

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
NANOBİLİM VE NANOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

YEŞİL SENTEZ İLE ELDE EDİLEN ÇİNKO OKSİT
KATKILI YUMURTA KABUĞU
NANOKOMPOZİTLERİNİN (ZnO@YK)
KARAKTERİZASYONU VE POTANSİYEL
BİYOMALZEME ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ

Büşra ŞENSOY GÜN

Danışman: Prof. Dr. Belgin TUNALI
II. Danışman: Doç. Dr. Rafiq GURBANOV

BURDUR, 2025

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “Yeşil Sentez ile Elde Edilen Çinko Oksit Katkılı Yumurta Kabuğu Nanokompozitlerinin (ZnO@YK) Karakterizasyonu ve Potansiyel Biyomalzeme Özelliklerinin İncelenmesi” başlıklı bu tezin;

- Kendi çalışmam olduğunu,
- Sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi,
- Bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi,
- Kullandığım verilerde değişiklik yapmadığımı,
- Tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı,
- Bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı,

bildirir, aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

12/05/2025

(İmza)

Büşra ŞENSOY GÜN

ÖNSÖZ

Bu tez çalışması için beni yönlendiren, eğitim ve kariyer hayatımda karşılaştığım tüm zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan çok değerli, sevgili Danışman Hocam Prof. Dr. Belgin TUNALI'ya teşekkürlerimi ve minnetlerimi sunarım. Antimikrobiyal deneylerde bana yardımcı olup bilgisi ile yol gösteren, laboratuvar ve kaynaklarımı tez çalışmam için temin eden değerli Eş Danışman Hocam Doç. Dr. Rafig GURBANOV'a teşekkür ederim. Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Nanobilim ve Nanoteknoloji Bölümünde ve Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezinde bulunan değerli hocalarıma teşekkür ederim. Doktora tezimde beni yönlendiren, bilgi ve tecrübeleri sayesinde önerileri ve yardımları ile tez çalışmama destek olan tezimi değerlendiren jüri üyesi hocalarıma teşekkür ederim.

09-DR-23 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

2211- Yurt İçi Doktora Burs programı ile doktora sürecinde maddi olarak destek almamı sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Eğitim ve hayatımın her aşamasında beni her anlamda destekleyen, sevgilerini eksik etmeyen çok kıymetli canım annem Güllü ŞENSOY'a, rahmetli canım babam Mustafa ŞENSOY'a ve kardeşlerime sonsuz sevgi, teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Lisansüstü eğitimim boyunca çok büyük fedakarlıklar yapan, sevgi ve saygısını benden hiç esirgemeyen hayat arkadaşım, eşim Hasan GÜN'e, neşe ve sevgileri ile hayatımı anlamlı kılan canım yavrularım Kaan Alp GÜN ve Deniz GÜN'e sevgilerimi sunarım.

Mayıs, 2025

Büşra ŞENSOY GÜN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÖZET	ix
ABSTRACT.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Nanoteknoloji.....	4
2.2. Çinko Oksit Nanopartikülleri.....	4
2.3. Nanokompozitler.....	7
2.4. Yumurta Kabuğu.....	8
2.5. Nanomalzeme Üretim Yöntemleri.....	10
2.5.1. Yukarıdan Aşağıya Üretim Yöntemleri	11
2.5.2. Aşağıdan Yukarı Üretim Yöntemleri	12
2.5.3. Yeşil Sentez Yöntemleri	12
2.6. <i>Althea Officinalis</i> Bitkisi.....	15
2.7. Nanomalzeme Karakterizasyon Yöntemleri	16
2.8. Nanomalzemelerde Antimikrobiyal ve Biyouyumluluk Testleri.....	20
2.8.1. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Testi	20
2.8.2. Kuyu Difüzyon Testi.....	22
2.8.3. Biyofilm İnhibisyon Testi	23
2.8.4. MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) Testi....	24
2.8.5. Hemoliz Testi	25
2.9. Kaynak Özetleri	26
3. MATERYAL VE YÖNTEM	29
3.1. Materyal	29
3.2. Aletler ve Cihazlar	29
3.3. Yöntem.....	30
3.3.1. Farklı Renkteki Çiçeklerden Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması	30
3.3.2. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analizi	30
3.3.3. <i>Althaea officinalis</i> bitkisinin pembe çiçek kısımlarından bitki özütü eldesi	31
3.3.4. Yumurta Kabuğu Tozunun Hazırlanması	31
3.3.5. Nanokompozitlerin Sentezi.....	32
3.3.6. Nanokompozitlerin Karakterizasyonu	33
3.3.7. Hemoliz Deneyi	33
3.3.8. Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi	34
3.3.9. Antibakteriyal Test.....	35
3.3.10. Antifungal Test	35
3.3.11. Biyofilm İnhibisyon Testi.....	35
3.3.12. Üretilen Nanokompozitlerin L929 Hücrelerinde Sitotoksitesinin Değerlendirilmesi	36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	36
4.1. HPLC Analizi.....	36
4.2. Nanokompozitlerin Yeşil Sentezi	37

4.3.	UV-Vis Analizi	38
4.4.	ATR FT-IR Analizi.....	39
4.5.	XRD Analizi	42
4.6.	SEM-EDX Analizi	47
4.7.	TEM Analizi	54
4.8.	Hemoliz Deneyi	56
4.9.	Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi.....	58
4.10.	Antimikrobiyal Testler.....	63
4.11.	Biyofilm İnhibisyon Testi	65
4.12.	L929 Fibroblast Hücre Hattında MTT Sitotoksosite Testi	68
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	70
	KAYNAKLAR	76



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. ZnO nanopartiküllerin antimikrobiyal etkileri (Mohd Yusof vd., 2019)	6
Şekil 2.2. ZnO nanopartiküllerin özellikleri	7
Şekil 2.3. Nanokompozit yapının şematik gösterimi.....	8
Şekil 2.4. Nanomalzeme sentez yöntemleri.....	10
Şekil 2.5. Bitki özütlerinde bulunan fenolik ve flavonoid bileşenler ile nanoyapıların sentezi	14
Şekil 2.6. <i>A. officinalis</i> bitkisinin farklı renkteki çiçek kısımları	16
Şekil 2.7. Minimum inhibitör konsantrasyon testi (Kadeřábková vd., 2024)	20
Şekil 2.8. Kuyu difüzyon testi (Correa vd., 2020).....	22
Şekil 3.1. Farklı çözümler kullanılarak hazırlanan bitki özütleri	30
Şekil 3.2. Pembe çiçek özütünün hazırlanması	31
Şekil 3.3. Nanokompozit sentez aşamalarından bazı fotoğraflar	32
Şekil 3.4. Hemoliz testi deney görüntüleri	34
Şekil 4.1. Yeşil sentez öncesi ve sonrası yumurta kabuğu tozunun renk değişimi	38
Şekil 4.2. <i>Althaea officinalis</i> bitkisinin pembe çiçek ekstraktı ile sentezlenen çinko oksit nanopartiküllerinin λ_{384} nm'de maksimum absorbanlarına ait UV-Vis spektrumları	39
Şekil 4.3. Boş Yumurta kabuğu tozunun FTIR spektrumu (4000-400 cm^{-1} spektral bölge).....	40
Şekil 4.5. a) Boş Yumurta kabuğu tozu, ZnO@YK1, ZnO@YK2, ZnO@YK3 ve ZnO@YK4 nanokompozitlerinin FTIR spektrumları (4000-400 cm^{-1} spektral bölge), b) ZnO'nun metal-oksijen gerilme moduna ait absorpsiyon band aralığı	41
Şekil 4.6. Yumurta kabuğu tozunun XRD kırınım deseni.....	43
Şekil 4.7. ZnO@YK1 nanokompozitinin XRD kırınım deseni.....	44
Şekil 4.8. ZnO@YK2 nanokompozitinin XRD kırınım deseni.....	45
Şekil 4.9. ZnO@YK3 nanokompozitinin XRD kırınım deseni.....	46
Şekil 4.10. ZnO@YK4 nanokompozitinin XRD kırınım deseni.....	47
Şekil 4.11. Boş yumurta kabuğunun SEM görüntüleri.....	48
Şekil 4.12. Boş Yumurta kabuğunun EDX spektrumları	49
Şekil 4.13. ZnO@YK1 nanokompozitinin SEM görüntüleri	50

Şekil 4.14. ZnO@YK2 nanokompozitinin SEM görüntüleri	51
Şekil 4.15. ZnO@YK3 nanokompozitinin SEM görüntüleri	52
Şekil 4.16. ZnO@YK4 nanokompozitinin SEM görüntüleri	53
Şekil 4.17. Nanokompozit numunelerinin EDX verileri	54
Şekil 4.18. ZnO@YK1 nanokompozitinin TEM görüntüleri	54
Şekil 4.19. ZnO@YK2 nanokompozitinin TEM görüntüleri	55
Şekil 4.20. ZnO@YK3 nanokompozitinin TEM görüntüleri	55
Şekil 4.21. ZnO@YK4 nanokompozitinin TEM görüntüleri	56
Şekil 4.22. Örneklerin hemoliz değerleri. Sonuçlar ortalama değer \pm ortalama standart hatası olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık derecesi * ($p \leq 0,05$), ns (istatistiksel olarak anlamlı değil).	57
Şekil 4.23. YK, ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitlerinin <i>S. aureus</i> ATCC 25923 bakterisinde yapılan MİK deney sonucu	59
Şekil 4.24. YK, ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitlerinin <i>E. coli</i> ATCC 35150 bakterisinde yapılan MİK deney sonucu	60
Şekil 4.25. YK, ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitlerinin <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442 bakterisinde yapılan MİK deney sonucu	61
Şekil 4.26. YK, ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitlerinin <i>C. albicans</i> ATCC 10239 mantarında yapılan MİK deney sonucu	62
Şekil 4.27. Yumurta kabuğu ve ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitlerinin a) <i>E. coli</i> b) <i>S. aureus</i> c) <i>P. aeruginosa</i> ve d) <i>C. albicans</i> mikroorganizmalarına karşı agar kuyu difüzyon yöntemi ile elde edilen görüntüler (1; ZnO@YK2, 2; ZnO@YK4, A; CHX antibiyotiği, YK; Yumurta kabuğu).....	64
Şekil 4.28. ES, ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitlerinin <i>E. coli</i> ATCC 35218 bakterileri suşuna karşı gerçekleştirilen biyofilm testi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi ** ($p \leq 0,01$), ***($p \leq 0,001$), **** ($p \leq 0,0001$).....	66
Şekil 4.29. ES, ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitlerinin <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 bakterileri suşuna karşı gerçekleştirilen biyofilm testi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi ** ($p \leq 0,01$), ***($p \leq 0,001$), **** ($p \leq 0,0001$)	67
Şekil 4.30. Yumurta kabuğu tozu (ES) ve sentezlenen nanokompozitler için L929 fibroblastına karşı MTT sitotoksikite testi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi ** ($p \leq 0,01$), ***($p \leq 0,001$), **** ($p \leq 0,0001$)	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Sentezlenen nanokompozitlerde kullanılan malzemelerin miktarları.....	32
Çizelge 4.1. HPLC analizi sonrası bitki ekstraktlarındaki kuersetin ve gallik asit miktarları	37
Çizelge 4.2. Sentezlenen nanokompozitlerin adlandırılması	37
Çizelge 4.3. Nanokompozitlerin ve boş yumurta kabuğu tozunun hemoliz değerleri. Sonuçlar ortalama \pm ortalama standart hatası olarak gösterilmiştir.	58
Çizelge 4.4. Agar kuyu difüzyon yönteminde mikroorganizmalara karşı ölçülen zon çapları (mm)	65



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CVD	: Kimyasal Buhar Biriktirme
PVD	: Fiziksel Buhar Biriktirme
ZnO	: Çinko Oksit
NP	: Nanopartikül
CaCO₃	: Kalsiyum Karbonat
UV-Vis	: Ultraviyole Görünür Işık Spektroskopisi
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
DAD	: Diyot Dizisi Dedektörü
FTIR	: Fourier Dönüşüm İnfrared Spektroskopisi
XRD	: X-ray Kırınım Spektroskopisi
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
EDS	: Enerjide Dağıtılmış X-ray Spektroskopisi
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskobu
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
STM	: Taramalı Tünelleme Mikroskobu
AFM	: Atomik Güç Mikroskobu
DLS	: Dinamik Işık Saçılımı
VSM	: Değer Akış Haritalama
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi
YK	: Yumurta Kabuğu
YKM	: Yumurta Kabuğu Membranı
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
KKH	: Kırmızı Kan Hücreleri
TSB	: Tryptic Soy Broth
TSA	: Tryptic Soy Agar
MHB	: Mueller Hinton Broth
MHA	: Mueller Hinton Agar
AgNP	: Gümüş Nanopartikül
CuO	: Bakır Oksit
SnO₂	: Kalay Oksit
NiO	: Nikel Oksit

Co	: Kobalt
Zn	: Çinko
NaBH₄	: Sodyum Borhidrür
4-NP	: 4-nitrofenol
2D	: İki Boyutlu
µL	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
mL	: Mililitre
mg	: Miligram
nm	: Nanometre
ppm	: Milyonda bir
mm	: Milimetre
A	: Absorbans
λ	: Dalga Boyu

ÖZET

Doktora Tezi

Yeşil Sentez ile Elde Edilen Çinko Oksit Katkılı Yumurta Kabuğu Nanokompozitlerinin (ZnO@YK) Karakterizasyonu ve Potansiyel Biyomalzeme Özelliklerinin İncelenmesi

Büşra ŞENSOY GÜN

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Nanobilim ve Nanoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Belgin TUNALI
II. Danışman: Doç. Dr. Rafiq GURBANOV

Mayıs, 2025

Bu tez çalışmasında *Althaea officinalis* çiçek özütü kullanılarak çevre dostu bir yöntemle çinko oksit-yumurta kabuğu (ZnO@YK) nanokompozitleri sentezlenmiş ve biyomalzeme potansiyelleri araştırılmıştır. Çiçek özütlerinin kuersetin içeriği yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) ile belirlenmiş, en yüksek içeriğe sahip pembe çiçek özütü ile farklı molaritelerde çinko nitrat çözeltileri belirli hacimlerle karıştırılarak yumurta kabuğunda ZnO nanopartikülleri (NP) içeren nanokompozitler sentezlenmiştir. Nanokompozitlerin yapısal ve morfolojik karakterizasyonu; ultraviyole-görünür bölge spektroskopisi (UV-Vis), zayıflatılmış toplam yansıma-Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR), X-ışını difraktometresi (XRD), taramalı elektron mikroskobu-enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (SEM-EDX) ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile yapılmıştır. Hemoliz testleri, ZnO@YK nanokompozitlerinin %5'in altında hemolitik aktivite gösterdiğini ve hemokompatibiliteye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Antimikrobiyal etkinlik, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Candida albicans* ATCC 10239 karşı değerlendirilmiş; minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve agar difüzyon testlerinde özellikle ZnO@YK4 numunesi güçlü etki göstermiştir. *Escherichia coli* ATCC 35218 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 karşı yapılan biyofilm inhibisyon testleri ZnO@YK2 ve ZnO@YK4'ün biyofilm oluşumunu önemli ölçüde engellediğini ortaya koymuştur. L929 fibroblast hücreleri üzerinde yapılan MTT sitotoksikite testleri, nanokompozitlerin biyoyumlu olduğunu ve hücre proliferasyonunu desteklediğini göstermiştir. Bu çalışma, ZnO@YK nanokompozitlerinin biyomedikal uygulamalar için umut vadeden, biyoyumlu ve antimikrobiyal materyaller olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: nanokompozit, yeşil sentez, yumurta kabuğu, antimikrobiyal

Hazırlanan bu Doktora tezi Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi BAP birimi tarafından 09-DR-23 proje numarası ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

**Characterization of Zinc Oxide Additive Eggshell Nanocomposites (ZnO@YK)
Obtained by Green Synthesis and Investigation of Their Potential Biomaterial**

Büşra ŞENSOY GÜN

**Burdur Mehmet Akif Ersoy University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Nanoscience and Nanotechnology**

**Supervisor: Prof. Dr. Belgin TUNALI
Co-Supervisor: Assoc. Prof. Rafig GURBANOV**

May, 2025

In this thesis study, zinc oxide-eggshell (ZnO@YK) nanocomposites were synthesized by an environmentally friendly method using *Althaea officinalis* flower extract and their biomaterial potential was investigated. Quercetin content of flower extracts was determined by high performance liquid chromatography (HPLC), nanocomposites containing ZnO nanoparticles (NP) in eggshell were synthesized by mixing certain volumes of different molar zinc nitrate solutions with the highest content of pink flower extract. Structural and morphological characterization of nanocomposites were performed by ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis), attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR), X-ray diffractometry (XRD), scanning electron microscope-energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDX) and transmission electron microscope (TEM). Hemolysis tests revealed that ZnO@YK nanocomposites showed hemolytic activity below 5% and had hemocompatibility. Antimicrobial activity was evaluated against *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Candida albicans* ATCC 10239; especially ZnO@YK4 sample showed strong activity in minimum inhibitory concentration (MIC) and agar diffusion tests. Biofilm inhibition tests against *Escherichia coli* ATCC 35218 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 revealed that ZnO@YK2 and ZnO@YK4 significantly inhibited biofilm formation. MTT cytotoxicity tests on L929 fibroblast cells showed that the nanocomposites were biocompatible and supported cell proliferation. This study indicates that ZnO@YK nanocomposites can be considered as promising, biocompatible and antimicrobial materials for biomedical applications.

Keywords: nanocomposite, green synthesis, eggshell, antimicrobial

The present Ph.D. Thesis was supported by Burdur Mehmet Akif Ersoy University BAP unit under the Project number of 09-DR-23

1. GİRİŞ

Son yıllarda oldukça ilgi çeken bir alan olan nanoteknoloji, maddeyi atom ve molekül seviyelerinde manipüle ederek, yeni ve üstün özellikler geliştirmeyi amaçlayan multidisipliner bir bilim dalıdır. Bu bilim dalı 1 ila 100 nanometre ölçeğinde gerçekleştirilen çalışmalar ile materyallerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini köklü bir şekilde değiştirebilmektedir (Binnig vd., 1986). Nanoteknolojinin önemi, elde edilen nanoyapıların sahip oldukları eşsiz özelliklerden kaynaklanan olağanüstü performans ve verimliliğidir. Çünkü nanomalzemeler, geleneksel malzemelere kıyasla daha yüksek mekanik dayanıklılık, enerji verimliliği, geniş yüzey alanı ve özgül işlevler sunabilirler. Nanoteknolojinin hızlı gelişimi, özellikle son yirmi yılda, gelişmiş üretim teknikleri ve karakterizasyon yöntemlerinin sağladığı ilerlemelerle desteklenmiştir. Bu gelişmeler, nanoteknolojinin tıp, elektronik, malzeme bilimi ve çevre mühendisliği gibi birçok alanda geniş uygulama yelpazesi sunmasını mümkün kılmaktadır (Roco vd., 2011).

Nanomalzemelerin üretimi için kullanılan geleneksel yöntemler, genellikle yüksek enerji tüketimi ve çevresel zararlara yol açan kimyasal kullanımı ile ilişkilidir. Bu geleneksel yöntemler arasında kimyasal buhar biriktirme (CVD), sol-jel yöntemi ve fiziksel buhar biriktirme (PVD) gibi süreçler yer alır. Bu yöntemler, yüksek sıcaklıklar ve yüksek enerji gereksinimleri ile çalışır ve toksik kimyasalların salınımına neden olarak çevresel kirliliğe yol açabilir (Huston vd., 2022).

Son yıllarda, çevre dostu ve sürdürülebilir üretim yöntemleri arayışında "yeşil sentez" olarak bilinen yöntemlere yönelme eğilimi artmıştır. Yeşil sentez, nanomalzemelerin üretiminde daha az kimyasal kullanarak, enerji tüketimini minimize ederek ve çevre dostu malzemeler kullanarak daha sürdürülebilir bir yaklaşım sunar (Sharma vd., 2019). Bu yöntemler, doğal kaynaklardan yararlanarak ve biyolojik sistemlerin avantajlarından faydalanarak nanomalzemelerin üretimini sağlar. Yeşil sentez yöntemleri, genellikle biyolojik kaynaklardan yararlanarak yapılır. Örneğin, bitki özleri ve mikroorganizmalar kullanılarak nanomalzemelerin sentezlenmesi mümkün olmaktadır (Zambonino vd., 2021). Biyolojik sentez, nanomalzemelerin yüzey modifikasyonunu ve stabilitesini artırma yeteneğine de sahiptir. Bitki özleri kullanılarak sentezlenen nanoparçacıkları, daha iyi biyolojik uyumluluk ve daha düşük toksisite gibi özellikler sergileyebilmektedir (Iravani ve Varma, 2020). Ayrıca, yeşil sentez yöntemleri genellikle

daha ekonomik ve daha kolay kontrol edilebilir süreçler sunar, bu da endüstriyel uygulamalar için büyük bir avantajdır.

Nanokompozitler, bir matris malzeme ile nanometre ölçeğindeki dolgu maddelerinin birleşiminden oluşan çok fazlı materyallerdir ve genellikle üstün mekanik, termal ve elektriksel özellikler sergilerler (Pownraj vd., 2021). Bu kompozitlerin performansı, nanopartiküllerin matrisle etkileşimleri sayesinde, bileşenlerinin tek başına sağladığı performanstan daha yüksek olabilir. Örneğin, karbon nanotüpler ve grafen gibi nanopartiküller içeren kompozitler, yüksek çekme dayanımı, düşük yoğunluk ve mükemmel elektriksel iletkenlik özellikleri ile dikkat çekerler (İbrahim vd., 2021). Nanokompozitlerin antimikrobiyal özellikleri de önemli bir uygulama alanıdır; özellikle metal nanopartikülleri, bakteri ve virüslere karşı yüksek etkinlik gösterir ve bu özellikleri sayesinde tıbbi cihazlar, giyilebilir malzemeler ve hijyen ürünlerinde kullanılmaktadır (Pownraj vd., 2021). Metal nanopartiküllerinin antimikrobiyal etkinliği, bu materyallerin yüksek yüzey alanı ve bakteriyel hücrelere doğrudan etki eden serbest radikallerin üretiminden kaynaklanır (İbrahim vd., 2021; Zhou vd., 2023). Ayrıca, metal nanopartiküllerinin çeşitli büyüklük, şekil ve kimyasal bileşimleri, antimikrobiyal aktiviteyi etkileyen önemli faktörler arasında yer almaktadır. Bu metal nanopartiküller arasında Çinko oksit nanopartikülleri (ZnO NP), yarı iletken özellikleri, yüksek yüzey alanı ve optik özellikleri nedeniyle geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir. ZnO nanopartiküllerinin antimikrobiyal özellikleri, onların mikroorganizmalar üzerindeki etkileri nedeniyle geniş bir araştırma konusudur. ZnO nanopartikülleri, mikroorganizmalara karşı etkili antimikrobiyal aktiviteler sergileyebilir. Bu etkinin temel mekanizması, ZnO nanopartiküllerinin yüzeyindeki serbest radikallerin, özellikle hidrojen peroksit ve süperoksitlerin, mikroorganizmaların hücre duvarlarını oksidatif stres yoluyla hasara uğratmasıdır (Zhou vd., 2023). Ayrıca, ZnO nanopartikülleri UV ışınları ile etkinleşerek fotokatalitik antimikrobiyal etkiler gösterebilir. Bu özellikler, onları gıda güvenliği, tıbbi uygulamalar ve su arıtma gibi alanlarda potansiyel uygulamalar için uygun hale getirir (Jin vd., 2019).

Nanokompozit haldeki biyomalzemelerin sentezinde birçok dolgu malzemesi kullanılmaktadır. Son zamanlarda sürdürülebilir çevre için biyomalzeme sentezlerinde kullanılan inorganik kalsiyum karbonat gibi dolgu malzemelerinin yerini yumurta kabuğu almaktadır (Owuamanam ve Cree, 2020). Yumurta kabuğu, biyolojik olarak türetilmiş ve yüksek oranda kalsiyum karbonat (CaCO_3) içeren bir materyaldir. Bu malzemenin yapısında bulunan aragonit kristal formu, nanoteknolojide nanopartikül üretimi için ideal

bir yapı sunar (Kalra vd., 2022). Kalsiyum karbonat nanopartiküllerinin yüksek yüzey alanı ve reaktivitesi, bu partiküllerin çeşitli endüstriyel uygulamalarda, özellikle de nanokompozit malzemelerde kullanılmasına olanak tanır. Yumurta kabuğu bazlı malzemelerin sağlık ve gıda güvenliği uygulamalarında kullanılabilirliğini artırmaktadır. Yumurta kabuğunun çevresel sürdürülebilirliği, doğal ve bol bulunabilirliği, biyolojik olarak bozunabilirliği ve geri dönüşüm potansiyeli ile desteklenmektedir. Bu nitelikler, yumurta kabuğunu plastik ve diğer sentetik malzemelere karşı etkili ve çevre dostu bir alternatif haline getirmektedir (Parvin vd., 2019).

Bu tez çalışmasında, *Althaea officinalis* bitkisinin çiçek kısımlarından elde edilen özütü ile nanokompozit sentezi gerçekleştirilmiştir. *Althaea officinalis* bitkisinin pembe, kırmızımsı pembe ve beyaz çiçek kısımlarından elde edilen özütlerin kuersetin ve gallik asit miktarları Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Diyot Dizisi Dedektörü (HPLC-DAD) ile tespit edildi. HPLC analizine göre seçilen pembe çiçek özütü kullanılarak ZnO NP'leri içeren yumurta kabuğu nanokompoziti sentezlendi. Sentez sırasında ZnO nanoyapılarının oluşumunu Ultraviyole görünür ışık spektroskopisi (UV-Vis) ile tespit edildi. Elde edilen nanokompozitler, karakterizasyon için Fourier dönüşüm infrared (FTIR) spektroskopisi, X-ray kırınımı (XRD), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve enerjide dağıtılmış X-ray spektroskopisi (EDS) ile detaylı bir şekilde incelenmiş ayrıca, geçirimli elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak morfolojik ve yapısal analizler yapılmıştır. Nanokompozitlerin hemolitik aktiviteleri, antimikrobiyal özellikleri, biyofilm oluşumu üzerindeki etkileri ve MTT sitotoksitesite testleri ile biyolojik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Bu analizler, üretilen ZnO NP nanokompozitlerinin çeşitli mikroorganizmalar karşısında yüksek antimikrobiyal etkinlik ve biyoyumluluk sağladığını, ayrıca biyofilm inhibitör özellikleri gösterdiğini ortaya koymuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nanoteknoloji

Nanoteknoloji, maddeleri atomik ve moleküler ölçeklerde manipüle ederek yeni materyaller ve sistemler tasarlamayı hedefleyen bir bilim ve mühendislik alanıdır. Bir nanometre, bir metrenin milyarda biri olan bir ölçü birimi ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) olarak tanımlanır. Bu mikroskobik ölçek, nanoteknolojinin, maddelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin mikroskopik ölçekteki davranışlarından farklı olmasını sağlar ve bu farklılıklar, yenilikçi uygulamalar için geniş bir potansiyel sunmaktadır (Drexler, 1986; Roco vd., 2023).

Nanoteknolojinin teorik temelleri, 1959 yılında Richard Feynman'ın "There's Plenty of Room at the Bottom" başlıklı konuşmasıyla atılmıştır. Feynman, bu konuşmasında atom ve molekülleri doğrudan manipüle etme fikrini öne sürmüştü ve bu alandaki bilimsel ve teknolojik gelişmelere ışık tutmuştur (Feynman, 1960). Nanoteknolojinin modern anlamda bir disiplin olarak gelişimi, K. Eric Drexler'in 1986'da yayımlanan 'Engines of Creation' adlı kitabıyla hız kazanmıştır. Drexler'in eseri, nanoteknolojinin teorik ve pratik potansiyelini detaylı bir şekilde incelemiş ve bu alandaki düşünce yapısını şekillendirmiştir (Drexler, 1986).

1990'ların başında, Taramalı Tünelleme Mikroskobu (STM) ve Atomik Güç Mikroskobu (AFM) gibi cihazların geliştirilmesi, nanoteknolojinin laboratuvar ortamında uygulanabilirliğini kanıtlamıştır. Bu araçlar, atom ve molekülleri doğrudan gözleme ve manipüle etme yeteneğini gözlemlemeyi sağlayarak nanoteknolojik araştırmaların temelini oluşturmuştur (Binnig vd., 1982; Binnig vd., 1986).

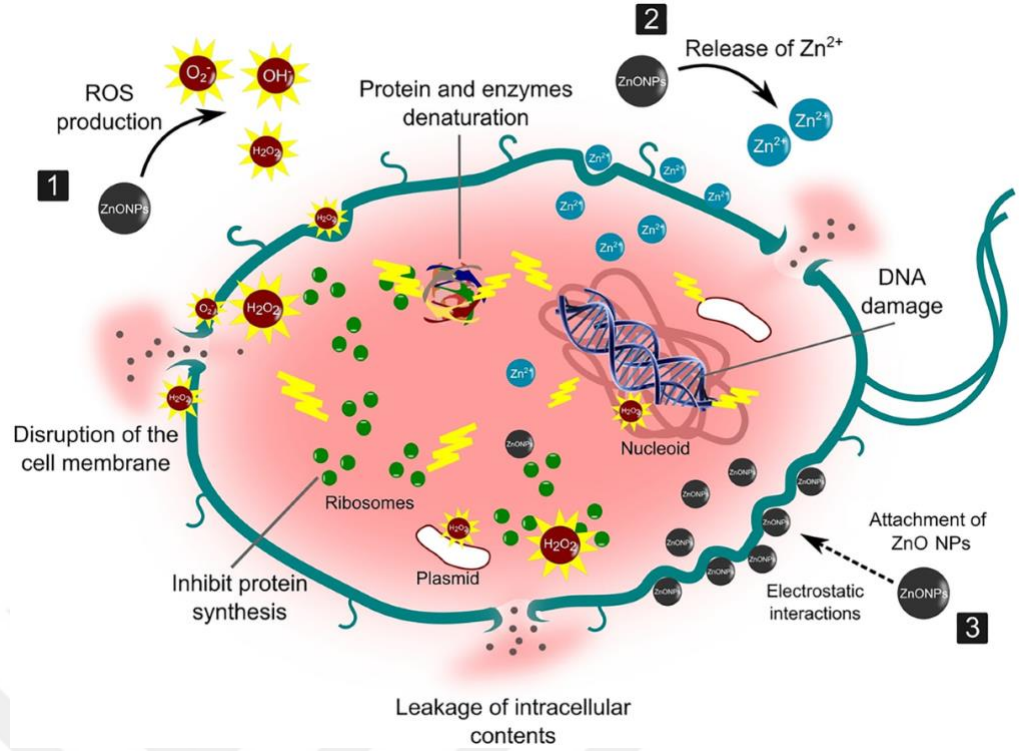
Son yıllarda, nanoteknoloji tıp, elektronik, enerji ve malzeme bilimleri gibi birçok alanda kayda değer ilerlemeler göstermiştir. Örneğin, tıpta nanoteknolojinin hedeflenmiş ilaç dağıtımı ve biyomühendislik uygulamaları, sağlık alanında devrim niteliğinde yenilikler sunmaktadır. Elektronik sektöründe, daha küçük ve daha güçlü cihazların üretimi için nanoteknolojik yöntemler kullanılmakta ve enerji alanında, nanoteknoloji, daha verimli enerji depolama ve dönüşüm çözümleri sunma potansiyeline sahiptir (Bhushan, 2021; Ejidike, 2024).

2.2. Çinko Oksit Nanopartikülleri

ZnO nanopartikülleri, yüksek yüzey alanı ve küçük boyutları sayesinde benzersiz elektronik, optik, antimikrobiyal ve kimyasal özelliklere sahiptir. ZnO'nun yarı iletken

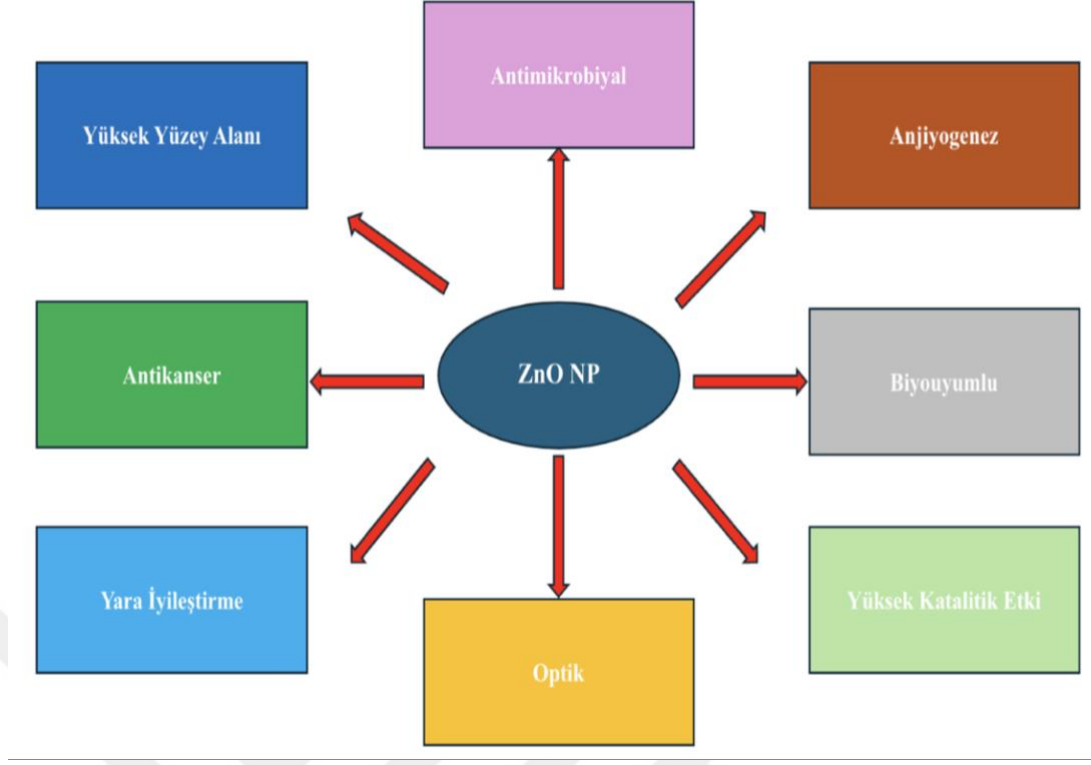
doğası, onu özellikle fotokatalitik ve elektronik uygulamalar için uygun hale getirir. ZnO nanopartiküllerinin UV ışınlarını absorbe etme kapasitesi, onları güneş enerjisi uygulamalarında ve ultraviyole filtreleme sistemlerinde değerli kılar. Ayrıca, yüksek yüzey enerjisi ve reaktif yüzey özellikleri, onları biyomedikal ve çevresel uygulamalar için ideal kılar. Bu özellikler, ZnO nanopartiküllerinin çeşitli endüstriyel ve bilimsel alanlarda geniş çapta kullanılmasını sağlamaktadır (Zhang vd., 2012; Akhtari vd., 2025; Kamaraj vd., 2025).

ZnO nanopartiküllerinin antimikrobiyal etkinliği, özellikle bakteriyel ve fungal patojenlerle mücadeledeki potansiyelinden dolayı geniş bir ilgi görmektedir. Bu nanopartiküller, mikroorganizmaların hücre duvarlarına etki ederek veya serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri üreterek patojenlerin büyümesini inhibe eder (Şekil 2.1). Bu özellikleri, ZnO nanopartiküllerinin çeşitli enfeksiyonlarla mücadelede etkili bir araç olmasını sağlar. Bunun yanı sıra, ZnO nanopartiküllerinin biyofilm oluşumunu inhibe edebilme yeteneği, onların antimikrobiyal özelliklerini daha da belirginleştirir. Biyofilm, bakterilerin yüzeylere yapışarak çoğaldığı ve antibiyotik tedavilerine karşı direnç kazandığı bir yapıdır (Sewid vd., 2025). ZnO nanopartikülleri, biyofilm oluşumunu engelleyerek bakteriyel kolonizasyonu ve enfeksiyon riskini azaltabilir. Bu nedenle, ZnO nanopartiküllerinin medikal ve çevresel uygulamalarda potansiyel kullanımları üzerinde yapılan araştırmalar hızla artmaktadır (Wang vd., 2023; Kamaraj vd., 2025; Bahari vd., 2025).



Şekil 2.1. ZnO nanopartiküllerin antimikrobiyal etkileri (Mohd Yusof vd., 2019)

ZnO NP'ler, biyotıp, kozmetik, optik ve elektronikteki geniş potansiyel uygulamaları ile son yıllarda kullanımları yaygınlaşmaktadır. ZnO NP'leri geniş yüzey alanına ve yüksek katalitik aktiviteye sahiptir. Birçok çalışmada ZnO NP'lerinin antibakteriyel, antioksidan, antikanser, anjiyogenez ve yetişkin dermal fibroblast hücrelerinin çoğalmasını sağladığı rapor edilmiştir (Şekil 2.2). Ek olarak, ZnO içeren malzemelerinin güvenliği, gıda ve ilaç idaresi (FDA) tarafından onaylanmıştır. (Ahtaz vd., 2017; Carofoglio vd., 2020; Mehar vd., 2022).

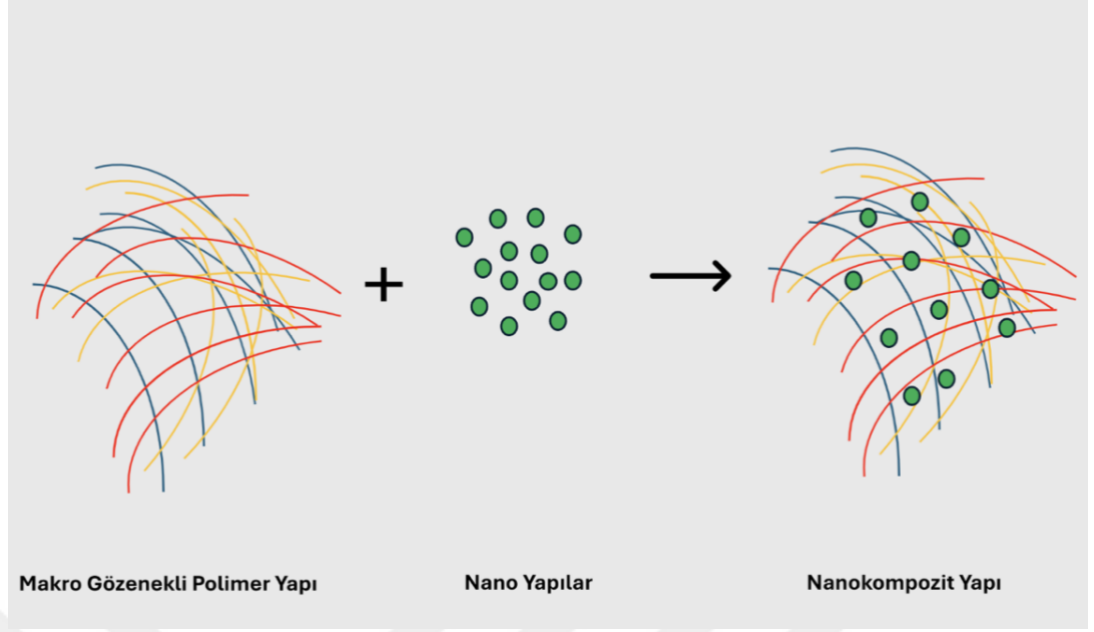


Şekil 2.2. ZnO nanopartiküllerin özellikleri

Bu özellikler, ZnO nanopartiküllerinin çeşitli sağlık ve çevresel uygulamalarda, özellikle enfeksiyonların kontrolünde ve sanitasyon uygulamalarında etkili bir çözüm olabileceğini gösterir. Güncel araştırmalar, bu nanopartiküllerin antimikrobiyal etkinliklerini ve potansiyel uygulama alanlarını daha da kapsamlı bir şekilde ortaya koymaktadır (Abdelghany vd., 2022; Lyngdoh vd., 2024; Tsakiridou vd., 2024).

2.3. Nanokompozitler

Nanokompozitler, nanometre ölçeğindeki (1-100 nm) bir veya daha fazla nanomalzemenin, matris malzemesi ile birleşmesiyle elde edilen ileri düzey malzemelerdir. Bu kompozitler, nanomalzemelerin özel fiziksel ve kimyasal özelliklerinin matris malzemesinin özellikleriyle birleşerek geliştirilmiş performans ve fonksiyonellik sunar. Nanokompozitler, özellikle üstün mekanik, elektriksel, optik ve termal özellikleri nedeniyle endüstriyel ve teknolojik uygulamalarda önemli bir rol oynamaktadır (Wang vd., 2023).



Şekil 2.3. Nanokompozit yapının şematik gösterimi

Nanokompozitler, genellikle iki veya daha fazla ana bileşenden oluşmaktadır. Bu bileşenler matris malzemesi içerisinde ya da yüzeyinde nanoyapılı doldurucu partiküller olarak yer almaktadır (Şekil 2.3). Matris malzemesi, polimer, seramik veya metal bazlı olabilir ve nanoyapılı partiküller, matrisin mekanik, elektriksel, optik ve antimikrobiyal özelliklerini iyileştirmek için kullanılmaktadır. Nanokompozitlerin performansı, nanoyapılı partiküllerin tipine, boyutuna, formuna ve matrisle olan etkileşimlerine bağlı olarak değişir. Örneğin, karbon nanotüpler ve grafen tabakaları gibi yüksek yüzey alanına sahip nanomalzemeler, matrisin mekanik özelliklerini artırabilirken; metal oksit nanopartiküller, elektriksel ve optik özellikleri iyileştirebilir. Ayrıca, bazı nanokompozitler antimikrobiyal özellikler de sergiler. Metal oksit nanopartiküller UV ışınımı altında reaktif oksijen türleri üretir ve bu da mikroorganizmaların inaktive olmasına neden olur (Sun vd., 2018). Özellikle, gümüş, çinko oksit ve bakır nanopartikülleri, antimikrobiyal özellikleri ile bilinir ve bu yüzden tekstil, kaplama ve biyomedikal uygulamalarda kullanılır (Zahran ve Marei, 2019).

2.4. Yumurta Kabuğu

Giderek artan nüfusa bağlı olarak mevcut doğal kaynakların azalması ve artan çevre sorunlarına ilişkin endişeler çoğalmaktadır. Doğal kaynak atıklar kullanılarak biyotemelli malzemelerin yapımı bu sorunların önüne geçmek için yeterlidir. Ayrıca maliyetlerin azalması ve biyomalzeme özelliklerinin geliştirilmesi için düşük maliyetli dolgu

maddeleri eklenmektedir. Yaygın olarak kullanılan bir inorganik dolgu maddesi kalsiyum karbonattır. Son zamanlarda bu inorganik (kireç taşı gibi) dolgu maddeleri yerine yüksek kalsiyum karbonat içeriği bulunan tavuk yumurta kabukları gibi atık biyomateryaller tercih edilmektedir (Owuamanam ve Cree, 2020). Ayrıca, dünya çapında atık tavuk yumurtası kabukları, çevresel sorunlara neden olan çöplüklere atılmaktadır. Bu atıkların ayrışması amonyak, hidrojen sülfür ve kötü kokulara neden olan aminler üretmektedir. Bu kötü kokuya ise fare, sıçan, sinek ve böcek gibi canlılar gelerek *Escherichia coli* ve *Salmonella* gibi patojenlerin yayılmasında etkili olmaktadır (Bee ve Abdul, 2020; Owuamanam ve Cree, 2020).

Yumurta kabuğunun son zamanlarda biyomalzemelerde kullanılması, onun çok önemli özelliklere sahip olmasındandır. Bu özellikler; yumurta kabuk zarının antibakteriyel aktivitesi, yara iyileştirme özelliği ve yumurta kabuk kısmının makro/mikro gözenek yapısıdır. Yumurta kabuk zarının antibakteriyel aktivitesi, yumurta kabuk yüzeyindeki gözenekleri saran ve bakteri penetrasyonunu engelleyen kütikül tabakasından kaynaklanmaktadır. Kütikül tabakasının bu antibakteriyel aktivitesi ise kimyasal ve fiziksel özellikleri sayesinde. Yumurta kabuğu kütikülünde bazı antibakteriyel proteinler (c-tipi lizozim, ovotransferrin ve ovokaliksin) tespit edilmiştir (Martel vd., 2012; Alba vd., 2013). Birçok kuş türü yumurtası ile yapılan bir çalışmada kütikül yapısının, opaklığının ve kalınlığının antibakteriyel özelliğine etkisi olduğu gözlenmiştir (Chen vd., 2019). Ayrıca bu çalışmada tavuk, hindi, bildircin, ördek, kaz ve devekuşu yumurta kabuklarının daha kalın kütikül tabakaları içerdiklerinden dolayı antibakteriyel etkileri diğer türlere göre fazla olduğu tespit edilmiştir (Chen vd., 2019). Yumurta kabuğunun *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus subtilis* gibi yaraları sıklıkla enfekte eden bakteri şuşlarında etkili şekilde antibakteriyel aktivite gösterdiği gözlenmiştir (Labadie vd., 2008; Alba vd., 2013). Bunlara ek olarak yumurta kabuğu membranı (YKM), yara iyileşmesinde kullanılan, potansiyel uygulamaları olan bir biyopolimerdir. YKM, yumurta kabuklarının içinde bulunan suda çözünmeyen proteinli lifli bir ağdan oluşmaktadır. Bu lifli ağ yapıda kolajenler, amino asitler ve diğer biyolojik olarak aktif bileşikler bulunmaktadır. YKM, kollajen birikimini teşvik ederek daha hızlı yara iyileşmesi ve kalın granülasyon dokusuna yol açarak yara dokusunun ilerlemesini sağlamaktadır (Sah ve Rath, 2016; Ahmed vd., 2019; Webb vd., 2022). Bir çalışmada yumurta kabuğu membran tozunun anti-inflamatur etkisi olduğunu ve ayrıca fare derisi yara iyileşme modeli kullanarak yapılan deneylerde yaraların kapanması için hücre uyarımı sağladığı gözlenmiştir (Vuong

vd., 2018). Yumurta kabuğu membranı doğrudan yara pansuman malzemesi olarak kullanılmak için farelerde denenmiş ve yara iyileşmesinde başarılı olmuştur. Ayrıca yumurta kabuğu zarı bazı polimerler ve metallerle kompozit oluşturularak yara iyileşme kapasitelerine bakılmıştır. Kitosan ve yumurta kabuğu zarı ile oluşturulan kompozit film hem antibakteriyel etki hem de yara iyileştirme özelliği göstermiştir (Ray vd., 2018). AgNp ile yapılan nanokompozitte aynı şekilde etki göstererek yumurta kabuğunun başarılı bir yara iyileştirici ajan olduğunu göstermiştir (Ray vd., 2018; Li vd., 2019; Mensah vd., 2021).

2.5. Nanomalzeme Üretim Yöntemleri

Nanoteknoloji alanında nanomalzemelerin üretimi Şekil 2.4’de gösterildiği gibi genel olarak üç ana yaklaşım etrafında şekillenir: yukarıdan aşağıya (top-down), aşağıdan yukarıya (bottom-up) yöntemler ve yeşil sentez yöntemleri. Bu yöntemler, malzemelerin özelliklerini ve üretim verimliliğini etkileyen çeşitli avantajlar ve sınırlamalar sunar.



Şekil 2.4. Nanomalzeme sentez yöntemleri

2.5.1. Yukarıdan Aşağıya Üretim Yöntemleri

Yukarıdan aşağıya yöntemler, büyük parçaların küçültülerek nanometre ölçeğine indirilmesi esasına dayanır. Bu yöntemler genellikle fiziksel ve kimyasal işlemler kullanarak makro ölçekli materyalleri nano boyutlarına dönüştürür. Yaygın yukarıdan aşağı yöntemlerinin bazıları şu şekildedir;

Mekanik öğütme, büyük parçaları mekanik kuvvetlerle küçük parçalara dönüştüren bir yöntemdir. Bu yöntemde kullanılan ball-milling tekniği, tozların ve nanopartiküllerin homojen bir şekilde üretilmesini sağlar. Ancak, geniş bir boyut dağılımı ve kontaminasyon riski gibi dezavantajları vardır (Dubadi vd., 2021).

Lazer ablasyonu, bir lazer ışınının hedef materyalin yüzeyini buharlaştırarak nanometre ölçeğinde partiküller elde edilmesini sağlar. Bu yöntem yüksek saflıkta ve kontrollü boyutta nanomalzemeler üretme avantajı sunar, fakat yüksek maliyetli ekipmanlar ve enerji gerektirebilir (Naser vd., 2019).

Litografi, silikon, cam veya bir substrat üzerine bilgisayar destekli desenlerin aktarılmasını sağlayan bir nanomalzeme üretim tekniğidir. Özellikle yarı iletken ve mikro/nano sistemlerin üretiminde temel bir adımdır. En yaygın kullanılan yöntem olan fotolitografi, UV ışık kaynağı ile fotoresist adı verilen ışığa duyarlı malzeme üzerine desen aktarımını sağlar. Bu yöntem, mikroelektronik üretimde standart hale gelmiştir. Alternatif olarak, elektron demeti (e-beam) litografisi ve X-ışını litografisi, daha yüksek çözünürlük gerektiren nano ölçekte üretimlerde dikkat çeken tekniklerdir. E-beam, doğrudan yazma sayesinde çok ince desenler oluşturabilirken; X-ışını litografisi, kısa dalga boyları sayesinde yüksek hassasiyet sunar (Ateş ve Bahçeci, 2015).

Nano yapı sentezinde kullanılan mekanik aşındırma yöntemi, malzemelerin fiziksel olarak öğütülmesi ve parçalara ayrılması esasına dayanır. Bu yöntem, genellikle yüksek enerjili mekanik işlemlerle gerçekleştirilir ve malzeme parçacıklarının boyutlarını nanometre ölçeğine indirmek için kullanılır. Mekanik aşındırma, özellikle metal, seramik ve polimer gibi çeşitli malzemelerin nano yapılarına ulaşmak için etkili bir yöntemdir. Bu süreçte, malzeme parçacıkları, bir dizi döner ve darbe mekanizması aracılığıyla birbirine sürtünerek veya çarpışarak küçülür. Sonuç olarak, elde edilen nano yapılar, yüksek yüzey alanları ve belirgin fiziksel özellikler sergileyerek, birçok endüstriyel uygulama için faydalı hale gelir (Ahmed vd., 2019).

2.5.2. Aşağıdan Yukarı Üretim Yöntemleri

Aşağıdan yukarıya yöntemler, atom ve moleküllerin bir araya gelerek nanomalzemeleri oluşturmasını sağlar. Bu yöntemler genellikle daha homojen ve kontrollü nanomalzemeler üretir. Yaygın aşağıdan yukarı sentez yöntemlerinden bazıları şu şekildedir;

Kimyasal buhar biriktirme (CVD), gaz fazındaki reaktörlerin bir substrat üzerine kimyasal reaksiyonlar yoluyla birikmesini sağlar. Bu yöntem, özellikle karbon nanotüpler ve grafen gibi 2D materyallerin üretiminde kullanılır ve yüksek kaliteli nanomalzemeler üretir (Elliott vd., 2013).

Metal alkoksitlerin veya metal tuzlarının sol-jel işlemine tabi tutulmasıyla nanomalzemeler üretilir. Bu yöntem, jel formundaki bir çözeltinin ısıtılması ve kurutulması yoluyla nanoyapılı seramikler ve metal oksitler üretir (Yang vd., 2023).

Sol-gel yöntemi, belirli koşullar altında moleküllerin veya atomların bir araya gelerek nanomalzeme oluşturmasını sağlar. Çözelti aşamasında nükleasyon, sonrasında büyüme aşaması ile devam eder. Bu teknik, özellikle nano kristaller ve nanoyapıların üretimi için kullanılır. Nükleasyon ve büyüme mekanizmaları, nanomalzemelerin oluşumunda kritik süreçlerdir. Nükleasyon, çözelti aşamasında başlangıçta küçük çekirdeklerin oluşumuyla başlar ve büyüme aşamasında bu çekirdeklerin büyüyerek nihai yapıyı oluşturmasıyla devam eder. Bu süreçler sırasında süper saturasyon durumu, çekirdek oluşumunun termodinamik olarak mümkün hale gelmesi için gerekli bir itici güç sağlar. Ayrıca, büyüme süreci genellikle difüzyon-kontrol veya kinetik kontrollü mekanizmalarla ilerler. LaMer mekanizmasına göre, bu aşamalar arasındaki denge ve dinamikler, partikül boyutu ve morfolojisi üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir (Harish vd., 2022; Aspillaga vd., 2023).

2.5.3. Yeşil Sentez Yöntemleri

Yeşil sentez, çevre dostu ve sürdürülebilir yöntemlerle nanomateryaller ve diğer kimyasal bileşenlerin sentezlenmesini amaçlayan bir yaklaşımdır. Bu metodoloji, toksik kimyasallar ve zararlı reaktiflerin kullanımını minimize ederek çevresel ve sağlık risklerini azaltmayı hedefler. Yeşil sentez süreçleri genellikle daha düşük sıcaklık ve basınç koşullarında çalışarak enerji tüketimini azaltır ve ekonomik olarak daha uygun hale gelir. Ayrıca, bu yöntemler toksik reaktiflerin kullanımını sınırlayarak işçi sağlığını korur ve laboratuvar güvenliğini artırır. Doğal ve biyolojik kaynakların kullanımı, sentez

sürecinde yüksek seçicilik ve verimlilik sağlar, bu da yüksek saflıkta ve belirli özelliklere sahip ürünler elde edilmesine olanak tanır. Yeşil sentez, sürdürülebilirlik prensiplerine uygun olarak çalışır ve doğal kaynakların korunmasına katkıda bulunur, çevresel dengeyi uzun vadeli olarak destekler. Ayrıca, maliyet etkinliği sağlamakta olup, daha az enerji ve maliyetli reaktifler kullanarak ekonomik tasarruflar sunar (Amrillah vd., 2022; Alsaiari vd., 2023).

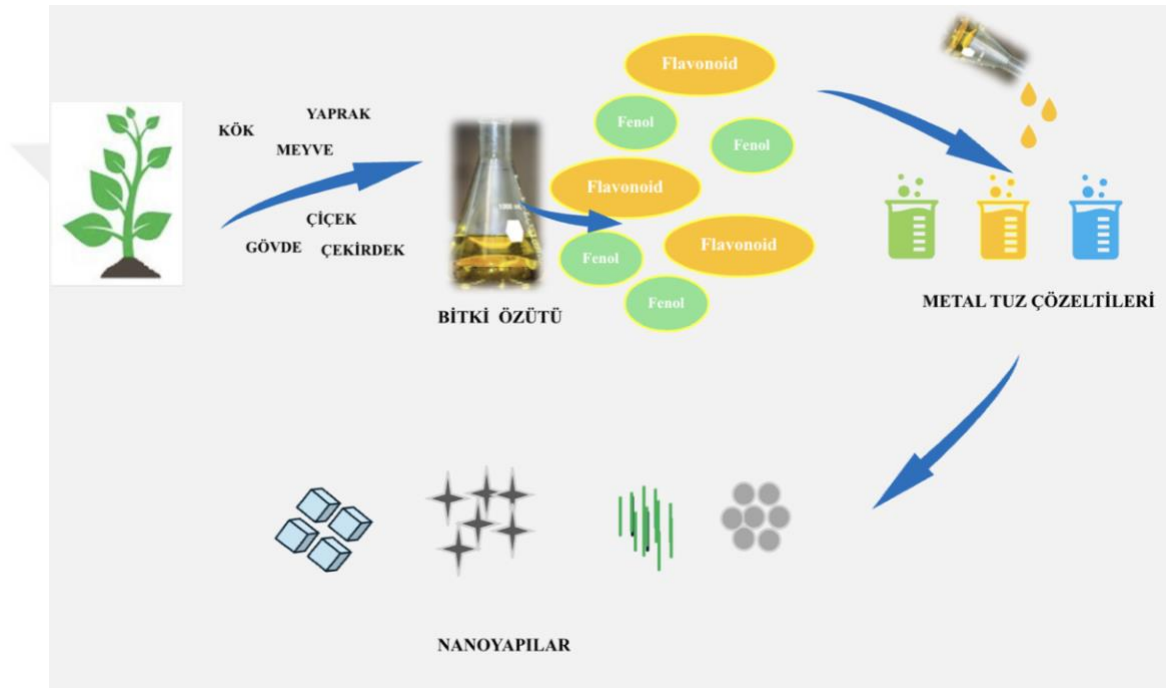
Mikroorganizmalar özellikle bakteriler, mantarlar ve algler metal iyonlarını indirgeme ve bu iyonları nanoboyutta parçacıklara dönüştürme yetenekleri sayesinde biyolojik nanopartikül sentezinde önemli bir rol üstlenmektedir. Bu organizmalar, hücresel metabolizmalarının bir parçası olarak çeşitli enzimler, redüktanlar ve diğer biyomoleküller üretir. Bu bileşenler, metal iyonlarının redüksiyonunu sağlayarak stabil ve çoğu zaman yüzeyleri fonksiyonel gruplarla kaplı nanopartiküllerin oluşumuna aracılık eder. Süreç, organizmanın türüne bağlı olarak hücre içinde (intraselüler) veya hücre dışında (ekstraselüler) meydana gelebilir (Park vd., 2015).

Bakteriler, genellikle metal iyonlarını doğrudan hücre içine alarak, redoks enzimleri aracılığıyla nanoparçacık oluşumunu sağlarlar. Bu enzimatik aktiviteler, genellikle sitoplazmada veya periplazmik alanda gerçekleşir. Mantarlar ise hücre dışı ortamda salgıladıkları metabolitler ve hücre duvarı bileşenleri aracılığıyla nanopartikül sentezine katkı sunar. Algler de benzer şekilde fotosentetik metabolizmaları ve ürettikleri polisakkaritler sayesinde bu sürece dahil olabilmektedir (Park vd., 2015).

Biyolojik nanopartikül üretimi, toksik kimyasallar kullanılmaması, düşük sıcaklık ve basınç gereksinimi gibi avantajlarıyla çevre dostu ve sürdürülebilir bir yöntem olarak öne çıkar. Ayrıca, mikroorganizmaların kolayca kültürlenebilmesi, sürecin ölçeklenebilirliğini destekler. Bu yöntemle elde edilen nanopartiküller genellikle yüksek biyoyumluluğa sahip olup tıbbi ve çevresel uygulamalarda değerlendirilmeye uygundur (Fariq vd., 2017).

Ancak bu yöntemlerin bazı sınırlılıkları da bulunmaktadır. Öncelikle, biyolojik sistemlerin hassas yapısı, proses kontrolünü zorlaştırabilir; bu da nanopartiküllerin boyut, şekil ve dağılımında istenmeyen varyasyonlara yol açabilir. Ayrıca üretim süreci genellikle daha yavaş ilerler ve sentez mekanizmaları her mikroorganizma için ayrıntılı olarak bilinmediğinden, süreçlerin standardizasyonu güçtür. Endüstriyel ölçekli üretim açısından ise saflaştırma, ayırıştırma ve verimlilik gibi teknik zorluklar hala önemli birer engel teşkil etmektedir.

Yeşil sentezde bitki özütlerinin kullanımı, çevresel sürdürülebilirliği artırma ve sağlık güvenliğini sağlama açısından büyük avantajlar sunar. Bitkisel özütler, doğal ve biyobozunur kaynaklar olduklarından, kimyasal sentez süreçlerinde toksik ve zararlı yan ürünlerin oluşumunu önemli ölçüde azaltarak çevre kirliliğini minimize eder ve sağlık risklerini en aza indirir. Ayrıca, bu özütler, yenilenebilir ve ekonomik kaynaklar olup, doğal olarak bol bulunan materyallerden elde edildikleri için maliyetleri düşürür ve enerji tüketimini azaltır (Thatyana vd., 2023). Özellikle, bitkisel özütlerde bulunan fenolik ve flavonoid bileşenler, yeşil sentez süreçlerinde kritik bir rol oynar (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Bitki özütlerinde bulunan fenolik ve flavonoid bileşenler ile nanoyapıların sentezi

Kuersetin, bitkisel özütlerde bulunan güçlü bir flavonoiddir ve metal nanopartiküllerin sentezinde oldukça etkili bir indirgeme ajanı olarak işlev görür (Rai vd., 2009). Kuersetin, yüksek antioksidan kapasitesi sayesinde serbest radikalleri nötralize eder ve metal iyonlarını indirger, bu da nanopartiküllerin morfolojisini ve büyüklüğünü kontrol altında tutarak daha homojen ve kararlı nanopartiküller elde edilmesini sağlar. Gallik asit ise, nanopartiküllerin stabilizasyonunda önemli bir rol oynar; bu bileşen, partiküllerin aglomerasyonunu önler ve nanopartiküllerin daha düzgün bir dağılımını sağlar (Ali vd., 2013). Kuersetin ve gallik asidin birlikte kullanımı, ZnO nanopartiküllerinin fiziksel ve kimyasal özelliklerini iyileştirir, antibakteriyel ve antifungal özelliklerini güçlendirir ve uygulama performansını artırır. Bu nedenle,

kuersetin ve gallik asidin, yeşil sentez süreçlerindeki kullanımları, nanopartiküllerin kalite ve etkinliğini artırmada önemli bir etkiye sahiptir.

Bitkilere dayalı nanopartikül sentezi, mikroorganizmalarla gerçekleştirilen biyosentetik yöntemlere kıyasla birçok pratik avantaj sunmaktadır. En belirgin üstünlüğü, mikroorganizma temelli yöntemlerde gerekli olan uzun süreli kültür hazırlığına ve kültür koşullarının korunmasına ihtiyaç duymamasıdır. Bu sayede hem işlem süresi kısaltmakta hem de biyogüvenlik açısından karşılaşılan kontaminasyon riski önemli ölçüde azaltılmaktadır (Barakat vd., 2020; Swilam ve Nematallah, 2020).

Bitki özütlerinin içeriğinde doğal olarak bulunan flavonoidler, alkaloidler, tanenler, saponinler ve çeşitli fenolik bileşikler gibi fitokimyasallar, nanopartikül sentezinde hem indirgeme ajanı hem de stabilizatör olarak işlev görmektedir. Bu bileşenler metal iyonlarını indirgerken aynı zamanda oluşan nanopartiküllerin aglomerasyonunu önleyerek stabil yapılar elde edilmesini sağlar. Ayrıca, bu fitokimyasalların farklı tür ve konsantrasyonları, sentezlenen nanopartiküllerin boyutunu, morfolojisini ve dağılımını etkileyerek süreç üzerinde yüksek düzeyde kontrol sunar (Muthu ve Priya, 2017).

Bitkisel materyalin kök, yaprak, gövde, kabuk veya meyve gibi farklı organları ekstraksiyon için kullanılabilir ve her bir bitki kısmı farklı fitokimyasal profile sahip olduğundan, elde edilen nanopartiküller üzerinde özgün etkilere sahip olabilir. Bu durum, bitki kaynaklı sentezin hem esnekliğini hem de uygulama potansiyelini artırmaktadır (Maisa ve Awwad, 2021; Elabbasy vd., 2025).

2.6. *Althea Officinalis* Bitkisi

Althaea officinalis (hatmi) bitkisi *Malvaceae* ailesine aittir ve dünya çapında yetiştirilmektedir. Çiçekler terminal ve aksiller yapıda olup; her biri bir, iki veya daha fazla çiçek taşıyan kısa pedinküllere sahiptir. Yapraklar soluk pembe, kırmızımsı pembe ve nadiren beyaz renklidir (Şekil 2.6). Terapötik özelliğe sahip olan bu bitki geleneksel olarak ağız ve faringeal mukozanın (kuru öksürük ile ilişkili olan) tahrişinin tedavisi için, hafif gastrit, cilt yanıkları, böcek ısırıkları, gastrointestinal (GI) sistem, idrar yolu şikayetlerinde iltihaplanma, ülser, apse, yanık, kabızlık ve ishal için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu bitki tarla ve yol kenarlarında kendiliğinden yetişir ve hemen hemen her şarta uyum sağlar. Ayrıca antimikrobiyal, antiinflamatuvar, immünomodülatör etki gibi birçok farmakolojik etkiye sahiptir (Snafi, 2013).



Şekil 2.6. *A. officinalis* bitkisinin farklı renkteki çiçek kısımları

Yüksek oranda antioksidan bileşik içeriğine sahip bitkilerin nano partikül sentezi için en iyi adaylardan biri olduğu bilinmektedir. *Althaea officinalis* bitkisinin çiçek kısımlarının kırmızımsı pembe çiçekleri daha fazla antioksidan aktiviteye sahiptir ve antioksidan aktivitenin gücü kırmızımsı pembe > pembe > beyaz şeklindedir. En yüksek flavonoid aktivite ise sırasıyla beyaz > kırmızımsı pembe > pembe şeklindedir (Sadighara vd., 2012).

2.7. Nanomalzeme Karakterizasyon Yöntemleri

Nanomalzeme karakterizasyonu, genellikle 1 ila 100 nanometre boyut aralığında olan ve klasik analiz yöntemlerinin genellikle yetersiz kaldığı malzemelerin ayrıntılı analizini gerçekleştiren bir süreçtir. Nanomalzemeler, atomik veya moleküler düzeyde özgün fiziksel ve kimyasal özellikler sergileyebilir. Bu yüzden, karakterizasyon süreci, nanomalzemelerin özelliklerini anlamak için kritik öneme sahiptir ve dört ana amaca hizmet eder. Yapısal özelliklerin belirlenmesi, nanomalzemelerin atomik ve moleküler yapılarını belirlemek için kullanılır ve kristal yapının veya amorf yapının analizini içerir (Saleh ve Hassan, 2023). Kimyasal bileşimin analizi, bu aşamada nanomalzemelerin elementel ve kimyasal bileşimleri detaylı olarak belirlenir ve yüzey kimyası ile iç kimyasal bağlar analiz edilir (Giannini vd., 2016). Fiziksel özelliklerin ölçülmesi, nanomalzemelerin boyut, şekil, yüzey pürüzlülüğü ve mekanik özellikleri ölçülür ve değerlendirilir. Performans ve güvenlik analizi, nanomalzemelerin belirli uygulamalarda

performansı ve potansiyel güvenlik riskleri değerlendirilir. Bu kapsamlı karakterizasyon, nanomalzemelerin çeşitli endüstriyel ve araştırma uygulamalarında etkili ve güvenli kullanımını sağlamada kritik bir rol oynar (Mourdikoudis vd., 2018; Yuan vd., 2023).

Nanomalzemelerin karakterizasyonu için kullanılan bazı analiz cihazları şu şekildedir;

X-Işını Kırınımı (XRD), nanomalzemelerin kristal yapısını ve faz bileşimini ayrıntılı bir şekilde analiz etmek için kullanılan bir teknik olup, özellikle nanoyapıların karakterizasyonunda kritik bir rol oynar. XRD, bir malzemeye gönderilen X-ışınlarının kristal örgü tarafından belirli açılarda saçılmasını ölçer. Bu saçılma, Bragg'ın yasası kullanılarak kristal düzlemlerinin uzaklıklarını ve düzenini belirlemek için analiz edilir (Goldstein vd., 2017). Nanomalzemelerin XRD analizi, malzemenin kristal yapısının kalitesini, faz geçişlerini ve mikroyapısal bozuklukları değerlendirmeye olanak tanır. Nanoyapıların küçük boyutları ve yüksek yüzey alanı nedeniyle, geleneksel XRD analizleri sınırlı bilgi verebilir; bu nedenle, yüksek çözünürlüklü XRD teknikleri, nanomalzemelerin daha hassas analizi için geliştirilmiştir (Williams ve Carter, 2009). Bu yöntemle elde edilen difraksiyon desenleri, malzemenin kristal örgü parametrelerini, kristal boyutlarını ve yüzey gerilimleri gibi özelliklerini ortaya koyar. Özellikle, Scherrer formülü, nanomalzemelerin ortalama kristal boyutlarını belirlemede kullanılır ve bu formül, temel kırınım piklerinin genişliğinden hesaplanarak boyut belirtir (Greene vd., 2015). Nanomalzemelerin XRD analizi, farklı fazların varlığını, kristal yapısındaki bozuklukları ve malzemenin homojenliğini değerlendirmek için etkili bir yöntem sağlar, bu da özellikle nanoteknoloji ve malzeme bilimleri alanlarındaki araştırmalar için hayati öneme sahiptir (Huang, 2009; Harlow vd., 2020a).

Fourier Dönüşüm İnfrared (FTIR) spektroskopisi, nanomalzemelerin kimyasal yapılarının ve yüzey fonksiyonel gruplarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan analitik bir tekniktir. Bu yöntem, malzemeye infrared (IR) bölgesindeki elektromanyetik ışınların uygulanmasıyla, belirli dalga boylarında gerçekleşen karakteristik absorpsiyonların ölçülmesine dayanır. Her fonksiyonel grup kendine özgü bir vibrasyon frekansına sahip olduğundan, elde edilen spektrum, malzemenin moleküler düzeydeki "kimyasal parmak izi"ni sunar (Smith, 2011).

Nanomalzemelerde FTIR analizi, özellikle yüzey özelliklerinin ve kimyasal modifikasyonların incelenmesinde kritik bir rol oynar. Örneğin, karbon nanotüpler veya grafen gibi karbon bazlı nanoyapıların fonksiyonelleştirilmesi sırasında yüzeye eklenen grupların varlığı, FTIR spektrumunda ortaya çıkan yeni pikler aracılığıyla tespit edilebilir

(Aliyev vd., 2019; Benko vd., 2021). Bu sayede, yüzey modifikasyonunun başarılı olup olmadığı doğrulanabilir. FTIR, ayrıca nanomalzeme sentezinde kullanılan yöntemlerin optimizasyonunda da değerli bilgiler sağlar. Üretim sürecinde kullanılan reaktifler veya işlem koşullarına bağlı olarak kimyasal bileşimde meydana gelen değişiklikler, spektral analizle izlenebilir. Bu, süreç kontrolü açısından önemli olup, malzemenin istenilen özelliklere sahip olup olmadığının değerlendirilmesine olanak tanır (Mourdikoudis vd., 2018). Sonuç olarak, FTIR spektroskopisi; nanomalzemelerin kimyasal karakterizasyonunda, yüzey fonksiyonlarının doğrulanmasında ve sentez süreçlerinin izlenmesinde vazgeçilmez bir karakterizasyon aracıdır.

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Enerji Dağılım Spektroskopisi (EDX), nanomalzemelerin yüzey morfolojisi ve kimyasal bileşimini detaylı bir şekilde analiz etmek için birlikte kullanılan güçlü karakterizasyon teknikleridir. SEM, nanomalzemelerin yüksek çözünürlüklü görüntülerini sağlar ve yüzey topografyasını, morfolojiyi ve yapısal detayları mikroskobik ölçeklerde incelemeye olanak tanır (Goldstein vd., 2017). Bu teknik, nanomalzemelerin şekil ve boyutlarının, yüzey özelliklerinin ve yüzey pürüzlülüğünün değerlendirilmesinde kritik bir rol oynar. EDX, SEM ile entegre edilerek, malzemenin kimyasal bileşimini belirlemek için kullanılır; malzemenin X-ışınları ile uyarılması sonucu yayılan karakteristik X-ışınları, elementel analizi sağlar. Nanomalzemelerin EDX analizi, elementlerin dağılımını, konsantrasyonlarını ve heterojen yapıları analiz ederek, malzemenin kompozisyonel özelliklerini detaylandırır (Rades vd., 2014; Ledniczky vd., 2024). Bu yöntemlerin kombinasyonu, nanomalzemelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini kapsamlı bir şekilde anlamak için kritik bir araç sağlar ve malzeme bilimlerinde, nanoteknolojide ve diğer ilgili alanlarda geniş bir uygulama yelpazesi sunar.

Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM), nanomalzemelerin atomik düzeydeki yapısını detaylı bir şekilde incelemek için kullanılan en güçlü karakterizasyon araçlarından biridir. TEM, elektronların malzemedan geçirildiği bir mikroskobik tekniktir ve bu süreçte malzemenin iç yapısı, kristal düzeni, yüzey özellikleri ve morfolojik detayları hakkında yüksek çözünürlüklü görüntüler sağlar (Guzzinati vd., 2018). Nanomalzemelerde TEM analizi, malzemenin kristal yapısını, mikroyapısal kusurları ve bileşenler arası etkileşimleri belirlemede kritik rol oynar. Özellikle, yüksek çözünürlük TEM (HRTEM) kullanılarak, malzemelerin atomik yapıları ve yüzey özellikleri doğrudan gözlemlenebilir, bu da nanomalzemelerin kristal örgü parametrelerinin, dislokasyonların ve diğer yapı bozukluklarının ayrıntılı analizini mümkün kılar (Egerton, 2011). Ayrıca,

TEM'in X-ray enerji dağılım spektroskopisi (EDX) ile entegrasyonu, nanomalzemelerin elementel bileşenlerini ve yerel kimyasal analizlerini sağlar, bu da malzemenin kompozisyonel özelliklerini ve heterojen yapısını daha kapsamlı bir şekilde değerlendirir (Zheng vd., 2023). Bu nedenle, TEM, nanomalzemelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini atomik seviyede detaylı bir şekilde karakterize etmek için vazgeçilmez bir tekniktir.

Ultraviyole-Görünür (UV-Vis) spektroskopisi, nanomalzemelerin optik özelliklerini karakterize etmek için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. UV-Vis spektroskopisi, bir malzemenin ultraviyole ve görünür ışık aralığında ışığın emilimini ölçerek, malzemenin elektron geçişleri, optik band boşluklarını ve yüzey özellikleri hakkında bilgi sağlar. Nanomalzemelerde UV-Vis analizi, genellikle malzemenin fotokimyasal davranışını, elektron-çoklu geçişlerini ve plazmonik özelliklerini anlamak için kullanılır. Özellikle metal nanoparçacıklar ve kuantum noktaları gibi nanomalzemelerde, UV-Vis spektroskopisi plasmon rezonans piklerini ve optik özelliklerdeki değişiklikleri belirlemek için kritik bir araçtır (Chuttrakulwong vd., 2024). Çinko oksidin (ZnO) UV-Vis spektrumunda, genellikle 350-400 nm aralığında bir bant aralığı gözlemlenir ve bu, ZnO'nun geniş bant aralığını yansıtır (Zhang vd., 2016). Bu teknik, nanomalzemelerin boyut, şekil ve yüzey kaplamalarının optik özelliklere etkilerini değerlendirmede etkili olup, malzemelerin potansiyel uygulamaları için önemli bilgiler sağlar. UV-Vis spektroskopisi, nanomalzemelerin özellikle biyomedikal ve elektronik uygulamalarındaki performansını değerlendirmek için temel bir analiz yöntemi sunar.

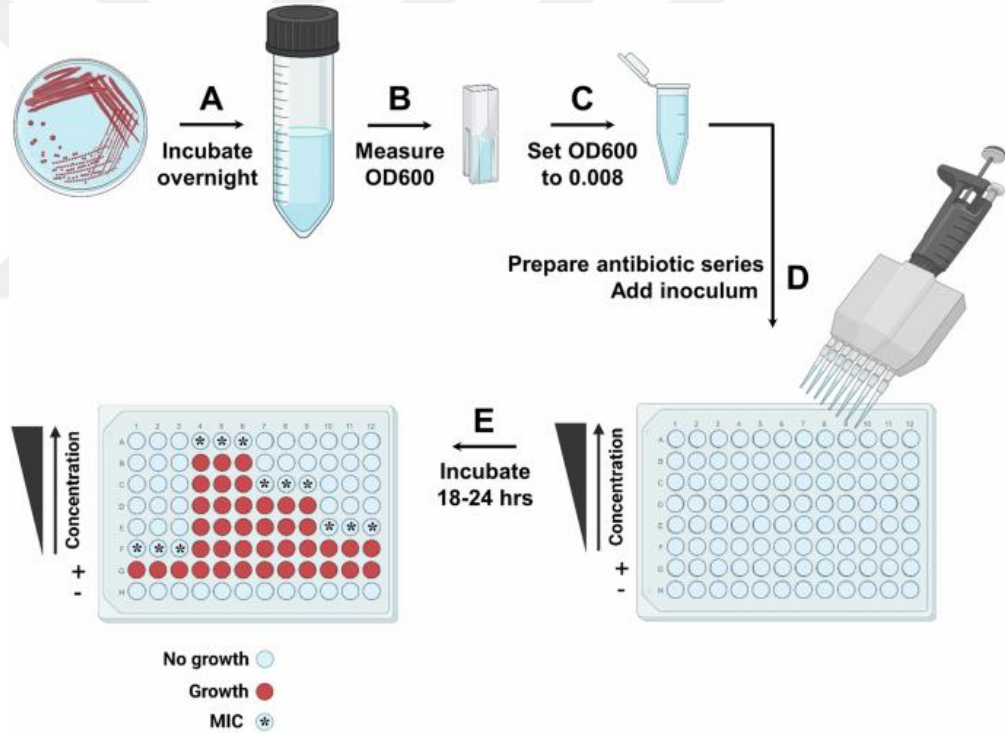
Nanokompozitlerin karakterizasyonu, bu malzemelerin özelliklerini tam olarak anlamak için çeşitli tekniklerin entegre bir şekilde kullanılması gerektiğini ortaya koyar. Nanokompozitler, bir matris malzeme içinde dağılmış nanomalzemelerden oluşur ve bu yapı, hem matris hem de nanoyapıların bireysel özelliklerini birleşik bir performansla yansıtır. Karakterizasyon süreci, nanokompozitlerin yapısal, kimyasal ve fiziksel özelliklerini değerlendirmeyi amaçlar. Yapısal analizler, genellikle X-Işını Kırınımı (XRD) ve Elektron Mikroskopisi (SEM/TEM) ile yapılır ve bu yöntemler, nanokompozitlerin kristal yapısını ve morfolojik özelliklerini detaylandırır (Kumar vd., 2021). Kimyasal bileşimler, Fourier Dönüşüm İnfrared (FTIR) ve Enerji Dağılım Spektroskopisi (EDX) ile analiz edilir, bu da nanokompozitlerin fonksiyonel gruplarını ve elementel bileşimini ortaya koyar. Fiziksel özellikler, UV-Vis spektroskopisi ve mekanik testler gibi yöntemlerle değerlendirilir; bu, malzemenin optik davranışlarını ve

mekanik dayanıklılığını belirler. Bu kapsamlı karakterizasyon, nanokompozitlerin performansını optimize etmek ve uygulama alanlarında etkinliğini artırmak için gerekli verileri sağlar.

2.8. Nanomalzemelerde Antimikrobiyal ve Biyouyumluluk Testleri

2.8.1. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Testi

Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) testi, bir antimikrobiyal ajan veya nanomalzemenin belirli bir mikroorganizma türüne karşı etkinliğini belirlemek amacıyla kullanılan temel yöntemlerden biridir. MİK, mikroorganizmanın büyümesini engelleyen en düşük konsantrasyon olarak tanımlanır ve özellikle ilaç geliştirme, nanomalzeme etkinlik testi ve antibiyotik duyarlılık çalışmalarında yaygın olarak kullanılır (Wiegand vd., 2008).



Şekil 2.7. Minimum inhibitör konsantrasyon testi (Kadeřábková vd., 2024)

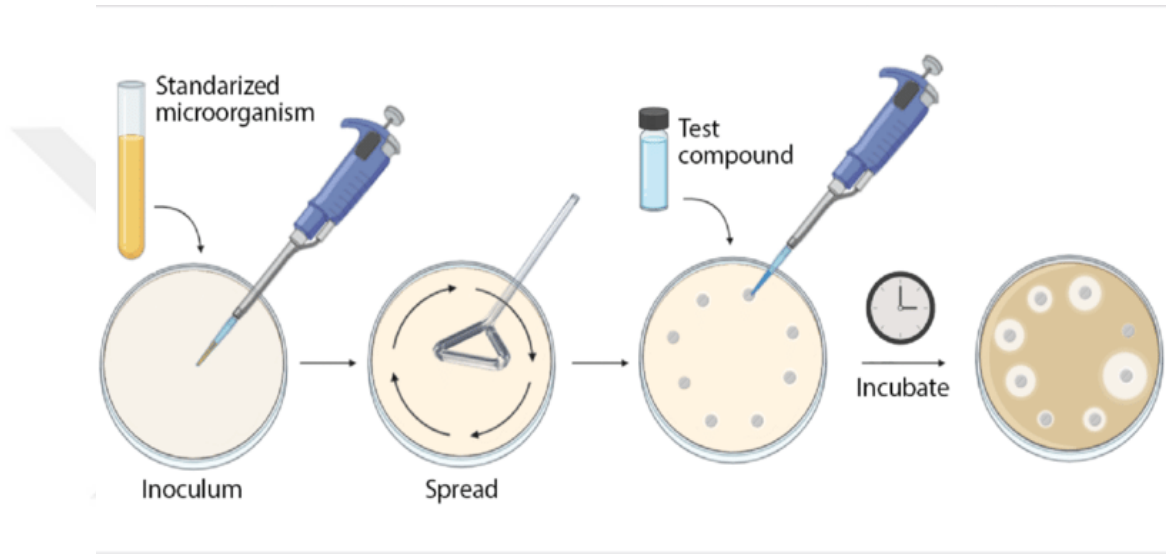
MİK testinde ilk olarak, test edilecek mikroorganizma uygun bir sıvı besiyerinde çoğaltılır ve genellikle 0,5 McFarland standardına (yaklaşık 1.5×10^8 CFU/mL) göre ayarlanır. Bu standart yoğunluk, farklı testler arasında standardizasyon sağlar ve test edilen ajanların mikroorganizma üzerindeki etkilerini kıyaslamayı mümkün kılar (Balouiri vd., 2016). Testte, antimikrobiyal ajan veya nanomalzemenin çeşitli konsantrasyonları seri dilüsyon yöntemiyle hazırlanır. Genellikle ajan konsantrasyonu

seri dilüsyon ile azaltılır (örneğin, 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL gibi) ve bu dilüsyonlar, ajanın mikroorganizma üzerindeki etkisinin hangi konsantrasyon seviyesinde sona erdiğini belirlemeyi sağlar. Daha sonra, her bir kuyucuğa hazırlanan dilüsyonlardan belirli miktarda alınır ve üzerine yaklaşık bir miktar (örneğin;100 µL) mikroorganizma süspansiyonu eklenir. Böylece, her kuyucukta farklı konsantrasyonlarda ajan-mikroorganizma karışımı elde edilir, bu da ajanın mikroorganizma üzerindeki doğrudan etkisinin gözlemlenmesini sağlar. Mikroplakalar, mikroorganizma süspansiyonu eklendikten sonra genellikle 35-37°C’de 16-24 saat inkübasyona bırakılır. Bu süre sonunda, mikroorganizmanın büyümesi gözlemlenerek ajanın etkisinin başladığı en düşük konsantrasyon belirlenir (Şekil 2.7). Testin sonunda bulanıklık veya renk değişimi gözlenen kuyucuklar, mikroorganizmanın büyüdüğünü gösterirken; üreme olmayan veya renk değiştirmeden kalan kuyucuklar büyümenin durduğunu işaret eder (Wiegand vd., 2008). İnkübasyon sonunda, bulanıklık göstermeyen en düşük konsantrasyona sahip kuyucuk, ajanın MİK değeri olarak kabul edilir. Örneğin, 16 µg/mL konsantrasyonundaki kuyucuk bulanıklık göstermiyorsa ancak 8 µg/mL kuyucuğu bulanıksa, bu durumda MİK değeri 16 µg/mL olarak belirlenir; bu değer, ajanın mikroorganizma üzerindeki büyüme engelleyici etkinliğini gösterir (Balouiri vd., 2016). MİK testi, antibiyotiklerin bakteriyel enfeksiyonlara karşı etkinliğini belirlemek ve nanomalzemelerin antimikrobiyal özelliklerini değerlendirmek açısından kritik bir yöntemdir. Antibiyotik ve antimikrobiyal dirençle mücadelede etkin stratejilerin geliştirilmesinde önemli bir role sahiptir. Ayrıca, yeni nanomalzemelerin mikrobiyal patojenlere karşı etkinliğini belirlemek için yaygın olarak kullanılır (Patel vd., 2011). MİK testinin avantajlarından biri, ajanların etkinliklerinin kantitatif olarak karşılaştırılabilmesidir. Bu test, bakteriyel türler arasındaki antimikrobiyal duyarlılık farklarını belirlemek ve farmasötik araştırmalarda ilaç geliştirme süreçlerinde önemli bir araçtır. Bununla birlikte, MİK testinin bazı sınırlamaları vardır; örneğin, bazı nanomalzemeler çözünürlük sorunları nedeniyle kuyucuk içinde homojen bir şekilde dağılamayabilir, bu da sonuçların yorumlanmasını zorlaştırabilir (Wiegand vd., 2008).

Antibiyotik ve antimikrobiyal dirençle mücadelede etkin stratejilerin geliştirilmesi açısından MİK testleri önemli bir role sahiptir. Ayrıca, yeni nanomalzemelerin mikrobiyal patojenlere karşı etkinliğini belirlemede yaygın olarak kullanılmaktadır (Patel vd., 2011).

2.8.2. Kuyu Difüzyon Testi

Kuyu difüzyon testi, antimikrobiyal ajanların etkinliğini in vitro ortamda belirlemek amacıyla sıkça kullanılan bir difüzyon yöntemidir. Bu test, özellikle nanomalzemeler ve çözelti formundaki diğer antimikrobiyal ajanların etkinliklerini değerlendirmede tercih edilir. Kuyu difüzyon testinde, nanomalzeme veya antimikrobiyal ajan içeren çözeltilerin, önceden mikroorganizmalarla inoküle edilmiş bir agar plakasına açılan kuyucuklara (well) eklenmesiyle difüzyona bırakılması sağlanır (Balouiri vd., 2016).



Şekil 2.8. Kuyu difüzyon testi (Correa vd., 2020)

Kuyu difüzyon testinde ilk aşamada, test edilecek mikroorganizma uygun bir sıvı besiyerinde çoğaltılır ve genellikle 0,5 McFarland standardına (yaklaşık 1.5×10^8 CFU/mL) göre ayarlanır. Bu, farklı testler arasında standart bir yoğunluk sağlamak amacıyla yapılır. Hazırlanan bakteri süspansiyonu, Müller-Hinton veya Sabouraud agar gibi uygun bir besiyeri içeren agar plakasının yüzeyine steril bir pamuklu çubukla yayılır. Bu adım, bakterinin plaka yüzeyine homojen şekilde dağılmasını sağlayarak test sonuçlarının güvenilirliğini artırır. Bakteri inoküle edilmiş agar plakasında, steril bir pipet veya başka uygun bir aparat yardımıyla belirli çaplarda (genellikle 5-8 mm) kuyucuklar açılır. Açılan kuyucuklar, nanomalzemenin veya antimikrobiyal ajanın agar matrisi içinde eşit bir şekilde difüze olmasına olanak tanır (Şekil 2.8). Kuyucukların derinliği ve çapı standartlaştırılmış olmalıdır, çünkü bu özellikler difüzyon sürecini ve inhibitör zon oluşumunu etkileyebilmektedir (Balouiri vd., 2016). Hazırlanan nanomalzeme veya antimikrobiyal ajan çözeltisi, açılan kuyucuklara belirli bir hacimde (genellikle 50-100

μL) eklenir. Bu aşamada, çözelti miktarı ve konsantrasyonu dikkatle kontrol edilmelidir. Eklenen çözeltinin kuyucuktan difüzyona başlaması ile birlikte ajan, çevresindeki agar matrisi boyunca yayılarak mikroorganizma büyümesini inhibe edebilir. Kuyucuklara nanomalzeme veya antimikrobiyal ajan eklendikten sonra, agar plakalar uygun bir sıcaklıkta (genellikle $35\text{-}37^\circ\text{C}$) ve süre boyunca (örneğin 18-24 saat) inkübasyona bırakılır. Bu inkübasyon süresi, mikroorganizmanın gelişimini gözlemlemek ve nanomalzemenin inhibitör etkisini değerlendirmek için gereklidir (Reller vd., 2009). İnkübasyon süresi sonunda, kuyucuk etrafında mikroorganizma büyümesinin olmadığı bir inhibitör zon oluşabilir. Bu inhibitör zonun çapı milimetre cinsinden ölçülerek nanomalzemenin etkinliği değerlendirilir. Zon çapının büyüklüğü, nanomalzemenin antimikrobiyal etkisinin bir göstergesi olarak kabul edilir. Zon çapı ne kadar büyükse, test edilen nanomalzemenin mikroorganizma üzerindeki antimikrobiyal etkisi o kadar güçlüdür (Balouiri vd., 2016; Kadiyala vd., 2018).

Kuyu difüzyon testi, çözeltideki nanomalzemeler ve diğer ajanların etkinliğini ölçmek için basit ve uygulanabilir bir yöntem olarak bilinir. Özellikle ZnO gibi çözünürlüğü düşük nanomalzemeler için etkili bir değerlendirme sağlar (Kadiyala vd., 2018).

2.8.3. Biyofilm İnhibisyon Testi

Biyofilm deneyleri, mikroorganizmaların yüzeylerde biyofilm oluşturma yeteneklerini ve antimikrobiyal ajanların bu biyofilmler üzerindeki etkisini değerlendirmek için kullanılan önemli yöntemlerdir. Biyofilmler, mikrobiyal hücrelerin kendilerini çevreleyen yapışkan bir matriks oluşturarak yüzeylere tutunması sonucu meydana gelir ve bu yapı, mikroorganizmaların çevresel streslere ve antimikrobiyal ajanlara karşı direncini artırır (Hall-Stoodley vd., 2004). Biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi için sıklıkla kullanılan yöntemlerden biri, 96 kuyucuklu mikrolakada biyofilm oluşum denemesidir.

İlk aşamada, test edilecek mikroorganizma uygun sıvı besiyerinde çoğaltılır ve genellikle 0,5 McFarland standardına göre ayarlanarak standart bir mikrobiyal yoğunluk elde edilir (Stepanović vd., 2007a). Bu mikroorganizma süspansiyonu, biyofilm oluşturması beklenen kuyucuklara belirli bir hacimde eklenir. Mikroorganizmaların yapışma ve biyofilm oluşturma aşamalarını gözlemleyebilmek için mikrolakalar belirli bir süre boyunca inkübasyona bırakılır; bu süre, genellikle 24-48 saat arasında değişir ve bu süreçte planktonik hücrelerin büyümesi gözlemlenmez (Stepanović vd., 2000).

Biyofilm oluşum sürecinin sonunda, planktonik hücrelerin uzaklaştırılması için kuyucuklar dikkatlice yıkanır ve biyofilm hücreleri genellikle kristal violet boyası ile boyanır. Kristal violet, biyofilmi oluşturan hücrelerin ve matriksin boyanmasını sağlayarak biyofilm miktarını dolaylı olarak ölçmeyi mümkün kılar (Christensen vd., 1985). Boyalı biyofilm, etanol veya aseton gibi bir üzücü ile üzülerek boya miktarı, spektrofotometre ile optik yoğunluk ölçümleri yapılarak değerlendirilir. Bu optik yoğunluk değeri, biyofilm oluşum seviyesinin bir göstergesi olarak kabul edilir ve biyofilmin antibiyotiklere veya antimikrobiyal ajanlara karşı direnç seviyesini yansıtır (Stepanovi vd., 2007b).

Bazı biyofilm deneyleri, antimikrobiyal ajanların biyofilm içerisindeki mikroorganizmalar üzerindeki etkinliğini de değerlendirmeye yönelik olarak yapılır. Bu tür deneylerde, biyofilm oluşum aşamasından sonra kuyucuklara antimikrobiyal ajanlar eklenir ve inkübasyon süresince ajanların biyofilm üzerindeki etkisi gözlemlenir. Daha sonra biyofilm yıkama, boyama ve optik yoğunluk ölçümleri tekrar edilerek biyofilm kalıntısı ölçülür ve ajan etkinliği değerlendirilir (Donlan, 2002). Biyofilm deneyleri, nanomalzemelerin veya yeni antibiyotiklerin biyofilm içindeki bakterilere karşı etkinliğini incelemek için de önemli bir yöntemdir. Özellikle biyofilm kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde yeni yaklaşımlar geliştirilmesi açısından bu deneylerin sonuçları büyük önem taşır (Parsek ve Singh, 2003).

Bu biyofilm deneyleri, özellikle sağlık sektöründe biyofilm kaynaklı enfeksiyonların anlaşılması ve tedavisi açısından oldukça değerlidir. Ancak, biyofilm yapısının heterojenliği ve antimikrobiyal ajanların biyofilm içinde farklı Şekilde dağılması nedeniyle, sonuçların güvenilirliğini sağlamak için tekrarlı testler yapılması ve sonuçların diğer yöntemlerle desteklenmesi gereklidir (Stewart ve Costerton, 2001).

2.8.4. MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) Testi

MTT testi, hücre canlılığını ve proliferasyonunu ölçmek için yaygın olarak kullanılan bir renk değiştirme yöntemidir. 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT), mitokondriyal dehidrojenaz enzimleri tarafından aktive edilerek, znmeyen mor bir formazan kristaline indirgenir. Canlı hücreler tarafından gerçekleştirilen bu indirgeyici reaksiyon, hücre metabolizmasının bir göstergesi olarak kabul edilir; bu nedenle MTT testi, hücre canlılığını dolaylı yoldan ler (Stockert vd., 2021).

MTT testi için belirli bir hücre sayısı her bir kültür plakasının kuyucuklarına eklenir ve hücrelerin yüzeye yapışarak bir monolayer oluşturması için 24 saat inkübe edilir (Fotakis ve Timbrell, 2020). Ardından, her bir kuyucuğa belirli bir konsantrasyonda MTT çözeltisi eklenir ve hücreler yeniden inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sırasında canlı hücreler, MTT'yi mor formazan kristallerine indirger. Bu işlem genellikle 2-4 saat süresince devam eder (Mosmann, 2019). İnkübasyon süresi sonunda çözilemeyen formazan kristallerinin çözülmesi için her kuyucuğa dimetil sülfoksit (DMSO) veya izopropanol gibi bir çözücü eklenir. Çözücü eklenmesiyle, formazan kristalleri homojen bir mor solüsyona dönüşür; bu çözelti, hücre sayısı ile doğrudan orantılı bir şekilde oluştuğu için hücre canlılığını belirlemek amacıyla kullanılır (Fotakis ve Timbrell, 2020; Van Meerloo vd., 2022). Solüsyonun absorbansı, genellikle 570 nm dalga boyunda bir mikropilaka okuyucusu ile ölçülür. Elde edilen yüksek absorbans değeri, daha fazla hücrenin canlı olduğunu ve MTT'yi metabolize ettiğini gösterir. Kontrol grubuna kıyasla düşük absorbans değerleri, test edilen ajanların sitotoksik etkilerini ortaya koymaktadır (Mosmann, 2019).

MTT testi, sitotoksikite ve hücre canlılığını değerlendirmede hızlı ve güvenilir bir yöntem olarak yaygın bir kullanım alanına sahiptir ve özellikle antikanser ajanların sitotoksik etkilerinin ölçümünde tercih edilmektedir (Fotakis ve Timbrell, 2020). Ancak bu test bazı sınırlamalara da sahiptir; yalnızca canlı hücrelerin metabolik aktivitesini ölçmesi nedeniyle hücre proliferasyonu ve sitotoksikiteyi doğrudan değerlendirememekte, ayrıca düşük metabolik aktiviteye sahip hücre tipleri veya MTT ile etkileşime giren bazı ajanlar hatalı sonuçlara yol açabilmektedir (Stockert vd., 2021).

2.8.5. Hemoliz Testi

Hemoliz testi, bir materyalin kanla temas ettiğinde kırmızı kan hücreleri (eritrositler) üzerinde oluşturduğu olası yıkıcı etkileri değerlendirmek amacıyla uygulanan in vitro bir biyouyumluluk testidir. Bu test, özellikle kanla doğrudan temas eden biyomalzemelerin güvenliğinin değerlendirilmesinde kritik bir rol oynar. Hemoliz, eritrositlerin zar yapısının bozulması sonucu hücre içeriğindeki hemoglobinin plazmaya salınmasıyla karakterize edilir. Bu durum, vücutta toksik etkiler yaratabileceği gibi ciddi sistemik komplikasyonlara da neden olabilir (Xu vd., 2016).

Biyomalzeme ve nanomalzeme teknolojilerindeki gelişmeler, doku mühendisliği, implantlar, ilaç taşıyıcı sistemler ve yara örtüleri gibi çok çeşitli uygulama alanlarını beraberinde getirmiştir. Bu malzemelerin kanla doğrudan veya dolaylı temas ettiği

durumlarda, hemoliz testi biyoyumluluk açısından bir ön koşul haline gelir. Özellikle nanomalzemeler, küçük boyutları ve yüksek yüzey alanları nedeniyle hücre zarlarıyla daha kolay etkileşime girebilmekte ve potansiyel olarak hemolitik etki gösterebilmektedir. Bu nedenle, nanomalzeme geliştirme süreçlerinde hemoliz testinin yapılması, olası toksisitelerin önceden belirlenmesi açısından hayati öneme sahiptir.

Hemoliz testi sonucunda elde edilen hemoliz oranı (% hemoliz), test materyalinin kanla temas ettiği yerde neden olduğu eritrosit yıkımının yüzdesel ifadesidir. Genellikle bu testte hemoliz oranı %0-2 arasında ise non-hemolitik, %2-5 arasında ise *hafif hemolitik*, %5'in üzerindeyse *hemolitik* olarak değerlendirilir. Bu değerler ışığında, geliştirilen bir nanomalzemenin hemoliz oranı %2'nin altında ise, bu malzeme genellikle kanla temas eden uygulamalarda güvenli kabul edilmektedir (Xu vd., 2016; Choudhary vd., 2021).

2.9. Kaynak Özetleri

Sajadi vd., (2018) CuO/yumurta kabuğu nanokompoziti, Shiwashok petrol sahasından alınan ham petrolden aromatik bileşenleri uzaklaştırmak için kurutulmuş nar kabuğu özütüyle yeşil sentez yöntemiyle üretilmiştir. Nanokompozit, 4-nitrofenolün 4-aminofenole indirgenmesi reaksiyonunda da kullanılmıştır. Karakterizasyon teknikleri (FE-SEM, EDS, XRD) ile nanokompozitin yüksek verimli ve kararlı olduğunu doğrulamıştır. Sonuçlar, nanokompozitin her iki reaksiyonda da etkili adsorban ve katalizör olduğunu göstermektedir.

Zhang vd., (2019) atık yumurta kabukları kullanılarak CuO/ZnO/yumurta kabuğu (CZ/YK) nanokompozitleri basit bir çöktürme ve kalsinasyon yöntemiyle sentezlenmiştir. Nanopartiküller, yumurta kabuğunun gözenekli yapısı üzerine eşit şekilde dağıtılmıştır. Elde edilen CZ/YK nanokompoziti, hem 4-nitrofenolün (foto)katalitik indirgenmesinde hem de *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etkinlikte yüksek performans sergilemiştir. UV-görünür ışık altında reaksiyon hızı, ışısız duruma göre yaklaşık beş kat artmıştır. Bu gelişmiş performans, yüksek reaktan emilimi, geniş reaksiyon yüzeyi ve elektron-ayırma verimliliğine bağlanmıştır. Ayrıca, 4-nitrofenol indirgenmesinin mekanizması detaylı şekilde incelenmiştir.

Pham vd., (2020) antibakteriyel özelliklere sahip gümüş nanopartiküller (Ag-NP) ile dekore edilmiş hidroksilapatit (HAp@Ag) nanokompozitleri, biyolojik bir yöntemle sentezlenmiştir. Ag-NP'lerin (ortalama çapı 24 nm) HAp yüzeyine homojen şekilde yerleşmesi, XRD, FT-IR, SEM, EDX, TEM ve DLS teknikleriyle doğrulanmıştır. Nanokompozit, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*

gibi Gram pozitif ve negatif bakterilere karşı etkili antibakteriyel aktivite sergilemiştir. Sonuçlar, HAp@Ag nanokompozitlerinin biyomedikal uygulamalarda antibakteriyel ajan olarak kullanılabilirliğini göstermektedir.

Huang vd., (2020) atık yumurta kabuğu ve *Cacumen platycladi* özütü kullanılarak, sulu çözeltilerde biyojenik olarak stabilize edilmiş gümüş nanopartikülleri (Ag NP'leri) içeren yeni bir nanokompozit (Eggshell/Ag) sentezlenmiştir. Ag NP'leri, yumurta kabuğu yüzeyine homojen şekilde dağılmış olup, organik maddelerin katalitik bozunması ve bakteriyel büyümenin engellenmesi gibi ikili işlevsellik göstermektedir. Nanokompozit, 4-nitrofenol (4-NP) indirgemesinde yüksek verimlilikle performans sergileyip, kısa sürede reaksiyonu tamamlamaktadır. Ayrıca, *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli* bakterilerine karşı güçlü antibakteriyel etkinlik göstermektedir. Minimum inhibisyon konsantrasyonları sırasıyla 0,08 mg mL⁻¹ ve 0,04 mg mL⁻¹, minimum bakterisidal konsantrasyon ise 0,64 mg mL⁻¹ olarak belirlenmiştir. Bu özellikleri ile biyomedikal, çevre ve enerji uygulamaları için potansiyel taşımaktadır.

Gupta vd., (2021) yüzyılda hibrit nanokompozitler, biyoelektronik, biyosensör, fotokatalitik ve biyomedikal uygulamalarda önemli bir rol oynamaktadır. Bu çalışmada, Fe₃O₄/PVA/yumurta kabuğu tabanlı hibrit nanokompozit geliştirilmiş ve fizikokimyasal özellikleri toz XRD, EDS, FTIR, VSM ve HR-TEM teknikleriyle detaylı olarak incelenmiştir. XRD analizleri, Fe₃O₄ NP'lerinin kristalin yapısını ve FCC düzenini ortaya koymuş ve ortalama kristal boyutunun 16,28 nm olduğunu göstermiştir. HRTEM görüntüleri, hibrit nanokompozitin düşük aglomerasyon gösteren küresel bir morfolojiye sahip olduğunu doğrulamıştır. Bu nanokompozit, güneş ışığı altında kongo kırmızısı ve kristal menekşe gibi organik kirleticilerin fotokatalitik olarak parçalanmasında etkin bir performans sergilemiştir. Ayrıca, Gram + ve Gram - bakteriler üzerinde güçlü antibakteriyel etki göstermektedir. Bu çalışma, yumurta kabuğu membran lifleri kullanılarak çevre dostu, ekonomik ve çok fonksiyonlu hibrit nanokompozitlerin üretimi için önemli bir örnek teşkil etmektedir.

Honarmand vd., (2020) *Teucrium polium* bitki özütü kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle SnO₂-ZnO-yumurta kabuğu nanokompoziti geliştirilmiş ve sulu çözeltilerden Hg(II) iyonlarının giderimi için etkili bir adsorban olarak kullanılmıştır. Yenilenebilir ve düşük maliyetli hammaddelerle hazırlanan bu kompozit, çevre dostu olmasıyla dikkat çekmiştir. Adsorpsiyon performansı üzerine pH, başlangıç metal konsantrasyonu, adsorban miktarı ve katalizör tipi gibi parametrelerin etkisi araştırılmış; optimum koşullarda %99,15 giderim verimi ve 396,6 mg/g adsorpsiyon kapasitesi elde edilmiştir.

Ayrıca, kompozit malzeme yüksek seçicilik göstermiş ve üç döngü boyunca yeniden kullanılabilirliği kanıtlanmıştır. Bu nanokompozit, düşük maliyetli, hızlı ve seçici cıva giderimi sağlayan sürdürülebilir bir çözüm sunmaktadır.

Lashkarizadeh, (2021) *Ferulago macrocarpa* özütü kullanılarak çevre dostu bir yöntemle ZnO nanoparçacıkları, yumurta kabuğu (YK) üzerinde stabilize edilerek ZnO/YK nanokompozitleri sentezlenmiştir. SEM, TEM, EDS, XRD ve IR analizleri ile karakterize edilen nanokompozitlerin, ortalama 25 nm boyutunda, ES matrisi üzerinde homojen dağılıma sahip saf ZnO nanoparçacıkları içerdiği doğrulanmıştır. Elde edilen ZnO/YK nanokompoziti, diazinonun fotokatalitik bozunmasında ve çeşitli balık ile insan bakteriyel patojenlerine karşı yüksek antibakteriyel etki göstermiştir. Bu yönüyle, sulu ortamlarda dezenfeksiyon ve pestisit bozunması için potansiyel taşıyan çevre dostu bir malzeme olarak öne çıkmaktadır.

Suvaitha vd., (2022) biyolojik atık olan yumurta kabuğu membranı doğal bir şablon olarak kullanılarak NiO/ZnO nanokompoziti başarıyla sentezlenmiştir. Yapısal analizler, nanokompozitin yüzey merkezli kübik NiO ve hegzagonal wurtzite ZnO fazlarını içerdiğini doğrulamıştır. TEM analizleri, parçacık boyutunun 50 nm'nin altında olduğunu göstermiştir. Antimikrobiyal testler, *Bacillus subtilis* ve *Aspergillus terrus*'a karşı 30 mm'lik inhibisyon bölgeleri ile güçlü antibakteriyel ve antifungal aktivite ortaya koymuştur. Elde edilen veriler, NiO/ZnO nanokompozitinin geniş spektrumlu bir antimikrobiyal ajan olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Jose vd., (2024) çevre dostu bir yaklaşımla tavuk yumurtası kabuğu özütü kullanılarak çinko oksit (ZnO) nanoyapıları başarıyla sentezlenmiştir. ZnO nanoparçacıklarının kristal yapısı ve boyutu XRD analizleriyle doğrulanmış; ortalama kristalit boyutu Scherrer yöntemiyle 21,9 nm, W-H yöntemiyle 19,1 nm olarak belirlenmiştir. UV-Vis spektroskopisiyle elde edilen bant aralığı 3,21 eV olarak hesaplanmıştır. Yüzey morfolojisi FESEM ve AFM ile incelenmiş, pürüzlü yüzeye sahip çubuk ve küresel yapılar gözlemlenmiştir. Zeta potansiyel değeri $-26,72$ mV olup süspansiyonun koloidal kararlılığını yansıtmaktadır. Darbeli lazer biriktirme ile üretilen ince filmlerde sıcaklığa bağlı direnç azalması gözlenmiş ve yarı iletken özellik sergilediği belirlenmiştir. Bu bulgular, sentezlenen ZnO nanoyapılarının elektronik, sensör ve çevreye duyarlı uygulamalarda kullanılabileceğini göstermektedir.

Bekiroğulları, (2024) organik-inorganik yapıya sahip biyolojik atık yumurta kabuğu, değerli bir substrat olarak değerlendirilmiş ve üzerine Au, Co ve Zn içeren nanokompozitler sentezlenmiştir. Farklı oranlarda metal kombinasyonları test edilerek en

etkili katalizör formülasyonu belirlenmiştir. %40 Co, %40 Zn ve 3 ppm Au içeren üçlü bileşim, 2,4 dakikalık kısa reaksiyon süresiyle en yüksek hidrojen üretim performansını göstermiştir. Bu katalizörle, NaBH₄ metanoliz reaksiyonunda 4394,6 mL/dak/gcat'lik hidrojen üretim hızı elde edilmiştir. Ayrıca, farklı NaBH₄ ve katalizör konsantrasyonlarında yapılan deneylerle katalitik davranış ayrıntılı şekilde incelenmiş, 13,25 kJ/mol aktivasyon enerjisi hesaplanmıştır. Yapısal ve yüzey özelliklerini değerlendirmek amacıyla SEM-EDX, BET, XRD ve FT-IR analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, geliştirilen yumurta kabuğu bazlı nanokompozitin sürdürülebilir enerji uygulamaları için güçlü bir aday olduğunu göstermektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bitki özütü hazırlamak için etanol (Isolab, CAS No: 64-17-5), metanol (Isolab, CAS No: 67-56-1) ve aseton (Isolab, CAS No. 67-64-1), HPLC analizi için kuersetin hidrat (%95, 337951, Sigma) ve gallik asit monohidrat (%98, 398225, Sigma), yeşil sentezde kullanılmak üzere çinko nitrat hegzahidrat (Zn(NO₃)₂•6H₂O, %98, Tekkim) ticari olarak satın alındı.

Antimikrobiyal testlerde kullanılmak üzere Mueller hinton agar (Biolife), Mueller hinton broth (Biolife), Tryptic soy agar (Biolife), Tryptic soy broth (Biolife), Rezasurin sodium salt (Sigma Aldrich 6758-13-8), methylene blue (Isolab), Klorheksidin asetat (CHX-Fluka analitik, PHR1222) ve glikoz (%99.5, Tekkim) ticari olarak, 96 well plate (Nest), falkon (15 ml, 50 ml), erlen (250 ml), beher (250 ml), mezur (250 ml), steril pipet uçları, öze ve öze uçları Isolab firmasından temin edilmiştir.

3.2. Aletler ve Cihazlar

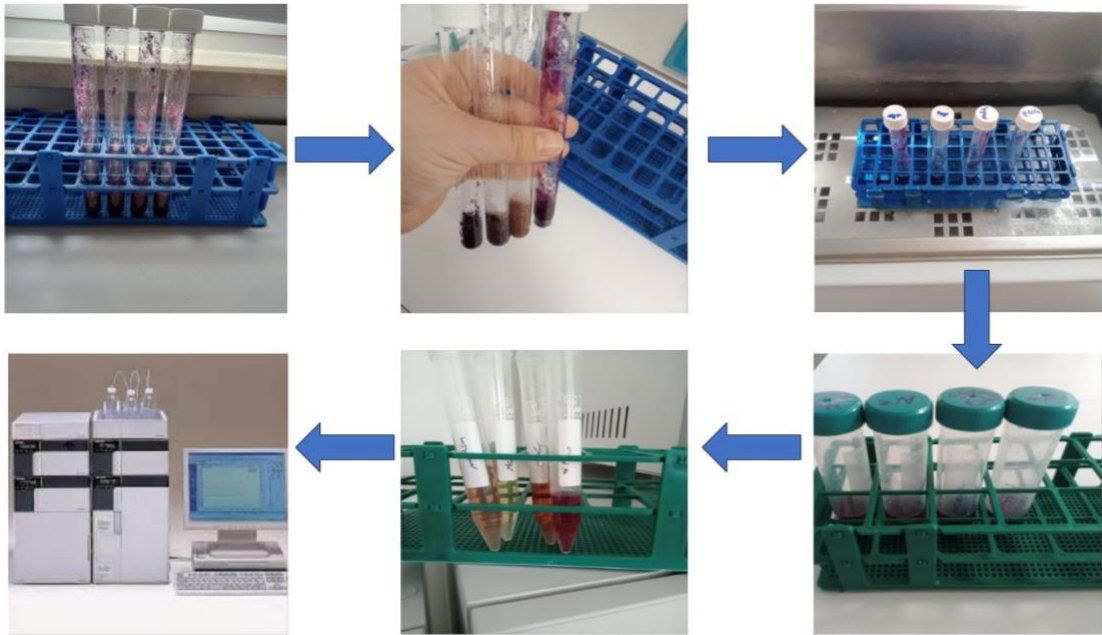
Nanokompozitlerin sentezi sırasında ZnO NP'lerin belirli bir dalga boyundaki absorpsiyonuna PERKIN ELMER / LAMBDA 25 marka UV-Vis cihazında bakıldı. XRD analizi, karakteristik dalga boyu $\lambda = 1.54$ nm olan Cu Ka radyasyonlu Malvern panalytical empyrean cihazı kullanılarak yapılmış ve veriler $5^\circ < 2\theta < 90^\circ$ tarama aralığında elde edilmiştir. ATR-FTIR spektrumları, 4000–400 cm⁻¹ aralığında, 4 cm⁻¹ çözünürlükte bir Spektrometre (Perkin Elmer Spectrum 100) cihazı ile ölçülmüştür. Nanokompozitler, ZEISS SUPRA 40VP GEMİNİ cihazı kullanılarak Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile morfoloji görüntüleri ve enerji dağılımlı X-ışını analizi (EDX) Bruker marka bir

dedektör yoluyla elementel haritalamaları elde edilmeden önce platin püskürtmeyle QUORUM-Q ISORES cihazında kaplanmıştır. Nanopartiküllerin morfolojileri Hitachi HT-7700 marka Geçirimli Elektron Mikroskobu ile görüntülendi.

3.3. Yöntem

3.3.1. Farklı Renkteki Çiçeklerden Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Burdur yöresinden toplanan *Althaea officinalis* (hatmi) bitkisinin kırmızımsı pembe ve pembe çiçek kısımları ultra saf suda yıkandıktan sonra oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan çiçekler ince toz hale getirildi ve her bir çiçek kısımlarından ayrı ayrı 0,5 gram örnek tartılarak üzerlerine 2,5 ml çözücü (etanol, metanol, aseton ve ultra saf su) ilave edildi (Şekil 3.1). Ardından 5 dakika homojenizatörde karıştırıldıktan sonra, 1 gece 60°C'deki su banyosunda bekletildi. Bu süre sonunda 5 dakika süreyle 4500 rpm'de santrifuj yapıldı. Süpernatant kısmı alınarak 45°C' de tamamen kuruyuncaya kadar bekletildi ve ekstraktlar 1 ml çözücü içerisinde çözülerek +4°C'de saklandı. (Kiselev vd., 2007).



Şekil 3.1. Farklı çözümler kullanılarak hazırlanan bitki özütleri

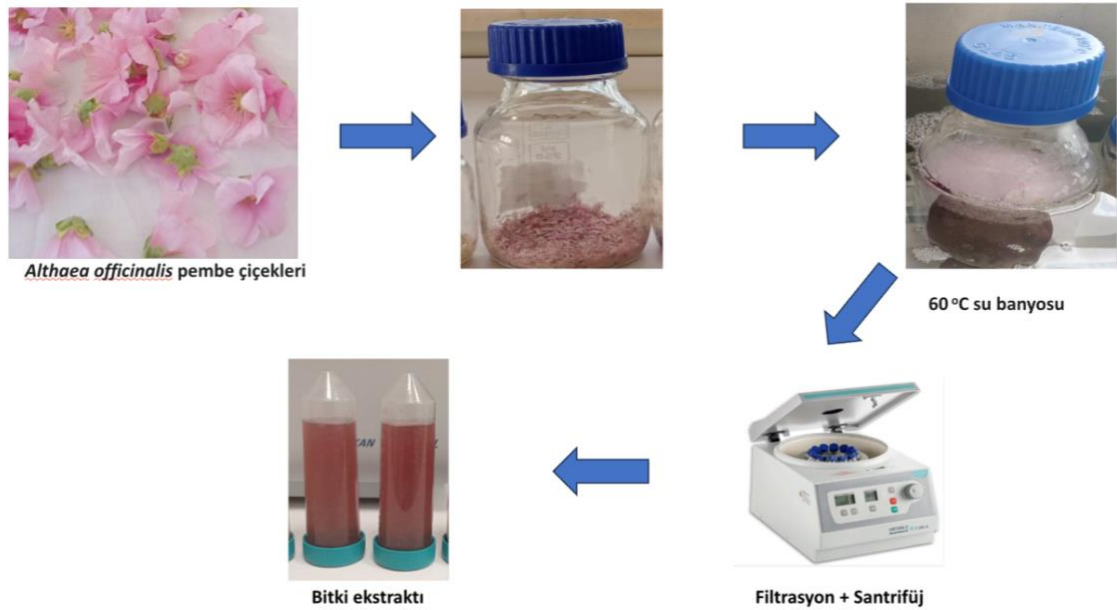
3.3.2. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analizi

Hazırlanan bitki ekstraktlarındaki kuersetin ve gallik asit miktarlarına, yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak, Gomes vd., (1999)'nun HPLC

metodu modifiye edilerek analiz gerçekleştirilmiştir. Analizde Shimadzu Prominence Marka HPLC-DAD cihazı, LC20 AT pompası ve Zorbax C18 (250*4,6 mm, 5 mikron) kolonu kullanıldı. Analiz için gradient programı: 93% A(%3 Formik asit) + 7% B(metanol) 3 dakika, 72% A + 28% B 25 dakika, 67% A + 33% B 32 dakika, 58% A + 42% B 2 dakika, 50% A + 50% B 8 dakika, 30% A + 70% B 5 dakika, 93% A + 7% B 15 dakika olarak toplamda 90 dakika olarak ayarlandı. Elde edilen sonuçlara göre kuersetin ve gallik asit miktarları en iyi olan örnek ve çözücü seçilerek deneylere devam edildi.

3.3.3. *Althaea officinalis* bitkisinin pembe çiçek kısımlarından bitki özütü eldesi

Althaea officinalis bitkisinin pembe çiçek kısımları toplanarak ultra saf su ile yıkandıktan sonra oda sıcaklığında kurutuldu. Agat havanda ince toz hale getirilen pembe çiçek kısmından iki gram alınarak 300 ml ultra saf su içeren 500 ml' lik şişeye aktarıldıktan sonra 60°C'lik bir su banyosunda 4 saat bekletildi. Oluşan bitki ekstraktı, Whatman 1 no.lu filtre kağıdı ile süzülükten sonra 4000 rpm de 5 dk santrifüj yapıldı (Abdallah vd., 2020). Süpernatant kısımları alınarak 4°C'de nanokompozit sentezinde kullanılmak üzere saklandı (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Pembe çiçek özütünün hazırlanması

3.3.4. Yumurta Kabuğu Tozunun Hazırlanması

Marketlerden toplanan yumurta kabukları ilk olarak kir parçacıklarını temizlemek için musluk suyu altında yıkandı ve ardından mikrobiyal kontaminasyonun giderilmesi

için saf suda 120 °C'de 3 saat sürekli karıştırılarak kaynatıldı. Kaynatılan yumurta kabukları bir gün süreyle kül fırınında (~150 °C) kurutuldu. Kurutulan yumurta kabukları agat havan kullanılarak ince bir toz haline getirildi. Elde edilen yumurta kabuğu tozu kullanılmak üzere desikatörde saklandı (Choudhary vd., 2021).

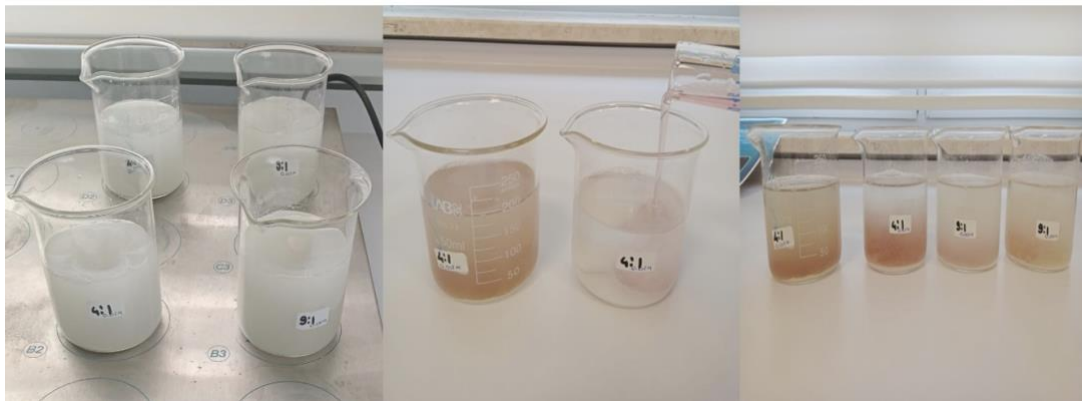
3.3.5. Nanokompozitlerin Sentezi

Yeşil sentez yöntemi ile nanokompozitleri sentezlemek için optimizasyon çalışması yapıldı. Çizelge 3.1'de gösterilen miktarlarda kullanılarak 4 adet nanokompozit sentezi gerçekleştirildi.

Çizelge 3.1. Sentezlenen nanokompozitlerde kullanılan malzemelerin miktarları

Nanokompozitler	Zn(NO ₃) ₂ •6H ₂ O (M)	Yumurta kabuğu (g)	Zn(NO ₃) ₂ •6H ₂ O /Bitki özütü (v/v)
1	0,001	2	4/1
2	0,01	2	4/1
3	0,001	2	9/1
4	0,01	2	9/1

Nanokompozitleri sentezlemek için iki gram yumurta kabukları farklı molaritelerde ve ultra saf su ile hazırlanan ZnO.9H₂O (0,001 M ve 0,01 M) çözeltilerine eklenerek 200 rpm de 1 saat kadar karıştırılmıştır (Şekil 3.3). Karıştırılan çözelti oda sıcaklığında 12 saat beklendikten sonra çözeltilere hacimce farklı oranlarda bitki özütü (çinko nitrat:bitki özütü: 9:1, 4:1 v/v) yavaş yavaş ilave edildi ve 30 dk kadar 200 rpm karıştırıldı. Sentezin tamamlanması için oda sıcaklığında çözeltiler 1 gece beklendi. Elde edilen çözelti 4500 rpm de santrifüj edildi. Bu işlem nanokompozitleri ultra saf su ile üç kez yıkanması ile devam ettirildi. Yıkama işlemi biten nanokompozit numuneleri gece boyunca etüvde 60°C' de kuruyana kadar beklendi (Huang vd., 2020).



Şekil 3.3. Nanokompozit sentez aşamalarından bazı fotoğraflar

3.3.6. Nanokompozitlerin Karakterizasyonu

Kolloidal çözeltide çinko oksit nanopartiküllerin varlığı, UV-Spektral analizi ile doğrulandı. Nanopartikül sentezinin gerçekleşmesi nitel olarak, kolloidal çözeltinin renginin değişimi ile gözlenebilmektedir. Farklı çinko nitrat ve bitki özütü (v:v) karışımından oluşan nanokompozitlerin UV 300-400 nm de spektral analizi gerçekleştirildi (Abdallah vd., 2020).

Toz formdaki nanokompozitlerin fonksiyonel grup spektrumlarını araştırmak için FT-IR spektrometresi (Perkin Elmer-Fronter) kullanıldı. Hazırlanan numuneler oda sıcaklığında $4000-400\text{ cm}^{-1}$ spektrum aralığında 4 cm^{-1} çözünürlükte bir ATR kristal üzerinde tarandı (Ogunyemi vd., 2019).

Nanokompozitlerinin yapısal karakterizasyonu ve morfolojilerinin incelemesi TEM ile gerçekleştirildi. Numunelerin ince filmini hazırlamak için 1 dakika boyunca karbon kaplı bakır ızgara üzerine konuldu. Fazla sıvı bir filtre kağıdı ile uzaklaştırılarak daha sonra sırayla bir ızgara kutusuna yerleştirilerek analiz gerçekleştirildi (Honarmand vd., 2020).

Nanokompozitlerinin yapısal morfolojisi ve boyutları SEM analizi ile incelendi. Toz hale getirilen nanokompozitler ince bir tabaka halinde karbon bant kaplı stab üzerine yayıldı ve platin kaplandı. Platin kaplanan nanokompozit numuneleri SEM cihazına yerleştirilerek görüntüleri alındı. Nanokompozit yapıların elementel analizi için bir enerji dağıtıcı spektrum (EDS) ile aydınlatıldı (Ogunyemi vd., 2019).

Toz haldeki nanokompozitlerinin kristal yapıları ve içerdikleri fazları tespit etmek için $5^\circ < 2\theta < 90^\circ$ tarama aralığında numunelerin XRD analizi gerçekleştirildi (Gun vd., 2024).

3.3.7. Hemoliz Deneyi

Nanokompozit numunelerinin hemolitik aktivitesini belirlemek için Choudhary vd., 2021 metodu optimize edildi. Şekil 3.4'te görüldüğü gibi deney için Kırmızı Kan hücreleri (KKH) kullanıldı. EDTA K3 tüpüne alınan kan örneğinden 1 ml alınarak üzerine 25 ml steril fosfat tamponlu salin (PBS) konuldu. 1000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Ardından üç defa 5ml PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi ve 50 ml PBS te çözüldü. Nanokompozit numunelerinden 6 mg kadarları 1,5 ml KKH süspansiyonuna eklenerek ardından 37°C 'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Karışım santrifüjlenerek ve süpernatantlar UV küvetine aktarılarak hemoglobin salınımı, 540 nm'de absorbans (A) olarak UV

spektrofotometri ile ölçüldü. Sırasıyla pozitif ve negatif kontroller olarak deiyonize su ve fosfat tamponlu salin (PBS) kullanıldı (Choudhary vd., 2021). Yüzde hemoliz oranları aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$\frac{(A)\text{Örnek} - (A)\text{Negatif Kontrol}}{(A)\text{Pozitif Kontrol} - (A)\text{Negatif Kontrol}} \times 100 = \text{Hemoliz \%} \quad (3.1)$$



Şekil 3.4. Hemoliz testi deney görüntüleri

3.3.8. Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi

MİK tahlilleri için 37 C°'de Mueller-Hinton-Broth (MHB) besiyerinde *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ve *Candida albicans* ATCC 10239 gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrası mikroorganizma süspansiyonları sterilize MHB besiyeri ile 5x10⁵ CFU/mL konsantrasyonuna ayarlandı. Sterilize haldeki 4 adet 96 oyuklu mikroplakların ilk sırasına sterilize edilmiş saf su ile hazırlanan nanokompozit numuneler ve yumurta kabuk tozu içeren 4000 ppm konsantrasyonundaki solüsyonlardan 200 µL eklendi. Kalan kuyulara 100 µL MHB eklendi. Numuneler mikropipet ile seri seyreltme tekniği kullanılarak seyreltildi. Her mikroplağa ilgili mikroorganizmanın içerdiği süspansiyondan 10 µL eklendi. Hazırlanan mikroplaklar 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra her kuyuya 10µL resazurin (6,75mg.mL⁻¹) ilave edildi. Deneyler üç tekrar halinde kuruldu ve 37 °C'de yaklaşık 18–24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Görsel olarak renk değişimi saat başı incelenerek, canlı hücrelerin varlığını gösteren mordan pembeye dönüşüm kolorimetrik olarak izlendi ve 600 nm de absorbansları ölçüldü. MIC tahlillerinde kontrol grupları boya+kültür, boya ve boya+MHB şeklinde ayarlandı (Ogunyemi vd., 2019; Selvam vd., 2020).

3.3.9. Antibakteriyal Test

Nanokompozitlerinin patojenik bakterilere karşı antibakteriyel aktiviteleri kuyu difüzyon yöntemi olan Kirby-Bauer yöntemi ile incelendi. *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 test suşları, 24 saat boyunca 37°C'de TSA (Tryptic Soy Agar) içinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası, 1.5×10^6 CFU/mL bakteri kültürü TSB (Tryptic Soy Broth) içinde seyreltildi. Bakteri süspansiyonları steril pamuklu çubuk kullanılarak agar plaka yüzeyine aseptik koşullarda yayıldı. MIC deney sonucuna göre belirlenen nanokompozitlerin konsantrasyonundan (mg/ml) 40 µL kadar agar plakalarındaki kuyu çapı 6mm olan oyuklara ilave edildi ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Antimikrobiyal aktivite, milimetre (mm) cinsinden ifade edilen kuyu etrafındaki net inhibisyon bölgesinin çapı belirlenerek değerlendirildi (Suwan vd., 2018).

3.3.10. Antifungal Test

Nanokompozitlerinin *C. albicans* ATCC 10239 karşı antifungal aktiviteleri kuyu difüzyon yöntemi olan Kirby-Bauer yöntemi ile incelendi. Saf kültür, 37 °C'de 24 saat boyunca MH broth besiyerinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 1.5×10^6 CFU/mL konsantrasyona ayarlanan mantar kültürü steril pamuklu çubuklar kullanılarak tek tek MH agar (CLSI M44-A2 ye göre; Mueller Hinton Agar+ %2 glikoz ve 0,5 mikrogram/ml metilen blue) plaka yüzeyine aseptik koşullarda yayıldı. MIC deney sonucuna göre belirlenen nanokompozitlerin konsantrasyonundan (mg/ml) 40 µL kadar agar plakalarındaki kuyu çapı 6mm olan oyuklara ilave edildi ve 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Antimikrobiyal aktivite, milimetre (mm) cinsinden ifade edilen kuyu etrafındaki net inhibisyon bölgesinin çapı belirlenerek değerlendirildi (Suwan vd., 2018).

3.3.11. Biyofilm İnhibisyon Testi

Nanokompozitler biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olan *E. coli* ATCC 35218 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşlarına karşı biyofilm aktivitesini incelemek için bakteriler TSB (Tryptic Soy Broth) içinde 24 saat boyunca 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası bakteriler OD₆₀₀'de 10^6 hücre yoğunluğu olacak şekilde ayarlandı ve 96 well plate 100 µL ekildi. Kuyularda bulunan bakterilerin üzerine sentezlediğimiz nanokompozitlerin (2, 1 ve 0,5 mg/ml) farklı konsantrasyonlarından 100 µL seri dilüsyon yapılarak eklendi ve gece boyunca 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 96 well plate içerisindeki kültür ortamı uzaklaştırıldı ve kuyucuklar

3 defa su ile yıkandı. Yıkanan kuyucuklara metanol eklendikten sonra 15 dk fiksasyon için bekletildi. Metanol uzaklaştırıldıktan sonra kuruyan kuyucuklara 0,1%'lik hazırlanan Kristal violet boya çözeltisinden 130 µL eklenerek 15 dk bekletildi. Kristal violeti uzaklaştırmak için kuyucuklar 3 defa su ile yıkandı. Son olarak 30%luk asetik asit çözeltisi kuyucuklara eklenerek OD₅₅₀ de absorbans ölçüldü (Stepanović vd., 2007).

3.3.12. Üretilen Nanokompozitlerin L929 Hücrelerinde Sitotoksitesinin Değerlendirilmesi

Nanokompozitlerinin biyoyumluluğunu değerlendirmek için 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) indirgeme tahlili kullanılarak L929 hücrelerinde sitotoksite testlerine bakıldı. Hücreler %10 fetal sığır serumu ve %1 penisilin-streptomisin ortamda 37 °C'de %5 CO₂ ile nemlendirilmiş havada kültürlendi. 1 mL'lik bir hücre süspansiyonu hacmi 96 oyuklu bir plaka ekildi ve 1 gece inkübasyona bırakıldı daha sonra belirlenen konsantrasyonda yumurta kabuğu ve nanokompozit numuneleri (0, 0,25; 0,5; 1; 2; 4 ve 8 mg/ml) 96 oyuklu plakaya (kuyu başına yaklaşık 3x10⁶ hücre/ml) ekildi. 24 saat inkübasyondan sonra her kuyuya 10 µL MTT eklendi. Hücreler 3 saat daha inkübasyona bırakıldı ve 570 nm'de ölçüm yapılarak işlenmemiş kontrol hücrelerine göre hücre canlılıkları değerlendirildi (Long vd., 2017).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. HPLC Analizi

Kırmızımsı pembe ve pembe çiçek kısımlarından farklı çözücülerle hazırlanan bitki özütlerine yapılan HPLC analiz sonuçları Çizelge 4.1' de verilmiştir. Yeşil sentez sırasında bitki kısımlarından elde edilen ekstraktlarda bulunan flavonidler, enzimler, antioksidan ve fenolik gibi çinko nitratı indirgeyen bileşikler çinko oksit oluşumunda yer almaktadır. Bu fitokimyasal süreçte çinko nitrat katyonları indirgenerek ZnO NP'ler oluşur. Oluşan ZnO NP'ler kuersetin gibi bazı fenolik bileşikler sayesinde stabilize olurlar (Patil ve Taranath 2016; Verma vd., 2020; Aljabali vd., 2022). Bitki özütlerindeki kuersetin ve gallik asit miktarları karşılaştırıldığında pembe çiçek kısımları kullanılarak ultra saf su ile hazırlanan bitki özütünün 24.341 ppm değerinde yüksek miktarda kuersetin içerdiği tespit edilmiştir. Birçok çalışmada hem kuersetin hem de gallik asit ile sentezlenen nanopartiküllerin stabilite, antimikrobiyal, antikanser özelliklerinin daha fazla olduğu yapılan optimizasyon çalışmaları sonucu tespit edilmiştir (Mittal vd., 2014;

Sarıbuğra vd., 2014). Yeşil sentez ile nanopartikül sentezinde kullanılan bitkilerde tanımlanan kuersetinin, nanopartiküllerin stabilitesini sağlayan metal şelatlama etkisinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca nanomalzeme sentezinde kullanılan kuersetinin nanopartiküllerin antimikrobiyal özelliklerini artırdığı bilinmektedir (Shah vd., 2017; Ashafa ve Balogun, 2020). Bu bilgiler ve çalışmamızdaki HPLC analiz sonuçlarına göre *A. officinalis* bitkisinin pembe çiçek kısımları kullanılarak ultra saf su ile hazırlanan bitki özütünün kuersetin miktarı diğer çiçek ekstraktlarına göre daha fazla olduğu için nanokompozit sentezi için tercih edilmiştir.

Elde edilen XRD sonuçları genellikle toz halindeki ZnO'ye aittir. Yapılan sentezlerin tamamında toz halinde ZnO elde edildiği için XRD sonuçları da benzerlik göstermektedir (Yang vd., 2006; Mao vd., 2008).

Çizelge 4.1. HPLC analizi sonrası bitki ekstraktlarındaki kuersetin ve gallik asit miktarları

Numune Adı	Gallik Asit (ppm)	Kuersetin (ppm)
KP-Etanol	0,013	4,589
KP-Metanol	0,203	4,502
KP-Aseton	0,117	1,297
KP- dH ₂ O	1,049	2,898
P-Etanol	0,834	3,202
P-Metanol	1,378	3,836
P-Aseton	0,256	12,492
P- UdH₂O	0,598	24,341

*KP; Kırmızımsı pembe, P; Pembe çiçek

4.2. Nanokompozitlerin Yeşil Sentezi

Althaea officinalis bitkisinin pembe çiçek kısmından ultra saf su kullanılarak hazırlanan bitki özütü ile gerçekleştirilen yeşil sentez ile elde edilen nanokompozitlerin adlandırılmaları Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Sentezlenen nanokompozitlerin adlandırılması

Nanokompozitlerin adlandırılması	Zn(NO ₃) ₂ •6H ₂ O M	Yumurta kabuğu g	Zn(NO ₃) ₂ •6H ₂ O /Bitki özütü (v/v)
ZnO@YK1	0,001	2	4/1
ZnO@YK2	0,01	2	4/1
ZnO@YK3	0,001	2	9/1
ZnO@YK4	0,01	2	9/1

Nanokompozit sentezinde dolgu malzemesi olarak kullanılan yumurta kabuk tozunun miktarları sabit tutularak yüzey ve gözenek kısımlarına biriken ZnO nanopartikül miktarlarını tespit etmek için bitki özütü hacmi ve $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ çözelti konsantrasyonları değiştirilerek sentez gerçekleştirilmiştir. Yeşil sentez sırasında pembe çiçek özütünün eklenmesi özütte bulunan flavonoidler, antioksidan ve fenolik bileşenlerin çinko nitratı indirgemesi ile zamanla çözeltide renk değişimi gerçekleşmiştir. Yeşil sentez sırasında sentezin ilk anında çiçek ekstraktından kaynaklanan pembe renk yaklaşık 30 dk içerisinde sarımsı bir renge, inkübasyon sonunda ise yeşilimsi-açık kahve rengine dönüştüğü gözlenmiştir. Bu renk değişimi ZnO NP'lerin sentezini kolorimetrik olarak doğrulamaktadır (Ramesh vd., 2015). Ayrıca Şekil 4.1'de görüldüğü üzere sentez öncesi kirli beyaz renge olan yumurta kabuk tozları sentez sonrası yeşil-kahve bir renk almıştır.

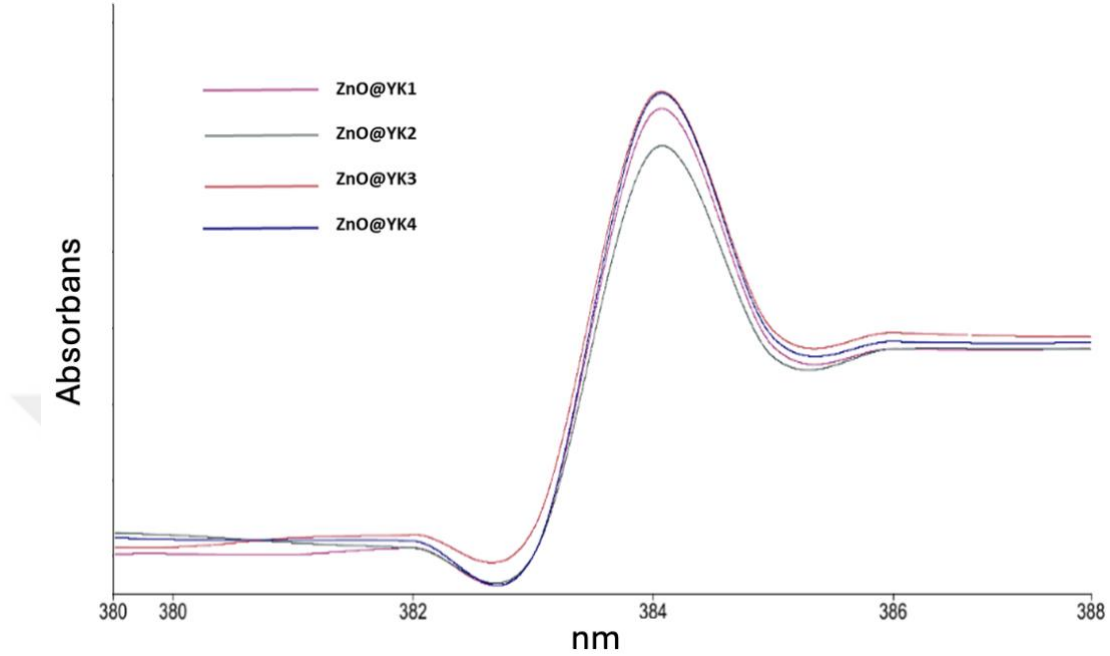


Şekil 4.1. Yeşil sentez öncesi ve sonrası yumurta kabuğu tozunun renk değişimi

4.3. UV-Vis Analizi

Althaea officinalis bitkisinin pembe çiçek kısımları kullanılarak gerçekleştirilen ZnO NP katkılı yumurta kabuğu nanokompozitinde ZnO NP oluşumunu doğrulamak için UV-vis analizi gerçekleştirildi. Absorpsiyon spektroskopisi, yarı iletken NP'lerin optik özelliklerini belirlemek için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. UV-Vis analizinden elde edilen absorpsiyon spektrumları dalga boyunun bir fonksiyonu olarak verilir. Bu durumda

nanopartiküllerin boyutu maksimum λ 'ya bağlı olmaktadır (Mohammadian vd., 2018). UV-Vis analizinde, ZnO nanopartiküllerin belirgin bir absorptans pikinin genellikle 370-390 nm civarında gözlemlendiği bilinmektedir (Abdo vd., 2021; Aljabali vd., 2022).



Şekil 4.2. *Althaea officinalis* bitkisinin pembe çiçek ekstraktı ile sentezlenen çinko oksit nanopartiküllerinin $\lambda=384$ nm'de maksimum absorptanslarına ait UV-Vis spektrumları

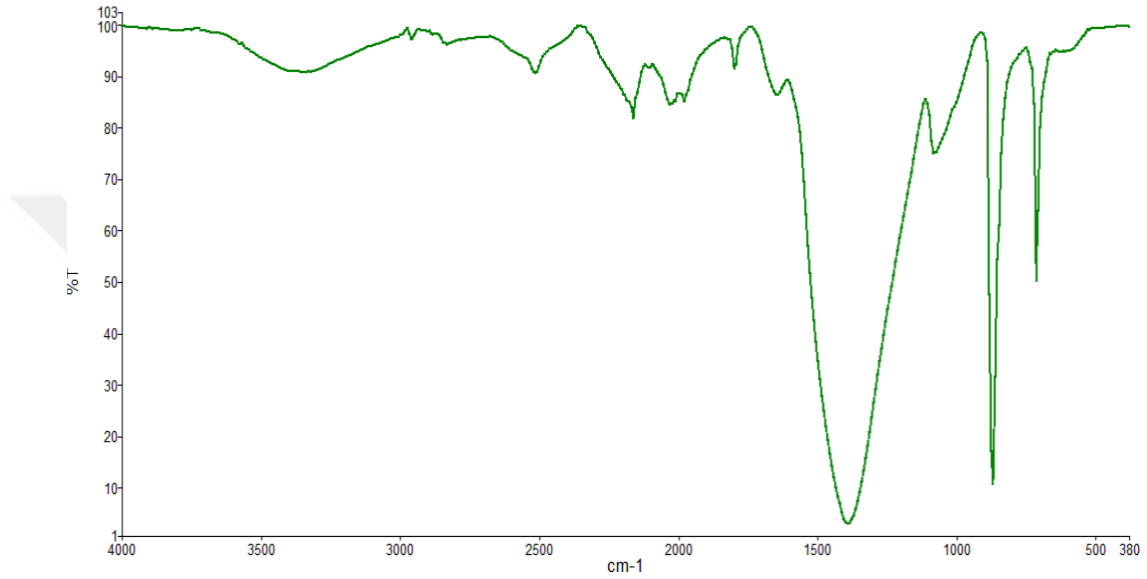
Şekil 4.2' de görüldüğü üzere tüm nanokompozitlerde görülen 384 nm'lik karakteristik absorpsiyon pikleri ZnO NP'lerin varlığını göstermiştir. 384 nm' de görülen belirgin zirve, oda sıcaklığındaki yüksek uyarılma bağlanma enerjileri olduğundan ZnO NP'ler için spesifiktir (Bhuyan vd., 2015). Ayrıca absorpsiyon spektroskopisinde bant aralığının azalması ile parçacık boyutu artmaktadır. Bant aralığı ile emilim dalga boyu arasında da ters bir oran vardır. Bulk ZnO NP'ler için absorpsiyon bandı 380 nm civarında gerçekleşmiştir.

Dolayısıyla hem renk değişimi hem de UV-vis analizi sonucunda 384 nm civarında tüm nanokompozitlerde absorpsiyon bandının görülmesi yeşil sentez sırasında *A. officinalis* bitkisinden bulunan fenolik ve flavonoid bileşenler sayesinde ZnO NP'lerin başarılı bir şekilde sentezlendiği tespit edilmiştir.

4.4. ATR FT-IR Analizi

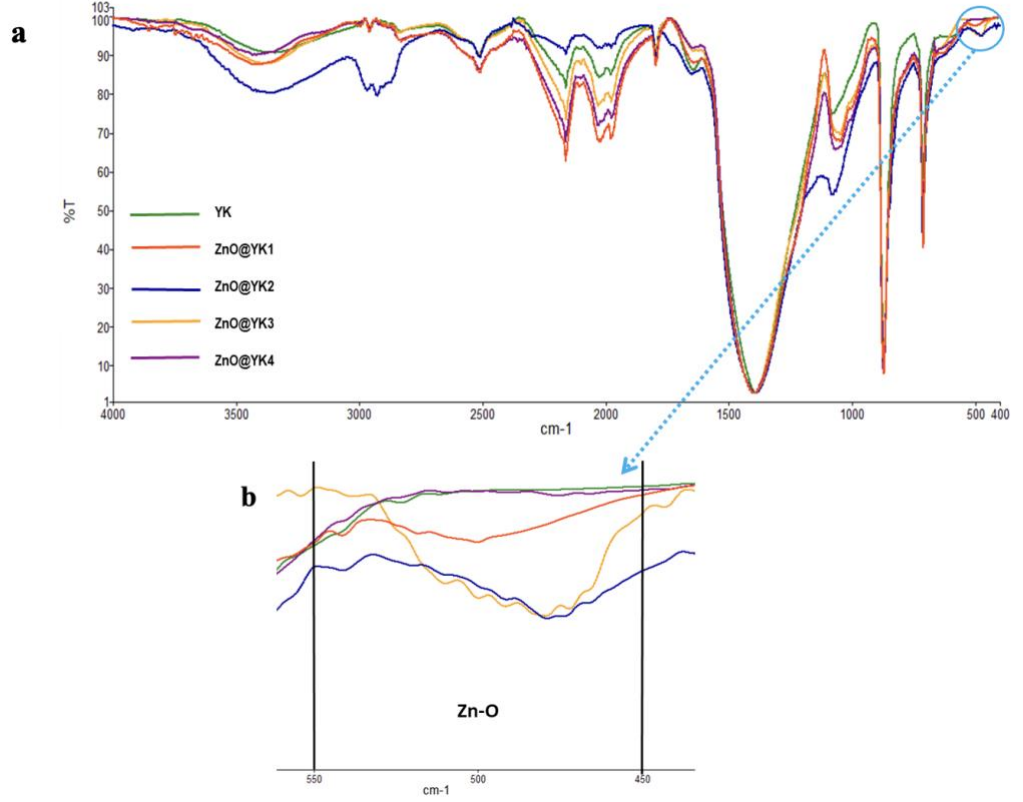
Althaea officinalis bitkisinin pembe çiçek kısımlarından sentezlenmiş

nanokompozitlerin ve yumurta kabuk tozunun, fonksiyonel grupları ile ZnO metal oksid bağlarının varlığını görmek için 4000-400 cm^{-1} arasında kızılötesi spektrumları alınmıştır. Nanokompozit sentezinde kullandığımız yumurta tozu, yumurtaların kabuğu ve membranı ayrılmadan elde edilmiştir. Buradaki amaç ise membran kısımda bulunan kollajen benzeri yapıların ve proteinlerin nanokompozit sentezi sırasında bozulmadan yapıya katılabilmesidir. Bu sayede, üretilen nanopartiküllerin sadece yumurta kabuğuna değil membran kısmındaki lifli yapılara da tutunması sağlanmıştır.



Şekil 4.3. Boş Yumurta kabuğu tozunun FTIR spektrumu (4000-400 cm^{-1} spektral bölge)

Yumurta kabuğu tozunun Şekil 4.3'te görülen FTIR spektrumundaki görülen bantlardan da anlaşıldığı üzere membran kısmındaki protein yapılar yumurta kabuğu tozu hazırlama aşamalarında korunmuştur. Yumurta tozu IR spektrumunda 1393 cm^{-1} , 1040 cm^{-1} , 872 cm^{-1} ve 712 cm^{-1} pozisyonlarında, yapıdaki kalsitle ilişkili sırasıyla asimetrik gerilme, düzlem dışı eğilme ve düzlem içi titreşimlere ait absorpsiyon bantları gözlemlenmiştir (Mittal vd., 2016). Ayrıca 3402 cm^{-1} ve 1646 cm^{-1} 'deki bantlar yumurta kabuğunun membran yapısındaki amid bağlarına karakteristiktir (Mansilla ve Mejia, 2017; Chen vd., 2022). Bozulmamış membrandaki sisteinin tiyol bağlarını 2515 cm^{-1} 'deki absorpsiyon bandı göstermektedir (Bhagavatheswaran vd., 2017). Spektrumdaki 2957 cm^{-1} ve 2828 cm^{-1} 'deki bantlar ise hem kabuk kısmındaki minerallerden hem de membran yapısındaki protein ve lipidlerden kaynaklanan simetrik ve asimetrik karbon hidrojen bağlarından gelmektedir (Mittal vd., 2016; Mansilla ve Mejia, 2017; Parvin vd., 2019).



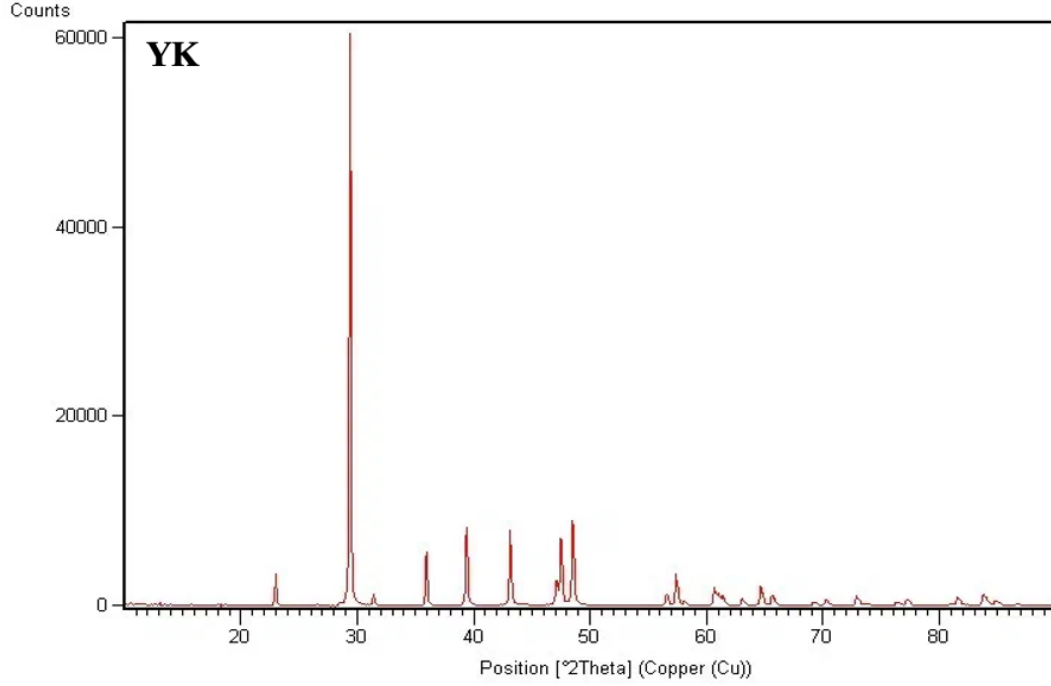
Şekil 4.5. a) Boş Yumurta kabuğu tozu, ZnO@YK1, ZnO@YK2, ZnO@YK3 ve ZnO@YK4 nanokompozitlerinin FTIR spektrumları (4000-400 cm⁻¹ spektral bölge), **b)** ZnO' nun metal-oksijen gerilme moduna ait absorpsiyon band aralığı

Çinko oksit (ZnO), FTIR analizinde karakteristik Zn-O bağ titreşimleriyle tanınır ve bu titreşimler genellikle 400-600 cm⁻¹ aralığında gözlemlenir. Bu frekans aralığındaki bantlar, ZnO'nun yapısındaki Zn-O bağlarının esneme titreşimlerine karşılık gelir. FTIR spektrumunda 430-450 cm⁻¹ aralığında gözlenen bant, ZnO'nun Zn-O bağlarının karakteristik esneme titreşimlerini temsil eder ve ZnO'nun yapısal özelliklerinin analizinde önemli bir gösterge olarak kabul edilir. 500-600 cm⁻¹ aralığındaki bant ise ZnO'nun kristal yapısına ve sentez koşullarına bağlı olarak görülebilen diğer bir Zn-O titreşim bölgesidir. Sentez yöntemi, partikül boyutu veya yüzey modifikasyonları gibi faktörler, bu bölgede gözlemlenen bant pozisyonlarında hafif değişikliklere neden olabilir. Bu nedenle, FTIR analizlerinde ZnO'nun karakteristik Zn-O titreşim frekanslarının sentez yöntemi ve yapısal özelliklerine göre değerlendirilmesi önemlidir (Beitollahi vd., 2020). Yumurta tozuna immobilize edilmiş ZnO nanopartiküllerinin spektrumları Şekil 4.5 a'da incelendiğinde, kalsit ve membran yapıları ile ilişkili absorpsiyon bantlarında zirve yoğunlukları dışında herhangi bir değişiklik

gözlemlenmemiştir. Bu durum, nanopartiküllerin yumurta tozuna başarılı bir şekilde immobilize olduğunu ve kalsit ve membran yapıları ile etkileşime girmediğini göstermektedir (Nasrollahzadeh vd., 2016; Yorseng vd., 2020). IR spektrumundaki 600 cm^{-1} ve 400 cm^{-1} civarındaki bantlar, metal oksijen (MeO) titreşim modun atfedilirken (He vd., 2019; Ruhaimi ve Aziz, 2021; Chaudhari vd., 2022), Şekil 4.5 b' de, 480 ve 499 cm^{-1} absorpsiyon bantları ise ZnO'nun metal-oksijen gerilme modu kaynaklıdır (Selvam vd., 2020; Mutukwa vd., 2022). Nanokompozit numunelerinde bulunan ZnO bantlarının yoğunluk ve tepe noktalarının her birinde gözlenen değişiklikler, ZnO ile yumurta kabukları arasındaki farklı yapısal etkileşimlerin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Öte yandan, ZnO@YK3 nanokompozitinde, ZnO nanopartikülleri diğer nanokompozitlere nazaran yumurta kabuğu tozuna daha az nüfuz etmiştir. Bu durum, IR spektrumunda daha düşük ZnO bant yoğunluğu olarak gözlemlenmektedir. Bunun sebebi; ZnO@YK3 sentezinde 0,001 M çinko nitrat çözeltisi ve en az bitki ekstraktı kullanılarak gerçekleştirilmiş olmasıdır. Birçok çalışmada yeşil sentez için sıcaklık, pH, metal tuzu, reaksiyon süresi gibi parametreler optime edilerek çalışılmıştır ve optimizasyonun nanopartikülün şekli, miktarı ve antimikrobiyal gibi birçok özelliğini etkilediği tespit edilmiştir (Hoseinpour vd., 2017; Anvarinezhad, vd., 2020) Bitki özütü ve kullanılan çinko nitrat molaritesi yeşil sentezde ZnO nanopartikülün oluşmasını etkilediği için IR spektrumunda ZnO bant yoğunluklarında farklılar görülmüştür.

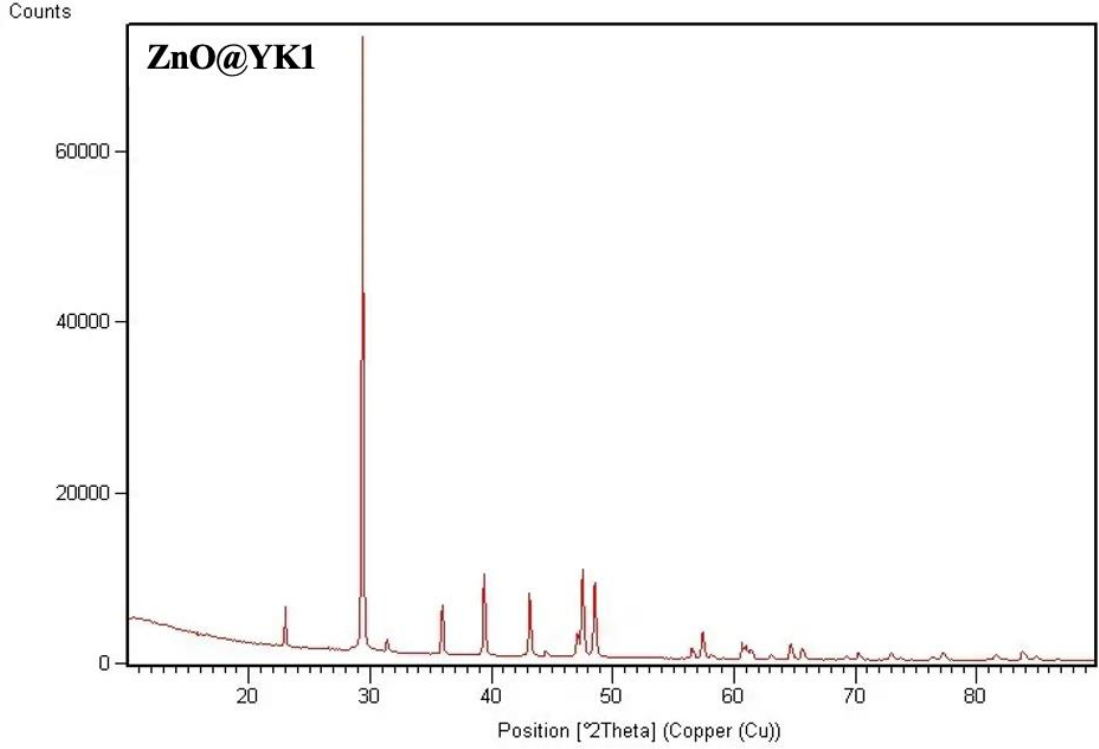
4.5. XRD Analizi

Yumurta kabuğu tozunun ve ZnO@YK nanokompozitlerinin kristal yapılarını ve içerdikleri fazları belirlemek için X-ışını analizi yapılmıştır.



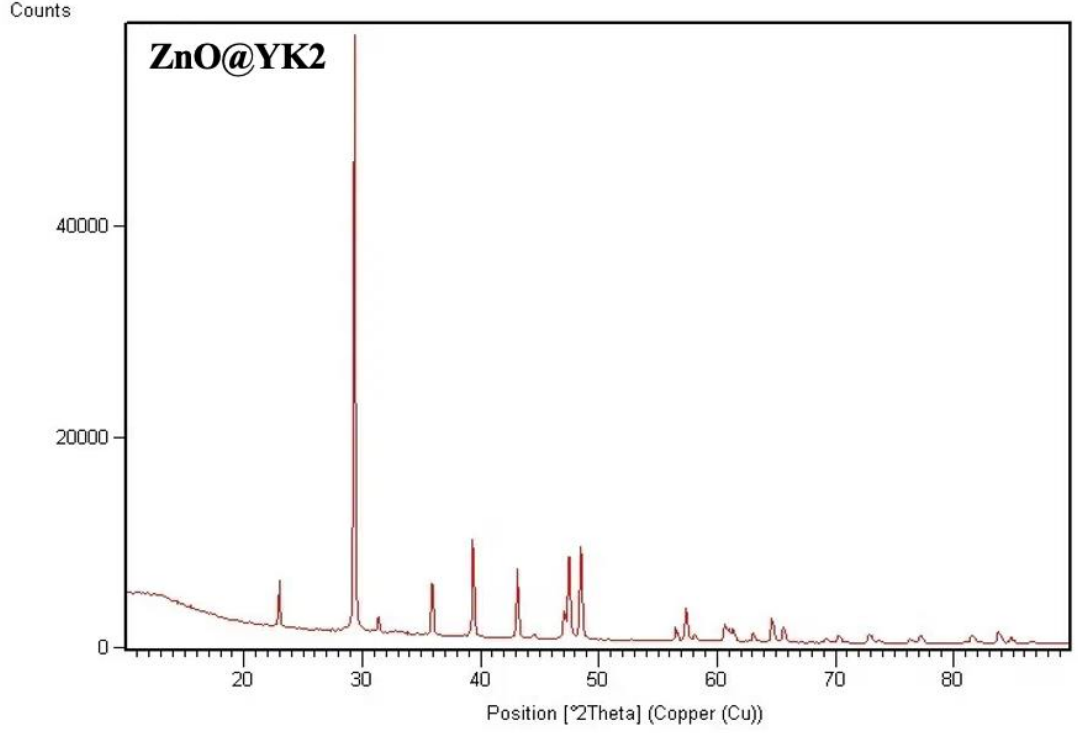
Şekil 4.6. Yumurta kabuğu tozunun XRD kırınım deseni

Yumurta kabuğu tozunun XRD deseni genellikle kalsiyum karbonat (CaCO_3) formunda olduğu için, bu desende bazı karakteristik tepe noktaları bulunur. Yumurtanın kabuğu, çoğunlukla aragonit veya kalsit kristal yapısına sahip olmaktadır. Kalsit için, $2\theta = 29,4^\circ; 36,0^\circ; 40,3^\circ; 43,0^\circ$ ve $48,6^\circ$ gibi tepe noktaları belirgindir (Hassan, 2015). Aragonit ise $2\theta = 25,9^\circ; 29,3^\circ; 34,0^\circ$ ve $47,3^\circ$ gibi noktalar göstermektedir (Huang vd., 2020b). Şekil 4.6’da boş yumurta kabuğu tozunun XRD kırınım deseni verilmiştir. Boş yumurta kabuğunun XRD kırınım desenine yapılan kütüphane taramaları sonucunda yumurta kabuğu tozunun $2\theta = 29,37^\circ; 39,38^\circ; 43,13^\circ; 47,49^\circ$ ve $48,49^\circ$ CaCO_3 ’ün karakteristik tepe noktaları olarak (CaCO_3 , kart no 96-901-6707) belirlenmiştir.



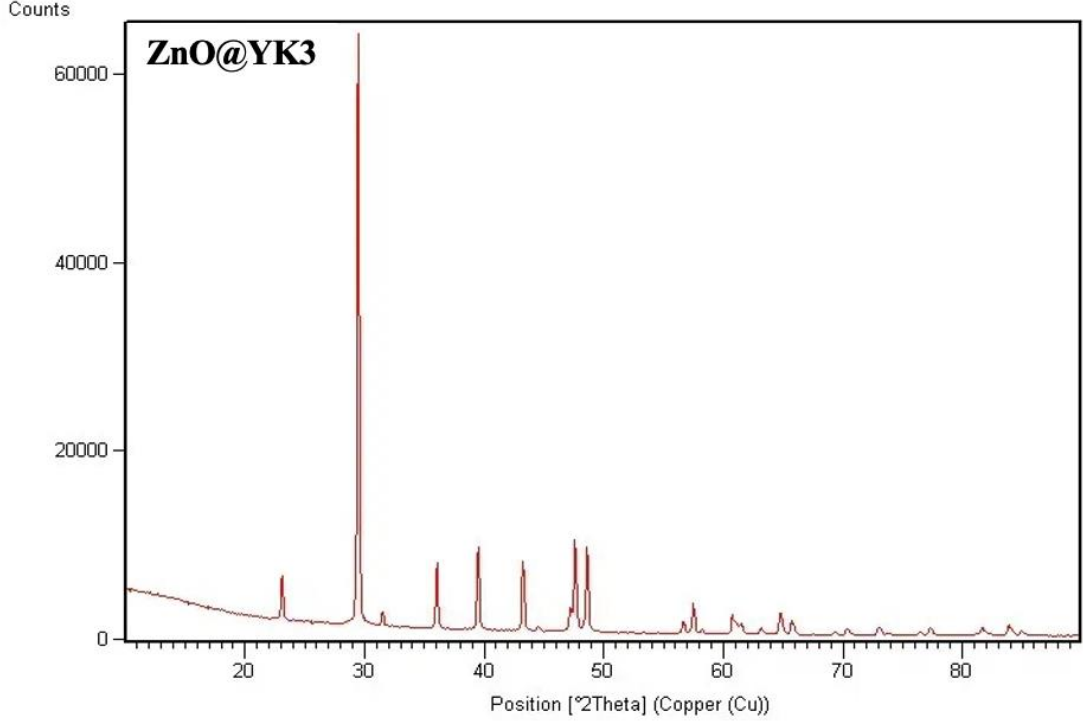
Şekil 4.7. ZnO@YK1 nanokompozitinin XRD kırınım deseni

Şekil 4.7’de ZnO@YK1 nanokompozitinin XRD kırınım deseni verilmiştir. Yumurta kabuğu tozuna ait olan XRD kırınım zirveleri nanokompozit yapısında da gözlenmiştir. Ayrıca ZnO@YK1 nanokompozitine ait XRD kırınım deseninde $2\theta = 31,27^\circ; 35,86^\circ; 47,32^\circ; 62,81^\circ; 65,24^\circ; 75,99^\circ$ ve $81,52^\circ$ ZnO’in karakteristik tepe noktaları (ZnO, kart no 98-018-1039) tanımlanmıştır (Kalpana vd., 2018; Qian vd., 2020). XRD kütüphane taraması sonucunda ZnO’in hekzagonal kristal yapıda olduğu tespit edilmiştir.



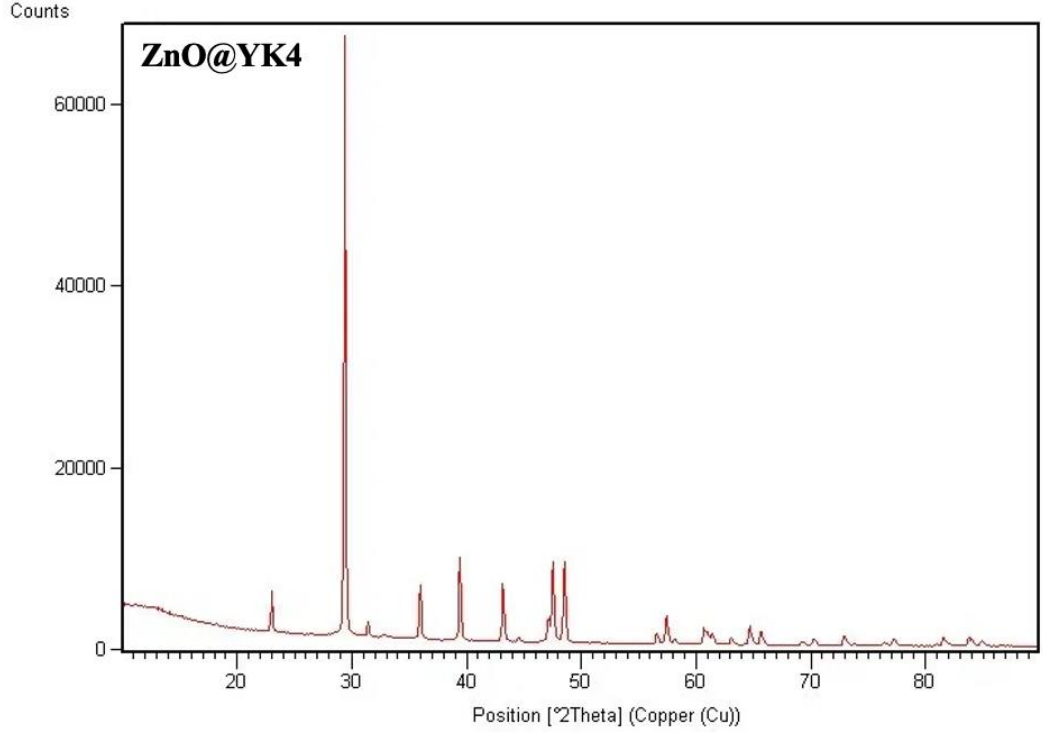
Şekil 4.8. ZnO@YK2 nanokompozitinin XRD kırınım deseni

Şekil 4.8’de ZnO@YK2 nanokompozitinin XRD kırınım deseni verilmiştir. Yumurta kabuğu tozuna ait olan XRD kırınım zirveleri bu nanokompozit yapıda da gözlenmiştir. Ayrıca ZnO@YK2 nanokompozitine ait XRD kırınım deseninde $2\theta = 31,27^\circ$; $35,86^\circ$; $47,32^\circ$; $62,81^\circ$; $65,24^\circ$; $75,99^\circ$ ve $81,52^\circ$ ZnO’in karakteristik tepe noktaları (ZnO, kart no 98-018-1039) tanımlanmıştır (Kalpana vd., 2018; Qian vd., 2020). XRD kütüphane taraması sonucunda ZnO’in hekzagonal kristal yapıda olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.9. ZnO@YK3 nanokompozitinin XRD kırınım deseni

Şekil 4.9’da ZnO@YK3 nanokompozitinin XRD kırınım deseni verilmiştir. Yumurta kabuğu tozuna ait olan XRD kırınım zirveleri bu nanokompozit yapıda da gözlenmiştir. XRD kırınım deseninde $2\theta = 31,27^\circ$; $35,86^\circ$; $47,32^\circ$; $65,24^\circ$ ve $75,99^\circ$ ZnO’in karakteristik tepe noktaları (ZnO, kart no 98-018-1039) tanımlanmıştır (Kalpana vd., 2018; Qian vd., 2020). XRD kütüphane taraması sonucunda ZnO’in hekzagonal kristal yapıda olduğu tespit edilmiştir. Ancak ZnO@YK1 ve ZnO@YK2 nanokompozitlerinde görülen ZnO yapının karakteristik tepe noktaları ZnO@YK3 nanokompozitinde daha az görülmüştür. Bu durum FTIR analiz sonucunda da bahsedilen yeşil sentezin en az bitki özütü ve düşük molaritede çinko nitrat çözeltisi ile gerçekleştirildiğinden kaynaklandığı düşünülmüştür.

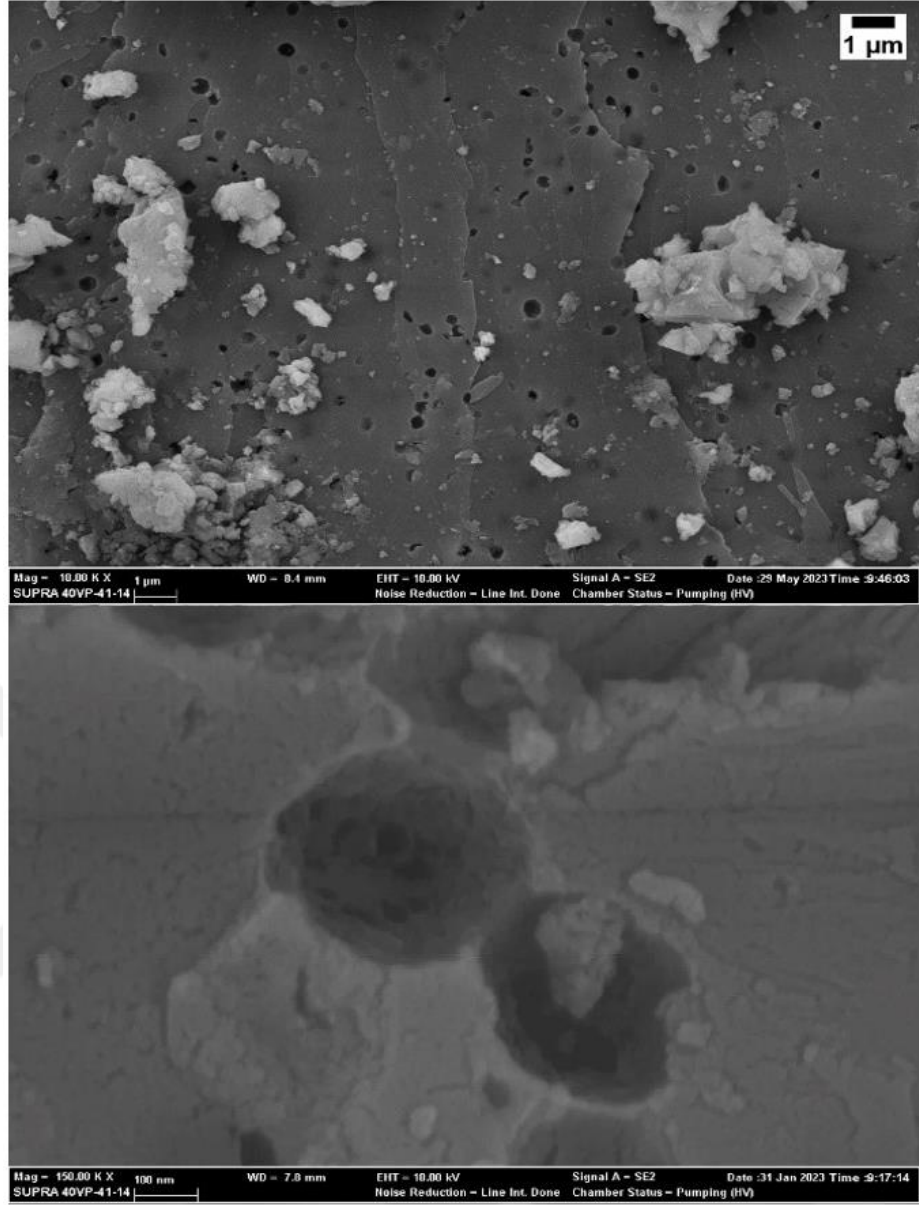


Şekil 4.10. ZnO@YK4 nanokompozitinin XRD kırınım deseni

Şekil 4.10'da ZnO@YK4 nanokompozitinin XRD kırınım deseni verilmiştir. Yumurta kabuğu tozuna ait olan XRD kırınım zirveleri bu nanokompozit yapıda da gözlenmiştir. ZnO@YK4 nanokompozitine ait XRD kırınım deseninde $2\theta = 31,27^\circ$; $35,86^\circ$; $47,32^\circ$; $62,81^\circ$; $65,24^\circ$; $75,99^\circ$ ve $81,52^\circ$ ZnO'in karakteristik tepe noktaları (ZnO, kart no 98-018-1039) tanımlanmıştır (Kalpana vd., 2018; Qian vd., 2020). XRD kütüphane taraması sonucunda ZnO'in hekzagonal kristal yapıda olduğu tespit edilmiştir. XRD analizi sonrası yumurta kabuğu tozuna ZnO'in katkılındığı ve ZnO'in en yaygın formu olan hekzagonal yapıda olduğu tüm nanokompozitler için doğrulanmıştır.

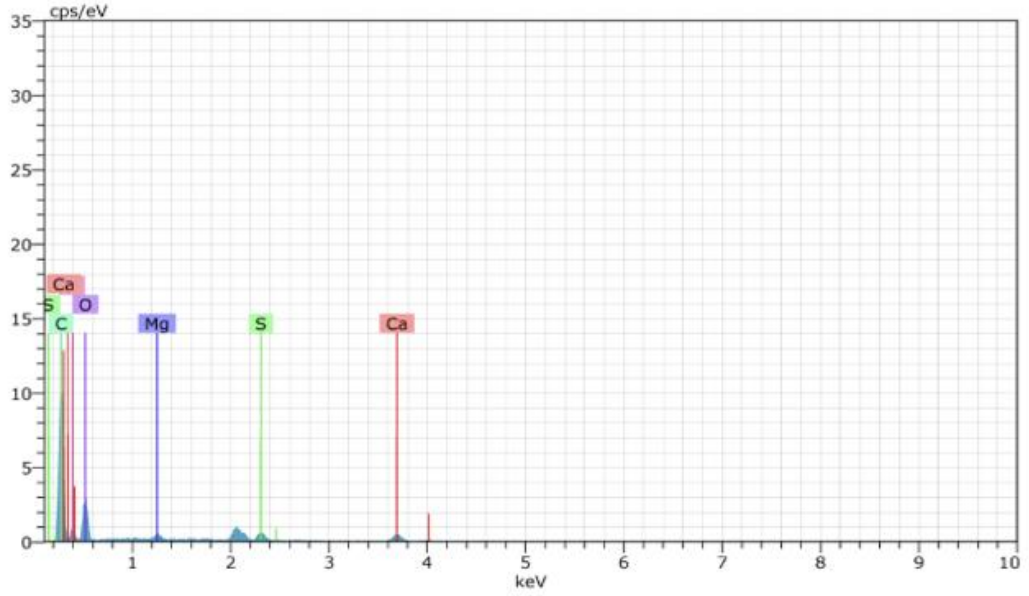
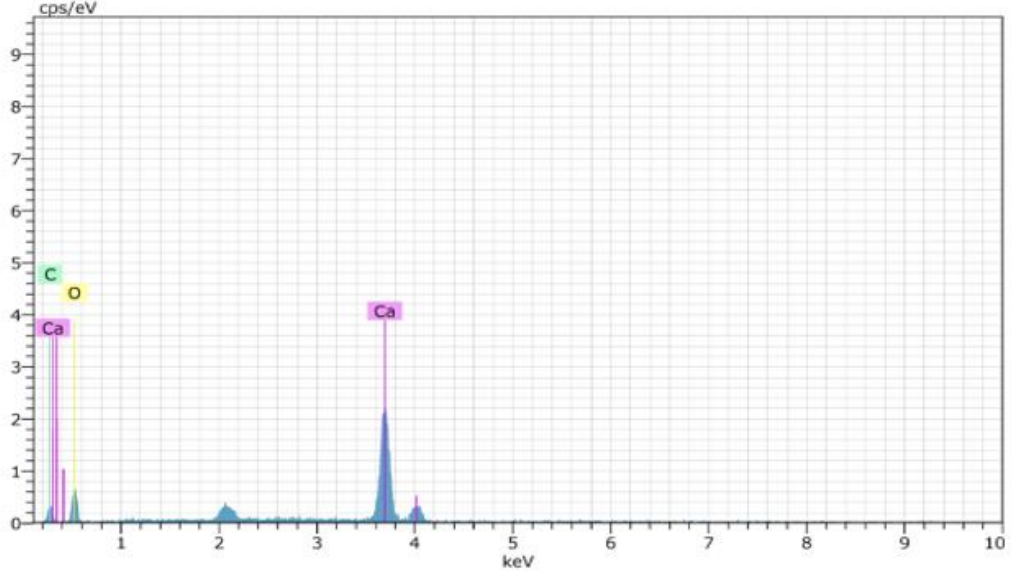
4.6. SEM-EDX Analizi

SEM-EDX analizi ile boş yumurta kabuğu tozunun ve ZnO@YK nanokompozitlerinin morfolojileri ile elementel tayinleri ayrıca ZnO yapıların boyut ve şekilleri SEM analiz ile tespit edilmiştir.



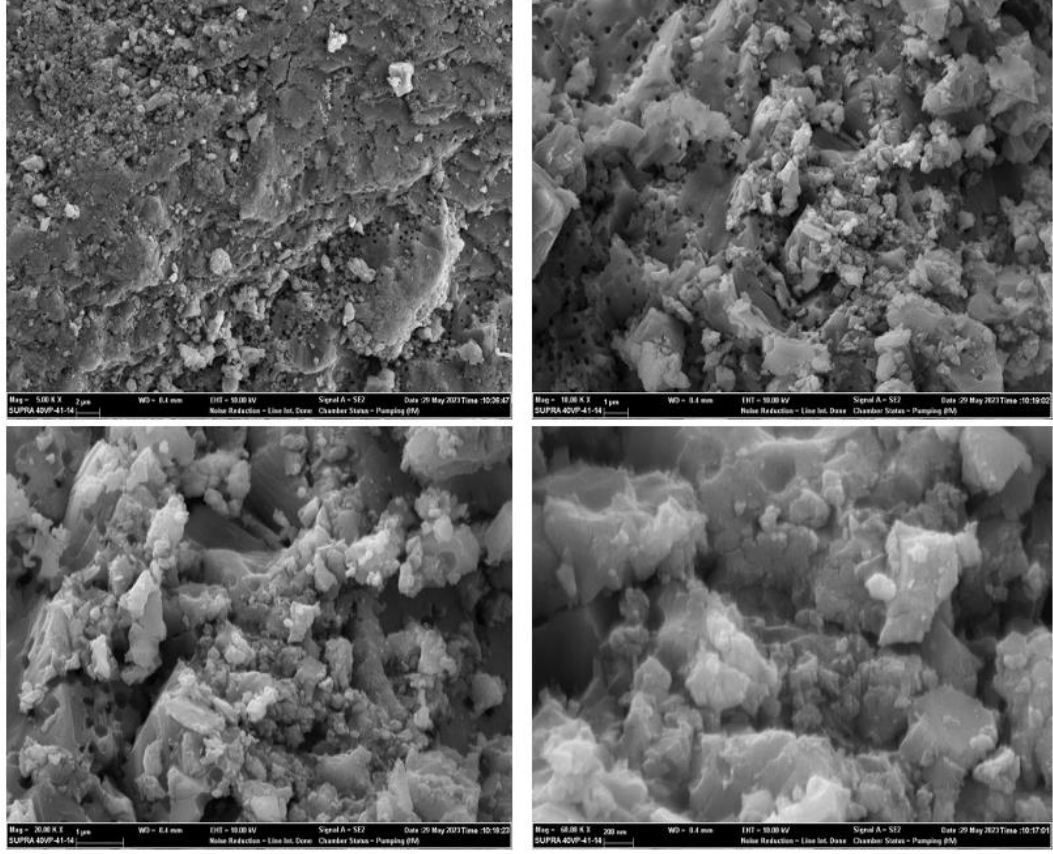
Şekil 4.11. Boş yumurta kabuğunun SEM görüntüleri

Boş YK yüzeyinde yumurta kabuğunun kendi yapısından kaynaklanan kalsit yapılar ve makro ve mikro gözenek yapıları Şekil 4.11'deki SEM görüntüsünde gösterilmiştir. Yumurta kabuğunun doğal gözeneklerinin çapları genellikle 200 nm civarında olup daha küçük gözeneklerde görülmüştür.



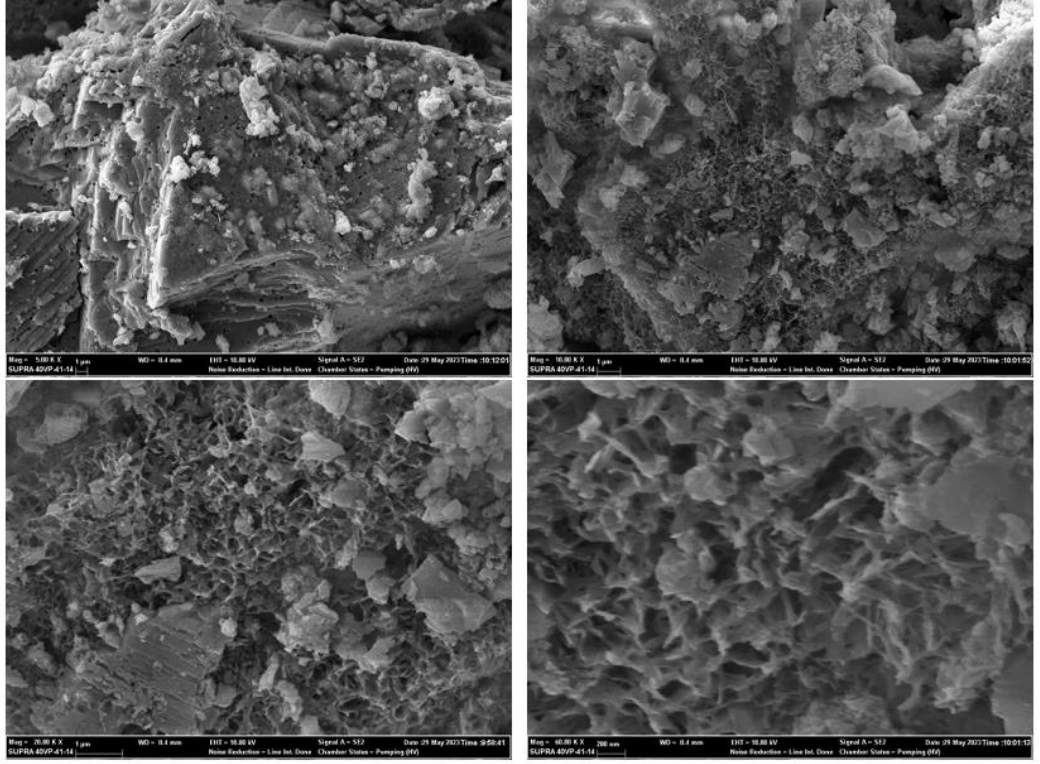
Şekil 4.12. Boş yumurta kabuğunun EDX spektrumları

Şekil 4.12’de YK yüzeyinin iki farklı bölgesinden alınan EDX spektrumları verilmiştir. YK’nın EDX spektrumu incelendiğinde elde edilen veriler elementel bileşimin çoğunlukla Ca, C ve O’ den oluştuğunu göstermiştir. Kullanılan yumurta kabuğu tozu kabuk ve membran ayrılmadan elde edildiği için EDX spektrumunda membran yapıdan kaynaklı olan S ve Mg elementlerin varlığı da görülmüştür (Kumar ve Muthu, 2018; Honarmand vd., 2020).



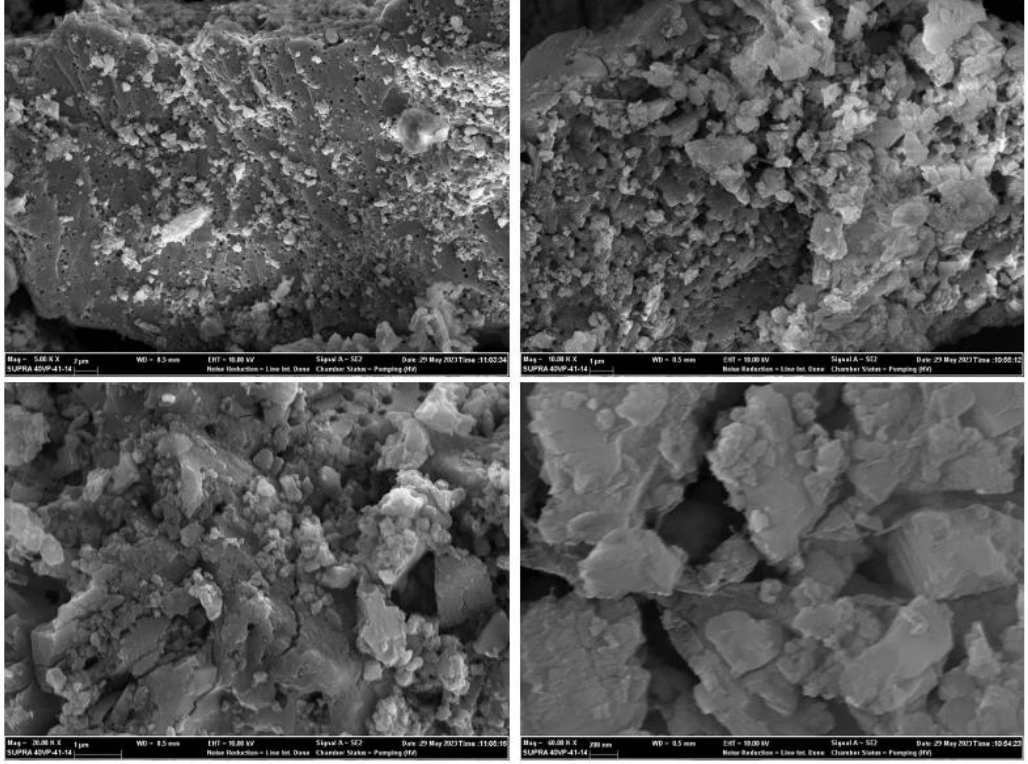
Şekil 4.13. ZnO@YK1 nanokompozitinin SEM görüntüleri

ZnO@YK1 nanokompozitinin SEM görüntüleri Şekil 4.13'te verilmiştir. SEM görüntüleri ayrıntılı olarak incelendiğinde boş YK yüzeyine göre ZnO@YK1 nanokompozitinin yüzeyinin ZnO nanoyapıları ile kaplandığı görülmüştür. Sentez sırasında oluşan ZnO nanoyapıların yumurta kabuğunun yüzeyine ve gözeneklerine nanopartikül yapısında tutunmuştur.



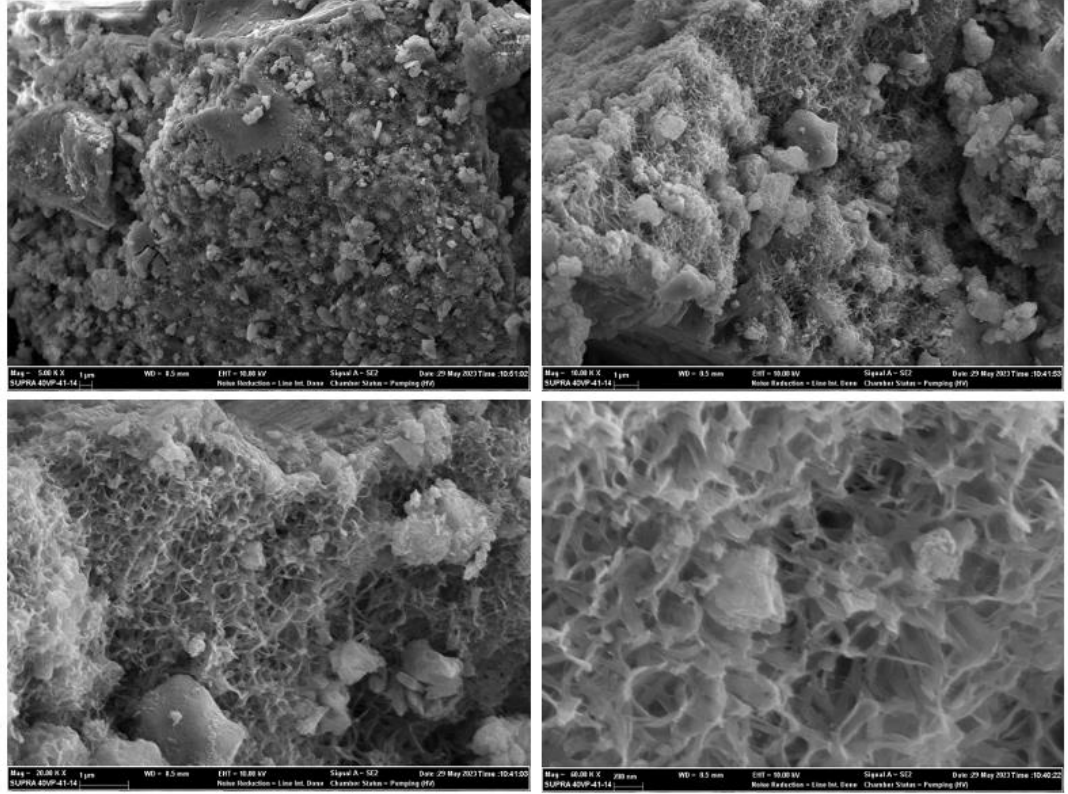
Şekil 4.14. ZnO@YK2 nanokompozitinin SEM görüntüleri

ZnO@YK2 nanokompozitinin SEM görüntüleri Şekil 4.14’de verilmiştir. SEM görüntüleri ayrıntılı olarak incelendiğinde boş YK yüzeyine göre ZnO@YK2 nanokompozitinin yüzeyinin ZnO nanoyapıları ile kaplandığı görülmüştür. Sentez sırasında Tablo 4.2’de de belirtildiği üzere farklı oranlarda ve molaritelerde kullanılan bitki özütü ve çinko nitrat sonucu oluşan farklılıklar SEM görüntülerinde de bir farklılık yaratmıştır. ZnO@YK2 nanokompoziti, ZnO@YK1 nanokompozite kıyasla sentez sırasında daha yüksek molaritede çinko nitrat çözeltisi kullanılmıştır. Bu durum sonucunda ZnO nanoyapıların ZnO@YK1 nanokompoziteye kıyasla ZnO@YK2 nanokompozitinde daha çok nanorod yapılarında olduğu nanokompozit yüzeyinden alınan SEM görüntülerinde görülmüştür. Nanorod yapıların yumurta kabuğunun yüzeyini yoğun bir tabaka halinde kaplamıştır. İğne benzeri yapıda olan ZnO nanorodlar birleşerek yıldızimsı nanoyapılar oluşturmuştur.



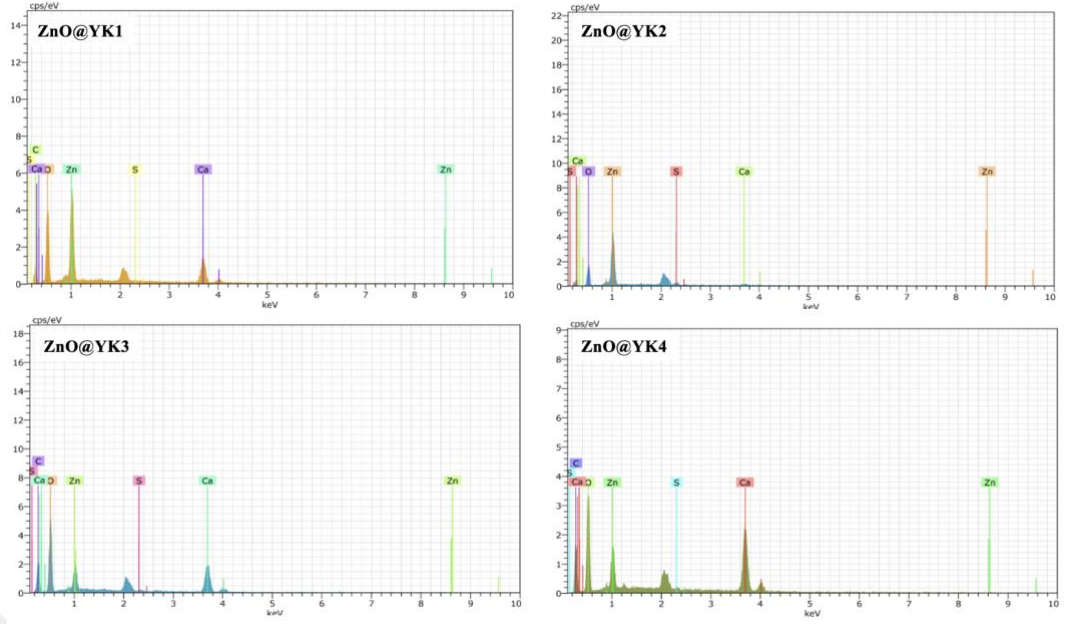
Şekil 4.15. ZnO@YK3 nanokompozitinin SEM görüntüleri

ZnO@YK3 nanokompozitinin SEM görüntüleri Şekil 4.15'te verilmiştir. SEM görüntüleri incelendiğinde boş YK yüzeyine göre ZnO@YK1 nanokompozitine benzer şekilde yüzeyin ZnO nanoyapıları ile kaplandığı görülmüştür. ZnO @YK3 nanokompozit yüzeyinde ve gözeneklerinde bulunan ZnO nanoyapıları nanopartikül halde oluşmuştur. ZnO@YK1 ve ZnO@YK3 nanokompozitlerinde nanorod yapıların görülmediği göstermiştir. Bu durum ZnO@YK1 ve ZnO@YK3 nanokompozitlerinde molarite olarak düşük çinko nitrat çözeltisinin kullanılmasından kaynaklanmıştır.



Şekil 4.16. ZnO@YK4 nanokompozitinin SEM görüntüleri

ZnO@YK4 nanokompozitinin SEM görüntüleri Şekil 4.16'da verilmiştir. SEM görüntüleri ayrıntılı olarak incelendiğinde boş YK yüzeyine ZnO@YK2 nanokompozitinin yüzeyinde olduğu gibi ZnO nanoyapıların nanopartikül ve nanorod ile kaplandığı görülmüştür. Diğer nanokompozit yapılarında da belirtildiği üzere sentez sırasında Tablo 4.2'de verilen deney koşulları incelendiğinde 0,01M gümüş nitrat kullanılarak gerçekleştirilen yeşil sentez sonucu oluşan nanokompozitlerde ZnO'in nanopartikül yapının yanında nanorod yapıda da oluşmuştur. ZnO@YK4 nanokompozitinin yüzeyine yoğun şekilde nanorod yapıların tabaka halinde kaplandığı ve ZnO nanorodların birleşerek yıldızimsı nanoyapılar oluşturduğu görülmüştür.

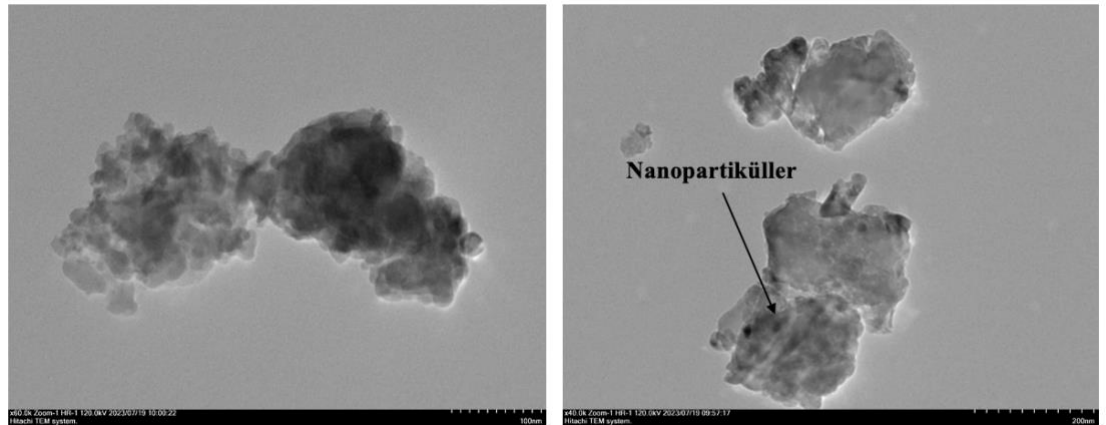


Şekil 4.17. Nanokompozit numunelerinin EDX verileri

Yeşil sentez sonrası elde edilen nanokompozitlerde ZnO'in tespiti için elementel analiz gerçekleştirilmiştir. SEM analizi sırasında noktasal ve bölgesel olarak seçilen alanlara EDX analizi yapılmıştır ve sonuç olarak Şekil 4.17' de sunulan nanokompozitlerin EDX spektrumları Şekil 4.12' de verilen YK'nın EDX spektrumları ile karşılaştırıldığında nanokompozitlerin yumurta kabuğu yüzeyinde yeşil sentez sırasında oluşan ZnO'in varlığı görülmüştür. EDX verileri ile yeşil sentez sırasında ZnO'in başarı bir şekilde sentezlendiğini desteklemiştir.

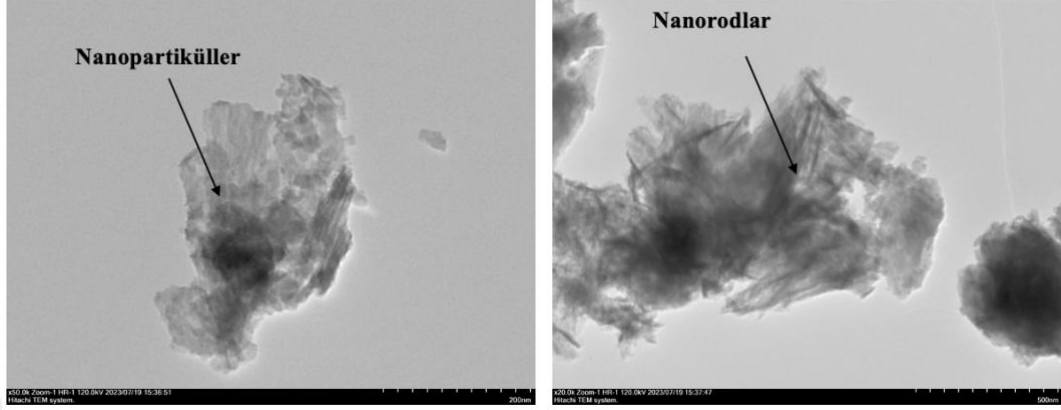
4.7. TEM Analizi

TEM analizi ile yumurta kabuk yüzeyini kaplayan ZnO'in ve nanokompozitlerinin mikro yapıları daha ayrıntılı olarak gözlemlenmiştir.



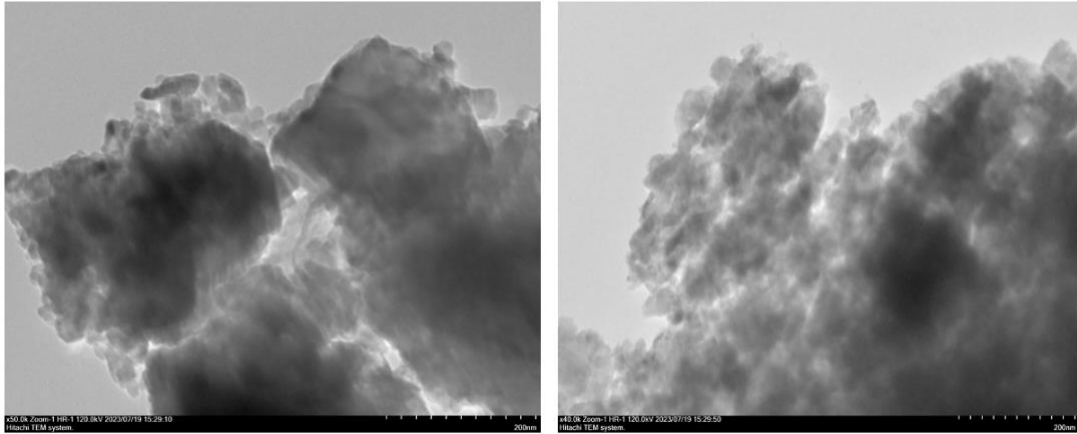
Şekil 4.18. ZnO@YK1 nanokompozitinin TEM görüntüleri

Şekil 4.18’ de ZnO@YK1 nanokompozitinin TEM görüntüleri incelendiğinde ZnO’ın nanopartikül yapıları görülmektedir. Yumurta kabuğunun yüzeyinde bulunan nanopartiküllerin nanoboyutları TEM analizinde daha ayrıntılı görülmektedir.



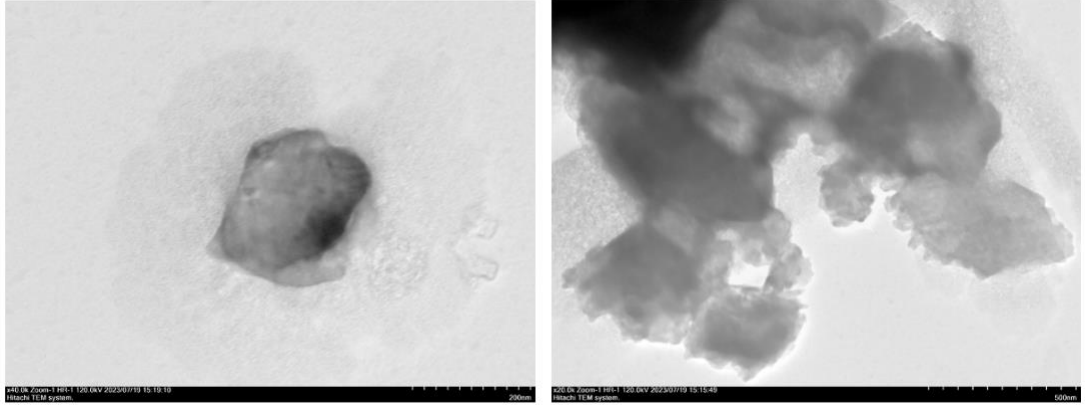
Şekil 4.19. ZnO@YK2 nanokompozitinin TEM görüntüleri

Şekil 4.19’da ZnO@YK2 nanokompozitinin TEM görüntülerinde yumurta kabuğuna tutunan ZnO nanoyapıların, SEM analizinde de görülen nanorod halleri verilmiştir. ZnO nanorod yapıların yanında nanopartikül yapılar da TEM görüntülerinde görülmüştür.



Şekil 4.20. ZnO@YK3 nanokompozitinin TEM görüntüleri

Şekil 4.20’de verilen ZnO@YK3 nanokompozitinin TEM görüntüleri incelendiğinde ZnO’ın nanopartikül yapıda yüzeye tutunduğu görülmüştür.



Şekil 4.21. ZnO@YK4 nanokompozitinin TEM görüntüleri

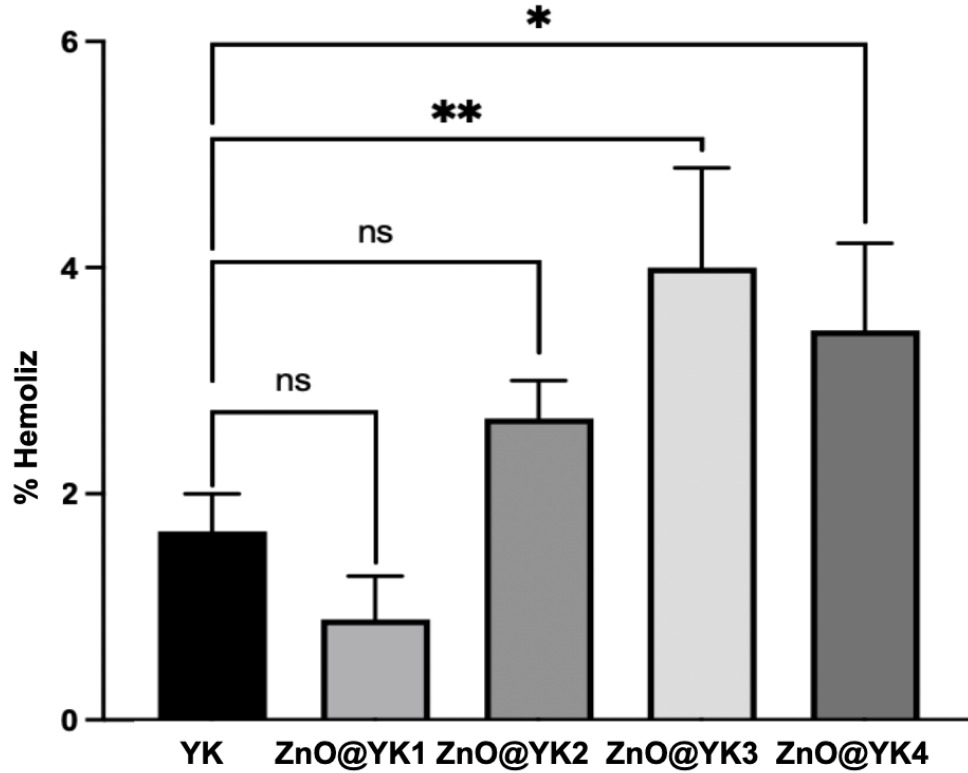
Şekil 4.21’de ZnO@YK4 nanokompozitinin TEM görüntüleri verilmiştir. TEM görüntüleri incelendiğinde yumurta kabuğu yüzeyine tutunan ZnO nanopartiküller dışında çok daha küçük nanopartiküller görülmüştür. Bu durumda TEM analizi ile SEM analizinde görülmeyen ya da agrega halde bulunan nano yapılar tespit edilmiştir.

TEM analiz sonuçlarına göre yumurta kabuğu tozu üzerinde bulunan ZnO yapılar açıkça görülmektedir. Özellikle Şekil 7d’de nanokompozit yapısındaki nanorodlar belirgin bir şekilde görülmektedir. Ayrıca TEM görüntülerinde, SEM sonuçları ile tutarlı ve daha küçük nanometre çapında nanorodlar ve nanopartikül yapıları tespit edilmiştir. TEM görüntüsünde numunedeki yumurta kabuğunun gözenekli yapısını görmek zordur. Bunun sebebi numunenin opaklığından kaynaklanıyor olabilmektedir (Qian vd., 2020). Hem TEM hem de SEM görüntülerinde görülen ZnO yapılarının nanopartikül, nanopul ve çoğunlukla iğne benzeri ZnO nanorodların oluşumu kullanmış olduğumuz *A. officinalis* bitkisinin pembe çiçek kısımlarını kullanarak elde ettiğimiz ekstraktaki biyomoleküllerin eşsiz birleşimi sayesinde çalışmamızdaki ayırt edici nanopartikül şekillerinin elde edilmesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Kimyasal sentez yolu ile ZnO nanorodların üretimi çoğunlukla güçlü bazların, yüzey aktif malzemelerin veya katalizör gibi maddelerinin kullanımını ile gerçekleşir (Awad vd., 2024). Fakat bizim çalışmamızda sürdürülebilir ve toksik etkisi olmayan yeşil sentez ile kimyasal maddeler kullanılmadan ZnO nanorod üretimi daha yeşil bir metod ile gerçekleştirilmiştir.

4.8. Hemoliz Deneyi

Sentezlenen nanokompozitlerin insan kan dokusu ile uyumluluğu biyomedikal ve farmasötik uygulamalarda biyomalzeme olarak kullanılabilceğini gösteren bir kriterdir.

Bu yüzden yumurta kabuğu tozunun ve nanokompozitlerin insan kırmızı kan hücrelerine karşı hemolitik aktiviteleri incelenmiştir.



Şekil 4.22. Örneklerin hemoliz değerleri. Sonuçlar ortalama değer \pm ortalama standart hatası olarak gösterilmiştir. İstatistiksel anlamlılık derecesi * ($p \leq 0,05$), ns (istatistiksel olarak anlamlı değil).

Şekil 4.22' de gösterildiği gibi, nanokompozitlerin kırmızı kan hücresi lizizi %4' den az olarak bulunmuştur. Tablo 4.3' de boş YK, ZnO@YK1, ZnO@YK2, ZnO@YK3 ve ZnO@YK4 hemoliz deneyi sonrası elde edilen hemoliz yüzdeleri verilmiştir. Bu ölçümlere göre, boş YK, ZnO@YK1 ve ZnO@YK2 numuneleri hemolitik özellik göstermeyen, ZnO@YK3 ve ZnO@YK4 numuneleri ise hafif hemolitik madde olarak belirlenmiştir (Dobrovolskaia vd., 2018). Ayrıca ZnO@YK1 nanokompozitinin doğal bir malzeme olan yumurta kabuğu tozuna göre bile daha az hemolitik özellik göstermesi yeşil sentez ile üretilen malzemelerin ne kadar biyouyumlu olabileceğini göstermiştir. Hemoliz sonuçları, bütün örneklerin biyogüvenli malzemeler için belirlenen %5'lik hemoliz sınırlarını aşmamıştır. Bu durum, örneklerin hemo-uyumlu olduğunu ve sağlık alanında kullanılabilir biyomalzeme potansiyeli taşıdığını ortaya koymuştur (Xu vd., 2016).

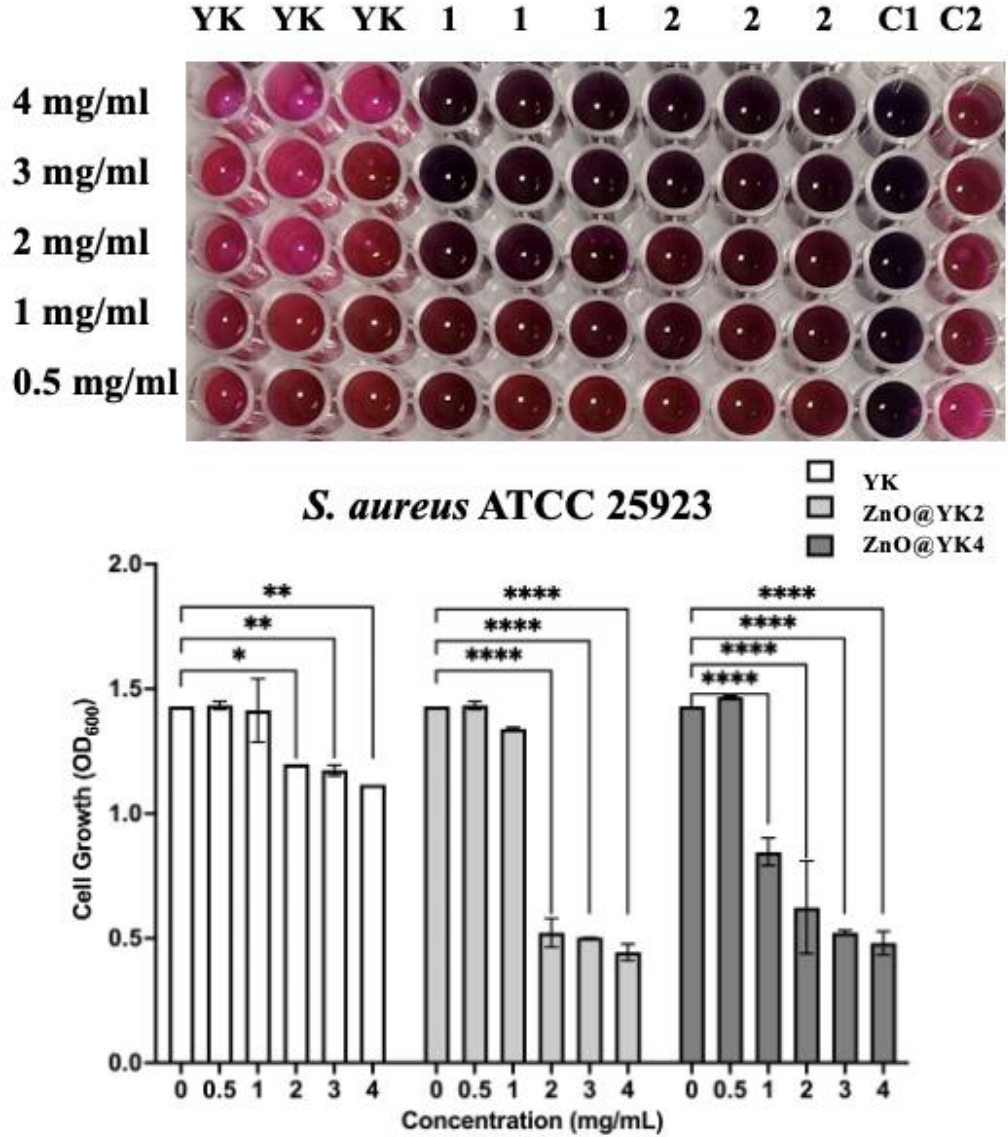
Çizelge 4.3. Nanokompozitlerin ve boş yumurta kabuğu tozunun hemoliz değerleri.

Sonuçlar ortalama \pm ortalama standart hatası olarak gösterilmiştir.

Örnek	Hemoliz (%)
YK	1,66 \pm 0,19
ZnO@YK1	0,888 \pm 0,22
ZnO@YK2	2,66 \pm 0,19
ZnO@YK3	4 \pm 0,5
ZnO@YK4	3,44 \pm 0,44

4.9. Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi

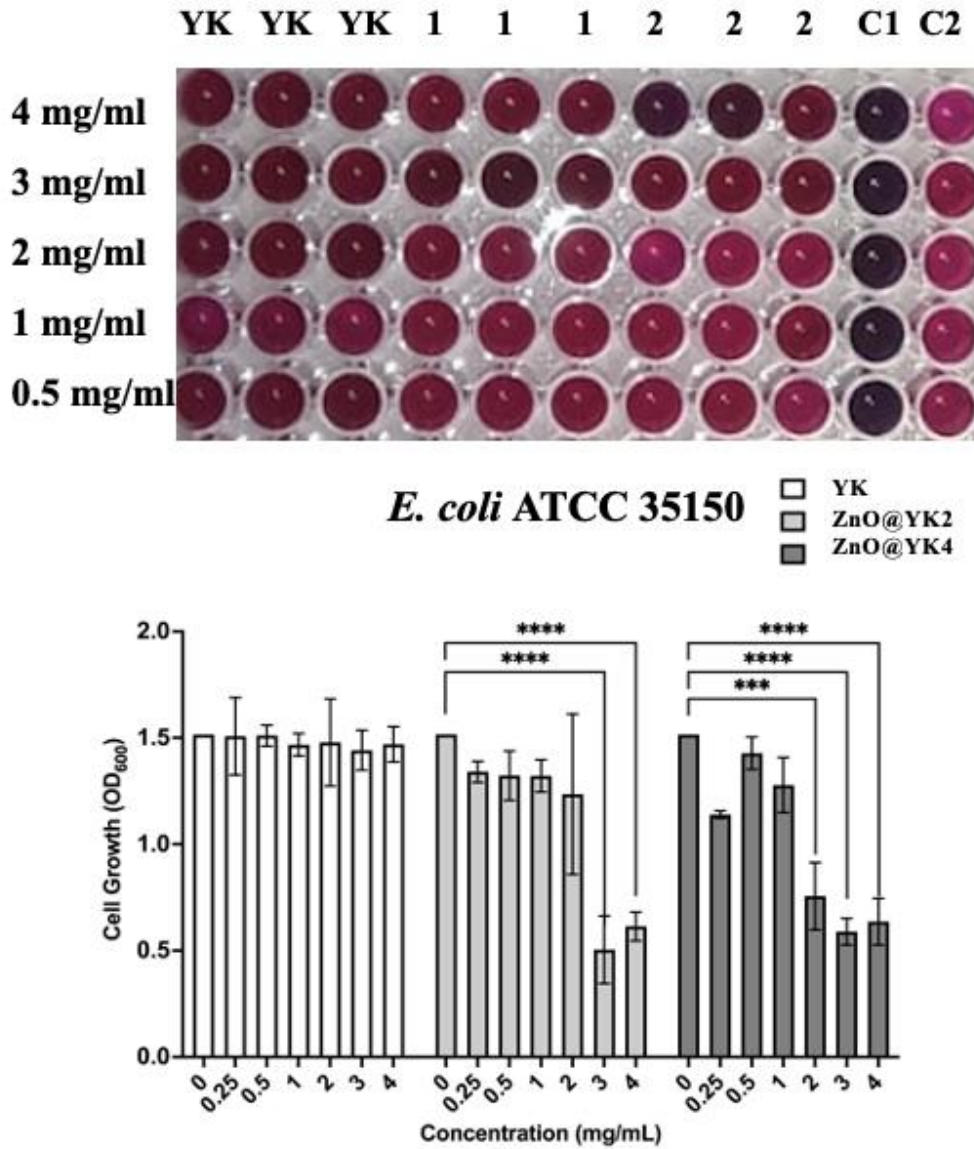
Tek başına ZnO NP' lerin antimikrobiyal etkilere sahip olduğu bilinmektedir. (Abdelghany vd., 2022; Lyngdoh vd., 2024; Tsakiridou vd., 2024). Yeşil sentez sonucu elde edilen nanokompozitlerin ZnO NP' lerden gelen antimikrobiyal etkilerini ve hangi nanokompozitin daha fazla antimikrobiyal özelliğe sahip olduğunu tespit etmek için ilk önce sıvı besiyerinde MİK testi yapılmıştır. Antimikrobiyal özellikleri test etmek için dört nanokompozitin XRD, FTIR, SEM analizlerine ve ön antimikrobiyal deney sonuçlarına göre ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitleri YK ile beraber MİK testlerinde kullanılmıştır. MİK testinde rezasurin boyası kullanarak nanokompozitlerin *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakteri suşları ve *C. albicans* ATCC 10239 mantarına karşı minimum öldürücü konsantrasyonu tespit edilmiştir.



Şekil 4.23. YK, ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitlerinin *S. aureus* ATCC 25923 bakterisinde yapılan MİK deney sonucu

Şekil 4.23'te verilen MİK deney sonuçlarına göre *S. aureus* bakterisine karşı yumurta kabuğu herhangi bir inhibisyon oluşturmamıştır. ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitleri ise *S. aureus* bakterisine karşı sırasıyla 2 ve 1 mg/ml gibi düşük bir konsantrasyonda MİK etkisi göstermiştir. Sonuçlar hem kolorimetrik olarak hem de bakterinin yumurta kabuğu ve nanokompozit numuneler ile inkübasyonundan sonra ölçülen absorbans değerlerinin sonuçlarından tespit edilmiştir. Bu durum yumurta kabuğunun *S. aureus* karşı öldürücü etkisi olmadığını ve nanokompozit numuneler için

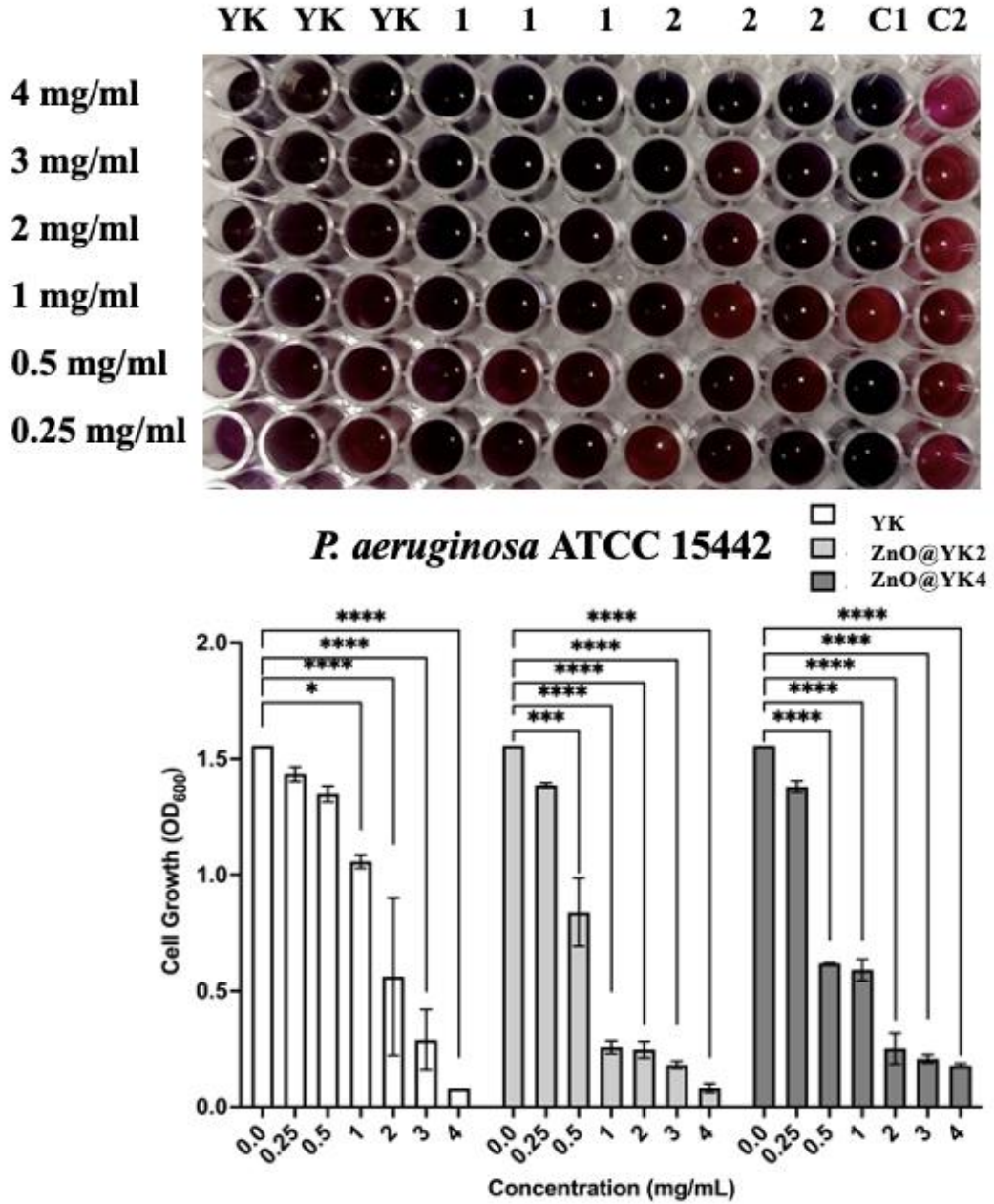
yumurta kabuğuna yeşil sentez ile yüklenen ZnO NP'ler ile antibakteriyel özellik kattığını göstermiştir.



Şekil 4.24. YK, ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitlerinin *E. coli* ATCC 35150 bakterisinde yapılan MİK deney sonucu

Şekil 4.24'de verilen MİK deney sonuçlarına göre yumurta kabuğunun *E. coli* bakterisine karşı öldürücü etkisi olmadığı görülmüştür. ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitleri ise *E. coli* bakterisine karşı 1 mg/ml gibi düşük bir konsantrasyonda MİK etkisi göstermiştir. Sonuçlar hem kolorimetrik olarak hem de bakterinin yumurta kabuğu ve nanokompozit numuneler ile inkübasyonundan sonra ölçülen absorbans değerlerinin sonuçlarından tespit edilmiştir. Bu durum yumurta kabuğunun *E. Coli*

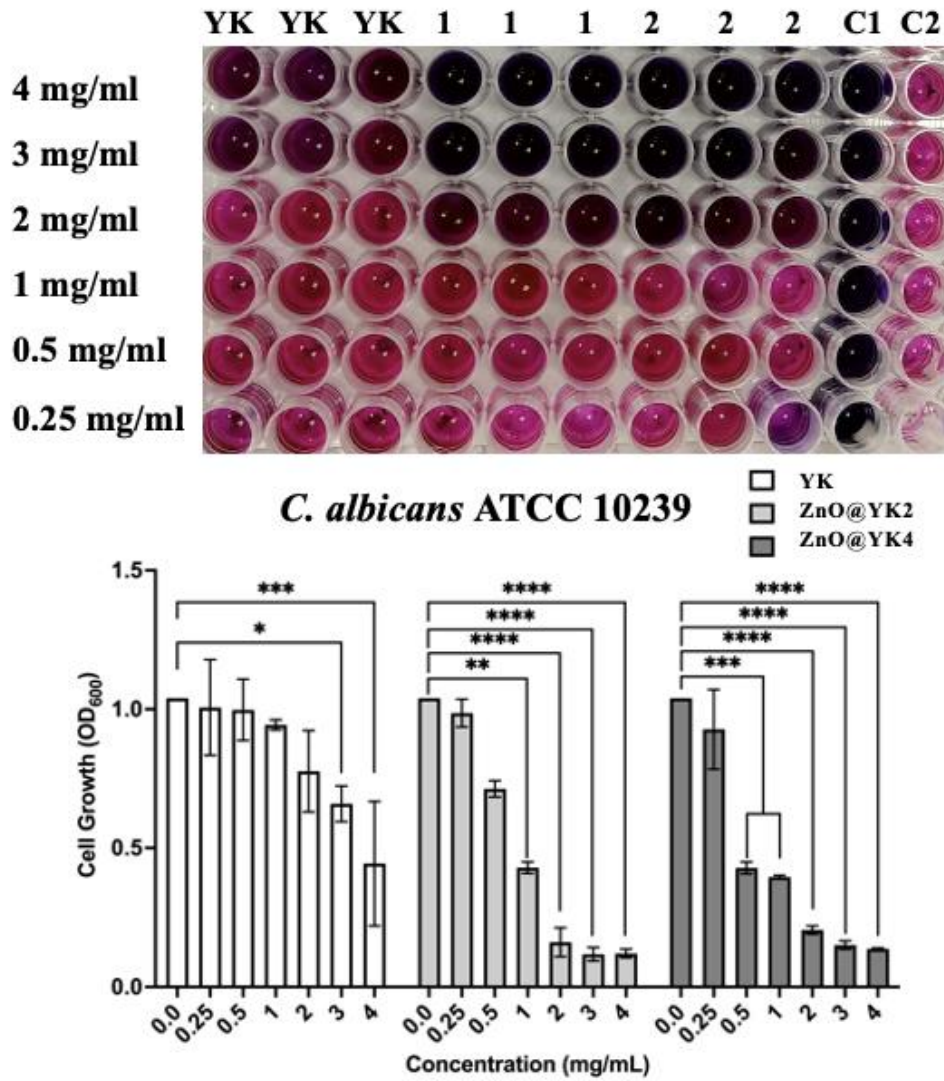
bakterisine karşı öldürücü etkisi olmadığını ve nanokompozit numuneler için yumurta kabuğuna yeşil sentez ile yüklenen ZnO NP'ler ile antibakteriyel özellik kattığını göstermiştir.



Şekil 4.25. YK, ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitlerinin *P. aeruginosa* ATCC 15442 bakterisinde yapılan MİK deney sonucu

Şekil 4.25' de verilen MİK deney sonuçlarına göre yumurta kabuğunun diğer bakterilerin tersine *P. aeruginosa* bakterisine karşı öldürücü etkisi olduğu görülmüştür. *P. aeruginosa* bakterisinde yumurta kabuğu 1 mg/ml konsantrasyona kadar inhibisyon

etki göstermiştir. ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitleri 0,5 mg/ml konsantrasyonunda MİK etkisi göstermiştir. Sonuçlar hem kolorimetrik olarak hem de bakterinin yumurta kabuğu ve nanokompozit numuneler ile inkübasyonundan sonra ölçülen absorbans değerlerinin sonuçlarından tespit edilmiştir. Bu durumda yumurta kabuğunun *P. aeruginosa* bakterisine karşı öldürücü etkisi olduğu ve nanokompozit numuneler için yumurta kabuğuna yeşil sentez ile yüklenen ZnO NP'ler ile de ekstra bir antibakteriyel özellik kattığını göstermiştir.



Şekil 4.26. YK, ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitlerinin *C. albicans* ATCC 10239 mantarında yapılan MİK deney sonucu

Şekil 4.26' da verilen MİK deney sonuçlarına göre yumurta kabuğu *P. aeruginosa* bakterisinde olduğu gibi *C. albicans* mantarına karşı öldürücü etkisi olduğu görülmüştür. *C. albicans* mantarına yumurta kabuğu 2 mg/ml konsantrasyona kadar inhibisyon etki

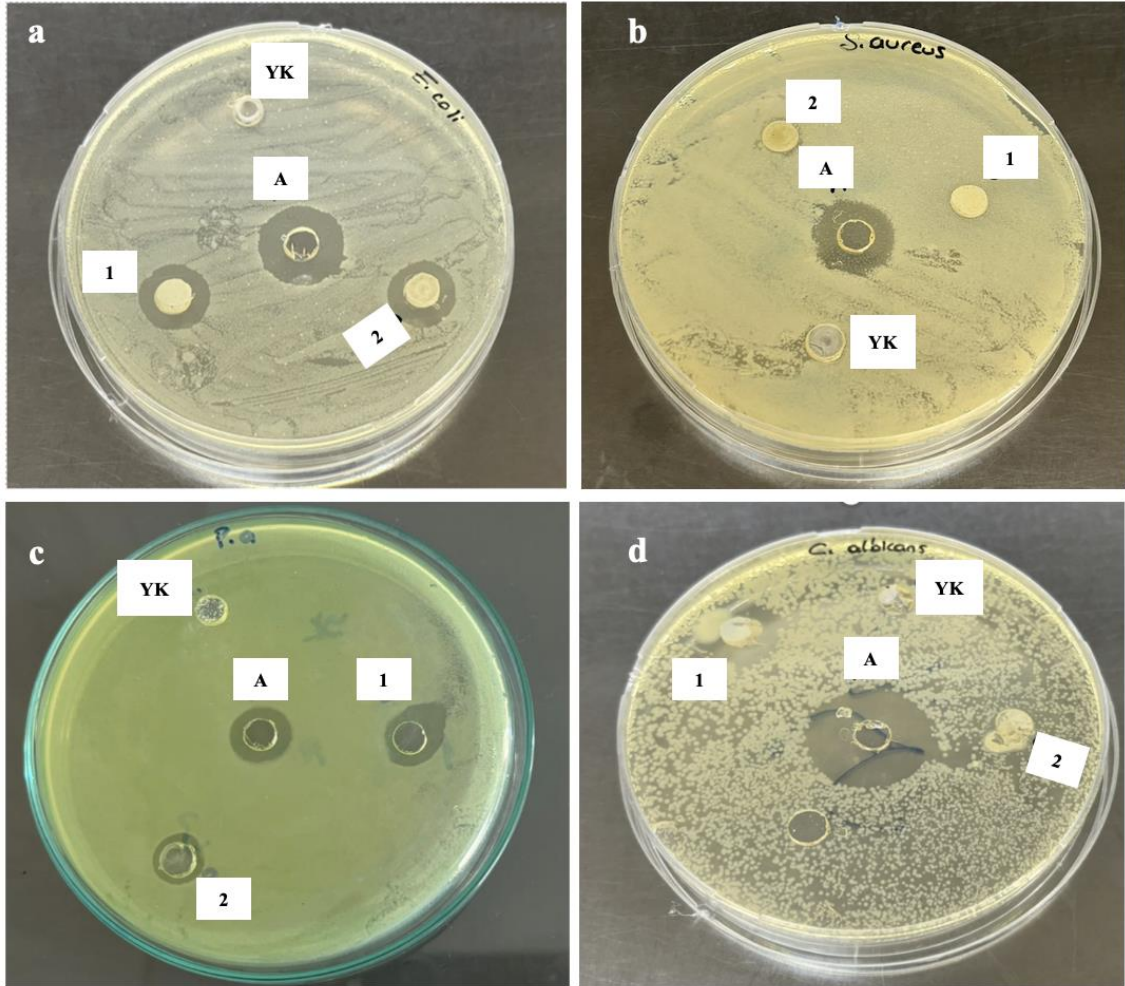
göstermiştir. ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitleri ise 1 mg/ml konsantrasyonuna kadar MİK etkisi göstermiştir. Sonuçlar hem kolorimetrik olarak hem de bakterinin yumurta kabuğu ve nanokompozit numuneler ile inkübasyonundan sonra ölçülen absorbans değerlerinin sonuçlarından tespit edilmiştir. Bu durumda yumurta kabuğunun *C. Albicans* mantarına karşı öldürücü etkisi olduğu ve nanokompozit numuneler için yumurta kabuğuna yeşil sentez ile yüklenen ZnO NP'ler ile de ekstra bir antibakteriyel özellik kattığını göstermiştir.

MİK test sonuçlarına göre yumurta kabuğu tozunun yüksek konsantrasyonlarda *P. aeruginosa* ve *C. albicans* mikroorganizmaları için öldürücü olabileceği görülmüştür. Yumurta kabuğunun yüksek konsantrasyonlarda bazı bakteriler üzerinde öldürücü etkiler gösterebilmesi, bileşiminde bulunan CaCO₃ ve organik bileşenlerin mikroorganizmalar üzerindeki zararlı etkilerine dayandırılmaktadır. CaCO₃, mikroorganizmalar üzerinde iki önemli mekanizma ile etki eder: birincisi, kalsiyum iyonlarının hücre zarlarını bozarak hücresel bütünlüğü zayıflatması, ikincisi ise kalsiyum karbonatın çözünmesiyle ortam pH'ını artırarak, özellikle düşük pH'a adapte bakteriler için elverişsiz bir çevre oluşturmasıdır (Wellman-Labadie vd., 2008; Ohshima vd., 2015; Mageswari vd., 2025). Bu etkileşimlerin, gram pozitif ve gram negatif bakterilerde farklı mekanizmalarla sonuçlanabileceği belirtilmektedir. Gram pozitif bakterilerin kalın peptidoglikan tabakasına rağmen, kalsiyum iyonlarının hücresel hasarı tetiklediği ve metabolik süreçleri bozduğu öne sürülmektedir (Ohshima vd., 2015). Buna ek olarak, yumurta kabuğu tozunun ortamın pH seviyesini artırması, özellikle düşük asidik veya nötr pH'da çoğalan bakteriler için büyüme koşullarını olumsuz yönde etkilemiştir. Yumurta kabuğundan türetilen bu antimikrobiyal etkinin, patojenlerin hücre yüzeyindeki protein yapılarını denatüre ederek veya hücre içi enzimatik süreçlere zarar vererek çalıştığı düşünülmektedir (Shang vd., 2022). Özellikle gram negatif bakterilere karşı, pH değişiminin dış membran yapısını destabilize ederek antibakteriyel bir etki oluşturduğu belirtilmiştir. ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitlerinin *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakteri suşları ve *C. albicans* ATCC 10239 mantarına karşı antimikrobiyal özellik göstermesi yumurta kabuğunun yapısına yeşil sentez ile katılan ZnO NP'lerin etkisi olmuştur.

4.10. Antimikrobiyal Testler

Yumurta kabuğu, ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitlerin *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakteri suşları ve *C. albicans*

ATCC 10239 mantarı kuyu difüzyon yöntemi kullanarak antibakteriyal özelliklerine bakılmıştır. Kuyu difüzyon testinde pozitif kontrol olarak gram +, gram – bakteriler ile mantarlarlara karşı geniş bir antimikrobiyal spektrum gösteren CHX (klorheksidin) antibiyotiği kullanılmıştır (Kamath vd., 2022).



Şekil 4.27. Yumurta kabuğu ve ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitlerinin **a) E. coli b) S. aureus c) P. aeruginosa ve d) C. albicans** mikroorganizmalarına karşı agar kuyu difüzyon yöntemi ile elde edilen görüntüler (1; ZnO@YK2, 2; ZnO@YK4, A; CHX antibiyotiği, YK; Yumurta kabuğu)

Şekil 4.27’ de Agar kuyu difüzyon yöntemi ile elde edilen deney görselleri incelendiğinde yumurta kabuğunun, patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki gösteremediğinden herhangi bir inhibisyon zonu oluşmadığı görülmüştür. ZnO@YK2 nanokompoziti *S. aureus* ve *C. albicans* mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etki göstermezken *P. aeruginosa* ve *E. coli* bakterilerine karşı inhibisyon zonu oluşturmuştur.

ZnO@YK4 nanokompoziti *C. albicans* mantarına karşı antimikrobiyal etki göstermezken *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı inhibisyon zon oluşturmuştur.

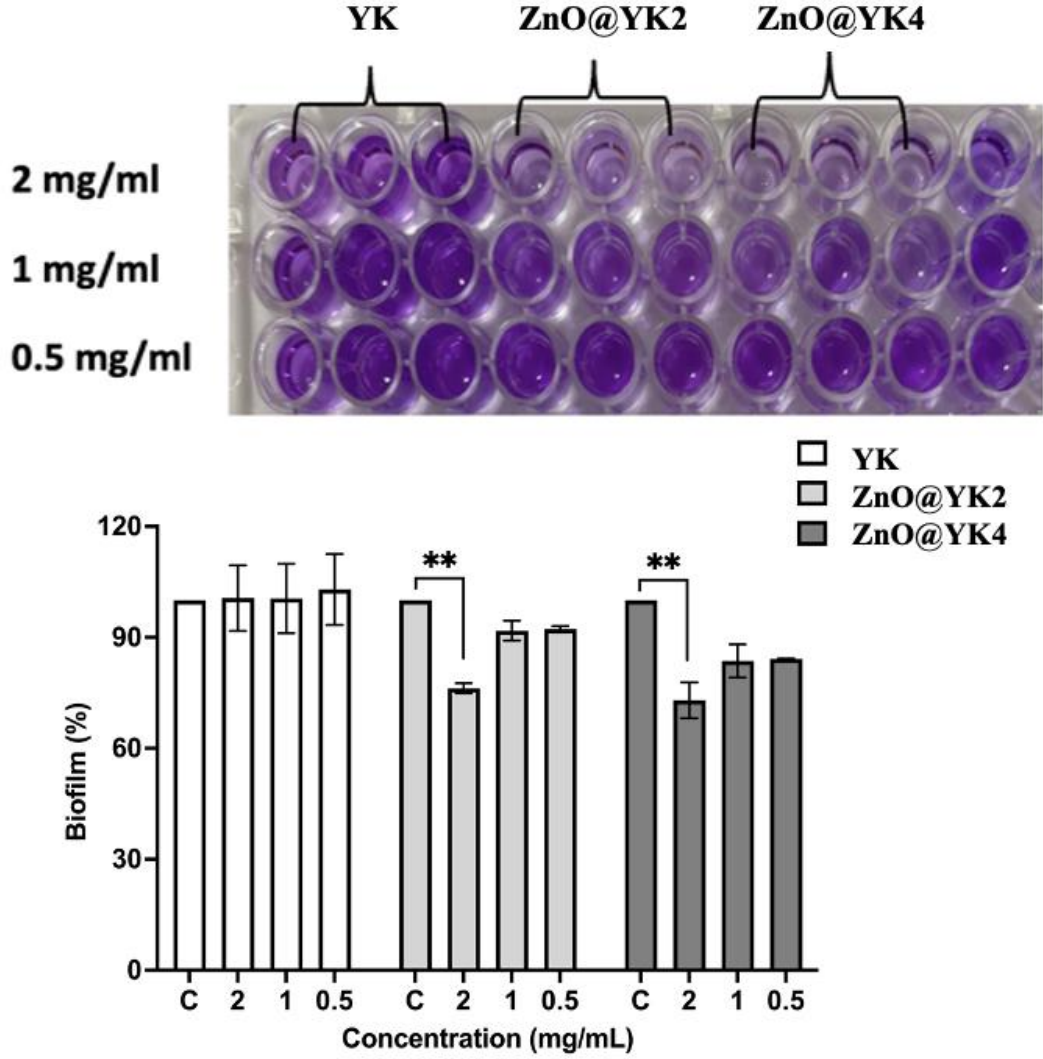
Çizelge 4.4. Agar kuyu difüzyon yönteminde mikroorganizmalara karşı ölçülen zon çapları (mm)

	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
CHX	17	13	16	13
YK	-	-	-	-
ZnO@YK2	14	10	-	9
ZnO@YK4	14	9	8	-

Agar kuyu difüzyon yönteminde patojen mikroorganizmalarda oluşan zonlar ölçülerek Çizelge 4.4'te zon çapı değerleri verilmiştir. ZnO@YK2 nanokompozitinin inhibisyon zon çapları mikroorganizmalar arasında karşılaştırıldığında 14 mm, 10mm ve 9 mm çapında oluşturduğu inhibisyon zonları sırasıyla *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *C. albicans* patojenlerine aittir. ZnO@YK4 nanokompozitinin mikroorganizmalara karşı oluşturduğu 14 mm, 9 mm ve 8 mm inhibisyon zon çapları ise sırasıyla *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *S. aureus* bakterilerine aittir. Bu durumda ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitleri *E. coli* bakterisine karşı aynı, *P. aeruginosa* ise benzer antibakteriyel etki göstermişlerdir. ZnO@YK4 nanokompoziti *S. aureus* bakterisine karşı inhibisyon zon oluştururken ZnO@YK2 nanokompoziti ise inhibisyon zon oluşturmamıştır. Bu durum *C. albicans* mantarında tam tersi olarak ortaya çıkmıştır.

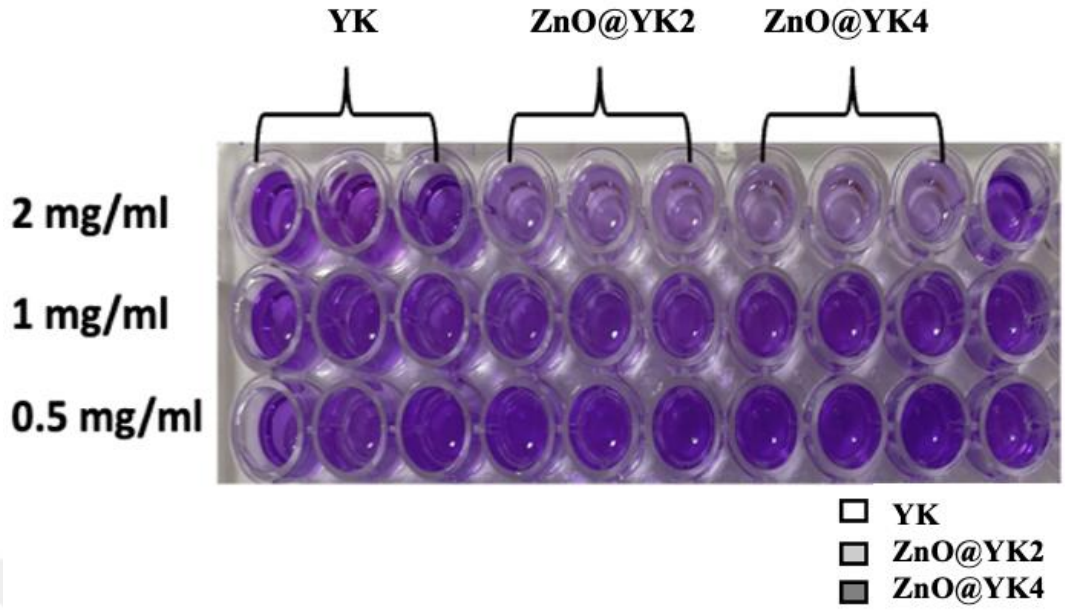
4.11. Biyofilm İnhibisyon Testi

Biyofilm testleri mikroorganizmaların bir yüzey üzerinde toplanarak oluşturarak kendilerini koruyucu bir matriksle çevreledikleri yapıyı antibakteriyel ajanların ve malzemelerin biyofilm önleme veya çözme kapasitelerini değerlendirmek için yapılmaktadır. Biyofilm oluşturan *E. coli* ATTC 35218 ve *P. aeruginosa* ATTC 27853 suşlarına karşı ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitlerinin biyofilm önleme kapasitelerine bakılmıştır.



Şekil 4. 28. ES, ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitlerinin *E. coli* ATCC 35218 bakterileri suşuna karşı gerçekleştirilen biyofilm testi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$), **** ($p \leq 0,0001$)

YK, ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitinin *E. coli* ATCC 35218 bakteri suşuna karşı biyofilm deney sonuçları Şekil 4.28’ de verilmiştir. *E. coli* ye karşı biyofilm oluşturma kapasitesi YK, ZnO@YK2 ve ZnO@YK4’nin farklı konsantrasyonları (2, 1 ve 0,5 mg/ml) ile bakteri kültürü muamele edilerek değerlendirilmiştir. İnkübasyon sonrası *E. coli* üzerindeki biyofilm inhibitör etkisi incelendiğinde YK’nın biyofilm inhibisyonunda çok etkili olmadığı görülmüştür. ZnO@ES2 ve ZnO@ES4 nanokompozitlerinin en iyi biyofilm inhibisyonu 2 mg/ml konsantrasyon olduğu görülmüştür.



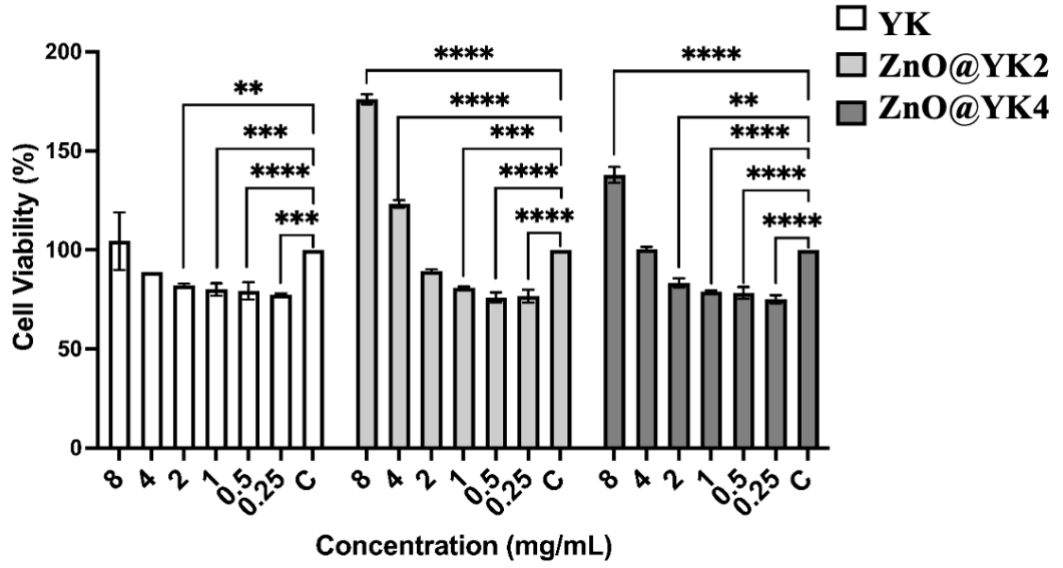
Şekil 4. 29. ES, ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitlerinin *P. aeruginosa* ATTC 27853 bakterileri suşuna karşı gerçekleştirilen biyofilm testi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$), **** ($p \leq 0,0001$)

YK, ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitinin *P. aeruginosa* ATTC 27853 bakterileri suşuna karşı biyofilm deney sonuçları Şekil 4.29' da verilmiştir. *P. aeruginosa* ya karşı biyofilm oluşturma kapasitesi YK, ZnO@YK2 ve ZnO@YK4' nin farklı konsantrasyonları (2, 1 ve 0,5 mg/ml) ile bakteri kültürü muamele edilerek değerlendirilmiştir. İnkübasyon sonrası *P. aeruginosa* üzerindeki biyofilm inhibitör etkisi incelendiğinde YK'nın biyofilm inhibisyonunda çok etkili olmadığı görülmüştür. ZnO@ES2 ve ZnO@ES4 nanokompozitlerinin en iyi biyofilm inhibisyonu 2 mg/ml konsantrasyon olduğu görülmüştür.

Nanokompozitlerin antimikrobiyal aktivitelere sahip olmasında ZnO NP'lerinin etkisi yapılan MİK, agar kuyu difüzyon ve biyofilm inhibisyon testlerinde görülmüştür. Yumurta kabuğu yüzeyinde yeşil sentez ile oluşumu sağlanan ZnO NP'lerin bakteriler ve mantara karşı göstermiş olduğu antimikrobiyal etkiyi göstermesinde birkaç mekanizma yer almaktadır (Qi vd., 2017; Suvaitha vd., 2022). Bu mekanizmalar birden fazla biyofiziksel ve biyokimyasal etkileşmenin birleşiminden kaynaklanmaktadır. ZnO NP'ler yüzeylerinde oluşan reaktif oksijen türleri (ROS), özellikle hidroksil radikali ($\bullet\text{OH}$), süperoksit anyonu ($\text{O}_2^{\bullet-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) — mikroorganizmaların hücre zarına zarar vererek hücre geçirgenliğinin bozulmasına ve içerik sızıntısına yol açmaktadır. ZnO NP'lerden kaynaklanan oksidatif stres, hücre bileşenlerinin (DNA, proteinler, lipidler) yapısal bütünlüğünü bozar ve hücre ölümünü tetikler. Ayrıca Zn^{2+} iyonlarının serbest kalması da antimikrobiyal etkiye katkı sağlamaktadır. Zn^{2+} iyonları, mikroorganizmaların hücre zarında iyon dengesini bozarak metabolik işlevleri sekteye uğratar ve enzimatik sistemleri inhibe eder. ZnO nanoparçacıkları bakteri ve mantar hücre zarına elektrostatik etkileşimlerle bağlanarak, zar bütünlüğünü bozabilir ve hücre içeriğinin sızmasına neden olabilmektedir (Zhang vd., 2019; Selvam vd., 2020; Verma vd., 2025). ES ise hem fiziksel destek sağlayarak ZnO nanoparçacıklarının daha homojen dağılmasına katkıda bulunmakta hem de yüzey pH'sını düzenleyerek ZnO'nun etkisini optimize etmektedir (Wellman-Labadie vd., 2008; Ohshima vd., 2015). Sonuç olarak, ZnO@ES nanokompozitlerinin antimikrobiyal etkisi; ROS üretimi, Zn^{2+} salınımı, hücre zarı etkileşimleri ve ES matrisinin destekleyici rolü gibi çok yönlü mekanizmaların sinerjik etkisiyle ortaya çıkmaktadır.

4.12. L929 Fibroblast Hücre Hattında MTT Sitotoksite Testi

Nanokompozitlere ve yumurta kabuğunun L929 hücreleri üzerinde yapılan MTT testi, nanokompozitlerin potansiyel biyomalzeme özelliğinin sitotoksik etkilerini değerlendirmek tercih edildi. Bu test, hücrelerin metabolik aktivitesini ölçerek malzemenin hücre sağlığı üzerindeki etkilerini ve malzemenin biyoyumluluğunu gösterdi.



Şekil 4.30. Yumurta kabuğu tozu (ES) ve sentezlenen nanokompozitler için L929 fibroblastına karşı MTT sitotoksosite testi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi ** (p<0,01), *** (p<0,001), **** (p<0,0001)

MTT sitotoksosite testinin sonuçları literatürdeki bulgularla örtüşmekte olup, çinko oksit bazlı nanokompozitlerin biyoyumluluk ve hücre canlılığını artırıcı etkilerini vurgulamaktadır. Çinko oksit nanopartiküllerinin, enzim aktivasyonu, hücre sinyalizasyonu ve çoğalmada önemli bir rol oynayan çinko iyonlarını serbest bırakarak hücre metabolik süreçleri desteklediği iyi belgelenmiştir (Rasmussen vd., 2010; Ahamed vd., 2008). Bu çalışmada, ZnO@ES2 ve ZnO@ES4 nanokompozitleri artan konsantrasyonlarla hücre canlılığında tutarlı bir artış göstererek 8 mg/mL'de en yüksek değerlerine ulaşmıştır. Bu bulgular, yeşil yöntemlerle sentezlenen bu nanopartiküllerin doğal dengeleyici ajanlardan yararlandığını, böylece toksisiteyi azalttığını ve biyoyumluluğu artırdığını öne süren önceki çalışmalarla tutarlıdır (Dobrovolskaia vd., 2008). Ayrıca, yeşil sentez yaklaşımlarının reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini düzenlediği, hücre stresini ve sitotoksisiteyi en aza indirirken hücrenin hayatta kalmasını desteklediği bildirilmiştir (Tang ve Lv, 2014). Buna karşılık, yumurta kabukları tek başına, muhtemelen biyoaktif çinko iyonlarının yokluğu ve sınırlı doğal biyolojik aktivite nedeniyle, daha düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığı üzerinde baskılayıcı bir etki göstermiştir. Bu gözlem, literatürde vurgulandığı gibi, biyomalzemeler arasındaki biyoyumluluk ve toksisite profillerindeki değişkenliği, bileşimsel ve senteze özgü özellikleriyle yönlendirmektedir (Rasmussen vd., 2010).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada toksik olmayan ve çevresel olarak sürdürülebilir bir yöntem olan yeşil sentez ile *Althaea officinalis* bitkisinin pembe çiçek kısımlarından elde edilen bitki özütü kullanılarak yumurta kabuğuna ZnO NP'ler katkılanarak nanokompozit üretilmiştir. Sentez sırasında ZnO nanoyapılarının oluşumları UV-Vis absorpsiyon spektroskopisi ile tespit edilmiştir. Yumurta kabuğu ve sentezlenen ZnO@YK nanokompozitlerinin ATR-FTIR analizi ile kimyasal yapıları, fonksiyonel grupları ve moleküler bağlanma türleri, XRD analizi ile kristal yapıları, faz bileşimleri, SEM-EDX analizi ile yüzey morfolojileri, kimyasal bileşimleri ve element dağılımları ve TEM analizi ile nanoyapıdaki ZnO NP'lerin morfolojileri belirlenmiştir. Karakterizasyon sonrası yumurta kabuğu ve ZnO@YK nanokompozitlerinin hemolitik aktiviteleri test edilmiştir. ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitlerinde *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *C. albicans* ATCC 10239 mikroorganizmaları kullanılarak Mik testi ve agar kuyu difüzyon deneyi yapılmıştır. Ayrıca *E. coli* ATCC 35218 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakteri şuşlarına karşı biofilm aktivitelerine bakılmıştır. L929 fibroblast hücre hattında MTT testi ile yumurta kabuğu ve nanokompozitlerin sitotoksik etkilerine bakılmıştır. Sonuç olarak yeşil sentez yöntemi ile doğal içerikli, antimikrobiyal özellikte ve hemouyumlu olan potansiyel bir biyomalzeme sentezlenmiştir.

Tez çalışmamızda ilk olarak temiz, çevresel olarak sürdürülebilir, düşük maliyetli ve toksik olmayan yeşil sentez yöntemi kullanılarak nanokompozit sentezi için *Althaea officinalis* bitkisinin kırmızımsı pembe ve pembe çiçek kısımlarından farklı çözücülerle (aseton, etanol, metanol ve ultra saf su) bitki ekstraktları hazırlanmıştır. Bitki ekstraktlarında nanopartikül oluşumunda indirgeyici ajan, şelatlama ve stabilizatör olarak görev yapan polifenoller ve flavonoidlerden kuersetin ve gallik asit seçilerek HPLC analizinde tespit edilmişlerdir. HPLC analizi ile en yüksek oranda 24,341 ppm kuersetin içeren bitki özütü pembe çiçeklerden ultra saf su kullanılarak hazırlanan özüt olmuştur.

Nanokompozit sentezinde ZnO NP'ler pembe çiçek kısımları kullanılarak ultra saf su ile hazırlanan bitki özütünden sentezlenerek yumurta kabuğuna sentez sırasında katkılanması sağlanmıştır. ZnO NP'ler ayrı olarak sentezlenip yumurta kabuğuna sonradan katkılanmasını sağlamak yerine sentez sırasında çözeltiye yumurta kabuğu ve membranı ayrılmadan toz halde eklenerek hem maliyetten hem de zamandan tasarruf sağlanmıştır. Yumurta kabuğu gibi çevreye atık halde atılan doğal biyomalzeme çalışmamızda kullanılarak atık malzemelerin sürdürülebilir olarak kullanımına katkı

sağlanmıştır.

Nanokompozitlerin sentezi sırasında yumurta kabuğu tozu 2 g olarak sabit tutulurken farklı molaritelerde (0,001 M ve 0,01 M) ZnO.9H₂O (ultra saf su içinde) çözeltileri kullanılmıştır. Ayrıca hacimce farklı oranlarda bitki özü (çinko nitrat:bitki özütü: 9:1, 4:1 v/v) ile farklı molaritede ZnO.9H₂O çözeltileri ile sentez gerçekleştirilerek optimizasyon çalışması yapılmıştır. Optimizasyon çalışmasında 0,01 M ZnO.9H₂O çözeltisi kullanılarak sentezlenen nanokompozit numunelerinde ZnO NP'ler daha fazla oluşarak farklı yapıda nanopartiküller oluşturmuştur. Bu durum nanokompozitlerin karakterizasyon analizleri sırasında morfolojik ve kimyasal sonuçları etkilemiştir.

Yeşil sentez sırasında ZnO NP'lerin bitki özütünde bulunan indirgeyici bileşikler sonucu çözeltide oluşmasını belirlemek için UV-vis analizi gerçekleştirilmiştir. Tüm nanokompozitlerde görülen 384 nm'lik karakteristik absorpsiyon pikleri ZnO NP'lerin varlığını göstermiştir. 384 nm' de görülen belirgin zirve, oda sıcaklığındaki yüksek uyarılma bağlanma enerjileri olduğundan ZnO NP'ler için spesifik bulunmuştur. Ayrıca sentez sırasında ve sonrasında değişen çözelti rengide ZnO NP'lerin oluşumunu göstermiştir. Dolayısıyla hem renk değişimi hem de UV-vis analizi sonucunda 384 nm civarında tüm nanokompozitlerde absorpsiyon bandının görülmesi yeşil sentez sırasında *A. officinalis* bitkisinden bulunan fenolik ve flavonoid bileşenler sayesinde ZnO NP'lerin başarılı bir şekilde sentezlendiği tespit edilmiştir.

Sentezlenen ZnO@YK nanokompozitlerin fonksiyonel grup spektrumlarını belirlemek için 4000-400 cm⁻¹ arasında kızılötesi spektrumları alınmıştır. FTIR sonuçlarına göre nanokompozit numunelerinde yumurta kabuğu ve membranına ait kalsit ve membran yapıları ile ilişkili absorpsiyon bantlarında zirve yoğunlukları dışında herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir. FTIR spektrumunda 430-450 cm⁻¹ aralığında gözlenen bant, ZnO'nun Zn-O bağlarının karakteristik esneme titreşimlerini temsil etmiştir ve ZnO'nun yapısal özelliklerinin analizinde önemli bir gösterge olarak kabul edilmiştir. ZnO@YK1, ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitlerinde Zn-O bağları belirgin şekilde FTIR spektrumunda görülmüştür. Fakat IR spektrumunda ZnO@YK3 nanokompozitinde diğer nanokompozit numunelere göre daha düşük ZnO bant yoğunluğu olarak gözlemlenmiştir. ZnO@YK3 nanokompozitinde ZnO nanopartikülleri diğer nanokompozitlere nazaran yumurta kabuğu tozuna daha az nüfuz etmiştir. Bu durum ZnO@YK3 sentezinde 0,001 M çinko nitrat çözeltisi ve en az bitki ekstraktı kullanılarak gerçekleştirilmiştir olmasıyla açıklanmıştır. Bitki özütü ve kullanılan çinko nitrat molaritesi yeşil sentezde ZnO nanopartikülün oluşmasını etkilediği için IR

spektrumunda ZnO bant yoğunluklarında farklılar görülmüştür.

ZnO@YK nanokompozitleri ve yumurta kabuğu tozunun kristal yapısını, faz bileşenlerini belirlemek için XRD analizi yapılmıştır. Yumurta kabuğunun XRD deseninden CaCO₃'a ait kırınım zirveleri $2\theta=29,37^\circ$; $39,38^\circ$; $43,13^\circ$; $47,49^\circ$ ve $48,49^\circ$ olarak belirlenmiştir. ZnO@YK nanokompozitlerine yapılan XRD kırınım desenleri incelendiğinde hepsinde yumurta kabuğuna ait olan karakteristik kırınım zirveleri görülmüştür. ZnO@YK1, ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitlerinde $2\theta=31,27^\circ$; $35,86^\circ$; $47,32^\circ$; $62,81^\circ$; $65,24^\circ$; $75,99^\circ$ ve $81,52^\circ$ ZnO'in karakteristik tepe noktaları bulunurken ZnO@YK3 nanokompozitinde ZnO'in karakteristik tepe noktaları $2\theta=31,27^\circ$; $35,86^\circ$; $47,32^\circ$; $65,24^\circ$ ve $75,99^\circ$ olarak belirlenmiştir. Bu durum FTIR analiz sonucunda da bahsedilen yeşil sentezin en az bitki özütü ve düşük molaritede çinko nitrat çözeltisi ile gerçekleştirildiğinden kaynaklandığı düşünülmüştür.

ZnO@YK nanokompozitleri ve yumurta kabuğu tozunun yüzeylerinin morfolojik özellikleri ve elementel içerikleri ayrıca ZnO yapıların boyut ve şekilleri için SEM-EDX analizi gerçekleştirilmiştir. Yumurta kabuğu tozunun yapısı SEM ile incelendiğinde kendi yapısından kaynaklanan kalsit yapılar, makro, mikro gözenek yapıları görülmüştür. Bu gözeneklerin çapları genellikle 200 nm civarında olup daha küçük gözeneklerde bulunmuştur. ZnO@YK nanokompozitlerine ait SEM görüntülerinde yumurta kabuğunun yüzeyine ve gözenekli yapılarına ZnO NP'lerin tutunduğu ve bazı nanokompozitlerde ZnO NP'lerin nanorod olarak oluştuğu görülmüştür. ZnO@YK1 ve ZnO@YK3 nanokompozitlerinde sentez sırasında oluşan ZnO yapıları nanopartikül şeklinde yumurta kabuğu yapısına katılmıştır. ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitlerinde sentez sırasından oluşan nanorod yapıları yumurta kabuğunun yüzeyini yoğun bir tabaka halinde kaplamıştır. İğne benzeri yapıda olan ZnO nanorodlar birleşerek yıldızimsı nanoyapılar oluşturmuştur. Bu durum ZnO@YK1 ve ZnO@YK3 nanokompozitlerinde molarite olarak düşük çinko nitrat çözeltisinin kullanılmasından kaynaklanmıştır. Daha yüksek molaritede çinko nitrat çözeltisi kullandığımız ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 ise ZnO NP'ler bir araya gelerek nanorodları, nanorodlar da bir araya gelerek nanoyıldızları oluşturmuştur. Sonuç olarak sentez sırasında oluşan nanoyapıların şeklini ve oluşumlarını belirleyen parametlerden biri metal tuzlarının derişimi olmuştur. Yumurta kabuğuna nanokompozitlerine yapılan noktasal ve bölgesel EDX analizinde yumurta kabuğunda membrandan gelen S, Mg ve kabuk kısmından gelen Ca, C, O elementleri, ZnO@YK nanokompozitlerinde ise yumurta kabuğunda bulunan elementler dışında ZnO NP'lerden gelen Zn elementi tespit edilmiştir.

TEM analiz sonuçlarında nanokompozit numunelerde yumurta kabuğu tozu üzerindeki ZnO nanorod yapıları belirgin bir şekilde tespit edilmiştir. Ayrıca, SEM sonuçlarıyla uyumlu olarak, daha küçük çapta nanorod ve NP yapıları TEM görüntülerinde gözlenmiştir. Numunenin opaklığı nedeniyle yumurta kabuğunun gözenekli yapısı TEM görüntüsünde net olarak seçilememiştir. ZnO yapılarının nanopartikül ve özellikle iğne benzeri ZnO nanorod şeklinde oluşumu, *A. officinalis* bitkisinin pembe çiçeklerinden elde edilen ekstraktın biyomoleküllerinin eşsiz bileşimiyle sağlanmıştır. Bu çalışmada, güçlü bazlar veya katalizörler kullanılmadan yeşil sentez yöntemi ile toksik etkisi olmayan, sürdürülebilir bir yöntemle ZnO nanorodların üretimi gerçekleştirilmiştir.

Yeşil sentez yöntemi ile elde ettiğimiz nanokompozit numunelerinin potansiyel biyomalzeme özelliklerini incelemek için hemouyumluluğuna hemoliz deneyi ile bakıldı. Yumurta kabuğuna ve nanokompozit numunelerine insan KKH ile yapılan hemoliz testi sonucunda biyogüvenli malzemeler için belirlenen %5'lik hemoliz sınırlarını aşmamıştır. Sonuç olarak yumurta kabuğu ($1,66 \pm 0,19$), ZnO@YK1 ($0,888 \pm 0,22$) ve ZnO@YK2 ($2,66 \pm 0,19$) numuneleri hemolitik özellik göstermeyen, ZnO@YK3 ($4 \pm 0,5$) ve ZnO@YK4 ($3,44 \pm 0,44$) numuneleri ise hafif hemolitik madde olarak belirlenerek insan kan dokusu ile uyumlu olması biyomedikal ve farmasötik uygulamalarda biyomalzeme olarak kullanılabilceğini göstermiştir.

Yumurta kabuğuna yüklenen ZnO NP'lerden gelen antimikrobiyal aktiviteyi ölçmek için MİK deneyi yapılmıştır. Yumurta kabuğu ve ZnO@YK nanokompozitlerinin a MİK testinde rezasurin boyası kullanarak nanokompozitlerin *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakteri suşları ve *C. albicans* ATCC 10239 mantarına karşı minimum öldürücü konsantrasyonu tespit edilmiştir. MİK testlerinde yumurta kabuğunun *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerine karşı inhibisyon etkisi göstermediği, ancak diğer mikroorganizmalar üzerinde bazı etkiler sergilediği görülmüştür. ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitleri, *E. coli*'ye karşı 1 mg/ml, *S. aureus*'a karşı sırasıyla 2 mg/ml ve 1 mg/ml konsantrasyonlarında MİK etkisi göstermiştir. *P. aeruginosa*'da yumurta kabuğu 1 mg/ml, ZnO içeren nanokompozitler ise 0,5 mg/ml konsantrasyonunda MİK etkisi göstermiştir. *C. albicans*'a karşı yumurta kabuğu 2 mg/ml, ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 ise 1 mg/ml konsantrasyonunda etkilidir. Araştırmalar, yumurta kabuğunun yüksek konsantrasyonda bazı bakteriler için öldürücü olabileceğini ve bu etkinin yumurta kabuğundaki CaCO₃ ve organik bileşenlere bağlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca, yumurta kabuğu tozu pH seviyesini artırarak bazı

bakterilerin büyümesini engellemiştir. ZnO nanopartiküllerin, yumurta kabuğu tozunun yapısına antimikrobiyal özellik kazandırdığı MİK testleriyle doğrulanmıştır.

Agar kuyu difüzyon yöntemi ile *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 bakteri suşları ve *C. albicans* ATCC 10239 patojen mikroorganizmalara karşı oluşan inhibisyon zonları ölçülerek yumurta kabuğu ve ZnO@YK nanokompozitlerinin antimikrobiyal etkileri test edilmiştir. Agar kuyu difüzyon testine göre ZnO@YK2 nanokompozitinin inhibisyon zon çapları mikroorganizmalar arasında karşılaştırıldığında 14 mm, 10mm ve 9 mm çapında oluşturduğu inhibisyon zonları sırasıyla *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *C. albicans* patojenlerine aittir. ZnO@YK4 nanokompozitinin mikroorganizmalara karşı oluşturduğu 14 mm, 9 mm ve 8 mm inhibisyon zon çapları ise sırasıyla *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *S. aureus* bakterilerine aittir. Bu durumda ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitleri *E. coli* bakterisine karşı aynı, *P. aeruginosa* ise benzer antibakteriyal etki göstermişlerdir. ZnO@YK4 nanokompoziti *S. aureus* bakterisine karşı inhibisyon zon oluştururken ZnO@YK2 nanokompoziti ise inhibisyon zon oluşturmamıştır. Bu durum *C. albicans* mantarında tam tersi olarak ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak ZnO@YK2 nanokompoziti antimikrobiyal, ZnO@YK4 nanokompoziti ise antibakteriyal etki göstermiştir.

Biyofilm testi mikroorganizmaların yüzeylerde oluşturduğu koruyucu matriksi hedef alarak, antibakteriyel ajanların ve malzemelerin biyofilm önleme veya çözme kapasitelerini değerlendirmek için yapılmıştır. Çalışmada, *E. coli* ATCC 35218 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşlarına karşı ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitlerinin biyofilm inhibisyon kapasiteleri incelenmiştir. *E. coli* ve *P. aeruginosa* 'ya karşı yapılan testlerde, yumurta kabuğu materyalinin biyofilm inhibisyonunda etkisiz olduğu görülürken, ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitlerinin en iyi inhibisyon etkisini 2 mg/ml konsantrasyonda gösterdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, ZnO nanopartikül içeren nanokompozitlerin biyofilm oluşumunu önlemede etkili olmuş ancak yumurta kabuğu etki göstermemiştir.

ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitlerinin L929 fibroblast hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri MTT testi ile değerlendirilmiştir. ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitlerinin MTT testi sonuçları, bu malzemelerin artan konsantrasyonlarla birlikte hücre canlılığını artırıcı bir etkiye sahip olduğunu ve biyoyumluluk açısından olumlu bir profil sergilediğini göstermiştir. Her iki nanokompozit, özellikle 8 mg/ml konsantrasyonda en yüksek hücre canlılığına ulaşmıştır. Buna karşılık, YK materyali düşük konsantrasyonlarda (0,25–2 mg/ml) hücre canlılığını

baskılamış, ancak yüksek konsantrasyonlarda (4 ve 8 mg/ml) daha sınırlı bir artış göstermiştir. Bu bulgular, ZnO ile modifiye edilen nanokompozitlerin biyoyuyluluk açısından ham YK materyaline kıyasla daha üstün olduğunu ortaya koymuştur.

ZnO@YK2 ve ZnO@YK4 nanokompozitlerinin güçlü antimikrobiyal, antibakteriyel ve biyofilm inhibisyon özellikleri sergilemesi, bu malzemeleri yara iyileştirme, antibakteriyel kaplamalar ve enfeksiyon önleyici biyomedikal cihazlarda kullanıma uygun hale getirmektedir. Aynı zamanda, L929 fibroblast hücre hattı üzerinde yapılan MTT testleri, bu nanokompozitlerin hücre canlılığını artırıcı etkileri ile biyoyuyluluk açısından olumlu bir profil sunduğunu ortaya koymuştur. Bu durum, nanokompozitlerin farmasötik uygulamalar, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp gibi ileri biyomalzeme alanlarında kullanılabilirliğini desteklemektedir. Ayrıca, yumurta kabuğu gibi atık bir biyomalzemenin değerlendirilmesi, hem maliyet etkinliği hem de çevresel sürdürülebilirlik açısından önemli bir katkı sağlamaktadır. Sonuç olarak, ZnO ile modifiye edilmiş bu nanokompozitler, antimikrobiyal özellikleri, biyoyuylulukları ve çevre dostu üretim süreçleriyle potansiyel biyomalzeme olarak dikkat çekmekte; biyomedikal, farmasötik ve çevresel uygulamalarda geniş bir kullanım alanı sunmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abdallah, Y., Liu, M., Ogunyemi, S. O., Ahmed, T., Fouad, H., Abdelazez, A., Yan, C., Yang, Y., Chen, J., ve Li, B. (2020). Bioinspired green synthesis of chitosan and zinc oxide nanoparticles with strong antibacterial activity against rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Molecules*, 25(20), 4795. <https://doi.org/10.3390/molecules25204795>.
- Abdelghany, T., Al-Rajhi, A., Yahya, R., Bakri, M., Al Abboud, M., Yahya, R., Qanash, H., Bazaid, A., ve Salem, S. S. (2022). Phytofabrication of zinc oxide nanoparticles with advanced characterization and its antioxidant, anticancer, and antimicrobial activity against pathogenic microorganisms. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03412-1>
- Abdo, A. M., Fouda, A., Eid, A. M., Fahmy, N. M., Elsayed, A. M., Khalil, A. M. A., Alzahrani, O. M., Ahmed, A. F., ve Soliman, A. M (2021). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles (zno-nps) by *Pseudomonas aeruginosa* and their activity against pathogenic microbes and common house mosquito, *Culex pipiens*. *Materials*, 14, 6983.
- Ahamed, M., Karns, M., Goodson, M., Rowe, J., Hussain, S. M., Schlager, J. J., ve Hong, Y. (2008). DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 257(2), 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.09.015>
- Ahmed, S. F., Mofijur, M., Raza, N., Chowdhury, A. T., Chowdhury, S., Nahrin, M., ve Ong, H. C. (2022). Green approaches in synthesising nanomaterials for environmental nanobioremediation: Technological advancements, applications, benefits and challenges. *Environmental Research*, 204, 111967. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111967>.
- Ahmed, T. A. E., Suso, H., Maqbool, A., ve Hincke, M. T. (2019). Processed eggshell membrane powder: bioinspiration for an innovative wound healing product. *Materials Science and Engineering: C*, 95, 192–203.
- Ahtzaz, S., Nasir, M., Shahzadi, L., Amir, W., Anjum, A., Arshad, Iqbal, F., Chaudhry, A. A., Yar, M., ve Rehman, I. (2017). A study on the effect of zinc oxide and zinc peroxide nanoparticles to enhance angiogenesis-pro-angiogenic grafts for tissue regeneration applications. *Materials & Design*, 132, 409–418.
- Akhtari, N., Mahdian, E., Oroojalian, F., ve Hakimzadeh, V. (2025). Antioxidant and antimicrobial properties of zinc oxide nanoparticles green synthesized with *Bunium persicum* essential oil. *Scientific Reports*, 15(1), 12117.
- Alba, L. D., Jones, D. N., Badawy, H. T., Eliason, C. M., ve Shawkey, M. D. (2013). Antimicrobial properties of a nanostructured eggshell from a compost-nesting bird. *Journal of Experimental Biology*, 217(7), 1116–1121.

- Aliyev, E., Filiz, V., Khan, M. M., Lee, Y. J., Abetz, C., ve Abetz, V. (2019). Structural characterization of graphene oxide: surface functional groups and fractionated oxidative debris. *Nanomaterials*, 9(8), 1180. <https://doi.org/10.3390/nano9081180>.
- Aljabali, A. A. A., Obeid, M. A., Bakshi, H. A., Alshaer, W., Ennab, R. M., Al-Trad, B., Al Khateeb, W., Al-Batayneh, K. M., Al-Kadash, A., ve Alstori, S. (2022). Synthesis, characterization, and assessment of anti-cancer potential of zno nanoparticles in an in vitro model of breast cancer. *Molecules*, 27, 1827. <https://doi.org/10.3390/molecules27061827>.
- Alsaiani, N. S., Alzahrani, F. M., Amari, A., Osman, H., Harharah, H. N., Elboughdiri, N., ve Tahoona, M. A. (2023). Plant and microbial approaches as green methods for the synthesis of nanomaterials: synthesis, applications, and future perspectives. *Molecules*, 28, 463. <https://doi.org/10.3390/molecules28010463>.
- Amrillah, T., Abdullah, C. A. C., Hermawan, A., Sari, F. N. I., ve Alviani, V. N. (2022). Towards greener and more sustainable synthesis of mxenes: a review. *Nanomaterials*, 12, 4280. <https://doi.org/10.3390/nano12234280>.
- Anvarinezhad, M., Javadi, A., ve Jafarizadeh-Malmiri, H. (2020). Green approach in fabrication of photocatalytic, antimicrobial, and antioxidant zinc oxide nanoparticles – hydrothermal synthesis using clove hydroalcoholic extract and optimization of the process. *Green Processing and Synthesis*, 9(1), 375–385. doi:10.1515/gps-2020-0040.
- Aspillaga, L., Jan Bautista, D., Daluz, S. N., Hernandez, K., Renta, J. A., ve Lopez, E. C. R. (2023). Nucleation and crystal growth: recent advances and future trends. *Engineering Proceedings*, 56, 22. <https://doi.org/10.3390/ASEC2023-15281>.
- Ateş, H., ve Bahçeci, E. (2015). Nano malzemeler için üretim yöntemleri. *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi Part C: Tasarım ve Teknoloji*, 3(2), 483–499.
- Awad, M. A., Hendi, A. A., Ortashi, K. M. O., Alnamlah, R. A., Alangery, A., Ali Alshaya, E., ve Alshammari, S. G. (2024). Utilizing cymbopogon proximus grass extract for green synthesis of zinc oxide nanorod needles in dye degradation studies. *Molecules*, 29, 355. <https://doi.org/10.3390/molecules29020355>.
- Bahari, N., Hashim, N., Abdan, K., Akim, A. M., Maringgal, B., ve Al-Shdifat, L. (2025). Green-synthesised silver and zinc oxide nanoparticles from stingless bee honey: Morphological characterisation, antimicrobial action, and cytotoxic assessment. *Chemosphere*, 370, 143961.
- Balouiri, M., Sadiki, M., ve Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.

- Barakat, M. A., Anjum, M., Kumar, R., Alafif, Z. O., Oves, M., ve Ansari, M. O. (2020). Design of ternary Ni(OH)₂/graphene oxide/TiO₂ nanocomposite for enhanced photocatalytic degradation of organic, microbial contaminants, and aerobic digestion of dairy wastewater. *Journal of Cleaner Production*, 258, 120588. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120588>.
- Bee, S. L., ve Abdul, H. Z. A. (2020). Hydroxyapatite derived from food industry bio-wastes: Syntheses, properties and its potential multifunctional applications. *Ceramics International*, 46, 17149–17175. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.04.103>.
- Beitollahi, H., Tajik, S., Nejad, F. G., ve Safaei, M. (2020). Recent advances in ZnO nanostructure-based electrochemical sensors and biosensors. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(27), 5826-5844., ISO 690.
- Bekirogullari, M. (2024). Synthesis of waste eggshell-derived Au/Co/Zn/eggshell nanocomposites for efficient hydrogen production from NaBH₄ methanolysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 52, 1380-1389.
- Benko, A., Duch, J., Gajewska, M., Marzec, M., Bernasik, A., Nocuń, M., ve Kotarba, A. (2021). Covalently bonded surface functional groups on carbon nanotubes: from molecular modeling to practical applications. *Nanoscale*, 13(22), 10152–10166. <https://doi.org/10.1039/d0nr09057c>.
- Bhagavatheswaran, E., S., Das, A., Rastin, H., Saeidi, H., Jafari, S., H., Vahabi, H., ve Saeb, M., R. (2019). The taste of waste: the edge of eggshell over calcium carbonate in acrylonitrile butadiene rubber. *Journal of Polymers and the Environment*, 27(11), 2478–2489. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01530-y>.
- Bhushan, B. (2021). *Springer handbook of nanotechnology*. Columbus: Springer.
- Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C., ve E. Meyer. (1986). Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Physical Review Letters*, 56(9), 930-933.
- Binnig, G., Rohrer, H., ve Gerber, C. (1982). Tunneling through a controllable vacuum gap. *Journal of Applied Physics*, 53(1), 29-37.
- Carofoglio, M., Barui, S., Cauda, V., ve Laurenti, M. (2020). Doped zinc oxide nanoparticles: synthesis, characterization and potential use in nanomedicine. *Applied Sciences*, 10, 5194.
- Chen, X., Li, X., He, Z., Hou, Z., Xu, G., Yang, N., ve Zheng, J. (2019). Comparative study of eggshell antibacterial effectivity in precocial and altricial birds using *Escherichia coli*. *Plos One*, 14(7), e0220054.
- Chen J., Kuichang, Z., Yilin, L., Huang, X., Jiahui, H., Yang, Y., Wang, W., Chen, L., Jain, A., Verduzco, R., Li, X., ve Li, O. (2022). Eggshell membrane derived nitrogen rich porous carbon for selective electrosorption of nitrate from water. *Water Research*, 216, 118351. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.118351>.

- Choudhary, R., Venkatraman, S. K., Bulygina, I., Senatov, F., Kaloshkin, S., Anisimova, N., Kiselevskiy, M., Knyaeva, M., Kukui, D., ve Swamiappan, S. (2021). Biom mineralization, dissolution and cellular studies of silicate bioceramics prepared from eggshell and rice husk. *Materials Science and Engineering*, 118, 111456. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111456>.
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., ve Beachey, E. H. (1985). Adherence of coagulase-negative *Staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(6), 996-1006. <https://doi.org/10.1128/jcm.22.6.996-1006.1985>.
- Chutrakulwong, F., Thamaphat, K., ve Intarasawang, M. (2024). Investigating UV-irradiation parameters in the green synthesis of silver nanoparticles from water *Hyacinth* leaf extract: optimization for future sensor applications. *Nanomaterials*, 14, 1018. <https://doi.org/10.3390/nano14121018>.
- Correa, M. G., Martínez, F. B., Vidal, C. P., Streitt, C., Escrig, J., ve de Dicastillo, C. L. (2020). Antimicrobial metal-based nanoparticles: A review on their synthesis, types and antimicrobial action. *Beilstein journal of nanotechnology*, 11(1), 1450-1469.
- Dobrovolskaia, M. A., Clogston, J. D., Neun, B. W., Hall, J. B., Patri, A. K., ve McNeil, S. E. (2008). Method for analysis of nanoparticle hemolytic properties in vitro. *Nano Letters*, 8(8), 2180–2187. <https://doi.org/10.1021/nl0805615>.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881-890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>.
- Drexler, K. E. (1986). *Engines of creation: the coming era of nanotechnology*. Anchor Books.
- Dubadi, R., Huang, S. D., ve Jaroniec, M. (2023). Mechanochemical synthesis of nanoparticles for potential antimicrobial applications. *Materials*, 16(4), 1460.
- Egerton, R. F. (2011). *Physical principles of electron microscopy: an introduction to TEM, SEM, and AEM*. New York: Springer.
- Ejidike, I. P., Ogunleye, O., Bamigboye, M. O., Ejidike, O. M., Ata, A., Eze, M. O., Clayton, H. S., Nwankwo, V. U., ve Fatokun, J. O. (2024). Role of nanotechnology in medicine: Opportunities and challenges. In *Nanomedicine: Advances and challenges*. New York: Springer.
- Elabbasy, M. T., El Bayomi, R. M., Abdelkarim, E. A., Hafez, A. E. S. E., Othman, M. S., Ghoniem, M. E., ve Hussein, M. A. (2025). Harnessing stevia rebaudiana for zinc oxide nanoparticle green synthesis: a sustainable solution to combat multidrug-resistant bacterial pathogens. *Nanomaterials*, 15(5), 369.

- Elliott, J. A., Shibuta, Y., Amara, H., Bichara, C., ve Neyts, E. C. (2013). Atomistic modelling of CVD synthesis of carbon nanotubes and graphene. *Nanoscale*, 5(15), 6662. <https://doi.org/10.1039/c3nr01925j>.
- Fariq, A., Khan, T., ve Yasmin, A. (2017). Microbial synthesis of nanoparticles and their potential applications in biomedicine. *Journal of Applied Biomedicine*, 15(4), 241–248. doi:10.1016/j.jab.2017.03.004.
- Feynman, R. P. (1960). There's plenty of room at the bottom: an invitation to enter a new field of physics. *Proceedings of the American Physical Society*, 6(1), 14-16.
- Fotakis, G., ve Timbrell, J. A. (2020). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT, and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160(2), 171-177. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.07.001>.
- Greene, D. G., Modla, S., Wagner, N. J., Sandler, S. I., ve Lenhoff, A. M. (2015). Local crystalline structure in an amorphous protein dense phase. *Biophysical journal*, 109(8), 1716-1723.
- Giannini, C., Ladisa, M., Altamura, D., Siliqi, D., Sibillano, T., ve De Caro, L. (2016). X-ray diffraction: a powerful technique for the multiple-length-scale structural analysis of nanomaterials. *Crystals*, 6(8), 87. <https://doi.org/10.3390/cryst6080087>.
- Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Michael, J. R., Ritchie, N. W., Scott, J. H. J., ve Joy, D. C. (2017). *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. New York: Springer.
- Gomes, T., Caponio, F., ve Alloggio, V., (1999). Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques. *Food Chemistry*, 64, 203-209. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00146-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00146-0).
- Gupta, P. K., Palanisamy, S., Gopal, T., Rajamani, R., Pandit, S., Sinha, S., ve Thakur, V. K. (2021). Synthesis and characterization of novel Fe₃O₄/PVA/eggshell hybrid nanocomposite for photodegradation and antibacterial activity. *Journal of Composites Science*, 5(10), 267.
- Guzzinati, G., Altantzis, T., Batuk, M., De Backer, A., Lumbeeck, G., Samaee, V., ve Bals, S. (2018). Recent advances in transmission electron microscopy for materials science at the EMAT Lab of the University of Antwerp. *Materials*, 11(8), 1304. <https://doi.org/10.3390/ma11081304>.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., ve Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 95-108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>.

- Harish, V., Ansari, M. M., Tewari, D., Gaur, M., Yadav, A. B., García-Betancourt, M. L., ve Barhoum, A. (2022). Nanoparticle and nanostructure synthesis and controlled growth methods. *Nanomaterials*, 12(18), 3226. <https://doi.org/10.3390/nano12183226>.
- Harlow, G. S., Lundgren, E., ve Escudero-Escribano, M. (2020). Recent advances in surface x-ray diffraction and the potential for determining structure-sensitivity relations in single-crystal electrocatalysis. *Current Opinion in Electrochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2020.08.005>.
- Hassan, N. M. (2015). Chicken eggshell powder as dietary calcium source in biscuits. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 10(2), 199-206.
- He, X., Yang, D., P., Zhang, X., Liu, M., Kang, Z., Lin, C., ve Luque, R. (2019). Waste Eggshell membrane-templated CuO-ZnO nanocomposites with enhanced adsorption, catalysis and antibacterial properties for water purification. *Chemical Engineering Journal*, 369, 621-633. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.03.047>.
- Honarmand, M., Mirzadeh, M., ve Honarmand, M. (2020). Green synthesis of SnO₂-ZnO-eggshell nanocomposites and study of their application in removal of mercury (II) ions from aqueous solution. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. <https://doi.org/10.1007/s40201-020-00576-8>.
- Hoseinpour, V., Souri, M., Ghaemi, N., ve Shakeri, A. (2017). Optimization of green synthesis of ZnO nanoparticles by *Dittrichia graveolens* (L.) aqueous extract. Health Biotechnol. *Biopharma*, 1(2), 39-49.
- Huang, T. C. (2009). Powder diffraction: theory and practice—a new and comprehensive book on the methods and applications of powder diffraction. *Powder Diffraction*, 24(1), 2-3.
- Huang, Y., Ji, Y., Kang, Z., Li, F., Ge, S., Yang, D.-P., Ruan, J., ve Fan, X. (2020a). Integrating eggshell-derived CaCO₃/MgO nanocomposites and chitosan into a biomimetic scaffold for bone regeneration. *Chemical Engineering Journal*, 395, 125098. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125098>.
- Huang, X., Chang, L., Lu, Y., Li, Z., Kang, Z., Zhang, X., ve Yang, D. P. (2020b). Plant-mediated synthesis of dual-functional Eggshell/Ag nanocomposites towards catalysis and antibacterial applications. *Materials Science and Engineering: C*, 111015.
- Huston, M., DeBella, M., DiBella, M., ve Gupta, A. (2022). Green synthesis of nanomaterials. *Nanomaterials*, 11, 2130. <https://doi.org/10.3390/nano11082130>.
- Ibrahim, A., Klopocinska, A., Horvat, K., ve Abdel Hamid, Z. (2021). Graphene-based nanocomposites: Synthesis, mechanical properties, and characterizations. *Polymers*, 13(17), 2869. <https://doi.org/10.3390/polym13172869>.
- Iravani, S. ve Varma, R. S. (2020). Green synthesis, biomedical and biotechnological applications of nanomaterials. *Green Chemistry*, 22(8), 2635–2651.

- Jin, S. E., Jin, J. E., Hwang, W., ve Hong, S. W. (2019). Photocatalytic antibacterial application of zinc oxide nanoparticles and self-assembled networks under dual UV irradiation for enhanced disinfection. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 1737–1751. <https://doi.org/10.2147/ijn.s192277>.
- Jose, B. J. A., Shinde, M. D., ve Bhavsar, A. (2024). Eco-friendly synthesis of zinc oxide nanostructures from chicken eggshell: exploring electrical and colloidal properties. *Journal Of Technical Education*, 24.
- Kadiyala, U., Kotov, N. A., ve VanEpps, J. S. (2018). Antibacterial metal oxide nanoparticles: challenges in interpreting the literature. *Current Opinion in Biotechnology*, 46, 128-135. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.12.010>.
- Kadeřábková, N., Mahmood, A. J. S., ve Mavridou, D. A. I. (2024). Antibiotic susceptibility testing using minimum inhibitory concentration (MIC) assays. *npj Antimicrobials and Resistance*, 2(1) 37. <https://doi.org/10.1038/s44259-024-00051-6>
- Kalpana, V. N., Kataru, B. A. S., Sravani, N., Vigneshwari, T., Panneerselvam, A., ve Devi Rajeswari, V. (2018). Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using culture filtrates of *Aspergillus niger* : Antimicrobial textiles and dye degradation studies. *OpenNano*, 3, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.onano.2018.06.00>.
- Kalra, K., Chhabra, V., ve Prasad, N. (2022). Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles: A mini review. *Journal of Physics: Conference Series*, 2267, 012049. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/2267/1/012049>.
- Kamaraj, C., Naveenkumar, S., Kumar, R. C. S., Al-Ghanim, K. A., Natesan, K., ve Priyadharsan, A. (2025). Ice apple fruit peel assisted bio-synthesis of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs): An anticancer, antimicrobial, and larvicidal applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 105, 106585.
- Kamath, A. K., Nasim, I., Muralidharan, N. P., ve Kothuri, R. N. (2022). Anti-microbial efficacy of *Vanilla planifolia* leaf extract against common oral micro-biomes: A comparative study of two different antibiotic sensitivity tests. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 26(3), 330-334.
- Kiselev, K. V., Dubrovina, A. S., Veselova, M. V., Bulgakov, V. P., Fedoreyev, S. A., ve Zhuravlev, Y. N. (2007). The rol-B gene-induced over production of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells. *Journal of Biotechnology*, 128, 681-692.
- Kumar, G. S., Muthu, D., Karunakaran, G., Karthi, S., Girija, E. K., ve Kuznetsov, D. (2018). *Curcuma longa* tuber extract mediated synthesis of hydroxyapatite nanorods using biowaste as a calcium source for the treatment of bone infections. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 86(3), 610–616. <https://doi.org/10.1007/s10971-018-4670-6>.
- Labadie, O. W., Picman, J., ve Hincke, M. T. (2008). Antimicrobial activity of the Anseriform outer eggshell and cuticle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 149(4), 640–649.

- Lashkarizadeh, F. (2021). Green synthesis of ZnO/eggshell nanocomposite using *ferulago macrocarpa* extract and its photocatalytic and antimicrobial activity in water disinfection. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*, 53(10), 1191–1202. <https://doi.org/10.1080/24701556.2021.1983837>
- Ledniczky, G., Tajti, F., Marokházi, S., ve Weltsch, Z. (2024). Effects of reprocessing on surface oxidation and microstructural composition in metal injection-molded materials: insights from SEM, EDX, and metallographic analysis. *Engineering Proceedings*, 79(1), 9. <https://doi.org/10.3390/engproc2024079009>.
- Li, X., Cai, Z., Ahn, D. U., ve Huang, X. (2019). Development of an antibacterial nanobiomaterial for wound-care based on the absorption of AgNPs on the eggshell membrane. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 183, 110449.
- Long, M., Zhang, Y., Huang, P., Chang, S., Hu, Y., Yang, Q., Mao, L. ve Yang, H. (2017). Emerging nanoclay composite for effective hemostasis. *Advanced Functional Materials*, 28(10), 1-9.
- Lyngdoh, M. E., Chettri, J., Kharchandy, V. F., Sheel, R., Choudhury, A. R., Sarkar, B., ve Kadirvel, G. (2024). Synthesis of green zinc-oxide nanoparticles and its dose-dependent beneficial effect on spermatozoa during preservation: sperm functional integrity, fertility and antimicrobial activity. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 12, 1326143.
- Mageswari, K., Bavani, T., Madhavan, J., ve Prabukanthan, P. (2025). Enhancement of photocatalytic and antimicrobial properties of SHMP-capped with Ni and Gd-doped zinc oxide nanoparticles. *Hybrid Advances*, 8, 100377.
- Maisa, W., ve Awwad, A. M. (2021). A novel route for the synthesis of copper oxide nanoparticles using *Bougainvillea* plant flowers extract and antifungal activity evaluation. *Chemistry International*, 7(1), 71–78. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4042902>.
- Mansilla, T., A., C., E. ve Mejía, D. (2017). Influence of separation techniques with acid solutions on the composition of eggshell membrane. *International Journal of Poultry Science*, 16(11), 451-456. <https://doi.org/10.3923/ijps.2017.451.456>.
- Martel, R. M., Du, J., ve Hincke, M. T. (2012). Proteomic analysis provides new insight into the chicken eggshell cuticle. *Journal Proteomics*, 75, 2697–2706. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.019>.
- Mehar, S., Khoso, S., Anam, I., Naheed, N., Saeed, F., Khan, N., ve Abbasi, B. H. (2022). Green synthesis of zno nanoparticles from *Foeniculum vulgare*, its characterization and biological potential against bacteria. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 32(1), 229-237.
- Mensah, R. A., Jo, S. B., Kim, H., Park, S. M., Patel, K. D., Cho, K. J., ve Chau, D. Y. (2021). The eggshell membrane: a potential biomaterial for corneal wound healing. *Journal of biomaterials applications*, 36(5), 912-929.

- Mohd Yusof, H., Mohamad, R., Zaidan, U. H., ve Abdul Rahman, N. A. (2019). Microbial synthesis of zinc oxide nanoparticles and their potential application as an antimicrobial agent and a feed supplement in animal industry: a review. *Journal of animal science and biotechnology*, 10, 1-22.
- Mosmann, T. (2019). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(19\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(19)90303-4).
- Mourdikoudis, S., Pallares, R. M., ve Thanh, N. T. K. (2018). Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale*, 10(27), 12871–12934. <https://doi.org/10.1039/c8nr02278j>.
- Muthu, K., ve Priya, S. (2017). Green synthesis, characterization and catalytic activity of silver nanoparticles using *Cassia auriculata* flower extract separated fraction. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 179, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.02.024>.
- Mutukwa, D., Taziwa, R., ve Khotseng, L. E. (2022). A review of the green synthesis of ZnO nanoparticles utilising Southern African indigenous medicinal plants. *Nanomaterials*, 12(19), 3456.
- Naser, H., Alghoul, M. A., Hossain, M. K., Asim, N., Abdullah, M. F., Ali, M. S., ve Amin, N. (2019). The role of laser ablation technique parameters in synthesis of nanoparticles from different target types. *Journal of Nanoparticle Research*, 21(11). <https://doi.org/10.1007/s11051-019-4690-3>.
- Nasrollahzadeh, M., Sajadi, S. M., ve Hatamifard, A. (2016). Waste chicken eggshell as a natural valuable resource and environmentally benign support for biosynthesis of catalytically active Cu/eggshell, Fe₃O₄/eggshell and Cu/Fe₃O₄/eggshell nanocomposites. *Applied Catalysis B: Environmental*, 191, 209–227. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2016.02.042>.
- Ogunyemi, S. O., Abdallah, Y., Zhang, M., Fouad, H., Hong, X., Ibrahim, E., Masum, M., M., I., Hossain, A., Mo, J., Li, B. (2019). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using different plant extracts and their antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 341–352.
- Ohshima, Y., Takada, D., Namai, S., Sawai, J., Kikuchi, M., ve Hotta, M. (2015). Antimicrobial characteristics of heated eggshell powder. *Biocontrol Science*, 20(4), 239–246. <https://doi.org/10.4265/bio.20.239>.
- Owuamanam, S., ve Cree, D. (2020). Progress of bio-calcium carbonate waste eggshell and seashell fillers in polymer composites: a Review. *Journal of Composites Science*, 4(2), 70. <https://doi.org/10.3390/jcs4020070>.
- Park, T. J., Lee, K. G., ve Lee, S. Y. (2015). Advances in microbial biosynthesis of metal nanoparticles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(2), 521–534. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6904-7>.

- Parsek, M. R., ve Singh, P. K. (2003). Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual Review of Microbiology*, 57, 677-701. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090720>.
- Parvin, S., Biswas, B., K., Rahman, M., A., Rahman, M., H., Anik, M., S. ve Uddin, M., R. (2019). Study on adsorption of congo red onto chemically modified eggshell membrane, *Chemosphre*, 236, 124326. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.07.057>.
- Patel, J. B., Tenover, F. C., Turnidge, J. D., ve Jorgensen, J. H. (2011). Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods. *Manual of clinical microbiology*, 1122-1143.
- Patil, B. N., ve Taranath, T. C. (2016). Limonia acidissima L. leaf mediated synthesis of zinc oxide nanoparticles: A potent tool against *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Mycobacteriology*, 5(2), 197–204.
- Pham, X. N., Nguyen, H. T., ve Pham, N. T. (2020). Green synthesis and antibacterial activity of HAp@ Ag nanocomposite using *Centella asiatica* (L.) urban extract and eggshell. *International journal of biomaterials*, 1, 8841221.
- Pownraj, C., ve Valan Arasu, A. (2021). Effect of dispersing single and hybrid nanoparticles on tribological, thermo-physical, and stability characteristics of lubricants: a review. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 143(2), 1773-1809.
- Qi, K., Cheng, B., Yu, J., ve Ho, W. (2017). Review on the improvement of the photocatalytic and antibacterial activities of ZnO. *Journal of Alloys and Compounds*, 727, 792–820. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2017.08.142>
- Qian, C., Yin, J., Zhao, J., Li, X., Wang, S., Bai, Z., ve Jiao, T. (2020). Facile preparation and highly efficient photodegradation performances of self-assembled Artemia eggshell-ZnO nanocomposites for wastewater treatment. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 125752. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.12>.
- Rades, S., Hodoroaba, V.-D., Salge, T., Wirth, T., Lobera, M. P., Labrador, R. H., ve Unger, W. E. S. (2014). High-resolution imaging with SEM/T-SEM, EDX and SAM as a combined methodical approach for morphological and elemental analyses of single engineered nanoparticles. *Royal Society of Chemistry Advances*, 4(91), 49577–49587. <https://doi.org/10.1039/c4ra05092d>.
- Rai, M., Yadav, A., ve Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27(1), 76-83.
- Ramesh, M., Anbuvaran, M., ve Viruthagiri, G. (2015). Green synthesis of ZnO nanoparticles using *Solanum nigrum* leaf extract and their antibacterial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136, 864–870. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.09.105>.

- Rasmussen, J. W., Martinez, E., Louka, P., ve Wingett, D. G. (2010). Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7(9), 1063–1077. <https://doi.org/10.1517/17425247.2010.502560>
- Ray, P. G., Pal, P., Srivas, P. K., Basak, P., Roy, S., ve Dhara, S. (2018). Surface modification of eggshell membrane with electrospun chitosan/ polycaprolactone nanofibers for enhanced dermal wound healing. *American Chemical Society Applied BioMaterials*, 1(4), 985-998.
- Reller, L. B., Weinstein, M., Jorgensen, J. H., ve Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49(11), 1749-1755. <https://doi.org/10.1086/647952>.
- Roco, M. C., Bainbridge, W. S. ve Hersam, J. D. (2011). *Nanotechnology Research Directions for Societal Needs in 2020: Retrospective and Outlook*. New York: Springer.
- Ruhaimi, A., H., ve Aziz, M., A. (2021). High-performance flake-like mesoporous magnesium oxide prepared by eggshell membrane template for carbon dioxide capture. *Journal of Solid State Chemistry*, 300, 122242. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2021.122242>.
- Sadighara, P., Gharibi, S., Jafari, A. M., Khaniki, G. J., ve Salari, S. (2012). The antioxidant and flavonoids contents of *Althaea officinalis* L. flowers based on their color. *Avicenna Journal of Phytomedicine Received*, 2(3), 113-117.
- Sah, M. K., ve Rath, S. N. (2016). Soluble Eggshell Membrane: A natural protein to improve the properties of biomaterials used for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*, 67, 807–821.
- Saleh, H. M., ve Hassan, A. I. (2023). Synthesis and characterization of nanomaterials for application in cost-effective electrochemical devices. *Sustainability*, 15, 10891. <https://doi.org/10.3390/su151410891>.
- Sajadi, S. M., Kolo, K., Abdullah, S. M., Hamad, S. M., Khalid, H. S., ve Yassein, A. T. (2018). Green synthesis of highly recyclable CuO/eggshell nanocomposite to efficient removal of aromatic containing compounds and reduction of 4-nitrophenol at room temperature. *Surfaces and Interfaces*, 13, 205-215.
- Sarıbuğra, S. (2014). *Manyetik Nanopartiküllerin Analitik İncelenmesi. (Doktora tezi)* İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Selvam S. P. S., Chinnadurai, G. S., Ganesan, D., Perumal, P., ve Kandan, V. (2020). Cadmium oxide-zinc oxide nanocomposites synthesized using waste eggshell membrane and its in-vitro assessments of the antimicrobial activities and minimum inhibitory concentration. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*. <https://doi.org/10.1007/s10904-020-01688-2>.

- Sewid, A. H., Sharaf, M., El-Demerdash, A. S., Ragab, S. M., Al-Otibi, F. O., Taha Yassin, M., ve Liu, C. G. (2025). Hexagonal zinc oxide nanoparticles: a novel approach to combat multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* biofilms in feline urinary tract infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *14*, 1505469.
- Shah, S., T., A., Yehya, W., Saad, O., Simarani, K., Chowdhury, Z., A., Alhadi, A., ve Al-Ani, L. (2017). Surface functionalization of iron oxide nanoparticles with gallic acid as potential antioxidant and antimicrobial agents. *Nanomaterials*, *7*(10), 306. <https://doi.org/10.3390/nano7100306>.
- Shang, B., Wang, S., Lu, L., Ma, H., Liu, A., Zupanic, A., Jiang, L., Elnawawy, A. S., ve Yu, Y. 2022. Poultry eggshell-derived antimicrobial materials: Current status and future perspectives. *Journal of Environmental Management*. *314*, 115096.
- Sharma, D., Kanchi, S. ve Bisetty, K. (2019). Biogenic synthesis of nanoparticles: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, *12*(8), 3576–3600.
- Smith, B. C. (2011). *Infrared spectral interpretation: a systematic approach*. Baco Raton: Chemical Rubber Company Press.
- Snafi A., E. (2013). The pharmaceutical importance of *Althaea officinalis* and *Althaea rosea*: a review. *International Journal of PharmTech Research*, *5*, 1378–1385.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., ve Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter plate test for quantification of *Staphylococcal* biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, *40*(2), 175-179. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6).
- Stepanović, S., Antić, N., Dakić, I., ve Švabić-Vlahović, M. (2007a). In vitro biofilm formation by *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* on plastic surfaces. *Letters in Applied Microbiology*, *43*(6), 650-654. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02014.x>.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukić, S., Ćirković, I., ve Ruzicka, F. (2007b). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. *Apmis*, *115*(8), 891-899.
- Stewart, P. S., ve Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, *358*(9276), 135-138. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05321-1).
- Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W., ve Villanueva, Á. (2021). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, *114*(8), 785-796. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.01.006>.

- Sun, Q., Li, J., ve Le, T. (2018). Zinc oxide nanoparticle as a novel class of antifungal agents: current advances and future perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03210>.
- Suvaitha, S. P., Sridhar, P., Divya, T., Palani, P., ve Venkatachalam, K. (2022). Bio-waste eggshell membrane assisted synthesis of NiO/ZnO nanocomposite and its characterization: Evaluation of antibacterial and antifungal activity. *Inorganica Chimica Acta*, 536, 120892.
- Suwan, T., Khongkhunthian, S., Sirithunyalug, J., Okonogi, S. (2018). Effect of rice variety and reaction parameters on synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles. *Drug Discoveries and Therapeutics*, 12(5), 267–274.
- Swilam, N., ve Nematallah, K. A. (2020). Polyphenols profile of pomegranate leaves and their role in green synthesis of silver nanoparticles. *Scientific Reports*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71847-5>.
- Şensoy Gün, B., Tunalı, B., ve Gurbanov, R. (2024). Yeşil sentez yöntemi ile *althaea officinalis* bitkisi kullanılarak elde edilen nanokompozitlerin karakterizasyonu ve hemolitik aktivitelerinin değerlendirilmesi. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 15(1), 22-32. <https://doi.org/10.29048/makufebed.1402681>. 66.
- Tang, Z. X., ve Lv, B. F. (2014). MgO nanoparticles as antibacterial agents: preparation and activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(4), 1917–1925. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20140313s00002813>
- Thatyana, M., Dube, N. P., Kemboi, D., Manicum, A. L. E., Mokgalaka-Fleischmann, N. S., ve Tembu, J. V. (2023). Advances in phytonanotechnology: a plant-mediated green synthesis of metal nanoparticles using *Phyllanthus* plant extracts and their antimicrobial and anticancer applications. *Nanomaterials*, 13(19), 2616. <https://doi.org/10.3390/nano13192616>.
- Tsakiridou, M., Tsagkalias, I., Papi, R. M., ve Achilias, D. S. (2024). Synthesis of Novel Nanocomposite materials with enhanced antimicrobial activity based on Poly (Ethylene Glycol Methacrylate) s with Ag, TiO₂ or ZnO nanoparticles. *Nanomaterials*, 14(3), 291. <https://doi.org/10.3390/nano14030291>.
- Van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L., ve Cloos, J. (2022). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods in Molecular Biology*, 731, 237-245. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20.
- Verma, P. R., Khan, F., ve Banerjee, S. (2020). *Salvadora persica* root extract-mediated fabrication of ZnO nanoparticles and characterization. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*, 1–7.
- Verma, P., Sao, P., Anitha, N., Rajmohan, K. S., Swamy, N. K., ve Kumar, N. P. (2025). *Duranta erecta* leaf Extract-Mediated green synthesis of zinc oxide nanoparticles with antimicrobial applications. *Inorganic Chemistry Communications*, 173, 113885.

- Vuong, T. T., Ronning, S. B., Ahmed, T. A. E., Brathagen, K., Host, V., Hincke, M. T., Suso, H. P., ve Pedersen, M. E. (2018). Processed eggshell membrane powder regulates cellular functions and increase MMP-activity important in early wound healing processes. *Plos One*, *13*(8), e0201975.
- Wang, Y., Liu, J., Wang, T., Liu, L.-Z., Tian, C., Cui, Y., Shao, W., Hua, X., Shi, Y., ve Wang, Y. (2023). Antibacterial properties and mechanism of nanometer zinc oxide composites. *Food Packaging and Shelf Life*, *40*, 101167.
- Webb, B. C. W., Rafferty, S., ve Vreugdenhil, A. J. (2022). Preparation and characterization of antibacterial films with eggshell-membrane biopolymers incorporated with chitosan and plant extracts. *Polymers*, *14*, 383.
- Wellman-Labadie, O., Picman, J., ve Hincke, M. T. (2008). Antimicrobial activity of the *Anseriform* outer eggshell and cuticle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *149*(4), 640–649. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.01.001>.
- Wiegand, I., Hilpert, K., ve Hancock, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, *3*(2), 163-175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>.
- Williams, D. B., ve Carter, C. B. (2009). *Transmission electron microscopy: A textbook for materials science (2nd ed.)*. California: Springer.
- Xu, Y. J., Dong, L., Lu, Y., Zhang, L. C., An, D., Gao, H. L., ve Yu, S. H. (2016). Magnetic hydroxyapatite nanoworms for magnetic resonance diagnosis of acute hepatic injury. *Nanoscale*, *8*(3), 1684–1690. <https://doi.org/10.1039/c5nr07023f>.
- Yang, H., Zhu, M. ve Li, Y. (2020). Sol–gel research in China: a brief history and recent research trends in synthesis of sol–gel derived materials and their applications. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, *106*, 406–42. <https://doi.org/10.1007/s10971-022-05750-y>
- Yuan, D., Liang, X., Kong, B., Sun, F., Li, X., Cao, C., ve Liu, Q. (2023). In-depth insight into the mechanism of incorporation of *Abelmoschus manihot* gum on the enhancement of gel properties and in vitro digestibility of frankfurters. *Foods*, *12*(7), 1507. <https://doi.org/10.3390/foods12071507>.
- Zahran, M., ve Marei, A. H. (2019). Innovative natural polymer metal nanocomposites and their antimicrobial activity. *International Journal of Biological Macro*.
- Zambonino, M. C., Quizhpe, E. M., Jaramillo, F. E., Rahman, A., Santiago Vispo, N., Jeffryes, C., ve Dahoumane, S. A. (2021). Green synthesis of selenium and tellurium nanoparticles: current trends, biological properties and biomedical applications. *International journal of molecular sciences*, *22*(3), 989.

- Zhang, Y., Ram, M. K., Stefanakos, E. K., ve Goswami, D. Y. (2012). Synthesis, characterization, and applications of ZnO nanowires. *Journal of Nanomaterials*, 624520. <https://doi.org/10.1155/2012/624520>.
- Zhang, X. F., Liu, Z. G., Shen, W., ve Gurunathan, S. (2016). Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1534. <https://doi.org/10.3390/ijms17091534>.
- Zhang, X., He, X., Kang, Z., Cui, M., Yang, D. P., ve Luque, R. (2019). Waste eggshell-derived dual-functional CuO/ZnO/eggshell nanocomposites: (Photo) catalytic reduction and bacterial inactivation. *American Chemical Society sustainable chemistry & Engineering*, 7(18), 15762-15771.
- Zheng, A., Yin, K., Pan, R., Zhu, M., Xiong, Y., ve Sun, L. (2023). Research progress on metal–organic frameworks by advanced transmission electron microscopy. *Nanomaterials*, 13(11), 1742. <https://doi.org/10.3390/nano13111742>.
- Zhou, X. Q., Hayat, Z., Zhang, D. D., Li, M. Y., Hu, S., Wu, Q., ve Yuan, Y. (2023). Zinc oxide nanoparticles: synthesis, characterization, modification, and applications in food and agriculture. *Processes*, 11(4), 1193. <https://doi.org/10.3390/pr11041193>.
- Zuo, J. M., ve Spence, J. C. (2017). *Advanced transmission electron microscopy*. New York: Springer Science+ Busin