1), 1-31.
- Nurlela, Ariesta, N., Santosa, E., and Muhandri, T. (2019). Effect of harvest timing and length of storage time on glucomannan content in porang tubers. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science,
- Onakpoya, I., Posadzki, P., and Ernst, E. (2014). The efficacy of glucomannan supplementation in overweight and obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Journal of the American College of Nutrition*, 33(1), 70-78.
- Oyewusi, H. A., Abdul Wahab, R., Edbeib, M. F., Mohamad, M. A. N., Abdul Hamid, A. A., Kaya, Y., and Huyop, F. (2021). Functional profiling of bacterial communities in Lake Tuz using 16S rRNA gene sequences. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35(1), 1-10.
- Özdener Kömpe, Y., Akin Mutlu, V., Özkoç, İ., Demiray, S., and Serhat, B. (2022). Fungal diversity and ex vitro symbiotic germination of *Serapias vomeracea* (Orchidaceae). *Acta Botanica Croatica*, 81(1), 108-116.
- Pantidos, N., and Horsfall, L. E. (2014). Biological synthesis of metallic nanoparticles by bacteria, fungi and plants. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 5(5), 1.
- Paramelle, D., Sadovoy, A., Gorelik, S., Free, P., Hobley, J., and Fernig, D. G. (2014). A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. *Analyst*, 139(19), 4855-4861.
- Pariona, N., and Martinez, A. (2018). Effect of iron oxide nanoparticles on germination and early growth of *Raphanus sativus*. *International Journal of Chemistry and Chemical Engineering Systems*, 3.
- Pavani, K., and Kumar, N. S. (2013). Adsorption of iron and synthesis of iron nanoparticles by *Aspergillus* species kpv 12. *Am J Nanomater*, 1(2), 24-26.
- Peng, C., Tong, H., Shen, C., Sun, L., Yuan, P., He, M., and Shi, J. (2020). Bioavailability and translocation of metal oxide nanoparticles in the soil-rice plant system. *Science of the Total Environment*, 713, 136662.
- Phuoc, T. X., Howard, B. H., Martello, D. V., Soong, Y., and Chyu, M. K. (2008). Synthesis of Mg (OH) 2, MgO, and Mg nanoparticles using laser ablation of magnesium in water and solvents. *Optics and lasers in Engineering*, 46(11), 829-834.
- Pirttilä, A. M., Mohammad Parast Tabas, H., Baruah, N., and Koskimäki, J. J. (2021). Biofertilizers and biocontrol agents for agriculture: How to identify and develop new potent microbial strains and traits. *Microorganisms*, 9(4), 817.

- Prasad, R. (2017). *Fungal nanotechnology: applications in agriculture, industry, and medicine*. Springer.
- Prasad, R., Kumar, V., Kumar, M., and Wang, S. (2018). *Fungal nanobionics: principles and applications*. Springer.
- Priya, Naveen, Kaur, K., and Sidhu, A. K. (2021). Green synthesis: An eco-friendly route for the synthesis of iron oxide nanoparticles. *Frontiers in Nanotechnology*, 3, 655062.
- Qi, L., Shi, Y., Li, C., Liu, J., Chong, S.-L., Lim, K.-J., . . . Chen, D. (2022). Glucomannan in *Dendrobium catenatum*: Bioactivities, Biosynthesis and Perspective. *Genes*, 13(11), 1957.
- Qu, H., Ma, C., Xing, W., Xue, L., Liu, H., White, J. C., . . . Xing, B. (2022). Effects of copper oxide nanoparticles on *Salix* growth, soil enzyme activity and microbial community composition in a wetland mesocosm. *Journal of Hazardous Materials*, 424, 127676.
- Rai-Kalal, P., and Jajoo, A. (2021). Priming with zinc oxide nanoparticles improve germination and photosynthetic performance in wheat. *Plant Physiology and Biochemistry*, 160, 341-351.
- Rai, A., Seena, S., Gagliardi, T., and Palma, P. (2023). Advances in the design of amino acid and peptide synthesized gold nanoparticles for their applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 102951.
- Rai, M., Bonde, S., Golinska, P., Trzcińska-Wencel, J., Gade, A., Abd-Elsalam, K. A., . . . Ingle, A. P. (2021). *Fusarium* as a novel fungus for the synthesis of nanoparticles: mechanism and applications. *Journal of Fungi*, 7(2), 139.
- Rajendhran, J., and Gunasekaran, P. (2011). Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiological research*, 166(2), 99-110.
- Rana, A., Yadav, K., and Jagadevan, S. (2020). A comprehensive review on green synthesis of nature-inspired metal nanoparticles: Mechanism, application and toxicity. *Journal of Cleaner Production*, 272, 122880.
- Rana, K. L., Kour, D., Kaur, T., Devi, R., Yadav, N., Rastegari, A. A., and Yadav, A. N. (2020). Biodiversity, phylogenetic profiling, and mechanisms of colonization of seed microbiomes. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 99-125). Elsevier.
- Ravindran, A., Mani, V., Chandrasekaran, N., and Mukherjee, A. (2011). Selective colorimetric sensing of cysteine in aqueous solutions using silver nanoparticles in the presence of Cr³⁺. *Talanta*, 85(1), 533-540.
- Rizwan, M., Ali, S., Ali, B., Adrees, M., Arshad, M., Hussain, A., . . . Waris, A. A. (2019). Zinc and iron oxide nanoparticles improved the plant growth and reduced the oxidative stress and cadmium concentration in wheat. *Chemosphere*, 214, 269-277.
- Rizwan, M., Ali, S., Qayyum, M. F., Ok, Y. S., Adrees, M., Ibrahim, M., . . . Abbas, F. (2017). Effect of metal and metal oxide nanoparticles on growth and physiology of globally important food crops: A critical review. *Journal of Hazardous Materials*, 322, 2-16.

- Romero, C. M., Alvarez, A., Martínez, M. A., and Chaves, S. (2018). Fungal nanotechnology: a new approach toward efficient biotechnology application. *Fungal Nanobionics: Principles and Applications*, 117-143.
- Rui, M., Ma, C., Hao, Y., Guo, J., Rui, Y., Tang, X., . . . Hou, T. (2016). Iron oxide nanoparticles as a potential iron fertilizer for peanut (*Arachis hypogaea*). *Frontiers in Plant Science*, 7, 815.
- Ryu, S., Nam, S.-H., and Baek, J.-S. (2022). Green Synthesis of Silver Nanoparticles (AgNPs) of *Angelica Gigas* Fabricated by Hot-Melt Extrusion Technology for Enhanced Antifungal Effects. *Materials*, 15(20), 7231.
- Saif, S., Tahir, A., and Chen, Y. (2016). Green synthesis of iron nanoparticles and their environmental applications and implications. *Nanomaterials*, 6(11), 209.
- Samreen, T., Naveed, M., Nazir, M. Z., Asghar, H. N., Khan, M. I., Zahir, Z. A., . . . Meena, V. S. (2021). Seed associated bacterial and fungal endophytes: Diversity, life cycle, transmission, and application potential. *Applied Soil Ecology*, 168, 104191.
- Saraswathi, K., Vadamalaikrishnan, K., and Jayaraman, P. (2020). The Effect of Chromium and Herbicide on the Growth of *Aspergillus terreus* Isolated from Soil Environment. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 14(3).
- Schäfer, H., Hess, C., Tobergte, H., Volf, A., Ichilman, S., Eickmeier, H., . . . Akram, W. (2015). Ultrafine sanding paper: a simple tool for creating small particles. *Small*, 11(8), 931-935.
- Schmidt, H. (2001). Nanoparticles by chemical synthesis, processing to materials and innovative applications. *Applied organometallic chemistry*, 15(5), 331-343.
- Šebesta, M., Vojtková, H., Cyprichová, V., Ingle, A. P., Urík, M., and Kolenčík, M. (2022). Mycosynthesis of Metal-Containing Nanoparticles—Fungal Metal Resistance and Mechanisms of Synthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 14084.
- Seleiman, M. F., Almutairi, K. F., Alotaibi, M., Shami, A., Alhammad, B. A., and Battaglia, M. L. (2020). Nano-fertilization as an emerging fertilization technique: why can modern agriculture benefit from its use? *Plants*, 10(1), 2.
- Servin, A., Elmer, W., Mukherjee, A., De la Torre-Roche, R., Hamdi, H., White, J. C., . . . Dimkpa, C. (2015). A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield. *Journal of Nanoparticle Research*, 17, 1-21.
- Sewe, S. O., Silva, G., Sicat, P., Seal, S. E., and Visendi, P. (2022). Trimming and validation of illumina short reads using Trimmomatic, Trinity assembly, and assessment of RNA-seq data. In *Plant bioinformatics: Methods and protocols* (pp. 211-232). Springer.
- Shelar, A., Nile, S. H., Singh, A. V., Rothenstein, D., Bill, J., Xiao, J., . . . Patil, R. (2023). Recent advances in nano-enabled seed treatment strategies for sustainable agriculture: Challenges, risk assessment, and future perspectives. *Nano-Micro Letters*, 15(1), 54.

- Shelar, A., Singh, A. V., Maharjan, R. S., Laux, P., Luch, A., Gemmati, D., . . . Shelar, A. (2021). Sustainable agriculture through multidisciplinary seed nanoprimer: prospects of opportunities and challenges. *Cells*, 10(9), 2428.
- Shrivastava, K., and Pramanik, B. (2021). Physiognomy and Antibacterial Activity of Mycosynthesized Iron Nanoparticles from *Penicillium citrinum* Thom, an Arsenic Removing Fungus. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology (IJPSN)*, 14(1), 5287-5296.
- Singh, S., Singh, G., and Arya, S. K. (2018). Mannans: An overview of properties and application in food products. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 79-95.
- Solanki, P., Bhargava, A., Chhipa, H., Jain, N., and Panwar, J. (2015). Nano-fertilizers and their smart delivery system. *Nanotechnologies in food and agriculture*, 81-101.
- Spectroscopy, I. (2013). <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/Spectrpy/InfraRed/infrared.htm>
- Srivastava, N. (2014). Iron nanoparticles induced toxicity in *Sesbania cannabina*: a morphological aspect. *Advanced Science Focus*, 2(2), 135-139.
- Su, C., Xie, R., Liu, D., Liu, Y., and Liang, R. (2023). Ecological Responses of Soil Microbial Communities to Heavy Metal Stress in a Coal-Based Industrial Region in China. *Microorganisms*, 11(6), 1392.
- Subhan, A., Uddin, N., Sarker, P., and Ahmed, N. (2016). Structure, spectroscopy, photocatalytic and antibacterial activities of Ag–ZnO–Fe₃O₄ nanoparticles and its composites with APTMS and curcumin. *Advanced Science, Engineering and Medicine*, 8(9), 676-688.
- Sudha, P. N., Sangeetha, K., Vijayalakshmi, K., and Barhoum, A. (2018). Nanomaterials history, classification, unique properties, production and market. In *Emerging applications of nanoparticles and architecture nanostructures* (pp. 341-384). Elsevier.
- Sun, H., Qu, G., Li, S., Song, K., Zhao, D., Li, X., . . . Hu, T. (2023). Iron nanoparticles induced the growth and physio-chemical changes in *Kobresia capillifolia* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 194, 15-28.
- Sun, Q., Cai, X., Li, J., Zheng, M., Chen, Z., and Yu, C.-P. (2014). Green synthesis of silver nanoparticles using tea leaf extract and evaluation of their stability and antibacterial activity. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering aspects*, 444, 226-231.
- Swihart, M. T. (2003). Vapor-phase synthesis of nanoparticles. *Current opinion in colloid & interface science*, 8(1), 127-133.
- Syu, Y.-y., Hung, J.-H., Chen, J.-C., and Chuang, H.-w. (2014). Impacts of size and shape of silver nanoparticles on *Arabidopsis* plant growth and gene expression. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83, 57-64.
- Tanaka, K. J., Song, S., Mason, K., and Pinkett, H. W. (2018). Selective substrate uptake: The role of ATP-binding cassette (ABC) importers in pathogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1860(4), 868-877.

- Tarafdar, J. C., and Raliya, R. (2013). Rapid, low-cost, and ecofriendly approach for iron nanoparticle synthesis using *Aspergillus oryzae* TFR9. *Journal of Nanoparticles*, 2013, 1-4.
- Thevenot, P., Cho, J., Wavhal, D., Timmons, R. B., and Tang, L. (2008). Surface chemistry influences cancer killing effect of TiO₂ nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 4(3), 226-236.
- Tkalec, V., Mahnic, A., Gselman, P., and Rupnik, M. (2022). Analysis of seed-associated bacteria and fungi on staple crops using the cultivation and metagenomic approaches. *Folia Microbiologica*, 67(3), 351-361.
- Tombuloglu, H., Albenayyan, N., Slimani, Y., Akhtar, S., Tombuloglu, G., Almessiere, M., . . . Manikandan, A. (2022). Fate and impact of maghemite (γ -Fe₂O₃) and magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Environmental Science and Pollution Research*, 29(3), 4710-4721.
- Tseng, T.-T., Tyler, B. M., and Setubal, J. C. (2009). Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC microbiology*, 9(1), 1-9.
- TÜRKİŞ, S., and ERTÜRK, Ö. (2015). Distribution of Orchid species in urban and meadow areas of Bartın city Turkey. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 8(3), 147-152.
- Turkmen, N., Gursoy, A., Akal, C., Unal, E. M., and Keskin, E. (2021). Evaluation of salep obtained from different wild orchid species of Turkey and their use in Maras type ice cream. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(12), e16063.
- Vahid, S., Hossein, J., and Mohammad, S. (2011). A comparison of various models for obtaining the intrinsic viscosity of salep gum and sweeteners mixture in dilute solutions. *International Food Research Journal*, 18(4), 1457.
- Vankova, R., Landa, P., Podlipna, R., Dobrev, P. I., Prerostova, S., Langhansova, L., . . . Vanek, T. (2017). ZnO nanoparticle effects on hormonal pools in *Arabidopsis thaliana*. *Science of the Total Environment*, 593, 535-542.
- Wadhams, G. H., and Armitage, J. P. (2004). Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 5(12), 1024-1037.
- Wang, F., Liu, X., Shi, Z., Tong, R., Adams, C. A., and Shi, X. (2016). Arbuscular mycorrhizae alleviate negative effects of zinc oxide nanoparticle and zinc accumulation in maize plants—a soil microcosm experiment. *Chemosphere*, 147, 88-97.
- Wang, Y.-P., and Lei, Q.-Y. (2018). Metabolite sensing and signaling in cell metabolism. *Signal transduction and targeted therapy*, 3(1), 30.
- Waqas Mazhar, M., Ishtiaq, M., Maqbool, M., Akram, R., Shahid, A., Shokralla, S., . . . El-Sabrou, A. M. (2022). Seed priming with iron oxide nanoparticles raises biomass production and agronomic profile of water-stressed flax plants. *Agronomy*, 12(5), 982.
- Weber, R. W., and Entrop, A.-P. (2017). *Dactylonectria torresensis* as the main component of the black root rot complex of strawberries and raspberries in Northern Germany. *Erwerbs-Obstbau*, 59(3), 157-169.

- Wegh, C. A., Baaleman, D. F., Tabbers, M. M., Smidt, H., and Benninga, M. A. (2022). Nonpharmacologic treatment for children with functional constipation: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of Pediatrics*, 240, 136-149. e135.
- Wei, A. (2006). Calixarene-encapsulated nanoparticles: self-assembly into functional nanomaterials. *Chemical communications*(15), 1581-1591.
- Win, T. T., Khan, S., Bo, B., Zada, S., and Fu, P. (2021). Green synthesis and characterization of Fe₃O₄ nanoparticles using Chlorella-K01 extract for potential enhancement of plant growth stimulating and antifungal activity. *Scientific reports*, 11(1), 21996.
- Wood, R. J., Fernandez, M. L., Sharman, M. J., Silvestre, R., Greene, C. M., Zern, T. L., . . . Kraemer, W. J. (2007). Effects of a carbohydrate-restricted diet with and without supplemental soluble fiber on plasma low-density lipoprotein cholesterol and other clinical markers of cardiovascular risk. *Metabolism*, 56(1), 58-67.
- Wooley, J. C., Godzik, A., and Friedberg, I. (2010). A primer on metagenomics. *PLoS computational biology*, 6(2), e1000667.
- Xia, Y., and Halas, N. J. (2005). Shape-controlled synthesis and surface plasmonic properties of metallic nanostructures. *MRS bulletin*, 30(5), 338-348.
- Xu, W., Yang, T., Liu, S., Du, L., Chen, Q., Li, X., . . . Gong, Y. (2022). Insights into the Synthesis, types and application of iron Nanoparticles: The overlooked significance of environmental effects. *Environment International*, 158, 106980.
- Yadav, A., Yadav, K., Ahmad, R., and Abd-Elsalam, K. A. (2023). Emerging Frontiers in Nanotechnology for Precision Agriculture: Advancements, Hurdles and Prospects. *Agrochemicals*, 2(2), 220-256.
- Yadav, G. K., Dadhich, S. K., and Bhateshwar, M. C. Recent Innovative Approaches in Agricultural Science.
- Yang, X., Alidoust, D., and Wang, C. (2020). Effects of iron oxide nanoparticles on the mineral composition and growth of soybean (*Glycine max* L.) plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 42, 1-11.
- Yehia, R. S., and Ali, A. M. (2020). Biosynthesis and characterization of iron nanoparticles produced by *Thymus vulgaris* L. and their antimicrobial activity. *Acta Botanica Croatica*, 79(2), 114-120.
- Zahedi, S. M., Karimi, M., and Teixeira da Silva, J. A. (2020). The use of nanotechnology to increase quality and yield of fruit crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(1), 25-31.
- Zakariya, N. A., Majeed, S., and Jusof, W. H. W. (2022). Investigation of antioxidant and antibacterial activity of iron oxide nanoparticles (IONPS) synthesized from the aqueous extract of *Penicillium* spp. *Sensors International*, 3, 100164.
- Zhang, H., Zhang, F., and Yuan, R. (2020). Applications of natural polymer-based hydrogels in the food industry. In *Hydrogels based on natural polymers* (pp. 357-410). Elsevier.

- Zhang, J., Su, L., Wang, Y., and Deng, S. (2020). Improved high-throughput sequencing of the human oral microbiome: From Illumina to PacBio. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2020.
- Zhang, T., Wang, N.-F., Liu, H.-Y., Zhang, Y.-Q., and Yu, L.-Y. (2016). Soil pH is a key determinant of soil fungal community composition in the Ny-Ålesund Region, Svalbard (High Arctic). *Frontiers in microbiology*, 7, 227.
- Zhang, T., Wang, N., Liu, H., Zhang, Y., and Yu, L. (2016). Soil pH is a key determinant of soil fungal community composition in the Ny-Ålesund region, Svalbard (high arctic). *Front Microbiol.* 2016; 7: 227. In.
- Zhang, Y., Zhang, H., Li, D., Abbas Naqvi, S. M. Z., Abdulraheem, M. I., Su, R., . . . Hu, J. (2021). Surface-enhanced Raman spectroscopy for the quantitative detection of abscisic acid in wheat leaves using silver coated gold nanocomposites. *Spectroscopy Letters*, 54(10), 732-741.
- Zhao, X., Zhao, H., Chen, Z., and Lan, M. (2014). Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging contrast agent. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 14(1), 210-220.
- Zhao, Z., Zhou, Z., Bao, J., Wang, Z., Hu, J., Chi, X., . . . Chen, Z. (2013). Octapod iron oxide nanoparticles as high-performance T₂ contrast agents for magnetic resonance imaging. *Nature communications*, 4(1), 2266.
- Zhou, Y., Ma, J., Yang, J., Lv, Z., Song, Z., and Han, H. (2023). Soybean rhizosphere microorganisms alleviate Mo nanomaterials induced stress by improving soil microbial community structure. *Chemosphere*, 310, 136784.
- Zia-ur-Rehman, M., Anayatullah, S., Irfan, E., Hussain, S. M., Rizwan, M., Sohail, M. I., . . . Alharby, H. F. (2022). Nanoparticles assisted regulation of oxidative stress and antioxidant enzyme system in plants under salt stress: A review. *Chemosphere*, 137649.

ÖZ GEÇMİŞ

Ahmed Ismael Naqee AL-BAYATI, Alfurat Lisesi’ni bitirdikten sonra Tikrit Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji bölümünden 11.09.2014 tarihinde mezun oldu. Sonra Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoteknoloji bölümünden 28.09.2018 tarihinde mezun oldu. 2018 yılında OMÜ Biyoloji Ana Bilim Dalı Doktora programına girdi. B1 derecede İngilizce bilmektedir (9.10.2023).

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0001-5411-7448.

Yayınlar:

1. Al-bayati, A., Özkoç,H., Mustafa,L., Özkoç,I (2023). The Effect of Heavy Metals on Bacterial Community Structure and Functional Profile in Surface Soils of Baiji Oil Refinery and Baghdad City, Iraq, *Geomicrobiology Journal*, [[Taylor & Francis Online](#)].
2. Al-bayati, A., Özkoç,I (2023). Effects of iron nanoparticles synthesized by endophytic fungi on orchid seed germination, *4th International “Artemis” Congress on Life, Engineering, and Applied Sciences*, pp. 248, June 3th- 6th, 2023 / İzmir – Turkey.
3. Al-bayati, A., Özkoç,I. Mohammed,A. Hasan,M (2019). Fungi sequester heavy metals in their walls and synthesis eco-friendly myconanoparticles, *15th NANOSCIENCE AND NANOTECHNOLOGY CONFERENCE*, pp. 147, November 3th - 6th, 2019 / Antalya – Turkey.