



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**BİYOJENİK SELENYUM
NANOPARÇACIK ÜRETİMİ,
KARAKTERİZASYONU ve *Chlorella* sp.
MİKROALGİNDE OKSİDATİF STRES
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

SENA KARDELEN DİNÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Figen Esin KAYHAN

EŞ-DANIŞMAN

Doç. Dr. Nalan Oya SAN KESKİN

İSTANBUL, 2021



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**BİYOJENİK SELENYUM
NANOPARÇACIK ÜRETİMİ,
KARAKTERİZASYONU ve *Chlorella* sp.
MİKROALGİNDE OKSİDATİF STRES
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

SENA KARDELEN DİNÇ
(520117023)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı
Biyoloji Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Figen Esin KAYHAN

EŞ-DANIŞMAN
Doç. Dr. Nalan Oya SAN KESKİN

İSTANBUL, 2021



MARMARA UNIVERSITY
INSTITUTE FOR GRADUATE
STUDIES



**SYNTHESIS OF BIOGENIC SELENIUM
NANOPARTICLE, CHARACTERIZATION
AND INVESTIGATION OF ITS EFFECTS ON
OXIDATIVE STRESS IN MICROALGAE**
Chlorella sp.

SENA KARDELEN DİNÇ

MASTER THESIS

Department of Biology
Biology Program

Thesis Supervisor

Prof. Dr. Figen Esin KAYHAN

Thesis CO- Supervisor

Assoc. Prof. Nalan Oya SAN KESKİN

ISTANBUL, 2021

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitim sürecim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak sadece akademik değil, hayata yönelik de dersler veren değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Figen Esin KAYHAN'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca eş danışmandan öte benim için bir mentor olan, kariyerimin şekillenmesinde çok büyük katkıları olan, her ihtiyacım olduğunda ve çalışmamın her aşamasında benimle olan, kısa zamanda çok şey öğrendiğim, beni öğrencisi olarak kabul ettiği için hep minnettar kalacağım kıymetli hocam Sayın Doç. Dr. Nalan Oya SAN KESKİN'e sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Çalışmada kullandığım mikroalgin temininde tereddütsüz yardım ederek katkı sağlayan Boğaziçi Üniversitesi öğretim üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Berat Z. HAZNEDAROĞLU'na çok teşekkür ederim.

Deneyisel çalışmalarında yardımcı olan başta Hacettepe Üniversitesi öğretim elemanı Öğr. Gör. Dr. Öznur AKBAL VURAL'a, ekip arkadaşlarım Bio. Sevgi ÖZACAR ve İmre TÜZÜN'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans sürecimin özellikle ilk yarısında; arkadaşlığını benden esirgemeyen, ablalık yapıp yanımda olan Uzman Bio. Şeyma TARTAR KIZILKAYA'ya, her fırsatta çok değerli tavsiyeler vererek abilik yapan Öğr. Gör. Ömer Faruk KARASAKAL'a, disiplini ile örnek olan Öğr. Gör. Harika Eylül ESMER DURUEL'e bana kattıkları için teşekkür ederim.

Hayatım boyunca aldığım her kararda beni destekleyen, yanımda ve destek olmaktan hiçbir zaman gocunmayan, sabırlarını esirgemeyen, beni özgür bir kadın olarak yetiştiren ve bu süreçte benimle birlikte koşup benimle yorulan başta sevgili babam Cengiz DİNÇ, sevgili annem Hülya DİNÇ ve sevgili kardeşim Ata Teoman DİNÇ'e en içten duygularımla teşekkür ederim.

Mayıs, 2021

Sena Kardelen Dinç

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
SEMBOLLER.....	viii
KISALTMALAR.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xv
TABLO LİSTESİ.....	xviii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Nanobiyoteknoloji	1
1.1.1. Tarihçesi	2
1.2. Nanomalzemeler	5
1.2.1. Sınıflandırılmaları.....	5
1.2.1.1. Boyutsal özelliklerine göre sınıflandırılmaları	6
1.2.1.2. Morfolojilerine göre sınıflandırılmaları	8
1.3. Nanoparçacıklar.....	10
1.3.1. Nanoparçacıkların sahip olduğu özellikler	10
1.3.2. Nanoparçacık sentez yöntemleri.....	12
1.3.2.1. Yukarıdan aşağıya (top down) yöntemi	13
1.3.2.2. Aşağıdan yukarıya (bottom up) yöntemi	14
1.3.3. Nanoparçacıkların sınıflandırılması	20
1.3.3.1. Karbon bazlı nanoparçacıklar	20

1.3.3.2. Organik nanoparçacıklar.....	22
1.4. Selenyum Nanoparçacıklar (SeNP)	24
1.5. Oksidatif Stres	25
1.6. Antioksidan Savunma Sistemleri	27
1.7. Mikroalglerde Oksidatif Stres	27
1.7.1. Mikroalglerde oksidatif stresin biyolojik göstergeleri.....	29
1.7.1.1. Lipit peroksidasyonu	29
1.7.1.2. Hidrojen peroksit	30
1.7.1.3. Klorofil içeriğinde değişiklik	31
1.7.1.4. Büyüme hızında düşüş.....	31
1.7.2. Oksidatif stres etmeni olarak UV – C ışınları.....	31
2. MATERYAL YÖNTEM.....	33
2.1. Materyal.....	33
2.1.1. Selenyum nanoparçacık sentezi için kullanılan mikroorganizma	33
2.1.2. Sentezlenen selenyum nanoparçacığın etkisinin araştırıldığı mikroorganizma	34
2.2. Yöntem	35
2.2.1. Selenyum nanoparçacıkların yeşil sentez yoluyla elde edilmesi.....	35
2.2.1.1. Selenyum nanoparçacık oluşumu için optimum koşulların belirlenmesi.....	35
2.2.1.2. Elde edilen selenyum nanoparçacıkların toz haline getirilmesi	38
2.2.1.3. Selenyum nanoparçacıkların karakterizasyonu	39
2.2.2. Sentezlenen selenyum nanoparçacığın <i>Chlorella vulgaris</i> mikroalginde oksidatif strese etkilerinin araştırılması.....	41
2.2.2.1. Ön hazırlık	41

2.2.2.2. Sentezlenen selenyum nanoparçacıkların <i>Chlorella vulgaris</i> mikroalgi üzerinde oksidatif strese etkisinin belirlenmesi.....	42
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	45
3.1. Selenyum Nanoparçacık Sentezi	45
3.1.1. Selenyum nanoparçacık oluşumunda optimum koşullarının belirlenmesi	45
3.1.1.1. Optimum pH değeri ve reaksiyon süresinin belirlenmesi	45
3.1.1.2. Optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi.....	51
3.1.1.3. Optimum çalkalama hızı (rpm) değerinin belirlenmesi.....	55
3.1.2. Selenyum nanoparçacıkların karakterizasyonu	61
3.1.2.1. Zeta potansiyelinin ölçülmesi.....	61
3.1.2.2. Zayıflatırılmış toplam yansıma - fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR FT-IR) analizi	63
3.1.2.3. Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ve enerji yayımlı X-ışını (EDX) analizi	66
3.1.2.4. Transmisyon elektron mikroskopisi (TEM)	68
3.1.2.5. Biyolojik selenyum nanoparçacıkların antibakteriyal aktivitesinin araştırılması....	70
3.2. Sentezlenen Selenyum Nanoparçacığın <i>Chlorella vulgaris</i> Mikroalginde Oksidatif Strese Etkilerinin Araştırılması	71
3.2.1. Ön hazırlık	71
3.2.1.1. Kullanılacak SeNP konsantrasyonunun belirlenmesi.....	71
3.2.1.2. UV-C maruziyet süresinin belirlenmesi	74
3.2.2. Sentezlenen selenyum nanoparçacıkların <i>Chlorella vulgaris</i> mikroalgi üzerinde oksidatif strese etkisi	75
3.2.2.1. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarının belirlenmesi.....	77
3.2.2.2. Malondialdehit (MDA) değerlerinin belirlenmesi.....	78

3.2.2.3. Optik yoğunluk (OD ₆₈₀) ve hücre dansitesinin belirlenmesi	79
3.2.2.4. Klorofil (a+b) miktarının belirlenmesi	84
4. SONUÇ	87
KAYNAKLAR.....	88
ÖZGEÇMİŞ	



ÖZET

BİYOJENİK SELENYUM NANOPARÇACIK ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU ve *Chlorella* sp. MİKROALGİNDE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Kimyasal ve fiziksel metotlar kullanılarak nanoparçacık sentezinin pahalı ve çevreye zarar veren kimyasalları içermeleri nedeniyle son yıllarda, çevre-dostu bir alternatif olarak biyolojik nanoparçacık sentez yöntemi kullanılmaya başlanmış ve hücrel metabolizmada önemli fonksiyonları olduğu için selenyum nanoparçacıklar diğer nanoparçacıklara göre ön plana çıkmıştır.

Bu çalışmada literatürde ilk defa, halofilik bir bakteri olan *Citricoccus* sp. bakterisi kullanılarak selenyum nanoparçacık sentezlenmiştir. Nanoparçacık sentezinde optimum koşullar pH 8, 24 saat sentez süresi, 37 °C sıcaklık ve 150 rpm çalkalamalı koşullar bulunmuştur. Sentezlenen biyojenik nanoparçacıkların karakterizasyon çalışması sonucunda sentezlenen nanoparçacıkların küre şeklinde ve ortalama $104,46 \pm 50,82$ nm boyuta ve $-20,43 \pm 0,41$ mV zeta potansiyeline sahip olduğu tespit edilmiştir. Karakterizasyon çalışması sonrasında, sentezlenen bu nanoparçacıklar ile model organizma *Chlorella vulgaris* üzerinde UV-C ışını uygulamasına bağlı olarak mikroalglerde oksidatif stresin biyolojik belirteçleri olan hidrojen peroksit (H_2O_2), malondialdehit (MDA), klorofil (a+b) ve büyüme parametrelerinde meydana gelen değişim incelenmiş ve selenyum nanoparçacığının bu değişiklikler üzerine etkileri araştırılmıştır. Selenyum nanoparçacık ve UV-C ışınının beraber uygulandığı deney gruplarında, sadece UV uygulanmış gruba kıyasla UV maruziyetini takip eden 1, 3 ve 7. günlerde hidrojen peroksit ve malondialdehit miktarında azalma, optik yoğunluk ve hücre dansitesinde artış görülürken klorofil (a+b) miktarında meydana gelen değişimler istatistiksel olarak benzer bulunmuştur. Sonuç olarak, sentezlenen selenyum nanoparçacığının oksidatif stresi azaltıcı etkisi gösterilmiştir.

Çalışma selenyum nanoparçacığının oksidatif stres parametreleri üzerinde etkili olduğunu, mikroalglerde verimin artırılması gerektiği çalışmalarda ve boyut özellikleri sayesinde de medikal uygulamalarda kullanım potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir.

ABSTRACT

SYNTHESIS OF BIOGENIC SELENIUM NANOPARTICLE, CHARACTERIZATION AND INVESTIGATION OF ITS EFFECTS ON OXIDATIVE STRESS IN MICROALGAE *Chlorella* sp.

Since nanoparticle synthesis via chemical and physical methods are expensive and includes hazardous chemicals, the biological synthesis has been used as an environmentally-friendly alternative recently and selenium nanoparticles have come to the forefront because they have important functions in cellular metabolism.

In this study, *Citricoccus* sp. was used in nanoparticle synthesis for first time and selenium nanoparticle synthesis was performed. Optimum synthesis conditions were found as pH 8, 24 hours, 37 ° C and 150 rpm. In characterization study, it was determined that the nanoparticles have a spherical shape, an average size of 104.46 ± 50.82 nm and a zeta potential of -20.43 ± 0.41 mV. Afterwards, it was investigated the effects of the nanoparticles on oxidative stress biomarkers, hydrogen peroxide, malondialdehyde, chlorophyll (a+b) and growth rate, subsequent to UV-C irradiation and effects of the nanoparticles on model organism *Chlorella vulgaris*. In the experimental group which nanoparticles and UV-C beam were applied together, the amount of hydrogen peroxide and malondialdehyde decreased on the 1st, 3rd and 7th days following UV exposure compared to the UV-applied group, while optical density and cell density increased, while the amount of chlorophyll (a + b) the changes were statistically similar. Consequently, it has been shown that the synthesized selenium nanoparticles reduces the oxidative stress effects.

The study suggests that these nanoparticles has an effect on oxidative stress parameters and it has the potential to be used in medical application through its size properties and the researches that need to increase the yield in microalgae.

SEMBOLLER

%	: Yüzde simgesi
Ag ⁰	: Elemental Gümüş
AgNO ₃	: Gümüş nitrat
Al	: Alüminyum
Al ₂ O ₃	: Alüminyum oksit
°C	: Celcius Derece
C	: Karbon
C ₆₀	: Fulleren
Cd	: Kadmiyum
CeO ₂	: Seryum oksit
cm	: Santimetre
Co	: Kobalt
Cu	: Bakır
Fe	: Demir
g	: Gram
H ₂ O	: Dihidrojen monooksit (su)
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HO ₂	: Hidroperoksil radikali
keV	: kiloelektronVolt
KI	: Potasyum iyodür
L	: Litre
m	: Metre

M	: Molar
μ	: Mikron
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
mM	: Millimolar
mV	: MiliVolt
Na₂SeO₃	: Sodyum selenit
NaCl	: Sodyum klorür
NaNO₃	: Sodyum nitrat
NaOH	: Sodyum hidroksit
Ni	: Nikel
nm	: Nanometre
NO	: Nitrit oksit
O₂	: Oksijen
O₂⁻	: Süperoksit radikali
OH	: Hidroksil radikali
ppm	: mg/L
\$	: Dolar para simgesi
Se	: Selenyum
W	: Watt
Xe	: Ksenon
Zn	: Çinko

ZnO

: Çinko oksit

ζ

: Zeta potansiyel



KISALTMALAR

0D	: Sıfır boyutlu
1D	: Bir boyutlu
2D	: İki boyutlu
3D	: Üç boyutlu
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AgNP	: Gümüş nanoparçacık
APX	: Askorbat peroksidaz
ATR FT – IR Kızılötesi Spektroskopisi	: Zayıflatılmış Toplam Yansıma – Fourier Dönüşümlü
<i>C. vulgaris</i> - 1 sa. UV	: <i>C. vulgaris</i> mikroalgine 1 saat UV ışını uygulaması yapılan deney grubu
<i>C. vulgaris</i> - 20 dk. UV	: <i>C. vulgaris</i> mikroalgine 20 dakika UV ışını uygulaması yapılan deney grubu
<i>C. vulgaris</i> - 3 sa. UV	: <i>C. vulgaris</i> mikroalgine 3 saat UV ışını uygulaması yapılan deney grubu
<i>C. vulgaris</i> - 6 sa. UV	: <i>C. vulgaris</i> mikroalgine 6 saat UV ışını uygulaması yapılan deney grubu
<i>C. vulgaris</i> - SeNP_{0,1 ppm}	: <i>C. vulgaris</i> mikroalgine 0,1 ppm selenyum nanoparçacık uygulaması yapılan deney grubu
<i>C. vulgaris</i> - SeNP_{10 ppm}	: <i>C. vulgaris</i> mikroalgine 10 ppm selenyum nanoparçacık uygulaması yapılan deney grubu
<i>C. vulgaris</i> - SeNP_{100 ppm}	: <i>C. vulgaris</i> mikroalgine 100 ppm selenyum nanoparçacık uygulaması yapılan deney grubu

***C. vulgaris* - UV - SeNP_{0,1} ppm:** *C. vulgaris* mikroalgine UV ışını uygulamasının ardından 0,1 ppm selenyum nanoparçacık takviyesi yapılan deney grubu

***C. vulgaris* - UV - SeNP₁₀ ppm:** *C. vulgaris* mikroalgine UV ışını uygulamasının ardından 10 ppm selenyum nanoparçacık takviyesi yapılan deney grubu

***C. vulgaris* - UV - SeNP₁₀₀ ppm:** *C. vulgaris* mikroalgine UV ışını uygulamasının ardından 100 ppm selenyum nanoparçacık takviyesi yapılan deney grubu

***C. vulgaris* – UV** : *C. vulgaris* mikroalgine UV ışını uygulanmış deney grubu

CAT : Katalaz

CNF : Karbon nanofiberler

CNT : Karbon nanotüp

CVD : Kimyasal Buharlaştırma

DLS : Dinamik Işık Saçılımı

DNA : Deoksiribonükleik asit

EC : Enzim kodu

EDX : Enerji Yayılımlı X – Işını Analizi

GO : Grafen oksit

GPx : Glutasyon peroksidaz

GQD : Grafen Kuantum Nokta

GR : Glutasyon redüktaz

GSH : Glutasyon

GSH-Px : Glutasyon peroksidaz

IBM : Uluslararası İş Makineleri Kurumu

IOP : Fizik Enstitüsü

MDA : Malondialdehit

MNP	: manyetik nanoparçacık
MÖ	: Milattan önce
MS	: Milattan sonra
NB	: Nutrient Broth
NP	: Nanoparçacık
OD₆₈₀	: 680 nm’de ölçülen optik yoğunluk
OGC	: Asal Gaz Ayrıştırma
Pmd hücrelere oranı	: Akış sitometrisi ile membran hasarlı hücrelerin toplam
QD	: Kuantum nokta
rGO	: İndirgenmiş grafen oksit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
rpm	: dakikadaki devir sayısı
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskopisi
SeNP	: Selenyum nanoparçacık
SOD	: Süperoksit dismutaz
SPR	: Plazmon rezonans rezonansı
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
TEM	: Transmisyon Elektron Mikroskopisi
Tris – HCl	: Tris (hidroksimetil) aminometan hidroklorit
TrxR	: Tioredoksin redüktaz
UV	: Ultraviyole
UV-Vis	: Ultraviyole – görünür ışık

yy.

: yüzyıl



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. Normalde yeşil renkli olan ancak ışık etkileşimiyle kırmızı ve mor renk alan <i>Lycurgus</i> kupası.....	2
Şekil 1.2. Boyutlarına göre nanomateryal örnekleri.....	8
Şekil 1.3. Morfolojilerine göre nanomateryaller	9
Şekil 1.4. Kompozisyonuna göre nanomateryaller	9
Şekil 1.5. Homojenite ve aglomerasyon durumlarına göre nanomateryaller	10
Şekil 1.6. Nanoparçacık sentezinde kullanılan genel yaklaşımların şematik gösterimi.....	12
Şekil 1.7. Kategorileri ile nanoparçacık sentez metotları.....	13
Şekil 1.8. Karbon bazlı nanoparçacık örnekleri: a) fullerenler, b) grafen, c) karbon nanotüpler d) karbon nanofiberler ve e) karbon siyahı	21
Şekil 1.9. Organik nanoparçacıklar: a) dendrimerler, b) lipozomlar ve c) miseller.....	23
Şekil 1.10. Moleküler oksijenin indirgenmesi sonucu reaktif oksijen türlerinin oluşumu. .	26
Şekil 1.11. Fenton ve Haber - Weiss Reaksiyonu	30
Şekil 2.1. <i>Citricoccus</i> sp. örneğinin ışık mikroskopunda görüntüsü (1000X büyütme).	33
Şekil 2.2. İnkübasyona bırakılan süpernatant - Na_2SeO_3 karışımları.....	38
Şekil 2.3. Santrifüj sonucunda elde edilen süpernatant ve selenyum nanoparçacıklar.	38
Şekil 2.4. 28 °C'lik fırında kurumaya bırakılan selenyum nanoparçacıklar.	39
Şekil 3.1. (a) pH 4 ve (b) pH 10 değerlerinde Na_2SeO_3 - <i>Citricoccus</i> sp. süpernatant içeren besiyerinin zamana karşı (12 - 24 - 48 ve 72. sa) UV-Vis absorpsiyon spektrumu	46
Şekil 3.2. (a) pH 5 (b) 6 ve (c) pH 7 değerlerinde Na_2SeO_3 - <i>Citricoccus</i> sp. süpernatant içeren besiyerinin zamana karşı (12 - 24 - 48 ve 72. sa) UV-Vis absorpsiyon spektrumu..	47
Şekil 3.3. (a) pH 8 ve (b) pH 9 değerlerinde Na_2SeO_3 - <i>Citricoccus</i> sp. süpernatant içeren besiyerinin zamana karşı (12 - 24 - 48 ve 72. sa) UV-Vis absorpsiyon spektrumu.	48

Şekil 3.4. Optimum pH olarak belirlenen pH 8’de farklı reaksiyon sürelerinde (0, 3, 6, 9, 12 ve 24 saat) gerçekleşen kademeli renk değişimi.	48
Şekil 3.5. 8 pH değerinde (a) 12, (b) 24 ve (c) 72. saatlerde alınan örneklerin DLS (dinamik ışık saçılımı) analiz sonuçları.	50
Şekil 3.6. (a) Oda sıcaklığı (23 ± 2 °C), (b) 30 °C ve (c) 37 °C deney gruplarında elde edilen UV-Vis spektrumları.....	52
Şekil 3.7. Selenyum nanoparçacık oluşumuna sıcaklığın etkisi : Oda sıcaklığında (23 ± 2 °C) denenen sentezde 0, 3, 6, 9, 12 ve 24. saatlerde meydana gelen renk değişimi fotoğrafları.	53
Şekil 3.8. Selenyum nanoparçacık oluşumuna sıcaklığın etkisi çalışması: 30 °C’de denenen sentezde 0, 3, 6, 9, 12 ve 24. saatlerde meydana gelen renk değişimi fotoğrafları.	53
Şekil 3.9. Selenyum nanoparçacık oluşumuna sıcaklığın etkisi çalışması: 37 °C’de denenen sentezde 0, 3, 6, 9, 12 ve 24. saatlerde meydana gelen renk değişimi fotoğrafları.	54
Şekil 3.10. Oda sıcaklığı (23 ± 2 °C), 30 °C ve 37 °C sıcaklık değerlerindeki SeNP sentezlerinden 24. saatte meydana gelen renk değişim fotoğrafları.	54
Şekil 3.11. (a) Çalkalamasız (0 rpm), (b) 100 rpm, (c) 150 rpm ve (d) 200 rpm çalkalama hızlarında deney gruplarında elde edilen UV-Vis spektrumları.	56
Şekil 3.12. 0 rpm;’de denenen sentezde 0, 3, 6, 9, 12 ve 24. saatlerde meydana gelen renk değişim fotoğrafları	57
Şekil 3.13. 100 rpm’de denenen sentezde 0, 3, 6, 9, 12 ve 24. saatlerde meydana gelen renk değişim fotoğrafları.	57
Şekil 3.14. 150 rpm’de denenen sentezde 0, 3, 6, 9, 12 ve 24. saatlerde meydana gelen renk değişim fotoğrafları	58
Şekil 3.15. 200 rpm’de denenen sentezde 0, 3, 6, 9, 12 ve 24. saatlerde meydana gelen renk değişim fotoğrafları.	58
Şekil 3.16. 24. saat sonunda deney gruplarında meydana gelen renk değişim fotoğrafları. 59	

Şekil 3.17. pH 8, 37 °C ve 24 saat reaksiyon süresi şartlarında (a) 0, (b) 100, (c) 150 ve (d) 200 rpm deney gruplarından alınan örneklerin DLS (dinamik ışık saçılımı) analiz sonuçları.	60
Şekil 3.18. Optimize edilmiş selenyum nanoparçacıkların FT-IR spektrumu.	64
Şekil 3.19. Sentez için kullanılan süpernatantın FT-IR spektrumu.	65
Şekil 3.20. Selenyum nanoparçacıkların a) 2 µm ve b) 1 µm ölçeğinde alınan ölçeğinde alınan SEM mikrografları.	67
Şekil 3.21. Sentezlenen selenyum nanoparçacıkların EDX spektrumu.	67
Şekil 3.22. Optimize edilmiş selenyum nanoparçacıkların (a) ve (b) 500 nm ölçeğinde alınan, (c) ve (d) 200 nm ölçeğinde alınan TEM mikrografları.	69
Şekil 3.23. %5 SeNP'lerin Kirby-Bauer Antibakteriyal testi agar görüntüleri (a) <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 23213) (b) <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) bakterisi.	70
Şekil 3.24. UV maruziyeti sonrası 14. gün kültürlerde meydana gelen renk değişimi, (a) Sırasıyla 20 dakika, 1 saat, 3 saat ve 6 saat UV-C ışınına maruz bırakılan kültürler; (b) sırasıyla kontrol grubu ve 6 saat UV-C ışınına maruz bırakılan deney grubu.	75
Şekil 3.25. UV maruziyeti sonrası kültürlerde 7. gün sonunda meydana gelen renk değişimleri (a) kontrol grubu, (b) 6 saat UV-C maruziyetine bırakılmış kültür, (c) 6 saat UV-C maruziyetine bırakılarak SeNP içeren besiyerinde gelişen kültür.	76
Şekil 3.26. Deney gruplarının 1, 3 ve 7. günlerde yapılan hücre sayım mikroskop görüntüleri.	80

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1. Bakteri kullanılarak gerçekleştirilen nanoparçacık sentez çalışması örnekleri. .	18
Tablo 1.2. Fungus kullanılarak gerçekleştirilen nanoparçacık sentez çalışması örnekleri. .	19
Tablo 1.3. Bitkiler kullanılarak gerçekleştirilen nanoparçacık sentez çalışması örnekleri. .	20
Tablo 2.1. BG-11 besiyeri içeriği ve bileşen miktarları	35
Tablo 3.1. Farklı SeNP konsantrasyonlarında UV maruziyeti yapılan ve yapılmayan kültürlerde 1 mL kültürde bulunan hücre sayısında (10^6) meydana gelen değişimler	71
Tablo 3.2. Farklı SeNP konsantrasyonlarında UV maruziyeti yapılan ve yapılmayan kültürlerde optik yoğunluk (OD_{680}) değerlerinde meydana gelen değişimler	72
Tablo 3.3. Farklı UV-C maruziyet sürelerinde 1 mL kültürde bulunan hücre sayıları (10^6).	74
Tablo 3.4. Farklı UV-C maruziyet sürelerinde kültürlerde optik yoğunluk (OD_{680}) değerlerinde meydana gelen değişimler	75
Tablo 3.5. 0,1 ppm SeNP konsantrasyonlarında UV maruziyeti yapılan, UV uygulanmayan ve kontrol grubu kültürlerinde hidrojen peroksit (H_2O_2) değerlerinde meydana gelen değişimler	77
Tablo 3.6. 0,1 ppm SeNP konsantrasyonlarında UV maruziyeti yapılan, UV uygulanmayan ve kontrol grubu kültürlerinde malondialdehit (MDA) değerlerinde meydana gelen değişimler	78
Tablo 3.7. 0,1 ppm SeNP konsantrasyonlarında UV maruziyeti yapılan, UV uygulanmayan ve kontrol grubu kültürlerinde optik yoğunluk (OD_{680}) değerlerinde meydana gelen değişimler	81
Tablo 3.8. 0,1 ppm SeNP konsantrasyonlarında UV maruziyeti yapılan, UV uygulanmayan ve kontrol grubu kültürlerinde 1 mL'de bulunan hücre sayısı (10^6) değerlerinde meydana gelen değişimler	82

Tablo 3.9. 0,1 ppm SeNP konsantrasyonlarında UV maruziyeti yapılan, UV uygulanmayan ve kontrol grubu kültürlerinde hücre dansitesinde meydana gelen değişimler 82

Tablo 3.10. 0,1 ppm SeNP konsantrasyonlarında UV maruziyeti yapılan, UV uygulanmayan ve kontrol grubu kültürlerinde klorofil a ve b miktarında meydana gelen değişimler 84



1. GİRİŞ

Son 20 – 25 yıl içerisinde “nanoteknoloji” kelimesinin içinde yer aldığı, bu yeni teknoloji ile çevremizi nasıl değiştirebileceğimize dair düşünceler ve bu konuda yapılan çalışmalar basında büyük ölçüde yer almış ve almaya da devam etmektedir. Güneş koruyucu losyonlar içeren nanoparçacıklar, nano – kaplamalı boyalar, kir tutmayan camlar, nanokompozit malzemeler ve mikro analiz sistemleri gibi uygulamalarıyla daha şimdiden günlük yaşamlarımızda yer almıştır. Nanoteknolojinin gelişimi ile beraber gelecekte hayal gücü ile gerçeklik arasındaki boşluğun doldurulacağı ve uygulamaların bilim kurgu filmlerinin ötesine geçeceği öngörülmektedir [1].

1.1. Nanobiyoteknoloji

Nanoteknoloji, boyutlara bağlı benzersiz özellikler sağlayan, yaklaşık 1-100 nm arasında boyuta sahip maddelerin anlaşılması ve kontrol edilmesini sağlamaktadır. Nano boyuttaki materyaller, kuantum sınırlama etkilerinde ve kimyasal reaktivitelerinde değişikliklere yol açan ve genellikle daha geniş yüzey alanı/hacim oranından kaynaklanan özellikleri ile geleneksel materyallere göre farklılık göstermektedir [2]. Nanoteknoloji, materyal ve bu materyalin fizikokimyasal özelliklerini moleküler düzeyde manipüle edebilen spesifik ekipmanı içeren yenilikçi bir bilimsel alandır. Biyoteknoloji de medikalden ziraat alanlarına kadar değişik birçok bilim dalında materyal geliştirilmesi ve genetik ve moleküler mekanizmaların düzenlenmesi konusunda metotların geliştirilmesinde yararlanılan bir bilim dalıdır. [3, 4].

Nanoteknoloji ve biyoteknoloji, 21. yüzyılın en umut verici teknolojilerinden biridir. Biyoteknoloji, mikrobiyal türler dahil olmak üzere canlı organizmaların fizyolojik ve diğer metabolik süreçleriyle ilgilenirken nanoteknoloji, fonksiyonel birimi 1 - 100 nm boyuta sahip materyallerin uygulamalarda kullanılması ve gelişimini sağlamayı amaçlamaktadır. Bu teknolojilerin kombinasyonu olan ve nispeten yeni ortaya çıkan nanobiyoteknoloji ise biyolojik sistemleri incelemek için birçok yararlı aracın uygulanmasında ve geliştirilmesinde inanılmaz bir rol oynamaktadır. [5, 6].

1.1.1. Tarihçesi

Nanomateriyallerin insanlık tarihinde kullanımının kanıtları, soda camında dağılmış olarak bulunan altın nanoparçacıkları sayesinde yeşil bir görünüme sahip olan ancak altın-gümüş ve bakır nanoparçacıkların ışıkla etkileşiminin bir sonucu olarak iletilen ışık nedeniyle kırmızı ve mor rengi yansıtan ve günümüzde British Müzesi'nde sergilenmekte olan "Lycurgus Kupası" ile MS 4. yüzyıla dayanmaktadır. Hatta günümüzde Lycurgus Kupası, elektron dalgalarının yüzey boyunca hareket ettiği yüzey plazmon fenomeninin ilk örneklerinden olduğu için günümüzde bir ikon haline gelmiştir [7].



Şekil 1.1. Normalde yeşil renkli olan ancak ışık etkileşimiyle kırmızı ve mor renk alan Lycurgus kupası [7].

Tanımlanması, gelişmesi ile nispeten yeni bir bilim alanı olmasına rağmen milattan önceki yıllarda da birçok basit nanoteknolojik uygulamalarla karşılaşmak mümkündür. MÖ 2600 yıllarında elyaf ve kumaşlara renk vermek amaçlı boyaların kullanılması, Orta Çağ kiliselerinde görülen pencere panellerinde, vitray zanaatkarlarının koyu sarı veya yakut kırmızısı renk vermede nanoölçekli gümüş veya altın parçacıklarından yararlanması ve 12 - 18. yy. Orta Doğu metal eşya ustaları tarafından günümüzdeki karbon nanotüplerinin içindeki sementit nanotellerini de içeren Şam çeliğinin üretilmesi bu uygulamaların

örnekleridir [8, 9]. Birçok uygulama olmasına rağmen o zamanlar, üretilen bu nanoyapıları gözlemlene ve araştırma için bir yol bulunmamaktaydı.

Metalik nanoparçacıkların sahip olduğu ve eşi benzeri olmayan özellikleri, 1857'de Michael Faraday tarafından küçük boyuttaki altının olağan dışı renkler ürettiğini keşfetmesiyle tespit edilmiştir [1, 8]. Bununla birlikte, nano ölçekte maddeyi kasıtlı olarak manipüle etmek, 1959'da Amerikan Fizik Derneği'nde Richard Feynman tarafından verilen "Altta Çok Yer Var: Yeni Bir Fizik Alanına Girme Daveti" konuşmasıyla kavramsallaşmış ve projelendirilmiştir. Bu konuşması ile Richard Feynman, nanoteknoloji bilimine dikkat çeken ilk bilim insanı olmuştur. Bu konuşmada 24 ciltlik Britannica ansiklopedisinin ufak bir raptiye başına sığabileceği örneği ile somutlaştırma yapılarak küçük ölçekteki maddeleri manipüle etmek ve gözlemek için bir vizyon belirlenmiş, birçok endüstride devrim yaratılabileceği ve en önemlisi biyolojiyi anlama bağlamında birçok temel soruya cevaplar sunulabileceğinin altı çizilmiştir [10]. Aynı zamanda Richard Feynman, bu konuşmasında 1/64 inç küplük çalışan bir motoru ilk üretecek kişiye 1000 \$ vaatetmiştir. Konuşmanın üzerinden çok zaman geçmeden bir öğrenci olan William McLellan, geleneksel saat yapım tasarımını kullanarak bu motoru dizayn etmiş ancak ödül için hak talebinde bulunmamıştır [11]. Bu konuşma bu örnekte olduğu gibi birçok bilim insanına ilham kaynağı olmuş ve o zamandan günümüze kadar geçen sürede fizik, kimya ve biyoloji bilim alanlarının bir arada kullanıldığı pek çok araştırma yapılmıştır ve çalışmalar hız kesmeden devam etmektedir.

Nanoteknoloji kelimesini ilk kez 1974 yılında Norio Taniguchi, yarı iletken süreçlerde boyuta bağlı toleransların işlenmesi ve bitirilmesi çalışmalarında kullanmıştır. [6]. "Nano" bir ön ek olup kökeni "cüce" kelimesinden gelmekte bir birimin milyarda birine karşılık gelmektedir. Nihayet 1981 yılında Uluslararası İş Makineleri Kurumu (IBM) araştırmacıları Gerd Binnig ve Heinrich Rohrer tarafından tarama tünelleme mikroskobunun geliştirilmesinden sonra bu alanda gerçekten ilerleme başlamış ve böylece nano ölçekteki maddeleri gözlemek mümkün hale gelmiştir. Bu buluşları ile 1986 yılında fizik alanında Nobel Ödülü'ne layık görülmüşlerdir. Atomların tarama tünelleme mikroskobu ile görüntülenmesi, belirli konumlara atomların yerleştirilmesine olanak sağlamıştır. 1990 yılında IBM'in ksenon (Xe) atomları kullanılarak heceleme ile

nanoteknolojinin ilerleyişi hız kazanmıştır [12–14]. Sonrasında yıl 1985'i gösterdiğinde Harol Kroto, Richard Smalley ve Robert Curl fullerenleri keşfetmiş ve bu keşif için de 1996 yılında taraflarına kimyada Nobel Ödülü verilmiştir. [15]. Karbon nanotüplerin ilk kontrollü geliştirilmesi de 1991 yılında Sumio Iijima ve çalışma arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir [16]. Ayrıca 1980'lerin başında, Massachusetts Teknoloji Enstitüsü'nden K. Eric Drexler, dipot nanoteknolojiye veya protein tasarımı gibi biyolojik mekanizmalara odaklanan moleküler mühendisliğe dayanan nanoteknoloji için alternatif bir vizyon geliştirmiştir. Feynman'ın 1959 konuşmasından esinlenen bu vizyon, 1986'da yayınlanan “Yaratılış Motorları: Nanoteknolojinin Yaklaşan Dönemi” başlıklı ilk nanoteknoloji kitabı ve aynı yıl Öngörü Enstitüsü isimli nanoteknolojinin gelişimine adanmış ilk organizasyonun oluşturulmasına öncülük etmiştir [17, 18]. 1990'larda Fizik Enstitüsü Yayıncılık (IOP Publishing) tarafından Birleşik Krallık'ta yayınlanan “Nanoteknoloji” başlıklı konuya adanmış ilk derginin oluşturulması ve “Nanomedicine (nanoilaç)” teriminin kullanılması ile alan büyümeye devam etmiştir. 1991'de karbon nanotüp keşfi, 1995'te polielektrolit kompleks misel ve farklı tiplerde nanoparçacıkların keşfiyle alanda bilimsel gelişmeler yaşanmıştır [19, 20]. Nanoteknolojinin vaadettikleri sayesinde 1998 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) Ulusal Nanoteknoloji Girişimi'nin oluşturulması sağlandı [21]. Dünya çapında, 2001 yılında kurulan Kanada Ulusal Nanoteknoloji Enstitüsü gibi benzer girişimler de kurulmuştur. Bu alana yapılan yatırımın artışına paralel olarak başta medikal alanlar olmak üzere birçok alanda gelişmeler gerçekleşmiştir. Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüsü ve Ulusal Kanser Enstitüsü 2004 yılında kanserde nanoteknoloji için bir ittifak ve çok kurumlu işbirliği, araştırma, eğitim ve karakterizasyon merkezleri kurmuştur. Nobel ödülü sahibi Fizikçi Paul Ehrlich, 1900'lerin başında sağlıklı dokuya zarar vermeden hücresel hedefe gidebilen ve “hedefe yönelik terapi” olarak da adlandırılan “sihirli mermiler” konseptini Dünya'ya tanıtmıştır. Bu tanım daha sonra nanoteknoloji sayesinde hedeflenen nanoparçacık kavramı ile birleştirilmiştir. “Nanoparçacık” terimi 1978'de bilimsel yayınlarda görünmeye başlanmış ve nanoparçacık araştırması yıllar içinde muazzam bir şekilde büyümüştür [2].

1.2. Nanomalzemeler

Nano boyuttaki malzemeler; enerji tasarrufu ve yapısal güç arttırımından antimikrobiyal özelliklerin ve kendi kendini temizleyen yüzeylerin geliştirilmesine kadar çeşitli yeni uygulamalara olanak tanıyan olağanüstü fizikokimyasal, plazmonik özellikleri ve potansiyel uygulamaları sayesinde son yıllarda kapsamlı araştırmalara olan ilgiyi arttırmıştır. Nanomateryallerin keşfedilmesiyle araştırma için yeni teorik ve deneysel yöntemler geliştirilmiş ve şimdiye kadar bilinmeyen nanomalzemelerin bulunması için de fırsatları ortaya çıkarmıştır. Buna ek olarak; tarım, nanoelektrik, nanotıp, sensör geliştirme, enerji depolama cihazları, katalizörler gibi alanlarda nanoteknolojik cihazlarda mevcut ve kısa süre içerisinde gerçekleşmesi beklenen ilerlemeler bulunmaktadır [22].

İnsan ve çevre sağlığı açısından ek değerlendirmeyi gerektiren materyallerin bu gruba dahil edilip edilmeyeceği tartışmalarından kaynaklı nanomateryallerin tanımının geliştirilmesi zorlu olmuş ve bu konudaki farklı düşüncelerden dolayı farklı ülke ve kuruluşlar tarafından birbirinden farklı tanımlar yapılmıştır [23]. Üst sınır mikroparçacıkların tanımlayıcısı olan 1 mikron (μ) ve alt sınır 1 nm olarak kabul edilirken bazı araştırmacılar üst sınırı 100 nm olarak kabul etmektedir. Ancak bu üst sınırı 100 nm’de tutmanın gerekli olduğuna dair bilimsel bir kanıt bulunmamaktadır. Bu nedenle Avrupa Birliği Ajansları nanomateryalleri “Yığın veya bağlanmamış halde bulunan, boyut dağılımında %50 veya daha fazlasının 1 – 100 nm arasında boyuta sahip doğal, tesadüfi olarak oluşan veya imal edilmiş materyaller” olarak tanımlamaktadır. Nanoteknolojinin temel ve anahtar unsuru olan bu nanomateryaller, yaygın olarak “1 - 100 nm boyutlara sahip malzemeler” olarak tanımlanmaktadır. Bu da nanomalzemelerin mikro ölçekten daha küçük, 10^{-9} m yani metrenin milyarda biri boyuta sahip malzemeler olduğu anlamına gelmektedir [24].

1.2.1. Sınıflandırılmaları

Nanomateryalleri farklı temel özelliklerine göre sınıflandırmak mümkündür. Morfolojileri, kompozisyonu, homojenliği ve boyutsal özellikleri bu sınıflandırmalarda kullanılan özelliklerdir.

1.2.1.1. Boyutsal özelliklerine göre sınıflandırılmaları

Nanomalzemeler üç boyutlu yapıda olabildiği gibi (nanopartiküller); iki boyut (nanometre kalınlığında filmler), bir boyut (nanoteller) veya sıfır boyutlu da (kuantum noktaları) olabilmektedir. Düzensiz şekilde olabildikleri gibi küresel ve tübüler şekillerde de olabilmekte veya kümeleşmiş (aglomerat halinde) ve kümeleşmemiş şekillerde bulunabilirler. En popüler nanomalzeme türleri nanotüpler, dendrimerler, kuantum noktalar ve fullerenlerdir [25].

Sıfır boyutlu nanomateriyaller (0D), nanoteknolojinin öncüsü olarak kabul edilmekte olup ultra küçük boyutları ve yüksek yüzey-hacim oranları gibi doğal yapısal özellikleri sayesinde birim kütle başına daha aktif kenar bölgelerine sahiptir. Elektronlar nano ölçek seviyesinde hapsedildiği için elektronların yer değiştirmesi durumu sıfır boyutlu nanomateriyallerde gözlemlenmez. Metalik, seramik veya polimerik gibi birçok formda; amorf ve kristal şeklinde bulunabilirler. Şimdiye kadar birçok 0D (sıfır boyutlu) nanomateriyal keşfedilmiştir. Örnek olarak grafen kuantum noktalar (GQD), karbon kuantum noktalar, inorganik kuantum noktalar (QD), fullerenler, magnetik nanoparçacıklar (MNP), soy metal nanoparçacıklar verilebilmektedir [26]. Sıfır boyutlu nanomateriyaller içerisinde incelenen kuantum noktalar, boyutu tek molekül ve dökme kristal katılar arasında olan bir yarı iletken malzemenin nanokristalleridir. Küçük boyutları sayesinde “kuantum sınırlama” olarak da adlandırılan fiziksel olarak sınırlandırılmış elektronlar ürettikleri için dikkat çekicidirler. Uzaysal özelliklerinin bir sonucu olarak, diğer malzemelerde bulunmayan birçok özel optik, elektronik ve kimyasal özelliğe sahiptirler. Boyut bağımlılığı, bu özelliklerin QD'lerin boyutunun ayarlanmasıyla kolayca kontrol edilebildiğini göstermektedir. Yarı iletken malzemeler olarak, elektronların gelen ışığın uyarılmasıyla köprülenebildiği doğal bir bant boşluğuna sahiptirler. Bununla birlikte, geleneksel yarı iletken malzemelerin aksine, QD'ler diğer makroskopik yarı iletkenler gibi sürekli değerlik ve iletim bantları oluşturmak için çok dağınık halde bulunurlar. Kuantum noktalarının optik özellikleri, benzersiz bir kuantum sınırlama olarak bilinen etki nedeniyle oluşur. Yeterli enerjiye sahip bir foton (bant boşluğuna eşit veya daha büyük) bir QD'ye çarptığında, bir elektronu değerlik bandından iletim bandına uyararak yerinde pozitif bir delik bırakabilir.

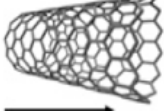
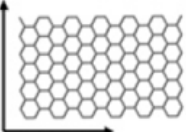
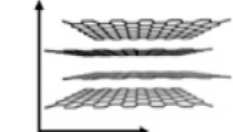
Bu, yarı iletken malzemelerde yaygın bir fenomen olan bir elektron deliği çiftinin (eksiton) oluşmasına yol açar. Bir QD'de, ortalama eksiton boyutu (eksiton Bohr yarıçapı), QD'nin boyutundan daha küçüktür ve eksiton malzemeye sıkıştırıldıkça bir sınırlama enerjisi üretir. Bir floresan fotonun toplam enerjisi, QD'nin bant boşluğunun, kuantum hapsetme enerjisinin ve bağlı eksiton enerjisinin toplamı olarak modellenenir. 1 – 10 nm'lik boyut rejiminde kuantum noktalarının yüksek oranda ayarlanabilir emme ve emisyon spektrumları vardır. Bu yüksek derecede kontrol, QD'lerin birçok uygulama için optimize edilmesini sağlar. Eşsiz nitelikleri QD'lere birçok bilimsel ve endüstriyel uygulama potansiyeli vermiştir. QD'lerin en sık uygulandığı alan, ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Bu yolla floresan taşıyan ilaç noktaları izlenebilmekte ve görüntüleme için yardımcı görevi görebilmektedir [25].

Tek boyutlu nanomateriyaller (1D), genellikle farklı bir materyalden yapılmış bir alt tabakaya tutundurulmuş yüzey kaplamaları veya çok ince yapıdaki filmlerdir. Nanotüpler, nanofiberler, nanoteller ve nanoçubuklar bu grup içerisinde incelenmektedir. Sıfır boyutlar nanomateriyallere benzer şekilde amorf, tek veya çoklu kristal yapısında, metalik, seramik veya polimerik yapıda bulunabilirler. Ancak kimyasal açıdan saf veya saf olmayan halde, bağımsız materyaller veya başka bir ortama gömülü halde bulunabilmektedirler. Uzunlukları genişliklerinden büyüktür [27]. Farklı yapısal özellikleri nedeniyle özellikle güneş enerjisi dönüşümü, termoelektrik cihazlar ve enerji depolama teknolojisindeki uygulamalarda kullanılmaktadırlar [28].

İki boyutlu nanomateriyaller (2D); bir substrata bağlanmış nanoparçacıklar, gözenekli ince filmler ve uzun en - boy oranına sahip olan nanoparçacıklar, teller ve tüplerden meydana gelmektedir. Elektronlar bir boyutla sınırlı olduğu için serbest bir şekilde hareket edemezler. Şekil açısından bir boyutlu nanomateriyallere benzemektedir. Ancak çeşitli kimyasal kompozisyonundan oluşabilmekte, tekli veya çoklu tabaka yapıları halinde bulunabilmektedir. Nanofilmler, nanoplakalar ve nanolevhalar, iki boyutlu nanomateriyallere örnektir.

Üç boyutlu nanomateriyaller (3D) ise bir substrat üzerindeki küçük nanoyapılar, bir substrat üzerinde nano gözenekli membranlar veya nanoparçacıklardan oluşur. Yığın

nanomateryaller olarak bilinmekle birlikte elektronun serbest bir şekilde hareket edebildiği nanomateryallerdir. Dendrimerler ve polikristaller bu grubun önemli örnekleridir [29].

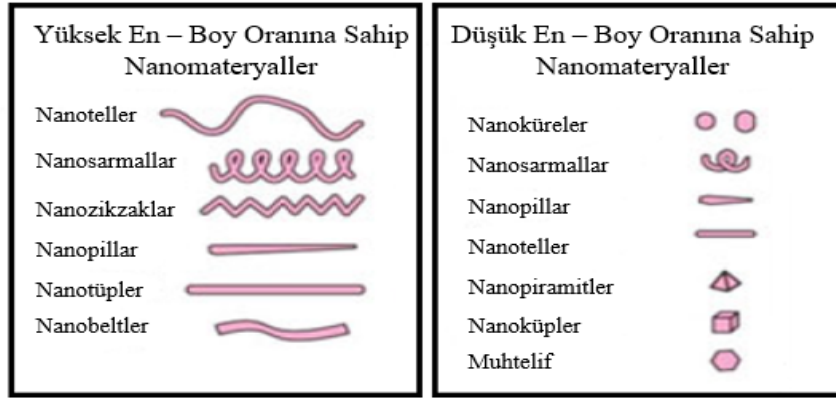
0D	1D	2D	3D
			
Fulleren	Karbon Nanotüp	Grafen	Grafit

Şekil 1.2. Boyutlarına göre nanomateryal örnekleri [30].

1.2.1.2. Morfolojilerine göre sınıflandırılmaları

Morfolojilerine göre nanomateryaller, yüksek ve düşük en – boy oranına sahip nanoparçacıklar olarak iki sınıfta incelenir. Yüksek en – boy oranına sahip nanoparçacıklar nanotel, nanozikzak, nanopil, nanotüp yapılarında olabilirken düşük en – boy oranına sahip nanoparçacıklar küresel, sarmal, piramidal, küp gibi birçok yapıda karşımıza çıkabilmektedir [31].

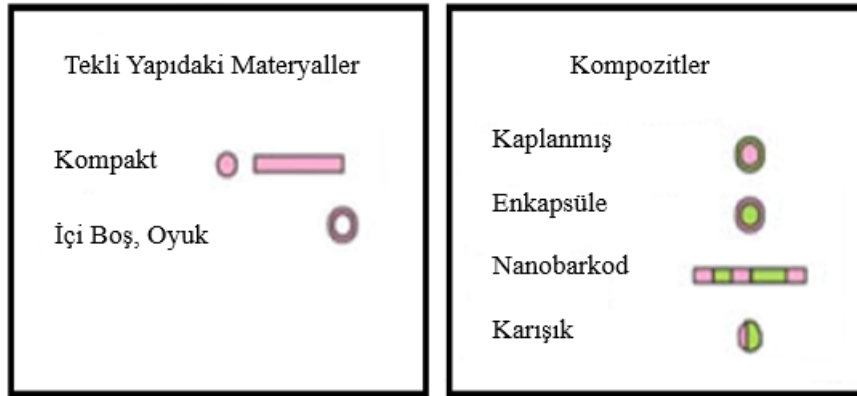
Bu grupta incelenen nanoteller, mekanik özellikleri nedeniyle kuantum telleri olarak da adlandırılmakta olup genellikle 1 - 100 nm civarında çapa sahip olan, farklı uzunluklarda bulunabilen, iletken veya yarı iletken tellerdir. Yüksek yüzey alanı - hacim oranına sahip olmaları ve bu yapılarından dolayı kazandıkları eşsiz özellikler sayesinde nanoteller, gelecek nesil yapısal malzemeler, biyosensörler, nano-ölçekli bilgisayarlar, mikro-mekanik bileşenlerde devre ve ara bağlantı olarak kullanımları yönünde birçok çalışmaya ilham kaynağı olmuştur [32].



Şekil 1.3. Morfolojilerine göre nanomateryaller [31].

Kompozisyonlarına göre sınıflandırılmaları

Kompozisyon açısından nanomateryaller; tek materyal halinde, kompakt ya da içi boş oyuk şeklinde olabilmektedir. Aynı zamanda iki veya daha fazla materyalden oluşan kaplama, enkapsüle veya karışık formda da bulunabilmektedir [31].



Şekil 1.4. Kompozisyonuna göre nanomateryaller [31].

Homojenite ve Aglomerasyon Durumlarına Göre Sınıflandırılmaları

İzomerik ve homojen olmayan nanomateryaller şeklinde iki grupta incelenmektedir. Aglomerasyon durumları açısından ise dağılabilen veya topaklanabilen şeklinde incelenmektedir. Aglomerasyon durumları, yüzey yükü ve manyetizma gibi elektromanyetik özelliklerle ilişkili olup hidrofobik ve hidrofilik durumunu da etkilemektedir [31].

İzometrik	Homojen Olmayan	
		Dağınık
		Topaklanmış

Şekil 1.5. Homojenite ve aglomerasyon durumlarına göre nanomateriyaller.

1.3. Nanoparçacıklar

Nanoparçacıklar (NP'ler), bir boyutu en az 100 nm'den küçük olan partiküler maddeleri içeren oldukça geniş bir nanomateriyal sınıfıdır [33]. Genel şekline bağlı olarak sıfır, bir, iki veya üç boyutlu olabilmekte ve yapısal olarak karbon, metal, metal oksitler veya organik maddeler gibi çeşitli maddelerden oluşabilmektedir [34, 35]. Nano-noktalar; uzunluk, genişlik ve yüksekliği tek bir noktada sabitlendiği sıfır boyutlu nanoparçacıklara, grafen iki boyutlu nanoparçacıklara ve altın nanoparçacıklar da uzunluk, genişlik ve yükseklik gibi tüm parametrelere sahip olması sebebiyle üç boyutlu nanoparçacıklara örnektir [36]. Boyutsal olarak çeşitlilik gösterdiği gibi, nanoparçacıklar şekil olarak da farklılık göstermektedir. Küresel, silindirik, tüp şeklinde, konik, spiral veya sarmal olabildiği gibi amorf düzensiz yapıda da nanoparçacıklara rastlanmaktadır [37].

1.3.1. Nanoparçacıkların sahip olduğu özellikler

Son zamanlarda nanomateriyaller ve özellikle nanoparçacıklar; geleneksel malzemelerle kıyaslandığında boyutta meydana gelen değişim ve bunun sonucunda klasik fizikten ziyade kuantum fiziğinin devreye girmesiyle fiziksel, manyetik, yapısal, termal, mekanik, kimyasal, optik ve elektronik gibi alanlardaki benzersiz özellikleri sayesinde birçok araştırmacının ilgisini çekmiş ve çalışmalarda kritik bir önem kazanmıştır [29]. Parçacık boyutu küçüldükçe yüzey alanı ve dolayısıyla yüzey – hacim oranı artmaktadır. Bu yüzey

alanındaki artış, nanoparçacıkların kendine özgü özelliklerinin kaynağını teşkil etmektedir [31].

Malzeme boyutu 10 nm'ye kadar düştüğünde yüzeyde bulunan atomlar, parçacığı oluşturan toplam atomların %20'sini oluştururken parçacık boyutu daha da küçülerek 1 nm civarına düştüğünde toplam atomların %99'u yüzey atomlarını oluşturur. Komşu atom eksikliğinden malzemelerin içinde çok sayıda sarkan bağ bulunur ve geniş yüzey alanı özelliği sayesinde bu bağlar kinetik enerjiyi en aza indirmek için diğer atomlarla güçlü bir şekilde bağlanma potansiyeline sahiptir [38, 39]. Bunun sonucunda da ultra yüksek kimyasal reaktivite sergileyebilmektedirler. Bunun yanı sıra, yüksek yüzey – hacim oranı, etkileşime geçecek yüzey alanı miktarındaki önemli artışa bağlı olarak reaksiyonların hızını arttırmaktadır [31].

Malzemelerde aynı zamanda boyut küçüldükçe geleneksel malzemelere kıyasla elektronların hareketinin arttığı gözlemlenmiştir. Bu yüksek hacim etkisi sayesinde daha düşük kütle, porozite ve yoğunluk meydana gelmekte ve dökme malzemelere göre farklı ve özel fiziksel, kimyasal, biyolojik ve elektronik özelliklere yeni bakış açıları kazandırmıştır. Kuantum boyut etkisi sayesinde de parçacık boyutunun azalmasıyla bant aralığı enerjisinin arttığı bilinmektedir. Aynı zamanda kuantum etkisi ve parçacığın boyutunun azalmasıyla yer çekimi kuvveti önemsiz hale gelmekte, atom ve molekülün davranışlarının belirlenmesinde elektromanyetik kuvvetler baskın hale gelmektedir [29, 40]. Nanoyapılarda birincil termal enerji taşıyıcısı olan elektronların dağılımında kuantum sınırlaması nedeniyle meydana gelen değişiklik ile elektronların daha dar enerji bandında bulunması; termal iletkenlik, faz geçişleri, ısı kapasitesi ve erime noktası gibi termal özelliklerin artışının ve azalışının düzenlenmesini sağlamaktadır [41].

Bilindiği gibi, eşleşmemiş elektronları bulunan maddeler paramanyetizma özelliği göstermektedir. Bu manyetizma özellikleri sayesinde nanoparçacıklar da kataliz, biyoteknoloji, görüntüleme ve bilgi depolanması gibi kapsamlı uygulamalarda kendine yer edinmiştir [42].

Nanoparçacıklar; fiziksel, manyetik ve termal benzersiz özellikleri yanında optik özellikleri ile de ön plana çıkmaktadır. Elektron ile dolu en yüksek enerji seviyesi ile en

düşük enerji seviyesinin iletim bağı arasındaki enerji değişiklikleri yoluyla elektronik yapı da değişiklik gösterir. Absorpsiyon ve emisyon geçişleri gibi optik özellikler, bu iki bant arasındaki değişikliklere bağlıdır. Nanoparçacıkların boyutunda meydana gelen değişikliğin kazandırdığı fiziksel ve elektronik özelliklerinin yanında metallerdeki renk ve iletkenlik gibi fiziksel ve elektronik özellikleri de değişecektir [43].

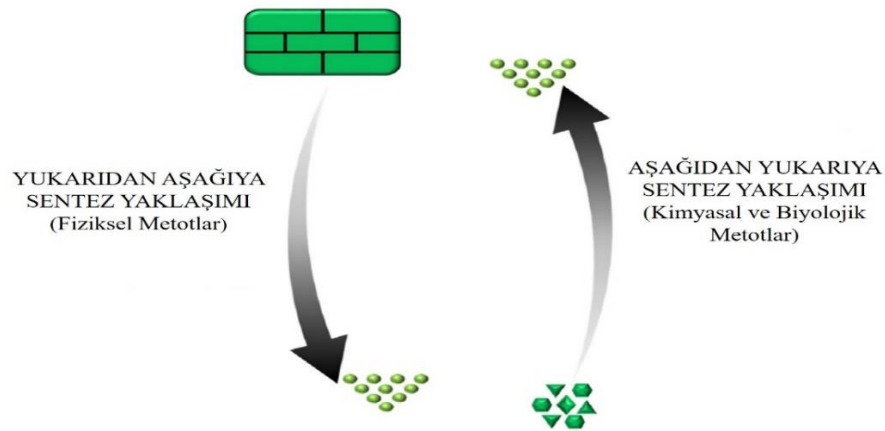
Geleneksel malzemelere göre yapısı ve özelliklerinde meydana gelen değişimler ile nanoparçacıklar çalışmalarda ilgi kaynağı olmuş ve potansiyeli ile dikkatleri üzerinde toplamıştır.

1.3.2. Nanoparçacık sentez yöntemleri

Nanoparçacıkların sentezlenmesi, farklı yaklaşımlar dikkate alınarak değişik şekillerde gruplandırılabilir. Bu yaklaşımlardan biri parçacığın oluşumunun büyük moleküllerin küçük moleküllere dönüşümü veya küçük moleküllerin bir araya getirilmesini içeren bir sınıflandırma yapmaktadır. Bu yaklaşıma göre; parçacık sentezi iki başlık altında incelenmektedir. Bunlar:

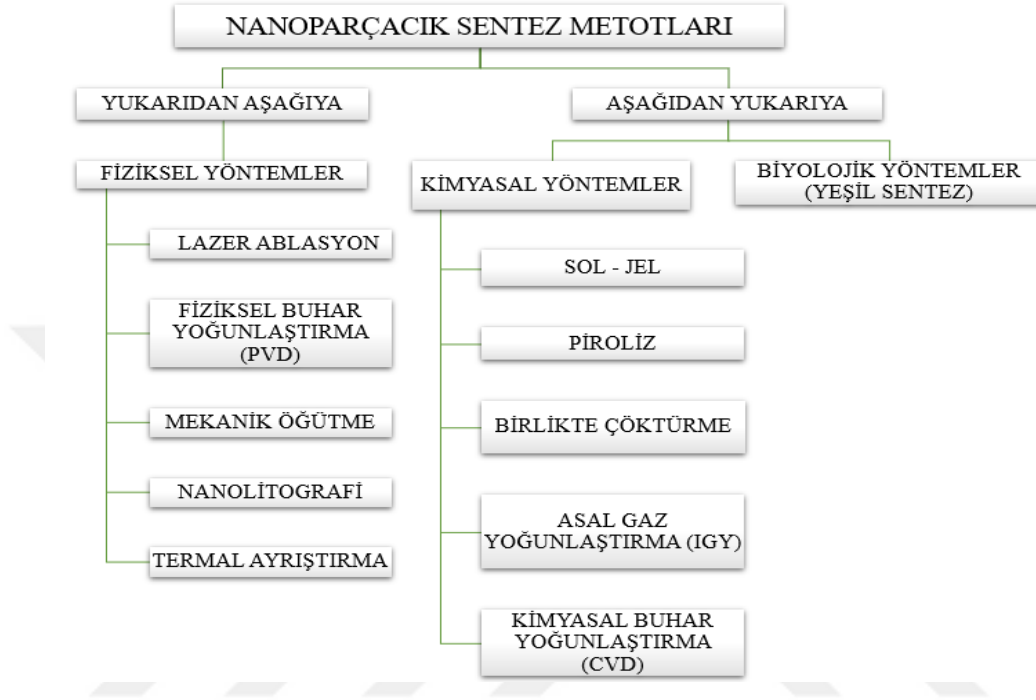
- Yukarıdan Aşağıya (Top Down) Yöntemi ve
- Aşağıdan Yukarıya (Bottom Up) Yöntemidir.

Bu sentez yaklaşımlarının şematik gösterimi Şekil 1.6'da verilmiştir:



Şekil 1.6. Nanoparçacık sentezinde kullanılan genel yaklaşımların şematik gösterimi [44].

Nanoparçacık sentez yöntemleri, örnek metotlarla beraber Şekil 1.7’de özetlenmiştir.



Şekil 1.7. Kategorileri ile nanoparçacık sentez metotları.

1.3.2.1. Yukarıdan aşağıya (top down) yöntemi

Büyük materyallere dış ortamdan mekanik ve/veya kimyasal işlemler uygulayarak enerji verilmesi ve bunun sonucu olarak da materyalin nano boyuta indirgenmesinin esas alındığı yaklaşımdır. Büyük moleküllerden başlanarak daha küçük birimlere ulaşarak en son nanoparçacıklara dönüştürülerek gerçekleştirilir. Bu yaklaşımda elde edilen parçacıklarda boyut ve yapı üzerinde iyi bir kontrol sağlanamamaktadır [45].

Lazer Ablasyon Yöntemi: Yüksek güce sahip bir lazer ışını materyaldeki hedefin vurulması için bir vakum hücresi içine odaklatılarak plazma oluşturulur ve oluşturulan bu plazma daha sonra nanopartiküllerin kolloidal çözeltisine dönüştürülür [46]. Bu yöntemde stabilize edici ajanlara veya diğer kimyasallara ihtiyaç duyulmadığından çevre dostu bir teknik olarak düşünülmektedir [47]. Kimyasal metotlarla karşılaştırıldığında çöktürme hızının yavaş olması ve enerji dönüşümünün etkisizliği nedeniyle pahalı bir yöntemdir [48].

Fiziksel Buharlaştırma (PVD): Özellikle ince filmler ve kaplamalar üretmek için kullanılan bu yöntem, materyal önce yoğunlaştırılmış bir fazdan buhar fazına ve ardından ince bir film haline yoğunlaştırıldığı faza geçtiği bir süreçle karakterize edilir [49]. Kullanılan substrata kıyasla daha üstün özelliklere sahip materyal üretmesi avantajına sahipken karmaşık ve uygulanması zor bir süreçle sahip olması, yüksek işlem maliyeti ve elde edilen çıktının az olması gibi dezavantajları da bulunmaktadır [50].

Mekanik Öğütme: Fiziksel yöntemlerden biri olan mekanik öğütme yöntemi, geleneksel dökme materyallerden nano – ölçekte materyal üretilmesini sağlayan, farklı faz karışımlarının üretilmesinde etkili olan ve genellikle nanokompozit materyallerin üretilmesinde kullanılan bir yöntemdir [51]. Yoğun materyallerin kullanımını gerektirdiği için genellikle çelik ve tungsten kullanılmaktadır ve büyük ölçekli sentezler için daha uygundur [52].

Nanolitografi: Birbirini takip eden hidroliz ve polikondensasyon reaksiyonlarını içeren bir yöntemdir. Düşük maliyetli olmasına rağmen özellikli materyallerin sentezinde daha kompleks sentezlerin gerekliliğinden dolayı fazla tercih edilmemektedir [53].

Termal Ayırıştırma: Termolizis olarak da bilinen bu yöntemde sıcaklık kullanılarak kimyasal bağlar kırılarak materyal sentezi gerçekleştirilmektedir [45]. Kararlı ve homojen dağılımlı nanoparçacık sentezi için uygun bir metottur. Uygulaması kolay, ekonomik ve büyük ölçekli sentez için uygundur [54].

1.3.2.2. Aşağıdan yukarıya (bottom up) yöntemi

Bu yaklaşımda atomik veya moleküler boyuttaki yapıların kimyasal reaksiyonlar ile büyütülerek parçacık oluşumunun sağlanması esas alınır. Bu yaklaşıma basit ve küçük yapılardan oluşum gerçekleştiği için “inşa yaklaşımı” da denilmektedir.

Sol – Jel Yöntemi: Materyallerin yoğunlaşma ve hidroliz reaksiyonlarına dayanan bir yöntemdir. Bu yöntem ile sentezlenecek nanoparçacığın boyut kontrolünün homojen bir şekilde sağlanabilir olması avantajı bulunurken uygulama yönünden zor ve maliyetli olması, veriminin düşük olması dezavantajlarını oluşturmaktadır [55].

Piroliz Yöntemi: Nanoparçacıkların büyük ölçekli üretiminin gerektiği endüstrilerde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Sıvı veya buhar özellikte olan öncül madde yüksek basınç altında fırına konulduktan sonra yanma sırasında oluşan ürün ve yan ürünlerin daha sonra nanopartikülleri elde etmek için kullanılması esasına dayanmaktadır [36]. Bu yöntem ile bağımsız nanopartiküller üretilbilmesine rağmen geniş boyut dağılımına sahip parçacıkların elde edilmesi dezavantajına sahiptir [56].

Asal Gaz Ayrıştırma (IGC): Nanoparçacıkların aşırı doymuş buhar fazından elde edildiği bir yöntemdir [56]. Materyalin helyum içeren ortamda buharlaştırıldıktan sonra soğutulmasıyla gerçekleştirilir [48].

Birlikte Çöktürme: Çekirdeklenme, büyüme, irileşme ve/veya aglomerasyon süreçlerinin eş zamanlı olarak meydana geldiği bir yöntemdir. Basit ve hızlı bir yöntem olması, parçacık sentezi ve kompozisyonunu kolayca kontrol edebilmeye imkan sağlaması ve süreç boyunca inorganik çözücü içermemesi avantajlarına sahipken yüksüz gruplara uygulanamaması, zaman alıcı ve farklı çökme hızlarına sahip reaktanlarla kullanıldığında verim alınamaması gibi dezavantajları bulunmaktadır [49].

Kimyasal Buharlaştırma (CVD): Özellikle karbon içerikli nanomateriyallerin sentezinde büyük öneme sahip olan bu yöntem, buhar fazı öncüllerinin kimyasal reaksiyonu ile substrat yüzeyinde ince bir film oluşturulması esasına dayanmaktadır. Düşük maliyetli ve stabilitesi yüksek bir yöntem olmasına rağmen katalizörlerin parçacık morfolojisi ve tipi üzerinde belirgin bir etkisinin olması dezavantajı bulunmaktadır [51].

Biyolojik yöntemler

Nanoparçacıkların fiziksel ve kimyasal yollarla sentezlenmesi sonucunda ortaya çıkan toksisite problemleri çevresel endişelere neden olmaktadır. Bunun yanı sıra fiziksel yöntemlerle çalışmak için geniş alanlara ve yüksek sıcaklık değerlerine ihtiyaç duyulması kaynak materyalin çevresindeki sıcaklığı da arttırmakta ve zaman kaybı yaratmaktadır. Kimyasal yöntemlerde de toksik çözücü ve kimyasalların kullanılması ile halihazırda birçok problemle mücadele etmekte olduğumuz çevre sağlığına ciddi zararlar vermektedir. Bu nedenle potansiyel özellikleri ve uygulama alanları açısından ümit vaaden nanoparçacıkların sentezi için alternatif bir sentez yöntemine ihtiyaç duyulmuştur. Bu ihtiyaç neticesinde

uygulama açısından basit, uygun maliyetli ve çevre dostu olması nedeniyle yeşil nanoteknoloji yöntemi geliştirilmiş ve son yıllarda büyük önem kazanmıştır [57].

Yeşil sentez olarak da bilinen yeşil nanoteknoloji en genel açıklamasıyla nanoparçacık gibi nanomateryallerin çeşitli biyoteknolojik teknikler yardımıyla bakteri, fungus, maya veya bitkilerin içinde yer aldığı biyolojik yollarla toksik kimyasal kullanmadan çevre dostu bir şekilde sentezlenmesidir.

Mikroorganizma ve bitki türleri kullanılarak gerçekleştirilen nanoparçacık sentezi çalışmaları biyolojik indirgenme temeline dayanmaktadır [58]. Bakteri, fungus, alg, virüs ve bitkiler kullanılarak geniş bir yelpazede nanoparçacık sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentez için kullanılan her canlının nanoparçacık sentezi sırasındaki biyokimyasal işlemlerde enzimler, şeker molekülleri, proteinler, polifenoller, aldehytler ve karboksil grupları aracılığıyla metal iyonlarının indirgenme/yükseltgenmesi gibi kendine has bir methodu bulunmaktadır [59].

Hızlı büyüme oranı, kolay yetiştirilmesi ve ortam koşullarında büyüebilmeleri sebebiyle bakteri, fungus ve bitkiler; sentez için en çok tercih edilen organizmalardır.

Bakteri aracılığıyla nanoparçacık sentezi

Bakteriler intraselüler (hücre içi) ve ekstraselüler (hücre dışı) olarak iki şekilde biyoakümülyasyon, biyomineralizasyon, kompleks oluşturma ve biyosorpsiyon mekanizmaları ile nanoparçacık sentezinde rol oynarlar. Bakterinin varlığında, organik bir madde olan elektron vericisinin elektron alıcısı olan metal iyonları çözeltisi ile etkileşimi meydana geldiğinde aerobik veya anaerobik koşullar altında nanoparçacıkların üretilmesi sağlanır [60, 61]. Ortamda bolca bulunmaları, ekstrem koşullara uyum sağlama yetenekleri, hızlı büyümeleri, büyüme koşullarının kolaylıkla kontrol edilebilmeleri, yetiştirilmelerinin ve manipüle edilmelerinin kolay olması ve ağır metalleri indirgeme kabiliyetleri sebebiyle çalışmalarda kullanılmak üzere ideal mikroorganizmalardandır [62].

Mikroorganizmalar, kendilerini ağır metal kalıntılarının toksisitesinden koruyan bir savunma mekanizması geliştirmiştir. Enzimatik oksidasyon, indirgenme ve soğurma, hücre içi ve dışında bulunan peptitler ya da polisakkaritlerin dahil olduğu çoklu mekanizmalar sayesinde nanoparçacık sentezini gerçekleştirmektedir. Canlı hücre içindeki genel biyolojik

savunma mekanizmaları, metal iyonlarını toksik olmayan metal tuzları ve metal nanoparçacıklar gibi toksik olmayan formlara indirgenmesini sağlarlar [63].

Bu mekanizmalara aşağıdaki örnekler verilebilir:

- Geçirgen zarlar boyunca metal iyonlarının atılımı [64],
- Enzimatik oksidasyon ve indirgeme [65],
- Metalik nanoparçacıkların plazma membranı dışında biriktirilmesi [66],
- Kemiosmotik süreçler, proton gradyanı ve ATP'ye bağımlı pompalar gibi atım pompası sistemleri [67].

Gümüş nanoparçacık (AgNP) oluşumda indirgeyici potansiyeli keşfedilen ilk bakteri *Pseudomonas stutzeri* AG259 suşu olmuştur. Bu çalışmada gümüş nitrat (AgNO_3) tuzu ile zenginleştirilmiş ortamda *P. stutzeri* bakterisi yetiştirilmiştir. Çalışma sonucunda gümüş iyonlarının toksik özelliklere karşı koruyucu mekanizma devreye girerek hücre içerisindeki gümüş iyonlarının elementel gümüşe (Ag^0) dönüşümünü sonucu AgNP oluşumu gözlemlenmiş ve 35 – 46 nm aralığında boyuta sahip nanoparçacıklar sentezlenmiştir [68].

Geçtiğimiz yıllarda bakteriler ve yapılarında bulunan bileşiklerden yararlanarak birçok nanoparçacık sentezi gerçekleştirilmiştir. Bakteri kullanılarak yapılmış nanoparçacık sentezi çalışmaları ve elde edilen nanoparçacıklarla ilgili örnekler Tablo 1.1'de verilmiştir.

Tablo 1.1. Bakteri kullanılarak gerçekleştirilen nanoparçacık sentez çalışması örnekleri.

İndirgeyici Ajan (Bakteri)	Parçacık	Sentez Şekli	Parçacık Morfolojisi	Boyut	Referans
<i>Bacillus subtilis</i> 16	Altın	İntraselüler	Sekizgen	5 – 25 nm	[69]
<i>Bacillus licheniformis</i>	Gümüş	Ekstraselüler	-	40 nm	[70]
<i>Bacillus megatherium</i>	Altın	Ekstraselüler	Küresel	0,5 – 2,5 nm	[71]
<i>Brevibacterium casei</i>	Gümüş Altın	Ekstraselüler	Değişken	5 – 100	[72]
<i>Lactobacillus sp.</i>	Titanyum dioksit	İntraselüler	Küresel	8 – 35 nm	[73]
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gümüş	Ekstraselüler	Küresel	160 – 180 nm	[74]
<i>Bacillus cereus</i>	Gümüş	İntraselüler	Küresel	20 – 40 nm	[75]
<i>Escherichia coli</i> (DH5a)	Gümüş	Ekstraselüler	-	10 - 100	[76]
<i>Rhodococcus pyridinivorans</i>	Çinko oksit	Ekstraselüler	Küre Benzeri ve Altıgen	100 – 120 nm	[77]
<i>Providencia sp.</i>	Selenyum	İntraselüler	Küresel	46 – 333 nm	[78]

Fungus aracılığıyla nanoparçacık sentezi

Yeni yeşil kimya temelli biyolojik sentez metotları geliştirmek üzere, araştırmacılar bakterilerin yanı sıra fungusların da farklı şekiller ve boyutlarda metal oksit nanoparçacıkları gibi birçok nanoparçacık sentezinde dikkate değer olduklarını keşfetmişlerdir. Fungusların sitoplazmik membranların, hücre duvarı ve iç yüzeyinde bulunan salgılanmış enzimler gibi indirgeyici özellikte maddelerle çevrili olduğu ve bu sayede nanoparçacık sentezinde önemli bir yerde oldukları bilinmektedir [79]. Bakterilerde olduğu gibi funguslarda da nanoparçacık sentezi, iyonların hücreye taşınması sonucu enzimlerin varlığında hücre dışı mekanizmalarla oluşabildiği gibi hücre dışı mekanizmalarla da oluşabilmektedir [35].

Fungus kullanılarak yapılmış nanoparçacık sentezi örnekleri ve elde edilen nanoparçacıklarla ilgili örnekler Tablo 1.2’de verilmiştir.

Tablo 1.2. Fungus kullanılarak gerçekleştirilen nanoparçacık sentez çalışması örnekleri.

İndirgeyici Ajan (Fungus)	Parçacık	Sentez Şekli	Parçacık Morfolojisi	Boyut	Referans
<i>Penicillium sp. (J3)</i>	Gümüş	Ekstraselüler	Küresel	10 – 100 nm	[80]
<i>Aspergillus fumigatus</i> TFR-8	Çinko oksit	Ekstraselüler	Altıgen ve Basık Küresel	3,8 nm	[81]
<i>Stererum hirsutum</i>	Bakır oksit	Ekstraselüler	Küresel	5 – 20 nm	[82]
<i>Pycnopus sp.</i> (HE792771)	Gümüş	Ekstraselüler	-	-	[83]
<i>Aspergillus terreus</i>	Selenyum	İntraselüler	-	500 nm	[60]
<i>Penicillium corylophilum</i>	Selenyum	Ekstraselüler	Küresel	29,1 – 48,9 nm	[84]
<i>Termitomyces heimii</i>	Kadmiyum sülfid	Ekstraselüler	Küresel	0,5 – 4 nm	[85]

Bitkiler aracılığıyla nanoparçacık sentezi

Mikroorganizmaların dışında, bitkilerde bulunan fitokimyasalların da verimli bir şekilde indirgenme ve stabilite göstermesi sebebiyle bitkiler de yaygın olarak nanoparçacık sentezinde kullanılmaktadır. Bitkilerin çoğu fenolik bileşikler, nitrojen bileşikleri, vitaminler, indirgeyici özellikte şeker molekülleri, terpenoidler ve antioksidan açıdan zengin

metabolitler içerir. Bu moleküllerle birlikte hidroksil ve karboksilik birçok grup içermesi nedeniyle bitkiler, nanoparçacık sentezinde kullanılmaktadır [86].

Bitkiler kullanılarak yakın zamanda yapılmış nanoparçacık sentezi örnekleri ve elde edilen nanoparçacıklarla ilgili örnekler Tablo 1.3’de verilmiştir.

Tablo 1.3. Bitkiler kullanılarak gerçekleştirilen nanoparçacık sentez çalışması örnekleri.

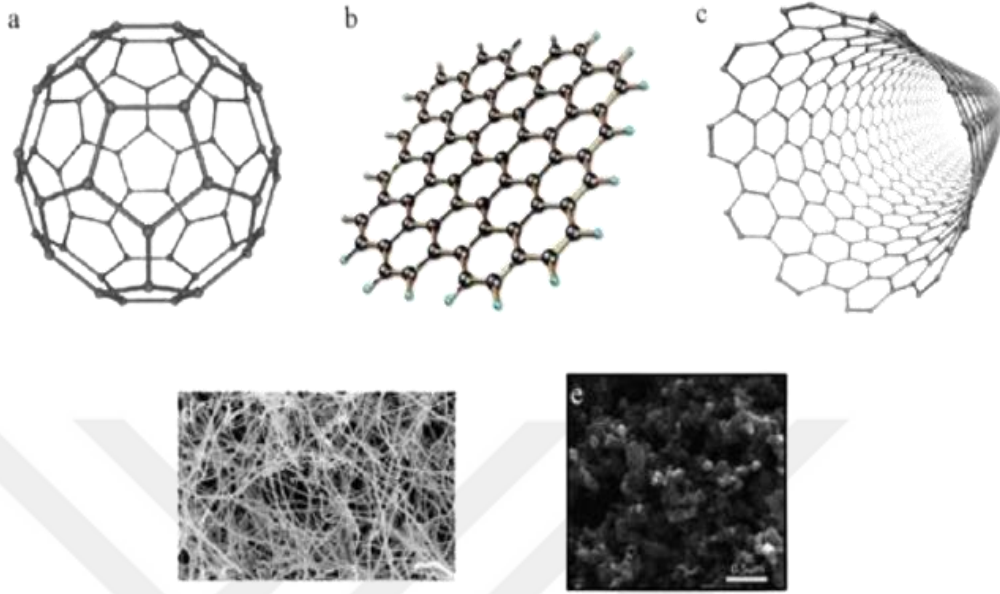
İndirgeyici Ajan (Bitki)	Parçacık	Parçacık Morfolojisi	Boyut	Referans
<i>Sargassum muticum</i>	Demir oksit	Kübik	18 nm	[87]
<i>Eichhornia crassipes</i>	Bakır oksit	Küresel	5 – 45 nm	[88]
<i>Ceropegia bulbosa</i>	Selenyum	Küresel	52,5 ± 3 nm	[89]
<i>Mangifera indica</i>	Titanyum dioksit	Pirinç tanesi ve küre benzeri şekli	18,1 ± 0,4 nm	[90]
<i>Abutilon indicum</i>	Krom oksit	-	17 – 42 nm	[91]
Çam ağacı poleni	Altın	Küresel	9,3 ± 2,9 nm	[92]
<i>Moringa oleifera</i>	Gümüş	Küresel	4 nm	[93]
Su sümbülü	Manyetit	Küresel	13,5 ± 3,7 nm	[78]

1.3.3. Nanoparçacıkların sınıflandırılması

Nanoparçacıklar; yapısal şekli, kimyasal ve boyutsal özellikleri dikkate alınarak birçok kategori altında incelenebilmektedir. Fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak en genel haliyle organik, inorganik ve karbon bazlı olmak üzere sınıflandırılır [34, 36].

1.3.3.1. Karbon bazlı nanoparçacıklar

Yapısı karbon atomundan (C) oluşan nanoparçacıkların incelendiği sınıftır. Fullerenler, grafen, karbon nanotüpler (CNT) ve karbon siyahı bu sınıfta yer almaktadır [36].



Şekil 1.8. Karbon bazlı nanoparçacık örnekleri: a) fullerenerler, b) grafen, c) karbon nanotüpler d) karbon nanofiberler ve e) karbon siyahı [36].

Fullerenler

Bucky küresi olarak da bilinen fullerenerler (C_{60}), küresel şekilli ve sp^2 hidridizasyonu ile bir arada tutulan karbon atomlarından oluşan bir karbon molekülüdür. Şekli, 20 altıgen ve 12 beşgenli bir futbol topuna benzemekle birlikte oldukça simetrik bir yapıya sahiptir. Bir reaktif oksijen türü olan tekli oksijenin foto üretiminde duyarlaştırıcı olarak davranabilme kabiliyetinden dolayı kan sterilizasyonu ve fotodinamik kanser tedavisinde kullanılırlar. Bunun yanı sıra, antiviral, antibiyotik ve antikanser ilaçlarının taşınmasında rol oynayabileceği düşünülmekte ve bu konuyla ilgili birçok çalışma yürütülmektedir [36, 94].

Grafen

Bir karbon allotropu olan grafen, iki boyutlu düzlemsel bir yüzeyde karbon atomlarından oluşan altıgen bir bal peteği şeklindeki ağ yapısıdır [36]. Grafen, grafen oksit (GO) ve indirgenmiş grafen oksitin (rGO) de içinde yer aldığı grafen ailesi, çeşitli pratik uygulamalarda potansiyeli olan fiziksel – kimyasal özellikleri nedeniyle keşfedilmelerinden bu yana kapsamlı bir şekilde incelenmektedir. Özellikle içme suyu talebinin artışıyla bu

nanomateryaller, su kirliliğine neden olan absorbanların önlenmesi, kontrolü ve azaltılması konusunda fizibilite ve uygunluk açısından değerlendirilmektedir [95].

Karbon nanotüpler

Fullerenlere benzer olarak, karbon nanotüpler sp^2 hibridizasyonunda iken aromatik yüzeye sahip karbon allotroplarıdır. Bu karbon allotropları, çaplarına bağlı olarak olağanüstü elektronik ve mekanik özelliklere sahip benzersiz bir nanoyapıdır. Morfolojisiyle bu özellikleri bir anda düşünüldüğünde, enerji depolama için cihazların geliştirilmesi, yüksek hassasiyet, seçicilik ve verimlilik ile absorpsiyon gibi birçok pratik uygulama için son derece çekici hale gelmiştir [95].

Karbon nanofiberler

Karbon nanofiberler (CNF) de yüksek yüzey alanı – hacim oranı, nano ölçekteki çapları ve mekanik özellikleri nedeniyle kimya endüstrisi, malzeme bilimi, kompozitlerin güçlendirilmesi ve enerji depolama alanlarında büyük potansiyellere sahip nanomateryallerdendir [96].

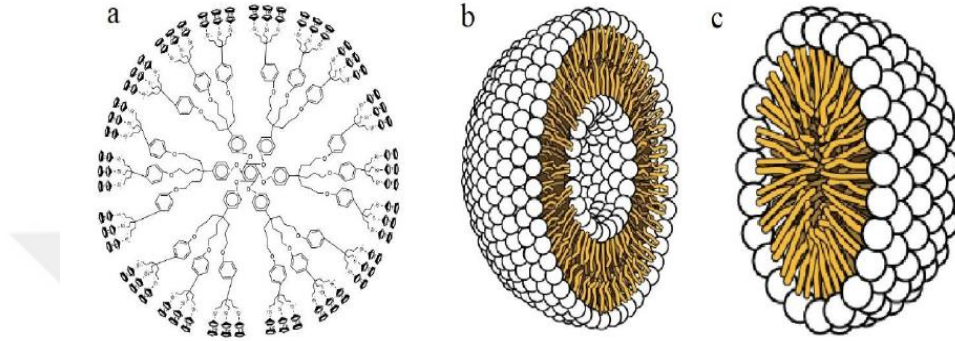
Karbon siyahı

Karbon nanoparçacıklar içerisinde yer alan bir diğer nanomateryal olan karbon siyahı, çap büyüklüğü 20 - 70 nm arasında olan, küre şekilli veya amorf olabilen bir materyaldir. Çapları 20 – 70 nm arasında değişse de sahip oldukları yüksek etkileşim nedeniyle kümeleşerek 500 nm büyüklüğünde agregatlar oluşturabilmektedir. [36].

1.3.3.2. Organik nanoparçacıklar

Denrimerler, miseller, lipozomlar ve ferritin, yaygın olarak bilinen organik nanoparçacık veya polimerlere örnektir. Bu nanoparçacıklar biyolojik olarak indirgenebilen, toksik olmayan nanomateryallerdir. Miseller ve lipozomlar gibi bazı çeşitleri, nanokapsüller olarak bilinen içi boş bir çekirdeğe sahiptir ve ısı, ışık gibi termal ve elektromanyetik radyasyona duyarlı olmaları sebebiyle ilaç taşınmasında ideal bir materyal oldukları

bilinmektedir. Organik nanoparçacıklar, vücudun belirli bölgelerine enjekte edilebildiklerinden ve etkili olduklarından dolayı ilaç dağıtım sistemleri gibi biyomedikal alanda en yaygın olarak kullanılan nanomateriyaldir [36].



Şekil 1.9. Organik nanoparçacıklar: a) dendrimerler, b) lipozomlar ve c) miseller [36].

İnorganik nanoparçacıklar

Yapısı karbon atomundan oluşmayan nanoparçacıklar, bu sınıfta incelenmektedir. Metal ve metal oksit nanoparçacıklar şeklinde iki alt sınıfa ayrılmaktadır.

Metal Nanoparçacıklar: Aşağıdan yukarı veya yukarıdan aşağıya nanoparçacık sentezi yöntemleri kullanılarak neredeyse bulunan bütün metallerden sentezlenebilen nano boyuttaki nanoparçacıklardır. Alüminyum (Al), kobalt (Co), kadmiyum (Cd), bakır (Cu), demir (Fe), altın (Au), kurşun (Pb), çinko (Zn) ve gümüş (Ag) ve çinko (Zn) nanoparçacık sentezinde büyük oranda kullanılan metallerdir. 10 – 100 nm gibi düşük boyutları, yüksek yüzey – hacim oranı, gözenek boyutu, yüzey yükü gibi özellikleri; kristal, amorf, küresel veya silindirik şekilleri bulunmaktadır.

Metal Oksit Nanoparçacıklar: Metal nanoparçacıkların özelliklerini değiştirmek ve geliştirmek için sentezlenen nanoparçacıklardır. Verimlilikleri ve etkinliği arttırmak amacıyla kullanılmaktadır. Alüminyum oksit (Al_2O_3), demir oksit (Fe_2O_3), seryum oksit (CeO_2), silikon dioksit (SiO_2), çinko oksit (ZnO), titanyum oksit (TiO_2) büyük ölçüde sentezleme çalışmaları olan nanoparçacıklardır. Metal benzerlerine kıyasla olağanüstü özelliklere sahiptir [36].

1.4. Selenyum Nanoparçacıklar (SeNP)

Selenyum (Se), antioksidan savunma sisteminde ve dolayısıyla metabolizmada rol alan glutatyon peroksidazlar (GPx), iyodotironin deiyodinazlar ve tioredoksin redüktaz (TrxR) gibi çeşitli enzimlerin yapısında bulunan (selenometiyonin, selenosistein formunda) bir mikro besin metalloiddir [97, 98]. Birden fazla biyolojik sürecin işleyişi için gerekli olup indirgeyici ve oksidatif etkileri nedeniyle endokrin, üreme, kardiyovasküler ve bağışıklık gibi birçok sistemde selenyumdan yararlanılmaktadır. Vücutta en yüksek miktarda selenyum içeren organ olan tiroit bezinde selenoproteinler aracılığıyla tiroksin hormonu aktif tiroit hormonu olan tri-iyodotironine dönüşmekte ve metabolik hızın, kemiklerin beslenmesini, besin gelişimini, kas kontrolü, kalp ve sindirim fonksiyonlarının düzenlenmesini desteklemektedir. Aynı zamanda GPx ve TrxR gibi enzimlerin yapısında kofaktör olarak görev yapmasıyla da büyümenin düzenlenmesinde rol oynamaktadır [99]. Antikanser uygulamaları gibi çeşitli tıbbi uygulamalarda etkisi araştırılmış ve bir besin takviyesi olarak prostat, akciğer, mide – kalp kanserleri dahil olmak üzere birçok kanser türünde riski azalttığı gösterilmiştir. Bunun yanı sıra selenyumla zenginleştirilmiş probiyotiklerin, patojenik bir bakteri olan *Escherichia coli*'nin in vitro ve in vivo büyümesini etkili bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. 2,4,6-tri-para-methoksifenil selenopirilyum klorür, 9-para-klorofeniloctahidroseleniksanthen ve perhidroselenoksanten gibi birçok organoselenyum bileşiği sentezlenmiş ve antibakteriyel etkisi olduğu saptanmıştır [100].

Selenyumun nanoparçacık haline getirilmesi, hem selenyumun terapötik faydalarından hem de nanoparçacıkların benzersiz özelliklerinden yararlanmak için umut verici bir yaklaşım olmuştur. Normal sağlıklı dokuda 2 – 6 nm olan damar çapları, tümör varlığında genişleyerek 100 – 800 nm boyuta ulaşabilmektedir. Bu gibi durumlarda 10 – 100 nm arasında olan bu nanoparçacıklar bu tümörlü dokulara nüfuz ederek ve tutunarak çevredeki sağlıklı dokuya zarar vermeden kanserli hücreleri seçici bir şekilde öldürebildiğine dair literatürde bazı çalışmalara rastlamak mümkündür. Buna ilaveten, yüksek yüzey – hacim oranı sayesinde geleneksel mikron boyuttaki parçacıklara kıyasla daha fazla aktif alan yoğunluğu sağladıkları da bilinmektedir [99]. Selenyum nanoparçacıklar, aynı zamanda sahip olduğu antibakteriyel, antiviral ve antioksidan aktivite gibi önemli biyolojik özellikleri

sayesinde dikkatleri üzerine çekmiştir. Fizikokimyasal tekniklerin yanı sıra; selenyum nanoparçacıkların sentezi için bakteri, mantar ve bitki özütlerinin kullanıldığı biyolojik sentez yöntemleri yeni, toksik olmayan, çevre – dostu ve temiz bir alternatif olarak gündeme gelmiştir [101]. Biyomedikal uygulamaların gelişmesi konusunda selenyum nanoparçacıklar, potansiyel vaatmektedir.

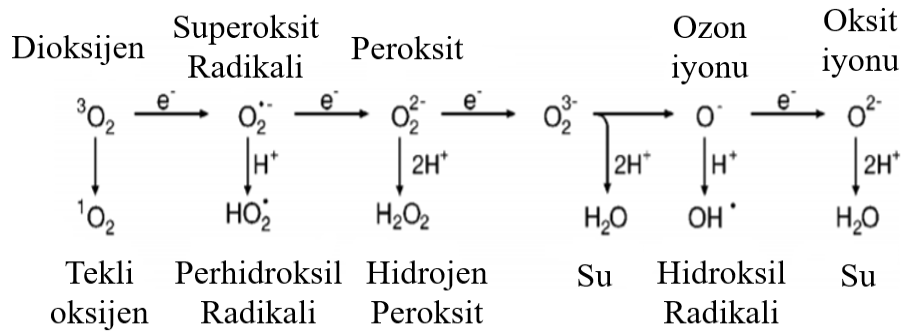
Selenyum nanoparçacıkların özellikle hastane patojenlerin olan *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* olmak üzere çeşitli patojenler üzerinde göstermiş oldukları antibakteriyel etkisi son zamanlarda iyi bir şekilde araştırılmıştır. Bu antimikrobiyal yeteneğin selenyum nanoparçacıkların hem bakteriyal hücreleri yani sitoplazmik membranı hem de deoksiribonükleik asiti (DNA) yıkması şeklinde olan ikili etki sebebiyle olduğu düşünülmektedir [99].

Selenyum nanoparçacıkları hastalıkların tanısında da önemli bir potansiyel göstermektedir. Ancak elementel selenyum ile doğal olarak oluşan selenyumun terapötik kanser yönteminde kullanılması hakkında toksisite ve biyoyararlanım konularında endişeler devam etmekte ve ileri çalışmalar gerektirmektedir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda selenyum nanoparçacıklarının birkaç kanser hücresinde kemoterapiye bağlı toksisite üzerinde gösterdiği anti - kanser özelliğin zamana ve doza bağlı olduğu gösterilmiştir [102]. Yapılan bir çalışmada, selenyum nanoparçacıkların LNCaP prostat kanserli hücre hattında kanserli hücrelerin büyümesini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise, selenyum nanoparçacıkların meme kanseri taşıyan farelere uygulandığında tümör hücrelerinin hacmini küçülterek hayatta kalma oranını arttırdığı gösterilmiştir [103].

1.5. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, metabolik aktivite sonucunda reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ile organizmanın bu türlerin eylemlerini antioksidatif koruma sistemleri vasıtasıyla önleme kapasitesi arasındaki denge eksikliği olarak tanımlanmaktadır [104]. Diğer bir deyişle, oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin yüksek oranda üretilmesi veya antioksidan koruma kabiliyetinin bozulmasıyla endojen sistemlerin hedef moleküllere yönelik oksidatif saldırıya karşı savaşma kabiliyetinin azalması olarak tanımlanmaktadır [105].

Aerobik yani yaşayabilmesi için oksijene ihtiyaç duyan organizmalarda oksijen (O_2), hücrenin temel işlevleri için elzem olan yüksek enerjili fosfatların oluşumunu ve kimyasal enerji üretimini sağlayan kompleks olaylar zincirinde mitokondriyal sitokrom oksidaz için son elektron alıcısı olarak görev yapmaktadır. O_2 , bu süreçte kademeli olarak bir dizi ara maddeye indirgenerek en son suya (H_2O) dönüşür. Bu kompleks olaylar sonucunda kararsız ve oldukça reaktif olan, lipid peroksidasyonunu indükleyen ve reaktif aldehytler oluşturan reaktif oksijen türlerinin yan ürün olarak oluşması ve birikimine neden olur. Reaktif oksijen türlerinin oluşum reaksiyonları Şekil 1.10'da özetlenmiştir:



Şekil 1.10. Moleküler oksijenin indirgenmesi sonucu reaktif oksijen türlerinin oluşumu [106].

Hidrojen peroksit (H_2O_2), tekli oksijen, süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) ve hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) gibi hem serbest radikal hem de serbest olmayan oksijenli moleküller; reaktif oksijen türleri (ROS) olarak tanımlanır. Serbest radikaller, hücresel solunum gibi aerobik süreçlerde, yoğun aktivite sırasında veya sigara dumanı, alkol, iyonlaştırıcı veya ultraviyole (UV) radyasyonları gibi dış etkenler, pestisitler ve ozon gibi kirletici veya toksinlerin etkisi sırasında oluşmaktadır. [105].

Organizmalar, aerobik solunum ve substrat oksidasyonu sonucunda oluşan bu reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerinden korunmada görevli antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. Reaktif oksijen türleri, düşük miktarlarda bulunduklarında transkripsiyon faktörlerini tetikleyerek hücre proliferasyonu, apoptoz ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde, büyüme, hücre farklılaşması gibi birçok biyokimyasal süreçlerde rol alan

hücre içi sinyal molekülü olarak da işlev görmektedir. Fakat aşırı üretildiklerinde antioksidan savunma sistemi, bu radikallerin ortadan kaldırılmasında yetersiz kalmakta ve bunun sonucunda da metabolik bozukluk ve hasara sebep olan oksidatif stres meydana gelmektedir [107]. Oksidatif streste serbest radikal kaynaklı hasarın nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok kronik sağlık sorununun patogenezin ve patofizyolojisinde rol oynadığı bilinmektedir [108].

1.6. Antioksidan Savunma Sistemleri

Biyolojik sistemleri serbest radikal toksisitesinden korumak için çeşitli hücreyel antioksidan savunma mekanizmaları, enzimatik ve enzimatik olmayan metabolik yollarla reaktif oksijen türlerinin üretimini kontrol altında tutarlar [109].

Başlıca antioksidan enzimler arasında süperoksit radikallerinde etkili olan süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px, EC 1.11.1.199) yer almaktadır. Lipitlerin oksidatif degradasyonunu ifade eden lipit peroksidasyonunun önlenmesi için, süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından ilk önce hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürülür. Ardından, katalaz enzimi (CAT) tarafından da su ve oksijene ayrıştırılarak hidroksil radikallerinin oluşumu önlenmektedir. Bunun yanı sıra, GSH-Px de peroksitleri ve hidroksil radikallerini oksidasyon ile toksik olmayan formlara dönüştürdüğü bilinen bir hücre için antioksidan enzimlerdendir [110]. Bunlara ek olarak, antioksidan savunma sistemlerinde enzimatik olmayan ve plazmada yer alan moleküller de bulunmaktadır. Askorbik asit, glutatyon (GSH), tokoferoller (vitamin E) ve karotenoidler, flavonoidler, enzimatik olmayan antioksidanlara örnek olarak verilmektedir [111].

1.7. Mikroalglerde Oksidatif Stres

Mikroalgler duyarlılıkları, her yerde bulunma ve kolayca kültüre edilebilmelerinden dolayı toksikoloji ve ekotoksikoloji alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Besin zincirinin başlangıç tropik seviyesini oluşturduğu için diğer sucul organizmalara kıyasla önemli bir konumdadır. Bununla birlikte mitokondri ve kloroplastlardan gelen sürekli elektron akışı ve metabolik faaliyetler, hücrelerini oksidatif hasara duyarlı hale getirmektedir

[112, 113]. Mikroalgler, tek hücreli mikroorganizmalar içerisinde yer almakta olup kloroplast barındırdıkları için kendi fotosentetik mekanizmalarına sahiptir. Mikroalgler, Dünya'daki fotosentetik aktivitenin büyük çoğunluğunu sağlayan organizmalardır ve Dünya biyokütlesinin %70'inden daha fazlası için gıda üretici konumundadır. Popülasyonlarını etkileyen herhangi bir olumsuz süreç veya madde, daha yüksek trofik seviyeler için de olumsuz sonuçlar doğuracaktır [114].

Oksijen zengin ortamlarda biyolojik sistemlerin varlığı, oksidatif stresin önemli bir bileşeni olan reaktif oksijen türlerini temizleyebilen, nötralize edebilen antioksidan mekanizmaların varlığını gerekli kılmıştır. Mikroalglerin reaktif oksijen türleri ile başa çıkmak için kullandığı mekanizmalar sucuk ve karasal organizmalara benzetmekle birlikte benzersiz adaptasyonlara sahip olduğu da bilinmektedir. Ancak yapılan çalışmalarla beraber reaktif oksijen türlerinin oluşumunun mikroalgler için de toksik olabildiğini göstermektedir.

Mikroalglerde bilinen en yaygın toksisite ve stres göstergeleri; büyüme hızı veya klorofil içeriğinde meydana gelen azalma ve morfolojik değişimdir. Yanıt molekülleri ve hücre içindeki reaktif oksijen türlerinde meydana gelen artışlar da oksidatif stresin mikroalglerdeki diğer göstergeleridir. Işık, metal ve kimyasallar kaynaklı mikroalglerde oksidatif stres meydana geldiği bilinmektedir [114, 115].

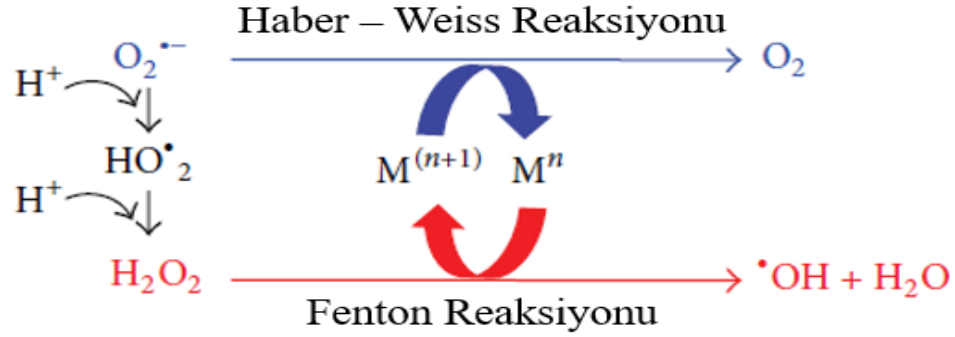
Işık, alglerde fotosentez için kritik öneme sahip olsa da ışık ve fotosentezin reaktif oksijen türlerinin oluşumuna katkı sağlamaktadır. Yapılan birçok çalışmada yüksek ışık yoğunluğu ve UV maruziyetine bağlı olarak reaktif oksijen türlerinin arttığı bildirilmiştir [116–118]. *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalgine yüksek ışık uygulaması yapılarak gerçekleştirilen bir çalışmada reaktif oksijen türlerinin oluşumunun ve fotosistem II mekanizmasında bozulmanın tetiklendiği rapor edilmiştir [119]. Türden türe farklılık gösterse de metaller de mikroalglerde çeşitli mekanizmalarla reaktif oksijen türlerinin oluşumunu tetiklemektedir [115, 120]. *Phaeodactylum tricornutum* alginin 5 ppm bakır (Cu) konsantrasyonuna duyarlı olduğu ve büyüme hızında düşüş görüldüğü bildirilirken *Dunaliella tertiolecta* alginde benzer düşüşü gösteren konsantrasyon 100 ppm'e kadar ulaşmıştır. Düşen büyüme hızının yanı sıra metal maruziyetine bağlı reaktif oksijen türlerinin oluşumu da yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur [121]. Mikroalglerde oksidatif stresin

oluşumuna neden olan bir diğer etmenin de herbisitler ve anti – fouling ajanlar olduğu da birçok çalışma ile gösterilmiştir [122].

1.7.1. Mikroalglerde oksidatif stresin biyolojik göstergeleri

1.7.1.1. Lipit peroksidasyonu

Prooksidan ve antioksidan seviyeleri arasında prooksidanlar tarafına doğru kayan dengesizlik sonucu hücre, doku ve organlarda hasar meydana gelmektedir. Yüksek seviyelerde serbest radikallerin veya reaktif oksijen türlerinin lipitlere doğrudan zarar verebileceği bilinmektedir [123]. Lipitleri önemli ölçüde etkileyen iki reaktif oksijen türü, hidroksil radikali ($\text{HO}^\cdot$) ve hidroperoksil (HO_2) radikalidir. Hidroksil radikali küçük, suda çözünür ve kimyasal olarak aktif oksijenin en reaktif radikalidir. Her bir hücrede saniyede yaklaşık 50 tane, her günde ise 4 milyon hidroksil radikali üretilmektedir. Hidroksil radikalleri, biyomoleküllere spesifik olmayan bir şekilde saldırır ve oksidatif hasara neden olurlar. Nörodejenerasyon, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi hücresel bozukluklarda rol oynarlar [124, 125]. Genel olarak biyolojik sistemlerdeki hidroksil radikalinin serbest demirin (Fe^{+2}) hidrojen peroksit (H_2O_2) ile reaksiyona girdiği Fenton reaksiyonu ve superoksitin Fe^{+3} ile etkileşimi sonucu Fe^{+2} üretimi ile oluşan Haber – Weiss reaksiyonu ve redoks döngüsü yoluyla oluştuğu bilinmektedir. Genellikle demir redoks döngüsü görülse de $\text{HO}^\cdot$ radikalinin oluşumundan Co, Cu ve Ni gibi geçiş metalleri de bu süreçte yer alabilmektedir. [126].



Şekil 1.11. Fenton ve Haber - Weiss Reaksiyonu (M harfi, geçiş metallerini temsil etmektedir.).

Hidroperoksil radikali (HO_2), lipid peroksidasyonunun metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır. Protonlanmış süperoksit olan hidroperoksil radikali, Fenton veya Haber-Weiss reaksiyonları yoluyla HO üretmek için demir veya bakır dahil olmak üzere aktif metallerle reaksiyona girebilen H_2O_2 oluşturur. HO_2 , süperoksit anyon radikalinden çok daha güçlü bir oksidandır ve çoklu doymamış fosfolipitlerin zincir oksidasyonunu başlatarak membran fonksiyonunun bozulmasına yol açabilir. Lipid peroksidasyonu sırasında oluşabilen aldehitlerden en mutajenik olanı malondialdehit (MDA) molekülüdür. Omega-3 ve omega-6 yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu için önemli bir biyolojik gösterge olan malondialdehit, tiyobarbitürik asit (TBA) ile kolayca reaksiyon gerçekleştirmekte ve bu yönüyle çalışmalarda lipid peroksidasyonunun belirlenmesinde kullanılmaktadır [127].

1.7.1.2. Hidrojen peroksit

Hidrojen peroksit, sinyal iletim yollarında rol oynamakta ve çoklu protein kinazların aktivitesini değiştirebilmektedir. Disülfür köprüleri oluşturmak ve metiyonin kalıntılarını oksitleyen enzimlerin ve transkripsiyon faktörlerinin aktivitesi modifiye etmektedir. ROS oluşumu, oksidatif stres hasarına giden yolda yalnızca tek bir süreçtir. Oluşan bu reaktif oksijen türlerinin yok edilmesi veya nötralizasyonu için birçok enzimatik ve enzimatif olmaya mekanizma bulunmaktadır. Bu mekanizmalarla homeostazı sürdürmek için hidrojen peroksit üretilmesi ve eliminasyonu sağlanmaktadır. Küçük miktarlarda süper

oksit dismutaz enziminin hasara karşı koruyabildiği bilinmektedir. Bununla birlikte, SOD aşırı eksprese edildiğinde, H_2O_2 veya OH radikallerinin üretimi, hücrenin onları yok etme kapasitesini aşabilmekte ve böylece oksidatif stresi tetikleyebilmektedir [128]. Buna ek olarak, nitrik oksit (NO) oluşumu teşvik ederek tirozin ve sistein kalıntılarının nitrosilasyonu yoluyla protein yapısını değiştirebilmektedir. Çünkü NO, mitokondride oksijen tüketimini arttırdığı için H_2O_2 oluşumu da iki katıya çıkar. Aynı zamanda NO, O_2 ile reaksiyona girerek oldukça reaktif bir tür olan peroksinitratı oluşturur [129, 130].

Hidrojen peroksit, proteinler üzerindeki etkisine ek olarak DNA hasarına neden olmakta ve transkripsiyon faktörlerinin gen promotorlarındaki düzenleyici elemanlara bağlanmasını değiştirirler. Bu karmaşık olaylar dizisi yoluyla H_2O_2 , gen ekspresyonunu aktive etmekte veya bastırmaktadır [131].

1.7.1.3. Klorofil içeriğinde değişiklik

Oksidatif stres sonucunda fotosentez metabolizmasının ve enzim dengesinin bozulduğu ve bunun sonucu olarak da klorofil sentezinde önemli ölçüde azalma görüldüğü birçok çalışmada gösterilmiştir [132, 133].

1.7.1.4. Büyüme hızında düşüş

Oksidatif stres göstergeleri arasında metabolizma ve enerji ile bağlantılı olanlardan da başarılı bir şekilde yararlanılmaktadır. Değişen çevre koşullarına yanıt olarak organizmaların bazal metabolizmasında, büyümesinde değişiklik meydana gelmektedir. Yapılan birçok çalışmada da mikroalglerde oksidatif stresin sonucu olarak büyüme hızında düşüş saptanmıştır [115, 134].

1.7.2. Oksidatif stres etmeni olarak UV – C ışınları

Antropojenik faaliyetler sonucu ozon tabakasının önemli derecede incilmesi, artan miktarda UV radyasyonunun dünya yüzeyine ulaşmasına neden olmakta ve canlı organizmalarda fizyolojik ve biyokimyasal birçok düzensizliğin etmeni durumundadır. Mikroalglerde büyüme hızının düşmesi ve metabolik süreçlerde değişiklik meydana

gelmesine neden olurlar. Bu iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalmanın en önemli sonuçlarından biri reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi olduğu bilinmektedir. Serbest radikallerden kaynaklanan lipid peroksidasyonu, hücrel elektrolitlerin hücreden sızmasına neden olarak hücrel bütünlüğe zarar vermektedir [135]. Büyüme hızında düşüş, biyokütle ve klorofil içeriğinde azalma, superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon redüktaz (GR), MDA (malondialdehit); mikroalglerde oksidatif stres için temel biyolojik göstergelerdir [115].

İyonlaştırıcı radyasyona maruziyet sonucunda aşırı üretilen en güçlü zararlı moleküllerden biri hidrojen peroksittir (H_2O_2) ve birçok kaynakta fotosentez inhibitörü olarak adlandırılır [136]. Katalaz ve çeşitli peroksidaz enzimleri, bu stresin metabolizmasında rol oynamaktadır. Bununla birlikte, foto-oksidatif stres altında katalaz enziminin aktivitesi, hidrojen peroksitin hücrel membranlardan yüksek oranda difüzyon potansiyeli ile birleştirildiğinde H_2O_2 birikimi daha da artmaktadır. Bu koşullar altında, peroksidazların artan aktiviteleri ile sağlanan koruma, foto-oksidatif stres için spesifiktir. Askorbat peroksidaz (APX) enzimi, H_2O_2 'yi detoksifiye etmek için savunma mekanizması tarafından kullanılan anahtar enzimdir [137]. APX enzimi (EC 1.11.1.11) , fotosentetik organizmalarda yaygın olarak bulunan antioksidan bir enzimdir. Oksidatif stres durumunda yanıt olarak arttığı ve askorbat – glutatyon döngüsünü sağlayarak H_2O_2 'nin toksik birikimini önlediği bilinmektedir [138].

Bu tez çalışmasının amacı, halofilik bir bakteri olan *Citricoccus* sp. bakterisi kullanılarak çevre dostu, kimyasal ve fiziksel metotlar gibi geleneksel yöntemlere alternatif olan yeşil sentez metodu ile selenyum nanoparçacık (SeNP) sentezlenmesi, sentezlenen nanoparçacıkların detaylı karakterize edilmesi ve model mikroorganizma olarak seçilen *Chlorella vulgaris* mikroalginde UV-C ışınlaması ile meydana gelen değişimlere etkisinin oksidatif stres parametreleri ile incelenmesidir.

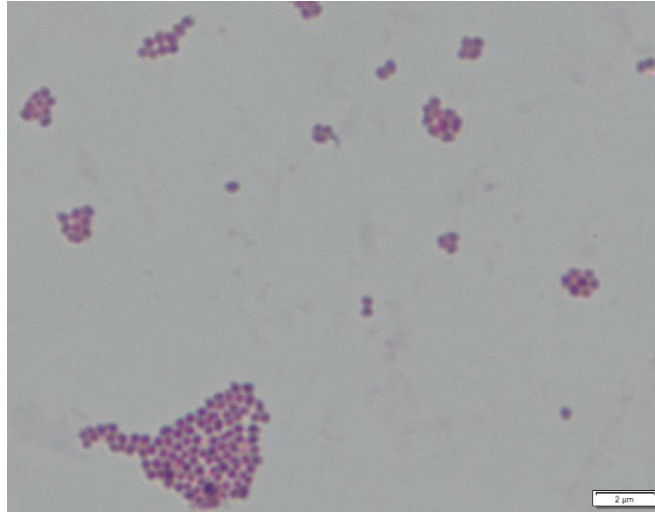
2. MATERYAL YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Selenyum nanoparçacık sentezi için kullanılan mikroorganizma

Selenyum nanoparçacık sentezi için Ankara Hacı Bayram Veli Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Nanosan Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan *Citricoccus* sp. bakteri suşu kullanılmıştır.

Citricoccus sp. bakteri stoğundan öze ile örnek alınarak steril edilmiş ve %3,5 sodyum klorür (NaCl, Fisher Scientific) içeren sıvı nutrient broth (NB, Merck) besiyerine inokülasyon yapılarak 30 °C 100 rpm’de orbital çalkalayıcı inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Her çalışma öncesi gram boyama yöntemi kullanılıp ışık mikroskopunda (Olympus - CX22LED) immersiyon objektifi (10x100) kullanılarak saflık kontrolü sağlanmıştır. Şekil 2.1’de görüntüleme yazılımı (cellSens) ile alınan gram boyama görüntüsü verilmiştir.



Şekil 2.1. *Citricoccus* sp. örneğinin ışık mikroskopunda görüntüsü (1000X büyütme).

2.1.2. Sentezlenen selenyum nanoparçacığın etkisinin araştırıldığı mikroorganizma

Bu çalışmada Boğaziçi Üniversitesi Çevre Bilimleri Enstitüsü Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Berat Z. HAZNEDAROĞLU'nun alg kültür koleksiyonundan alınan *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11B suşu kullanılmıştır. Bu suş, Beijerinck tarafından 1892 yılında Hollanda'nın Delft şehrinde bulunan tatlı sudan izole edilmiştir. Sistematiği olarak "Chlorophyta" isimli filuma dahil olan "Trebouciophyceae" sınıfı ve "Chlorellales" takımı içerisinde incelenmektedir.

Mikroalgin geliştirilmesinde içeriği Tablo 2.1'de verilen BG-11 besiyeri kullanılmıştır. BG-11 hazırlanmasında distile su içerisine tabloda belirtilen miktarda NaNO_3 eklendikten sonra pH 7'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika boyunca otoklav yardımıyla steril edilmiş ve besiyerinin oda sıcaklığına gelmesinin ardından önceden hazırlanmış steril stok solüsyonlarından gerekli miktarlar eklenmiştir. Besiyeri içerisine *C. vulgaris* inoküle edilerek 23 ± 2 °C sıcaklıkta orbital çalkalayıcıda 150 rpm çalkalama koşulunda inkübe edilerek geliştirilmiştir.

Tablo 2.1. BG-11 besiyeri içeriği ve bileşen miktarları [139].

Bileşenler	Miktar (g/L)
NaNO ₃	1,5
Stok A:	
H ₂ HPO ₄	0,04
Stok B:	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,075
Stok C:	
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,03
Stok D:	
Na ₂ CO ₃	0,02
Stok E:	
C ₆ H ₈ O ₇	6,00
C ₆ H ₈ FeNO ₇	6,00
Na ₂ EDTA	1,0
Stok A5:	
H ₃ BO ₃	2,86
	1,81
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,222
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,390
Na ₂ MoO ₄ .5H ₂ O	0,079
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,049
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	

2.2. Yöntem

2.2.1. Selenyum nanoparçacıkların yeşil sentez yoluyla elde edilmesi

2.2.1.1. Selenyum nanoparçacık oluşumu için optimum koşulların belirlenmesi

Optimum pH ve reaksiyon süresinin belirlenmesi

Selenyum nanoparçacık optimizasyonu sağlamak amacıyla pH 4 - 10 aralığında 12, 24, 48 ve 72 saat sürelerinde selenyum nanoparçacık sentezi araştırılmıştır.

50 mL erlen içerisinde %3,5 NaCl içeren nutrient broth besiyerine *Citricoccus* sp. inokülasyonu yapılarak 24 saat boyunca orbital çalkalayıcılı inkübatörde 30 °C 100 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda kültür ortamı 4000 rpm’de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatant elde edilmiştir.

pH 4 - 10 aralığında her pH grubu için 0,1 mM Na₂SeO₃ (sodyum selenit) içeren nutrient broth besiyerinden 100 mL’lik kahverengi cam şişelere 45 mL eklenmiş ve 1 M NaOH kullanılarak pH metre yardımıyla pH 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10’a ayarlanmıştır. Her deney grubu 3 paralel şeklinde çalışılmıştır. Her şişe içerisine 5 mL hücre içermeyen süpernatant eklenerek 37 °C 150 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. 12, 24, 48 ve 72. saatlerde örnek alınarak fotoğraflanmış ve mikropilaka okuyucuda (BMG Labtech Spectrostar®^{Nano}) 200-1100 nm aralığında tarama yapılarak absorpsanları okunmuştur.

Optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi

Optimum pH ve reaksiyon süresinin belirlenmesinin ardından optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi amacıyla oda sıcaklığı (23 ± 2 °C), 30 °C ve 37 °C sıcaklık değerlerinde selenyum nanoparçacık sentezi araştırılmıştır.

50 mL erlen içerisinde %3,5 NaCl içeren nutrient broth besiyerine *Citricoccus* sp. inokülasyonu yapılarak 24 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde 30 °C 100 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda kültür ortamı 4000 rpm’de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatant elde edilmiş ve elde edilen süpernatant, biyokütleden (pellet) ayrı bir falkon tüpe alınmıştır.

Oda sıcaklığı, 30°C ve 37 °C deney grupları için 1 mM Na₂SeO₃ (sodyum selenit) içeren nutrient broth besiyerinden 100 mL’lik 3 adet kahverengi cam şişelere 45 mL eklenmiş ve 1 M NaOH kullanılarak pH metre yardımıyla pH 8’e ayarlanmıştır. Her şişe içerisine 5 mL hücre içermeyen süpernatant eklenmiş ve oda sıcaklığı deney grubu orbital çalkalayıcıya, 30 ve 37 °C deney grupları ise orbital çalkalayıcılı inkübatörde istenen sıcaklığa ayarlanarak 24 saat boyunca 150 rpm çalkalama hızı ile inkübasyona bırakılmıştır. 24. saat inkübasyon sonunda her deney grubundan örnekler alınarak fotoğraflanmış ve UV-Vis spektrofotometre

(Shimadzu UV Visible Spectrophotometer UV-mini-1240) cihazında 200-1100 nm aralığında tarama yapılarak absorbensları okunmuştur.

Optimum çalkalama hızı (rpm) değerinin belirlenmesi

Optimum pH, reaksiyon süresi ve sıcaklık değerinin belirlenmesinin ardından optimizasyonun son aşamasında optimum çalkalama hızı (rpm) değerinin belirlenmesi amacıyla 0, 100 ve 150 rpm çalkalama hızlarında selenyum nanoparçacık sentezi araştırılmıştır.

50 mL erlen içerisinde %3,5 NaCl içeren nutrient broth besiyerine *Citricoccus* sp. inokülasyonu yapılarak 24 saat boyunca orbital çalkalayıcılı inkübatörde 30 °C 100 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda kültür ortamı 4000 rpm’de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatant elde edilmiş ve elde edilen süpernatant, biyokütleden (pellet) ayrı bir falkon tüpe alınmıştır.

0, 100 ve 150 rpm deney grupları için 0.1 mM Na₂SeO₃ (sodyum selenit) içeren nutrient broth besiyerinden 100 mL’lik 3 adet kahverengi cam şişelere 45 mL eklenmiş ve 1 M NaOH kullanılarak pH metre yardımıyla pH 8’e ayarlanmıştır. Her şişe içerisine 5 mL hücre içermeyen süpernatant eklenmiş ve orbital çalkalayıcılı inkübatörde 37 °C’de çalkalama hızı 0 rpm, 100 rpm ve 150 rpm’e ayarlanarak her deney grubu 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24. saat inkübasyon sonunda her deney grubundan örnekler alınarak fotoğraflanmış ve UV-Vis spektrofotometre cihazında 200 - 1100 nm aralığında tarama yapılarak absorbensları okunmuştur.

Optimum değerlerde ölçek büyütme ile selenyum nanoparçacıkların sentezi

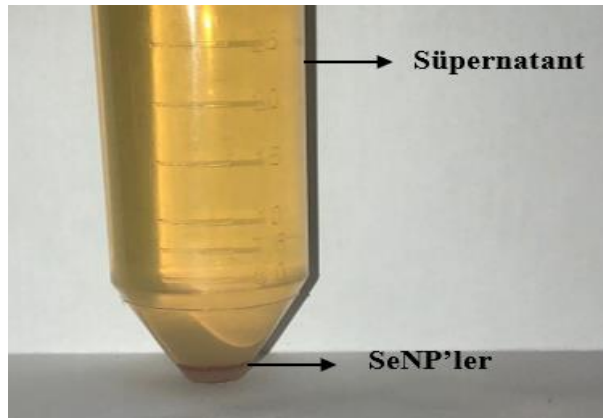
Her şişe başına 45 mL Na₂SeO₃ ve nutrient broth karışımının pH’ı optimum olarak belirlenen 8’e ayarlanarak üzerine 5 mL bakteri süpernatantı eklenmiştir. 37 °C 150 rpm’de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. İnkübasyona bırakılan süpernatant - Na_2SeO_3 karışımları.

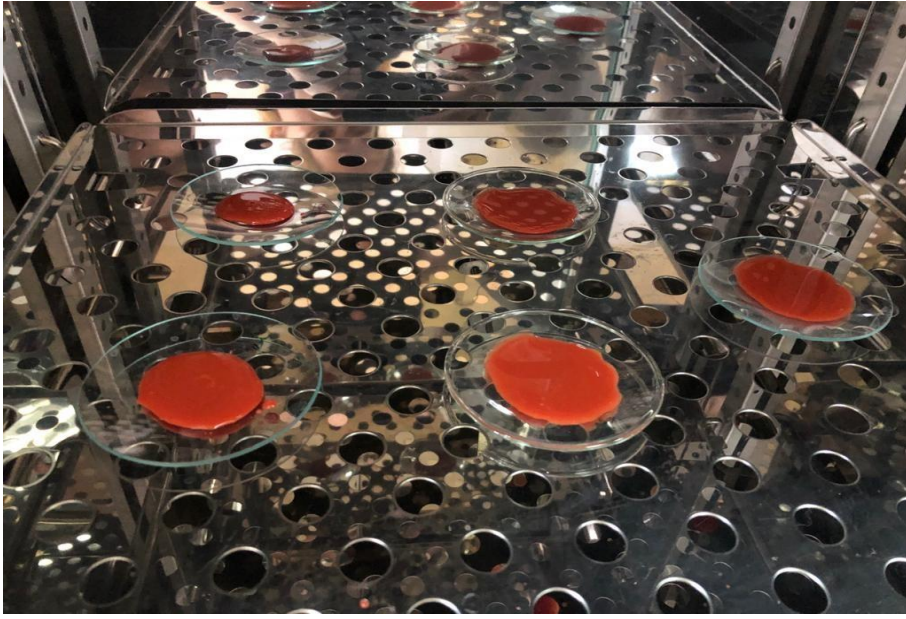
2.2.1.2. Elde edilen selenyum nanoparçacıkların toz haline getirilmesi

24 saat inkübasyon sonucunda oluşan selenyum nanoparçacıkları toz formuna getirmek için ilk önce besiyerinden ayırmak amacıyla 4000 rpm’de 30 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucunda Şekil 2.3’te görüldüğü şekilde süpernatant ve pellet şeklinde dibe çöken selenyum nanoparçacıklar elde edilmiştir.



Şekil 2.3. Santrifüj sonucunda elde edilen süpernatant ve selenyum nanoparçacıklar.

Süpernatant atılarak dipte kalan selenyum nanoparçacıkların üzerine distile su eklenip vortekslenerek 4000 rpm’de 30 dakika boyunca santrifüjlenerek yıkama sağlanmıştır. Üst kısımda kalan su içeriği atılarak selenyum nanoparçacık üzerine tekrar distile su eklenerek 4000 rpm’de 15 dakika boyunca ikinci yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve yıkama sonunda üstte kalan kısım atılarak dibе çöken selenyum nanoparçacıklar, saat camı üzerine alınarak 28 °C’ye ayarlanmış fırında Şekil 2.4’te de görülebileceği şekilde kurutmaya bırakılmıştır. 24 saat sonunda saat camında biriken toz halindeki selenyum nanoparçacıklar toplanmıştır.



Şekil 2.4. 28 °C’lik fırında kurumaya bırakılan selenyum nanoparçacıklar.

2.2.1.3. Selenyum nanoparçacıkların karakterizasyonu

Optimizasyon deneyleri sırasında selenyum nanoparçacık oluşumunu doğrulamak amacıyla yapılan dinamik ışık saçılımı (DLS) analizi ve spektrofotometrik analizlerinin yanı sıra Zeta Potansiyeli (ζ) Ölçümü, Zayıflaştırılmış Toplam Yansıma - Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (ATR FT-IR), Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM), Tranmisyon Elektron Mikroskopisi (TEM) ve Enerji yayımlı X-Işını Analizi (EDX) ile karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Zeta potansiyelinin ölçülmesi

Selenyum nanoparçacıkların yüzey yükünün belirlenmesi amacıyla zeta potansiyeli, Malvern Zetasizer Nano ZSP cihazı kullanılarak 25 °C’de ultra saf suda ölçülmüştür. 1 mg/mL nanoparçacık solüsyonunun elektroforetik mobilitesi analiz edilerek elde edilen data Helmholtz-Smoluchowski denklemi kullanılarak zeta potansiyeli değerine dönüştürülmüştür.

Transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) analizi

Selenyum nanoparçacıkların şekli ve boyutunun belirlenmesi amacıyla SeNP’lerin kolloidal solüsyonu bakır TEM gridlerine damlatılmış ve hızlanan voltajda (100 – 200 keV) ölçümler alınmıştır.

Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ve enerji yayımlı X-ışını (EDX) analizi

Nanoparçacıkların morfolojisi SEM ile görüntülenmiş ve EDX spektroskopisi ile nanoparçacık yapısındaki selenyum değerlendirilmiştir. SEM ve EDX analizi, sırasıyla 10 ve 20 keV elektron ışını kullanılarak Tescan GAIA 3 FIB-SEM mikroskobu ile yapılmıştır. Bunun için nanoparçacıklar silikon plakalarına konulmuştur. Hassas Yüzey Aşındırma ve Kaplama Sistemi (Leica EM ACE600, Almanya) kullanılarak oda sıcaklığında kurutulduktan sonra 6 nm kalınlığında altınla kaplanmıştır.

Zayıflatılmış toplam yansıma – fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR - FT-IR) analizi

SeNP’lerin yapısal ve kimyasal karakterizasyonları Nicolet TM ISTM 50 Spektrometre (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile ATR tekniği kullanılarak FT-IR analizi ile incelenmiştir. Analiz için, nanopartikül süspansiyonu önce ultra saf su ile santrifüj yoluyla saflaştırılmış ve ardından liyofilize edilmiştir. *Citricoccus* sp. bakterisi, süpernatant ve optimize edilmiş selenyum nanoparçacıkların spektrumları 4000 ile 600 cm⁻¹ arasında havaya karşı 4 cm⁻¹ çözünürlükte 64 tarama ile transmisyon modunda kaydedilmiş ve fonksiyonel gruplar yorumlanmıştır.

Biyolojik selenyum nanoparçacıkların antibakteriyel aktivitesinin araştırılması

Sentezlenen SeNP'lerin antibakteriyel aktivitesi iki indikatör tür olarak Gram (+) *Staphylococcus aureus* (ATCC 23213), Gram (-) *Escherichia coli* (ATCC 25922) bakterileri kullanılarak Kirby-Bauer Disk Difüzyon Testi kullanılarak yapılmıştır. Her bir bakteri suşu sıvı besiyerinde aktifleştirildikten sonra 100 µL alınarak nutrient agar besiyerine dragalski özesi yardımıyla yayıldıktan sonra %5 SeNP emdirilmiş diskler agarların üzerine konulmuştur. Agarlar 24 saat boyunca 37 °C'lik inkübatörde inkübasyona bırakılmış ve 24 saat sonunda görüntüleri alınmış ve zon oluşma durumu değerlendirilmiştir.

2.2.2. Sentezlenen selenyum nanoparçacığının *Chlorella vulgaris* mikroalginde oksidatif strese etkilerinin araştırılması

2.2.2.1. Ön hazırlık

Kullanılacak SeNP konsantrasyonunun belirlenmesi

C. vulgaris mikroalginde meydana getirilecek UV'ye bağlı stres üzerinde etkilerini belirlemek amacıyla; *C. vulgaris* taze besiyerine inoküle edilmiş ve orbital çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. UV-spektrofotometre ile 680 nm'de optik yoğunluk takibi yapılmış ve optik yoğunluğun çalışma için optimum hale geldiği 10. gün deney düzeneği başlatılmıştır.

Aktifleştirilmiş *C. vulgaris* kültüründen 15'er mL steril cam petrilere alınmış ve manyetik karıştırıcıda karıştırılarak 1 saat boyunca 254 nm, 15W özellikte UV-C lambası (OSRAM HNS 15W G13) ile UV maruziyetine bırakılmıştır.

Maruziyet sonunda; cam petrilerdeki kültürden örnek alınarak taze BG-11 besiyerine, selenyum nanoparçacık etkisini incelemek üzere deney grupları için de 0,1 ppm; 10 ppm ve 100 ppm SeNP içeren BG-11 besiyerine inokülasyon yapılmıştır. Aynı zamanda UV etkisi olmadan SeNP etkisini incelemek üzere de UV maruziyetine bırakılmamış *C. vulgaris* kültüründen örnek alınarak taze BG-11 besiyerine, 0,1 ppm, 10 ppm ve 100 ppm SeNP içeren BG-11 besiyerine teker teker inokülasyon yapılmıştır. Selenyum nanoparçacık konsantrasyonunun *C.vulgaris* gelişimi üzerinde etkili olduğu zamanı belirleyebilmek

amacıyla da 4, 6 ve 11. günlerde UV-spektrofotometre ile 680 nm’de optik yoğunluk takibi ve thoma labı ile ışık mikroskobunda hücre sayımı yapılmış ve 1 mL kültürde bulunan hücre sayısı hesaplanmıştır.

UV maruziyet süresinin belirlenmesi

C. vulgaris mikroalginde UV-C ışınlama süresine bağlı olarak oksidatif stres ve büyüme kinetiğinde oluşacak değişimleri gözlemlemek üzere gelişmiş *C. vulgaris* kültüründen her bir deney grubu için 15’er mL alınarak steril cam petrilere konulmuş ve çoklu manyetik karıştırıcıda karıştırılarak 254 nm UV-C lambası ile 20 dakika, 1 saat, 3 saat ve 6 saat UV-C maruziyetine bırakılmıştır.

Maruziyet sonunda; cam petrillerdeki kültürden örnek alınarak taze BG-11 besiyerine inokülasyon yapılmış ve 3, 7 ve 14. günlerde UV-spektrofotometre ile 680 nm’de optik yoğunluk (OD₆₈₀) takibi ve thoma labı ile ışık mikroskobunda hücre sayımı yapılmış ve 1 mL kültürde bulunan hücre sayısı hesaplanarak karşılaştırılmıştır.

2.2.2.2. Sentezlenen selenyum nanoparçacıkların *Chlorella vulgaris* mikroalgi üzerinde oksidatif strese etkisinin belirlenmesi

C. vulgaris mikroalginde 6 saat UV-C ışınlaması maruziyetine bağlı olarak gelişen oksidatif stres üzerinde etkilerini belirlemek amacıyla; *C. vulgaris* taze besiyerine inoküle edilmiş ve orbital çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. UV-spektrofotometre ile 680 nm’de optik yoğunluk takibi yapılmış ve optik yoğunluğun çalışma için optimum hale geldiği ekspanensiyal büyüme fazına denk gelen 10. gün deney düzeneği başlatılmıştır.

Gelişmiş *C. vulgaris* kültüründen 15’er mL alınarak steril cam petrilere alınmış ve manyetik karıştırıcıda karıştırılarak 6 saat boyunca 254 nm, 15W özellikte UV-C lambası ile UV maruziyetine bırakılmıştır.

Maruziyet sonunda; cam petrillerdeki kültürden örnek alınarak UV maruziyetinin etkisini gözlemlemek amacıyla *C. vulgaris* – UV deney grubu için taze BG-11 besiyerine, selenyum nanoparçacık etkisini incelemek üzere de *C. vulgaris* – UV – SeNP_{0,1ppm} deney grubu için 0,1 ppm SeNP içeren BG-11 besiyerine inokülasyon yapılmıştır. Kontrol grubu

olan *C. vulgaris* için de taze BG-11 besiyerine inokülasyon yapılmış ve orbital çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır.

Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarının belirlenmesi

0,2 g pellet, 3 mL %0,1 trikloroasetik asit (TCA, 4°C) içerisinde homojenize edilmiş ve hemen ardından 15 dakika boyunca 4100 rpmde santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatant, miktar tayini için kullanılmıştır. 0,5 mL süpernatanta 0,5 mL 0,1 M Tris-HCl (pH 7,6) ve 1 mL 1M KI (potasyum iyodür) eklenerek karıştırılmış ve 350 nm dalga boyunda absorbans değerleri belirlenmiştir [140]. Standart çözeltiler hazırlanarak çizilen absorbans (kalibrasyon) grafiği kullanılarak H₂O₂ miktarı hesaplanmıştır.

Malondialdehit (MDA) değerlerinin belirlenmesi

0,2 g pellet, 3 mL %0,1 TCA (4°C) içerisinde homojenize edilmiş ve hemen ardından 15 dakika boyunca 4100 rpmde santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatant, miktar tayini için kullanılmıştır. 0,5 mL süpernatanta 0,5 mL pH 7,6 0,1 M Tris-HCl (pH 7,6) ve 1 mL TCA – TBA çözeltisi (%15 trikloroasetik asit – %0,375 w/v tiyobarbitürik asit) eklenerek karıştırılmış ve 30 dakika boyunca sıcak su banyosunda (95 °C) bekletilmiştir. Karışım içerisindeki sıvıda asılı kalabilecek bulanıklığı gidermek için karışım 4100 rpm’de 15 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve elde edilen süpernatantlarda bulunan MDA miktarı, 532 ve 600 nm dalga boyunda ölçülerek 155 mM⁻¹cm⁻¹ ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır [140].

Optik yoğunluk (OD₆₈₀) ve hücre dansitesinin belirlenmesi

Alg kültürlerinin büyümesinde meydana gelen değişimi belirlemek amacıyla 1, 3 ve 7. günlerde kültürlerden örnek alınarak UV-Vis spektrofotometre ile 680 nm’de optik yoğunluk (OD₆₈₀) değerine tekabül eden absorbans değerleri okunmuş ve takibi yapılmış ve thoma labı ile ışık mikroskobunda hücre sayımı yapılmış ve 1 mL kültürde bulunan hücre sayısı hesaplanmıştır.

Klorofil (a+b) miktarının belirlenmesi

Örnekler %80'lik sulu aseton (Merck) çözeltisi ile muamele edilmiştir. Bu çözelti ayrıca 2,5 mM sodyum fosfat pH 7,8 tamponu da içermekte olup bu sayede klorofilin faeofitinlere dönüşmesi, en aza indirilmektedir. Alg kültüründen 2,5 mL alınarak 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan pellet üzerine %80'lik sulu aseton çözeltisinden 5 mL eklenmiştir. Örneklerin iyice ezilmesi sağlanarak klorofil, maksimum bir şekilde ekstrakte edilmiştir. Hücre artıklarını uzaklaştırmak amacıyla tüpler tekrardan 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant klorofil tayini için kullanılmıştır. Üst sıvının optik yoğunluk değeri 646,6 nm ve 663,6 nm'lik dalga boylarında okutularak μg klorofil / ml örnek cinsinden aşağıdaki formüle göre klorofil miktarları hesaplanmıştır [141]:

$$\text{Klorofil (a+b)} = 17,76 \times A_{646,6} + 7,37 \times A_{663,6}$$

İstatistiksel analizler

İstatistikler IBM SPSS Statistics (İstatistik Paketi) Sürüm 26 ile analiz edilmiştir. Sonuçlar, ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğunun değerlendirilmesinde Shapiro Wilk Testi, ardından varyans homojenliği değerlendirilmesinde Levene Varyansların Homojenliği Testi kullanılmıştır. Normal dağılım ve varyansların homojenliğinin belirlenmesinin ardından veriler, Tek Tönlü Varyans Analizi (ANOVA) kullanılarak analiz edilmiştir. En az iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu tespit edilen gruplar arasındaki farklılığın değerlendirilmesinde Post-hoc Tukey HSD Testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri $p < 0,05$ kabul edilmiştir

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Selenyum Nanoparçacık Sentezi

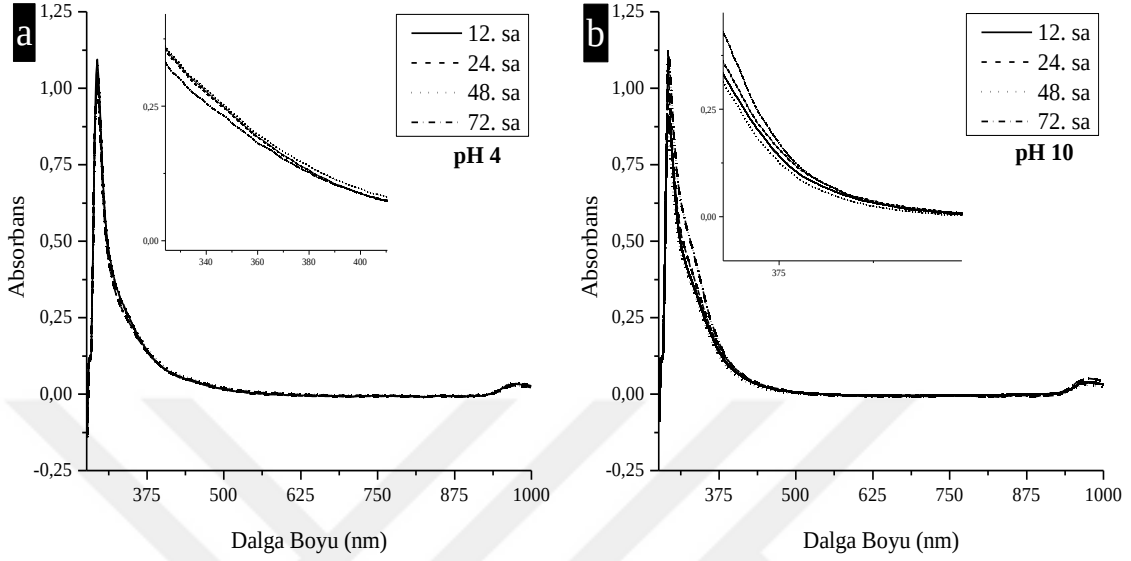
3.1.1. Selenyum nanoparçacık oluşumunda optimum koşullarının belirlenmesi

3.1.1.1. Optimum pH değeri ve reaksiyon süresinin belirlenmesi

Mikroorganizmaların biyokimyasal aktiviteleri ile pH ve sıcaklık gibi çevresel faktörlerin etkileşiminin, nanoparçacıkların oluşumunu, boyutunu ve morfolojisini etkilediği yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [142]. Bu nedenle parçacıkların üretim optimizasyonunu sağlamak amacıyla nanoparçacık sentezi için optimum pH ve reaksiyon süresi incelenmiştir. 4-10 pH aralığında 12, 24, 48 ve 72 saat sürelerinde nanoparçacık sentezi araştırılmış ve elde edilen veriler incelenmiştir.

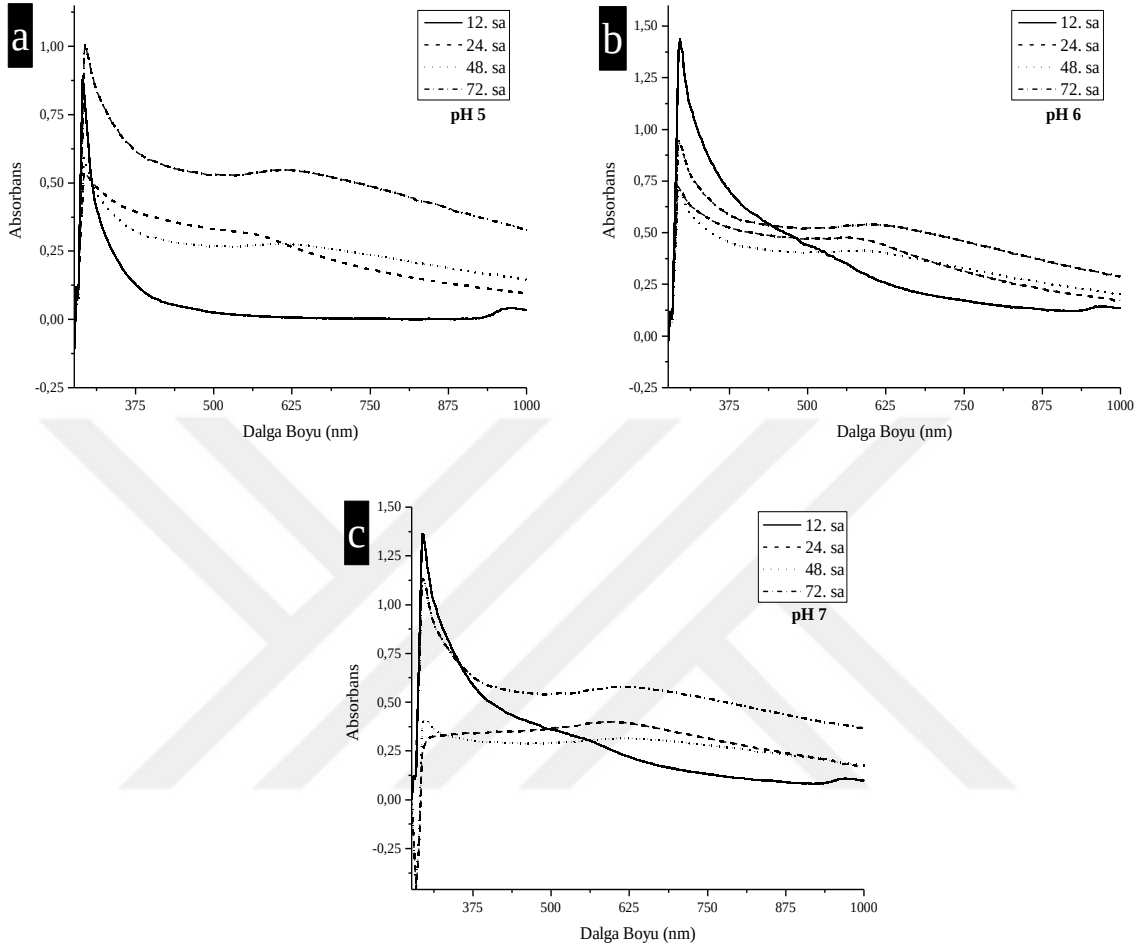
Optimum pH değerinin belirlenmesi

Çalışmada denenen en düşük pH değeri olan pH 4 ve en yüksek pH değeri olan pH 10'da selenyum nanoparçacık oluşumunda gözlemlenen kiremit kırmızısı renk değişimi görülmemiş olup UV-Vis spektrofotometre taramasında da karakteristik piklere rastlanmamıştır. Bu pH değerlerinde elde edilen spektrum Şekil 3.1'de verilmiştir. En düşük ve en yüksek pH değerlerinde SeNP oluşmamasının nedeni, düşük ve yüksek sodyum hidroksit (NaOH) seviyelerinin selenyum nanoparçacık oluşumunu engellediği şeklinde açıklanmaktadır [143].



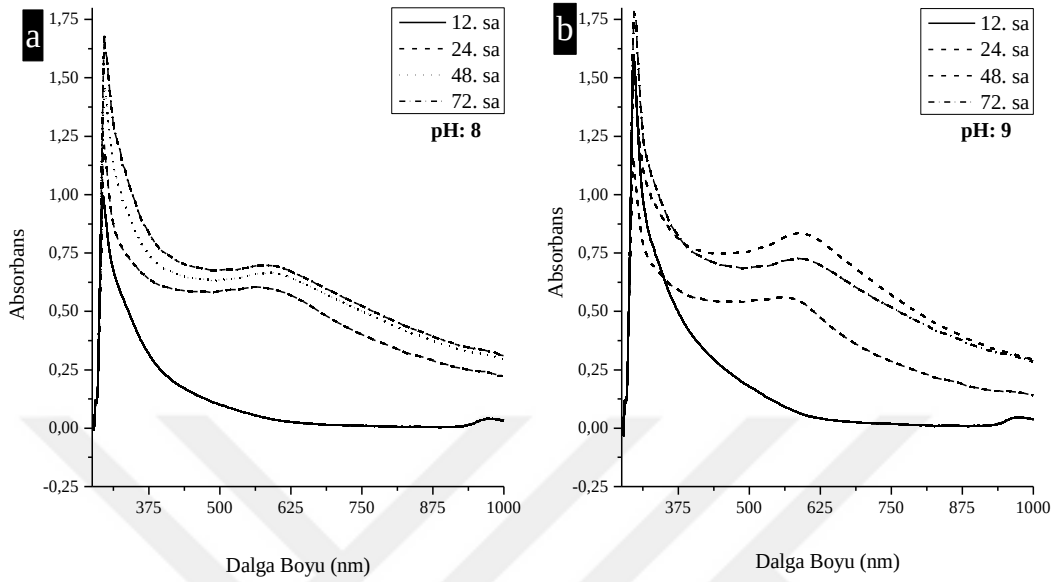
Şekil 3.1. (a) pH 4 ve (b) pH 10 değerlerinde Na_2SeO_3 - *Citricoccus* sp. süpernatant içeren besiyerinin zamana karşı (12 - 24 - 48 ve 72. sa) UV-Vis absorpsiyon spektrumu. Grafik içinde verilen küçük resimde büyütölüş ölçekte SeNP spektrumu verilmiştir.

Şekil 3.2’de pH 5, pH 6 ve pH 7 değerlerinde Na_2SeO_3 - *Citricoccus* sp. süpernatant içeren besiyerinin zamana karşı (12 - 24 - 48 ve 72. sa) UV-Vis absorpsiyon spektrumu verilmiştir. pH değeri arttıkça, renk değişimi belirginleşmiş ve karakteristik pikler görülmüştür.



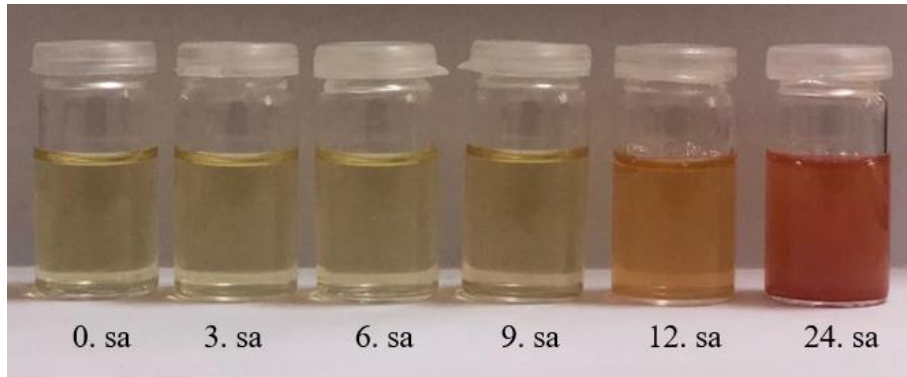
Şekil 3.2. (a) pH 5 (b) 6 ve (c) pH 7 değerlerinde Na_2SeO_3 - *Citricoccus* sp. süpernatant içeren besiyerinin zamana karşı (12 – 24 - 48 ve 72. sa) UV-Vis absorpsiyon spektrumu.

Şekil 3.3'te pH 8 ve pH 9 değerlerinde Na_2SeO_3 – *Citricoccus* sp. supernatant içeren besiyerinin zamana karşı (12 – 24- 48 ve 72 sa.) UV-Vis absorpsiyon spektrumu verilmiştir. Her iki pH grubunda da sarıdan tuğla kırmızısına doğru renk değişimi oluşmuş ve karakteristik pikler pH 8 ve pH 9'da net olarak elde edilmiştir.



Şekil 3.3. (a) pH 8 ve (b) pH 9 değerlerinde Na_2SeO_3 - *Citricoccus* sp. süpernatant içeren besiyerinin zamana karşı (12 – 24 - 48 ve 72. sa) UV-Vis absorpsiyon spektrumu.

Bu analizde pH 8 için eş zamanlı olarak alınan örneklerdeki renk değişimleri fotoğraflar ile Şekil 3.4'te gösterilmiştir. Şekil 3.4'de renk değişimlerinden de görüldüğü üzere pH 8'de sarıdan tuğla kırmızısına doğru belirgin renk değişimi görülmüş ve parçacık oluşumun UV-Vis analizleri ile doğrulanmasıyla bu çalışmada pH 8, SeNP sentezi için optimum pH olarak belirlenmiş ve 500 - 700 nm aralığında görülen parçacık sentezi kaynaklı yüzey plazmon rezonans (SPR) bandı oluşumunun, pH'a bağlı olduğu saptanmıştır.



Şekil 3.4. Optimum pH olarak belirlenen pH 8'de farklı reaksiyon sürelerinde (0, 3, 6, 9, 12 ve 24 saat) gerçekleşen kademeli renk değişimi.

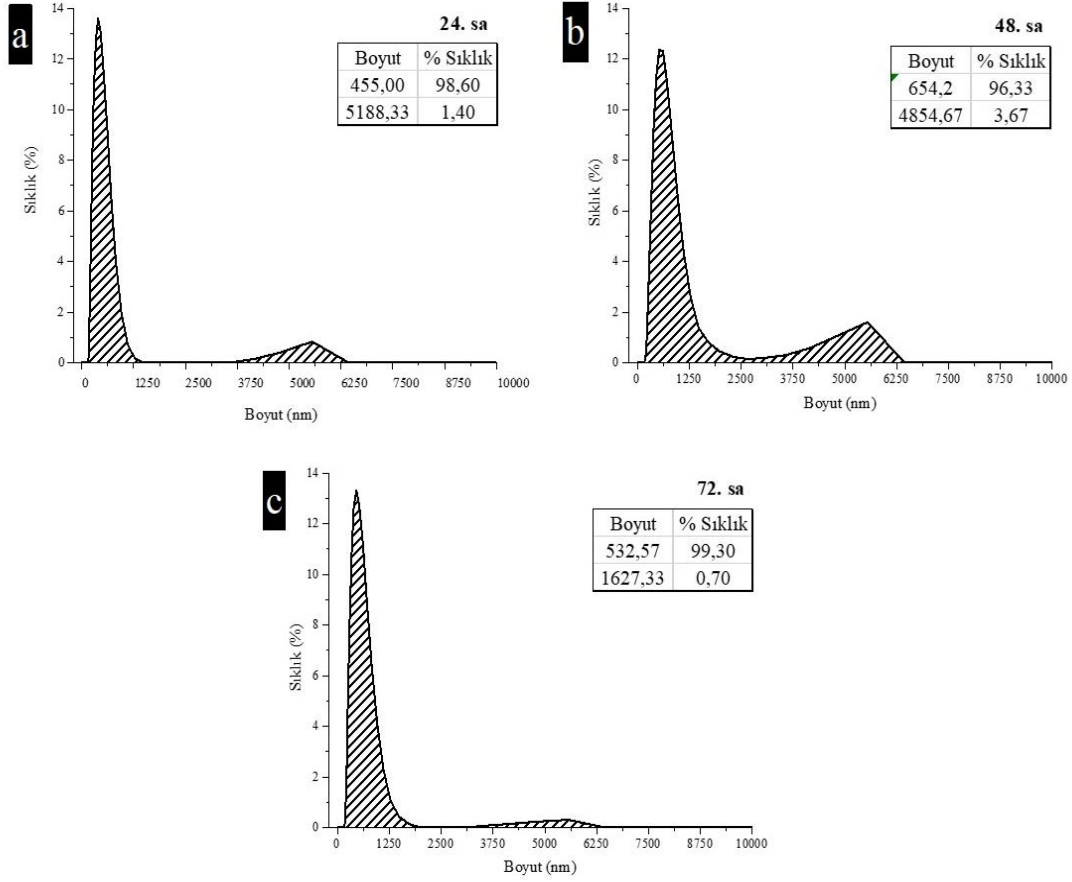
2019 yılında Diko ve diğerleri tarafından *Trichoderma* sp. WL-Go süpernatantı kullanılarak yapılan intraselüler ve ekstraselüler selenyum nanoparçacık üretimi çalışmasında optimum pH 8 ve reaksiyon süresi 24 saat olarak bulunmuştur [144]. Bir diğer çalışmada, Bhitarkanika mangrov topraklarından izole edilmiş halofilik iki bakteri suşu olan *Bacillus megaterium* BSB6 ve *Bacillus megaterium* BSB12 ile hem intraselüler hem de ekstraselüler olarak yapılan sentez çalışmasında 200 - 300 nm arasında maximum absorpsiyon piki bulunmuş ve optimum pH 7,5; reaksiyon süresi ise 40 saat olarak belirlenmiştir [145]. Zhang vd. selenyum nanoparçacık biyosentezi için *Mariannaea* sp. HJ fungusunu kullanmışlar ve bu çalışmada pH 8 - 11 aralığında 588 nm oluşan SPR bandı ile parçacık oluşumu gözlemlenirken diğer pH değerlerinde oluşum gözlemlenmemiştir [146]. UV-Vis spektrumu, SeNP'lerin oluşum ve yüzey plazmon rezonans (SPR) titreşimi olarak belirtilen ve *Pseudomonas aeruginosa* JS-11 suşu ile yapılan çalışmada da 500 – 700 nm arasında geniş bir pik göstermiştir [147].

Bu çalışmada elde edilen SeNP karakteristik pikleri, yukarıda verilen literatürle benzerlik göstermektedir. Ayrıca, pH optimizasyon değerleri de literatürle uygunluk taşımaktadır.

Parçacık oluşması için gereken optimum reaksiyon süresinin belirlenmesi

Selenyum nanoparçacık sentezinde, parçacık sentez süresinin belirlenmesinde öncelikle renk değişimi temel alınmıştır. Görsel olarak renk değişimi dikkate alınarak yapılan incelemede nanoparçacık sentezinin 12. saatten sonra başladığı gözlemlenmiş olmasına rağmen 12. saatte muhtemel sodyum selenit indirgenmesinden sorumlu biyomoleküllerin konsantrasyon azlığı nedeniyle renk değişimi tamamlanamamıştır. Tam olarak tuğla kırmızısı rengine dönüşüm 24. saatte gerçekleşmiş ve zaman artıkça rengin de koyulaştığı görülmüştür. Sentez süresinin belirlenmesi amacıyla renk değişimi ile birlikte boyut analizi için 24, 48 ve 72. saatlerde alınan örnekler dinamik ışık saçılması (DLS) analizi yapılmıştır. pH 8 değerinde 12, 24 ve 72. saatlerde alınan örneklerin DLS analiz sonuçları Şekil 3.5'de

verilmiştir.



Şekil 3.5. 8 pH değerinde (a) 12, (b) 24 ve (c) 72. saatlerde alınan örneklerin DLS (dinamik ışık saçılımı) analiz sonuçları.

DLS analizi sonuçlarına göre ortalama parçacık boyutu 24. saatte 455 nm, 48. saatte 654,20 nm ve 72. saatte 532,57 nm olarak ölçülmüştür. Sentez süresi arttıkça parçacık boyutu artmış olup tez çalışması için Şekil 3.5(a)'da da görüldüğü üzere sentez süresi olarak en küçük parçacıkların sentezlendiği süre olan 24 saat seçilmiştir.

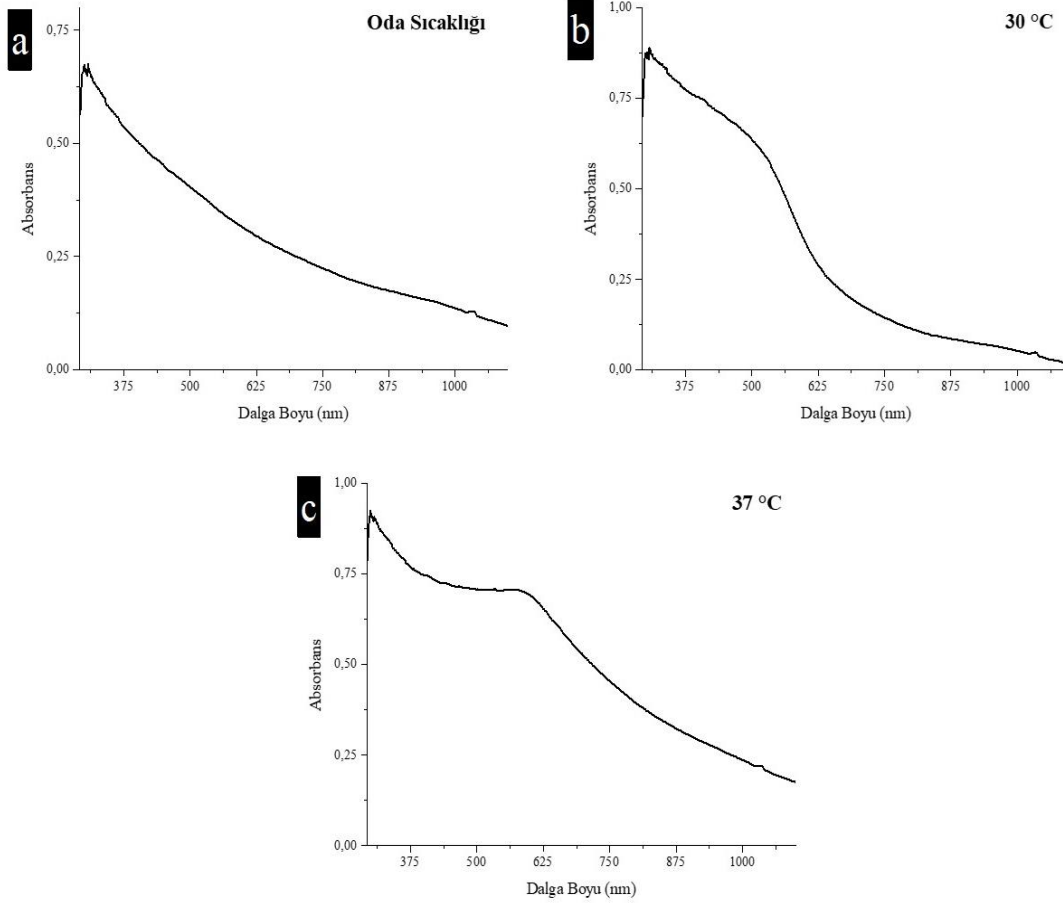
Çiftlik rizosferinden izole edilen *Providencia vermicola* BGRW suşu ile yapılan biyolojik selenyum nanoparçacık sentez çalışmasında da parçacık sentezi için 24 saatin yeterli olduğu belirtilmiştir [148].

San-Keskin vd. tarafından *Lysinibacillus* sp. NOSK bakterisi kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise selenyum nanoparçacık sentezi için optimum reaksiyon süresi 48 saat olarak belirlenmiştir [149].

Literatürde yapılan incelemede selenyum nanoparçacık sentezinin gerçekleşmesi için gereken süre çalışmaya göre farklılık göstermektedir. Ancak bakteri ile yapılan çalışmalarda sentez için gereken sürenin en az 18 - 24 saat olduğu belirtilmiştir. Literatürde sentez çalışmaları incelendiğinde reaksiyon süresi açısından benzer biyolojik selenyum nanoparçacık çalışmalarına rastlanmıştır.

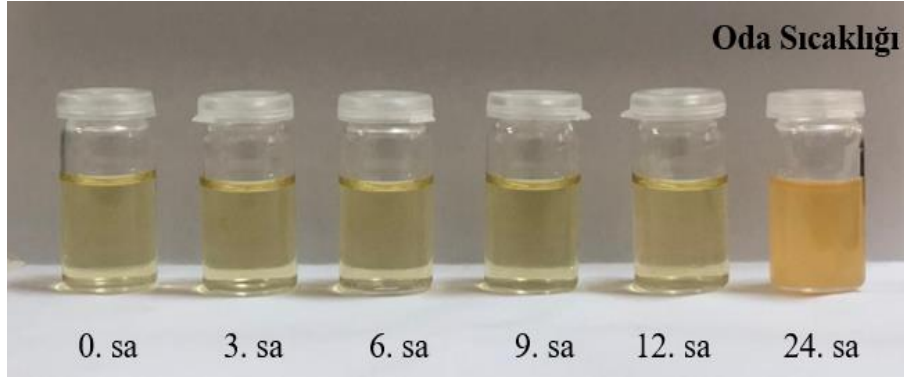
3.1.1.2. Optimum sıcaklık değerinin belirlenmesi

Nanoparçacık oluşumunu etkileyen fiziksel faktörlerden biri de reaksiyon sıcaklığıdır. Yapılan çalışmalarda reaksiyon sıcaklığının artmasına paralel olarak hem sentez hızının hem de nanoparçacık dönüşümünün arttığı, yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen sentez sırasında çekirdeğin oluşumunda metal iyonlarının kullanımı nedeniyle yüksek oranda indirgenme meydana geldiği sonucuna ulaşılmıştır [150, 151]. Reaksiyon sıcaklığının etkisini araştırmak ve optimum sıcaklık değerini belirlemek amacıyla Na_2SeO_3 - *Citricoccus* sp. süpernatant içeren besiyerinin pH 8 ve 24. saatte SeNP oluşumu; oda sıcaklığı (23 ± 2 °C), 30 ° ve 37 °C 'de araştırılmıştır. Belirlenen süreler sonucunda, deney gruplarının her birinden örnek alınarak UV-Vis taraması yapılmış ve elde edilen spektrumlar Şekil 3.6'da verilmiştir.



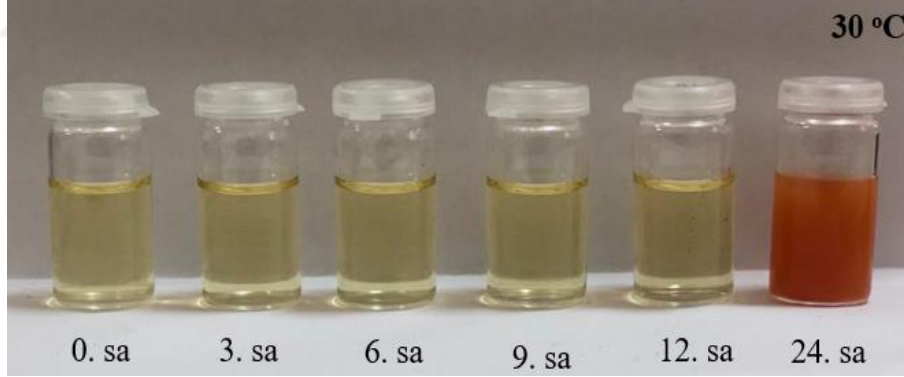
Şekil 3.6. (a) Oda sıcaklığı (23 ± 2 °C), (b) 30 °C ve (c) 37 °C deney gruplarında elde edilen UV-Vis spektrumları

Oda sıcaklığında SeNP'e ait karakteristik UV-Vis pikleri ve nanoparçacık oluşumu ile gözlenen tuğla kırmızı renk oluşmamıştır. Oda sıcaklığı (23 ± 2 °C), 30 °C ve 37 °C'de denenen SeNP sentezinde 0, 3, 6, 9, 12 ve 24. saatlerde örnekler alınmış ve renk değişimi gözlemlenmiştir (Şekil 3.7, 3.8 ve 3.9). Şekil 3.6(a)'da görüldüğü üzere oda sıcaklığında karakteristik pikler net olarak görülememiş olup SeNP oluşumunda görülen tuğla kırmızı rengine dönüşüm tam olarak gözlemlenmemiş; Şekil 3.7'de görüldüğü gibi 24. saatte çok hafif bir turuncu renginin oluşumu not edilmiştir.



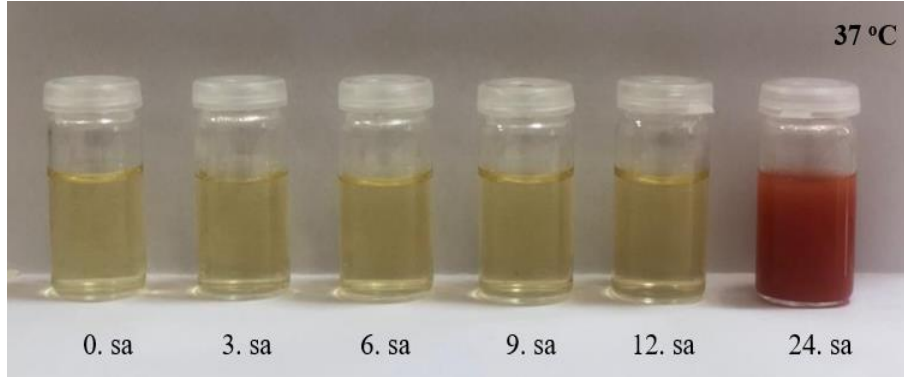
Şekil 3.7. Selenyum nanoparçacık oluşumuna sıcaklığın etkisi : Oda sıcaklığında (23 ± 2 °C) denenen sentezde 0, 3, 6, 9, 12 ve 24. saatlerde meydana gelen renk değişimi fotoğrafları.

30 °C’de gerçekleştirilen nanoparçacık sentezinde ise Şekil 3.8’de görüldüğü üzere oda sıcaklığında elde edilen değişimden daha koyu bir renk değişimi gözlemlenmiş; ancak sentez için yeterli olmamıştır. Şekil 3.6(b)’de gösterilen UV-Vis spektrumunda ise karakteristik piklerin oluşmaya başladığı görülmüş olup pikler çok belirginleşmemiştir.



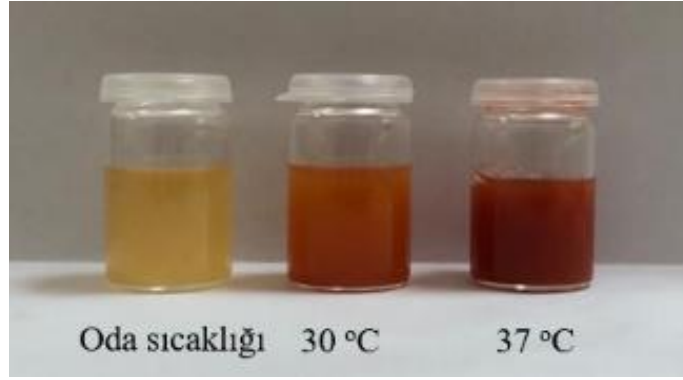
Şekil 3.8. Selenyum nanoparçacık oluşumuna sıcaklığın etkisi çalışması: 30 °C’de denenen sentezde 0, 3, 6, 9, 12 ve 24. saatlerde meydana gelen renk değişimi fotoğrafları.

37 °C’de gerçekleşen nanoparçacık sentezinde sarı renkten tuğla kırmızısı rengine dönüşüm gözlemlenmiş ve Şekil 3.9’da verilmiştir. Selenyum nanoparçacık oluşumu ile gözlemlenen kiremit kırmızısı renk, 24. saatte net olarak görülmüştür. Şekil 3.6(c)’de verilen UV-Vis spektrumunda da karakteristik pikler görülmekle birlikte maksimum absorpsiyon elde edilerek optimum sıcaklık değerinin 37 °C olduğu bulunmuştur.



Şekil 3.9. Selenyum nanoparçacık oluşumuna sıcaklığın etkisi çalışması: 37 °C’de denenen sentezde 0, 3, 6, 9, 12 ve 24. saatlerde meydana gelen renk değişimi fotoğrafları.

Selenyum nanoparçacık sentezinde optimum sıcaklık değerinin 37 °C’ bulunmasının sebebinin sodyum selenitin indirgenmesinden sorumlu biyomolekül veya proteinlerin yalnızca belirli sıcaklıkta aktif olmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir [143]. İncelenen üç sıcaklık değerinde 24. saatte meydana gelen renk değişiminin karşılaştırılması gösteren fotoğraflar Şekil 3.10’da verilmiştir.



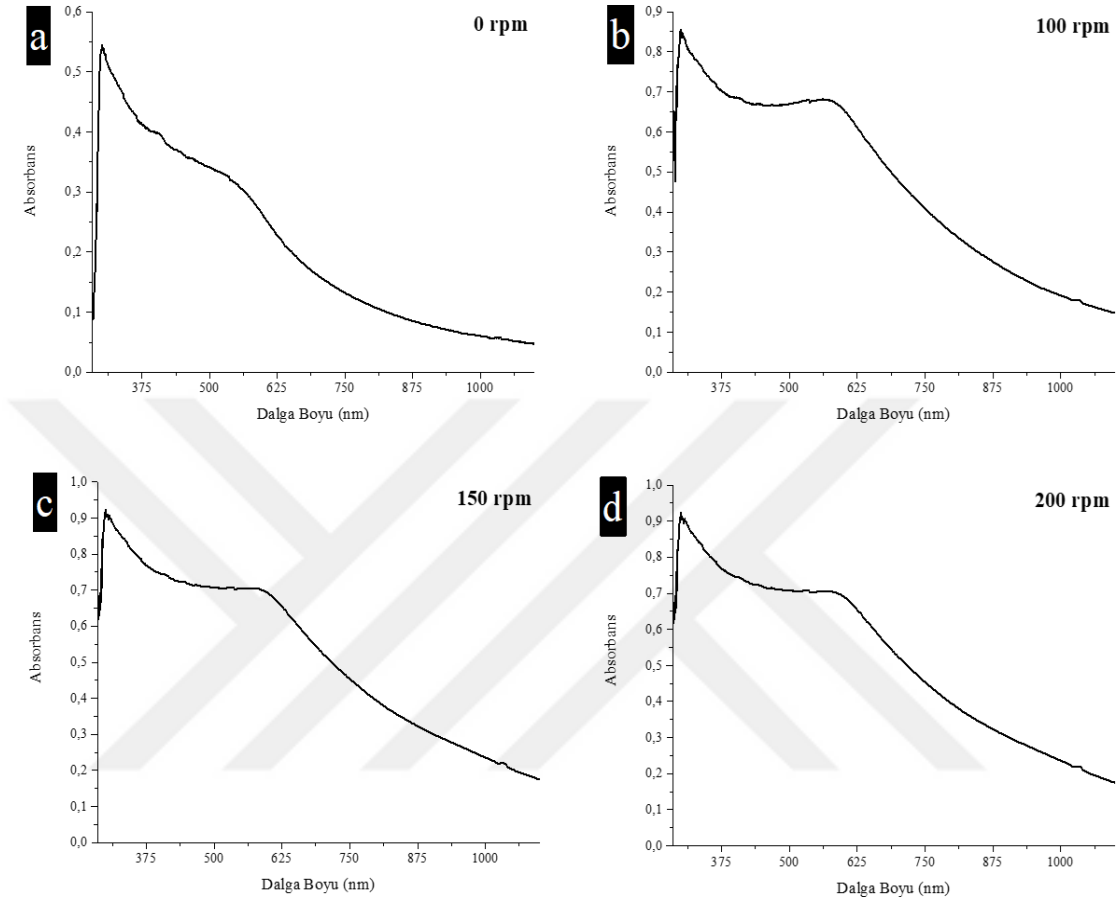
Şekil 3.10. Oda sıcaklığı (23 ± 2 °C), 30 °C ve 37 °C sıcaklık değerlerindeki SeNP sentezlerinden 24. saatte meydana gelen renk değişim fotoğrafları.

Abdollahnia vd. tarafından halofilik bir bakteri olan *Bacillus* sp. suşu kullanılarak gerçekleştirilen intraselüler ve ekstraselüler selenyum nanoparçacık sentezinde 40 °C reaksiyon sıcaklığı olarak belirlenmiştir [152]. Kora tarafından Hindistan’ın Nacharam şehrinde bulunan ve kirlenmiş bir göl olan Pedda Cheruvu’dan izole edilmiş *Bacillus cereus* AJK3 suşu kullanılarak ekstraselüler sentez yoluyla elde edilmiş selenyum nanoparçacıkların

sentezi için ise 37 °C, reaksiyon sıcaklığı olarak belirlenmiştir [153]. Tez çalışmasında optimum sentez sıcaklığı olarak bulduğumuz 37 °C değer literatürle uyum göstermektedir.

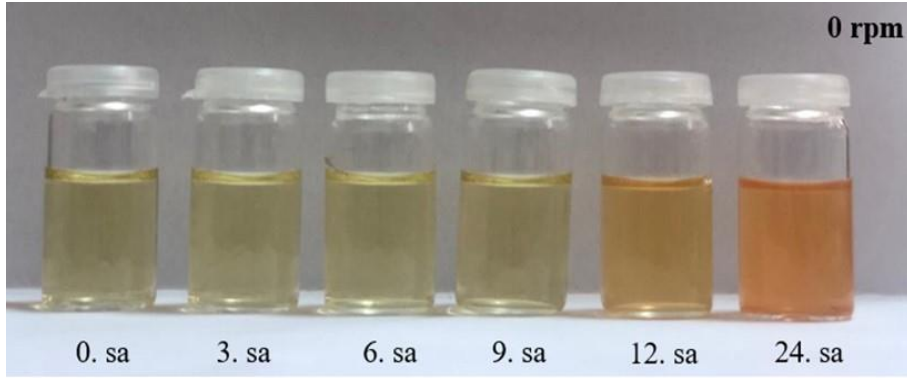
3.1.1.3. Optimum çalkalama hızı (rpm) değerinin belirlenmesi

Nanoparçacık sentezinde optimum koşullardan bir tanesi de çalkalama hızıdır. Çalkalama, indirgenmeyi sağlayan kompleks bileşenlerin uygun bir şekilde etkileşime girmesini sağlamaktadır [154]. Sentezde önemli olan ısı ve kütle transferini daha yüksek oranda sağlaması sebebiyle daha güçlü karıştırma sonucunda parçacık oluşumunun verimliliğinin arttığı bilinmektedir [155]. Bu nedenle çalkalama hızının (rpm) etkisini araştırmak ve optimum değeri belirlemek için pH 8 ve 37 °C şartlarında 24 saat süresince çalkalamasız (0), 100 rpm, 150 rpm ve 200 rpm çalkalama hızlarında SeNP oluşumu değerlendirilmiştir. 24 saat inkübasyon süresinin ardından deney gruplarının her birinden örnek alınarak UV-Vis taraması yapılmış ve elde edilen spektrumlar Şekil 3.11’de verilmiştir.



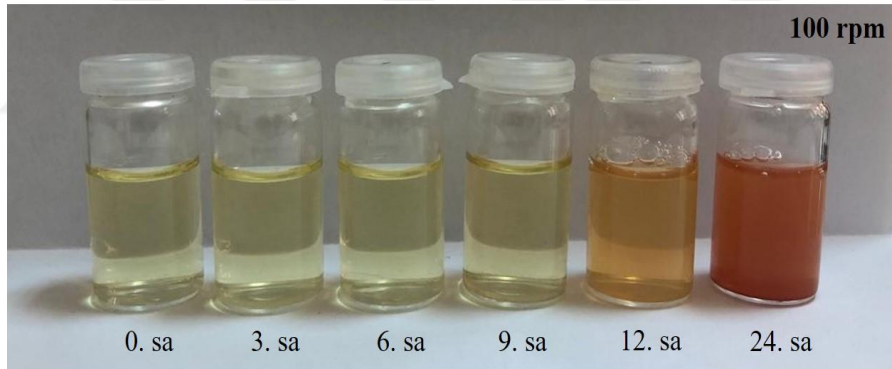
Şekil 3.11. (a) Çalkalamasız (0 rpm), (b) 100 rpm, (c) 150 rpm ve (d) 200 rpm çalkalama hızlarında deney gruplarında elde edilen UV-Vis spektrumları.

Çalkalamasız (0 rpm) şartlarda, Şekil 3.11(a)'da verilen UV-Vis spektrumunda 500-700 nm aralığında SeNP oluşumunu doğrulayan yüzey plazmon rezonans (SPR) bandı oluşmaya başladığı ancak oluşumun tamamlanmadığı görülmektedir. Analiz sırasında 0, 3, 6, 9, 12 ve 24. saatlerde örnek alınarak meydana gelen renk değişimi de incelenmiş ve Şekil 3.12'de verilmiştir.



Şekil 3.12. 0 rpm;’de denenen sentezde 0, 3, 6, 9, 12 ve 24. saatlerde meydana gelen renk değişim fotoğrafları

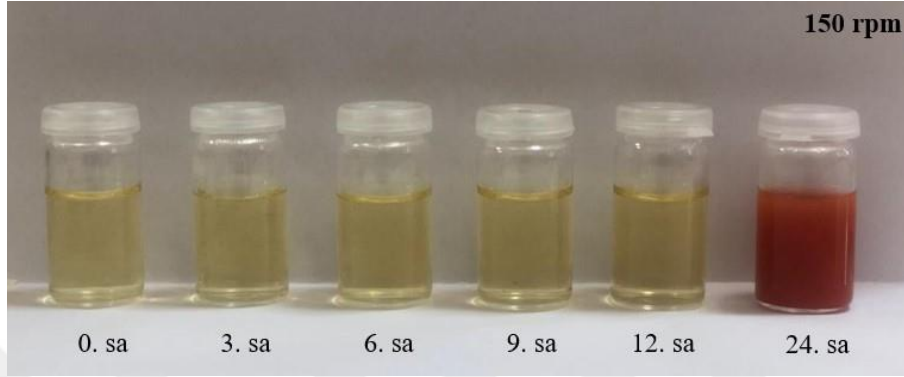
Şekil 3.12’de görüldüğü gibi 0 rpm’de 24. saat sonunda SeNP oluşumunda görülen tuğla kırmızı rengine dönüşüm görülmemiş olup sentez için çalkalamasız şartlar yeterli olmamıştır.



Şekil 3.13. 100 rpm’de denenen sentezde 0, 3, 6, 9, 12 ve 24. saatlerde meydana gelen renk değişim fotoğrafları.

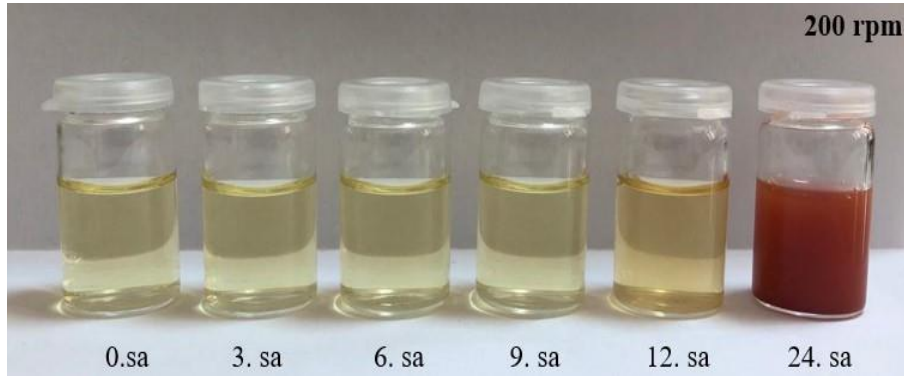
Şekil 3.11 (a), (b) ve (c)’de 100, 150 ve 200 rpm çalkalama hızında gerçekleştirilen sentezlerden elde edilen spektrumlarda 500-700 nm arasında yüzey plazmon resonans (SPR) bandı oluşumunu ifade eden karakteristik pikler görülmüştür. 100 rpm çalkalama hızı ile yapılan sentezde 0, 3, 6, 9, 12 ve 24. saatte meydana gelen renk değişimi Şekil 3.13’te verilmiştir.

100 rpm çalkalama hızı ile gerçekleştirilen sentezde 24. saat sonunda SeNP oluşumunu doğrulayan tuğla kırmızısı rengi oluşumu görülmüştür.



Şekil 3.14. 150 rpm'de denenen sentezde 0, 3, 6, 9, 12 ve 24. saatlerde meydana gelen renk değişim fotoğrafları .

150 rpm çalkalama hızı ile yapılan sentezde de 0, 3, 6, 9, 12 ve 24. saatte meydana gelen renk değişimini gösteren Şekil 3.14'de SeNP oluşumunu doğrulayan tuğla kırmızısı renk oluşumu görülmektedir.

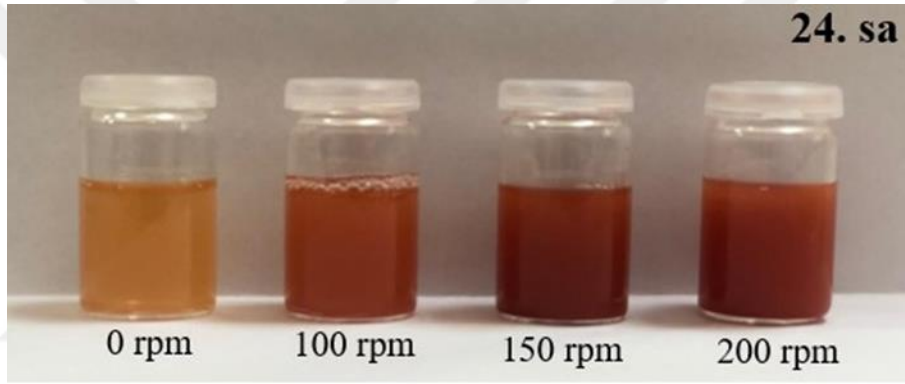


Şekil 3.15. 200 rpm'de denenen sentezde 0, 3, 6, 9, 12 ve 24. saatlerde meydana gelen renk değişim fotoğrafları.

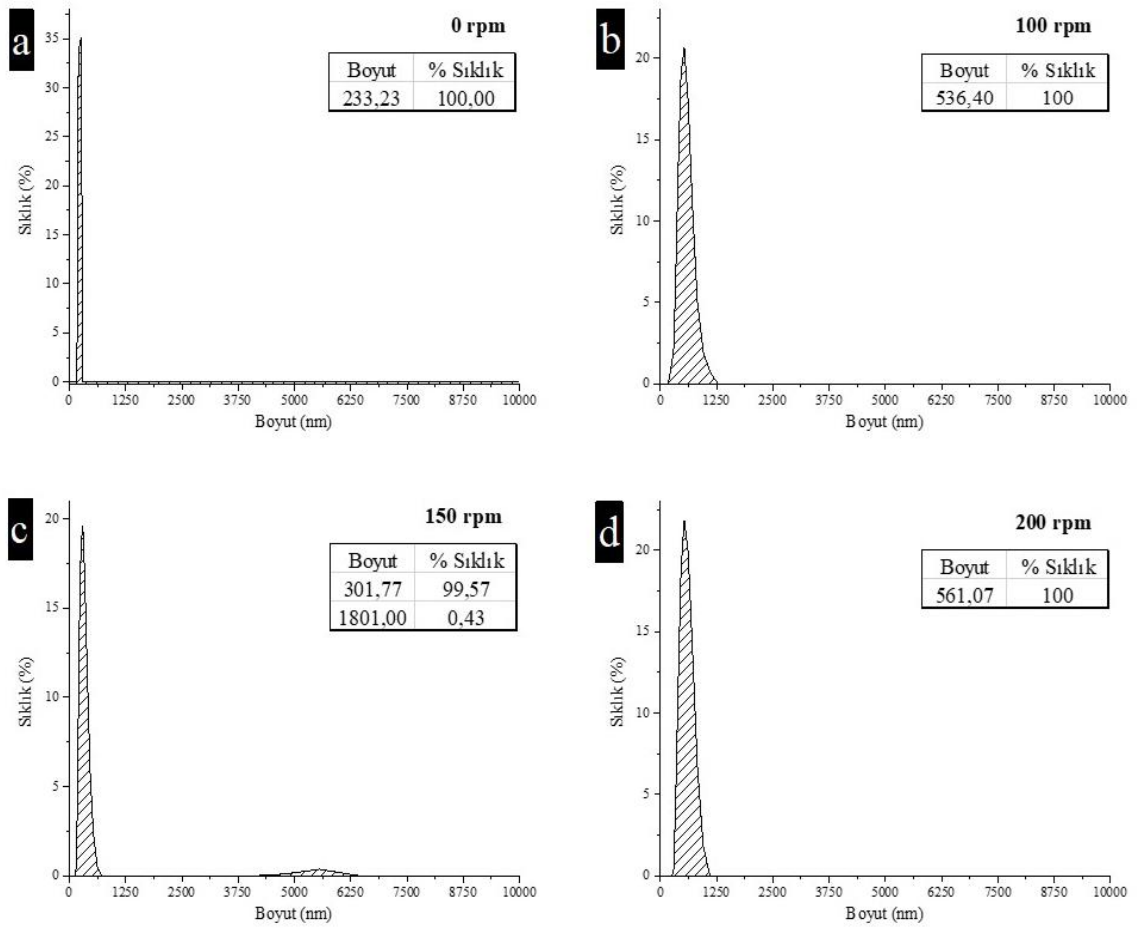
200 rpm çalkalama hızı ile yapılan sentezde 0, 3, 6, 9, 12 ve 24. saatte meydana gelen renk değişimini gösteren Şekil 3.15'de SeNP oluşumunu doğrulayan tuğla kırmızısı renk oluşumu görülmektedir.

Optimum çalkalama hızının belirlenmesi amacıyla 24. saatte alınan örneklerde SeNP oluşumuna bağlı olarak oluşan tuğla kırmızısı renk değişimi Şekil 3.16’da verilmiştir. Şekil incelendiğinde; çalkalama hızının artışına paralel olarak oluşan renkte koyulaşma görülmüştür.

Optimum çalkalama hızının belirlenmesinde UV-Vis spektrumu ve renk değişimi ile birlikte 0, 100, 150 ve 200 rpm deney gruplarından örnekler alınarak dinamik ışık saçılması (DLS) analizi yapılmıştır. pH 8, 37 °C ve 24 saat reaksiyon süresi şartlarında 0, 100, 150 ve 200 rpm deney gruplarından alınan örneklerin DLS analiz sonuçları Şekil 3.17’de verilmiştir.



Şekil 3.16. 24. saat sonunda deney gruplarında meydana gelen renk değişim fotoğrafları.



Şekil 3.17. pH 8, 37 °C ve 24 saat reaksiyon süresi şartlarında (a) 0, (b) 100, (c) 150 ve (d) 200 rpm deney gruplarından alınan örneklerin DLS (dinamik ışık saçılımı) analiz sonuçları.

Şekil 3.17’de görüldüğü gibi, DLS analizi sonuçlarına göre ortalama parçacık boyutu 0 rpm için 233,23 nm, 100 rpm için 536,40 nm, 150 rpm için 301,77 nm ve 200 rpm için ise 561,07 nm olduğu tespit edilmiştir. En düşük boyut 0 rpm çalkalamalı ortamda sentez ile belirlenmiştir; ancak renk değişiminin ve SPR bandına bağlı karakteristik piklerin uygun şekilde oluşmaması nedeniyle renk değişimi ve karakteristik piklerin uygun olarak görüldüğü 150 rpm, optimum çalkalama hızı olarak belirlenmiştir. 150 rpm çalkalama hızının altında ve üstündeki değerlerde parçacık boyutunun artması ve en küçük boyutun 150 rpm’de elde edilmesinin sebebi 150 rpm’nin reaksiyon ortamında bulunan indirgeyici moleküllerle Na_2SeO_3 ’in en iyi etkileşimi burada gösterdiği şeklinde açıklanabilir [156].

Srivastava ve Mukhopadhyay tarafından 2013 yılında *Zooglea ramigera* bakterisi kullanılarak 48 saatlik inkübasyon süresi ile yapılan intraselüler selenyum nanoparçacık sentezinde çalkalama hızı olarak 150 rpm kullanılmış ve ortalama 85 nm büyüklüğünde parçacıklar elde edilmiştir [157]. Wadhvani vd. tarafından 2013 yılında *Acinetobacter sp.* SW30 bakterisi kullanılarak intraselüler şekilde yapılan başka bir selenyum nanoparçacık sentezinde ise çalkalama hızı olarak 180 rpm kullanılmış ve 100 nm altında parçacıklar elde edilmiştir [143].

Literatürde farklı çalkalama (rpm) değerlerinde sentez örnekleri bulunmaktadır. Bu çalışmada 150 rpm olarak belirlenen çalkalama hızında da örnek çalışmalar bulunmakta olup bu çalışma literatür ile uyumluluk göstermektedir.

3.1.2. Selenyum nanoparçacıkların karakterizasyonu

Karakterizasyon; nanomalzemelerin biyolojik ortamdaki davranışlarının belirleyicisi olan parçacık boyutu, yüzey yükü, şekli gibi fizikokimyasal özelliklerinin belirlenip güvenilir veriler elde etme, üretilen parçacıkların geleneksel bulk malzemelerden farklı özelliklerinin açıklanması açısından önem arz etmektedir [158].

3.1.2.1. Zeta potansiyelinin ölçülmesi

Kolloidal sistemlerde dağılmış halde bulunan parçacıkların yüzeyinde zıt yüklenmiş iyonlardan oluşan ve elektriksel çift tabaka olarak adlandırılan iki tabaka bulunmaktadır. Bu tabakalardan iç kısımda kalan stern tabakada iyonlar sıkı bir şekilde yüzeye tutunurken dış kısımda yer alan yayılım ya da dağınık tabaka olarak bilinen ikinci tabakada ise iyonlar dağınık ve gevşek bir şekilde bulunmaktadır. Bir parçacık sıvı içerisinde hareket ettiği zaman bu iki tabaka arasında bir kayma meydana gelir. Bu kayma düzleminde oluşan potansiyel, elektrokinetik potansiyel olarak da adlandırılan zeta potansiyelini ifade etmektedir [158, 159]. Bir süspansiyon için zeta potansiyeli, parçacıklar arasındaki itme kuvvetinin yoğunluğunu ve süspansiyon içerisindeki dağılımın kararlılığını yansıtan önemli bir indekstir [160]. Yüklü parçacıklar durumunda zeta potansiyeli arttıkça, itici etkileşimler daha büyük olacak ve daha muntazam bir boyut dağılımına sahip ve daha kararlı parçacıkların oluşumunu

sağlayacaktır. Eğer iki parçacık aynı cins ve yüksek zeta potansiyeline sahipse birbirlerini iteceklerinden dolayı agglomerate olmayacaktır.

-10 ve +10 mV arasında zeta potansiyeline sahip nanoparçacıklar genellikle nötr olarak kabul edilirken zeta potansiyeli +30 mV'den büyük nanoparçacıklar güçlü katyonik özellikte, -30 mV'den az olan nanopartiküller ise güçlü anyonik özellikte olduğu kabul edilmektedir. Hücresel membranların çoğu negatif yüklü olduğu için zeta potansiyeli nanoparçacıkların membranlara nüfuz etme potansiyelini etkileyebilmekte ve katyonik nanoparçacıklar genellikle hücre duvarı bozulmasıyla bağlantılı olarak daha fazla toksisite gösterdiği bilinmektedir [159]. Benzer şekilde, literatürde +25 mV'dan büyük ve -25 mV'dan küçük zeta potansiyeline sahip nanoparçacıkların yüksek stabiliteye sahip olduğu da belirtilmiştir. Bu aralığın dışında zeta potansiyeline sahip nanoparçacıkların kendi aralarında meydana gelen van der Waals etkileşimleri nedeniyle kümelenmeye, pıhtılaşmaya veya topaklanmaya yatkın olduğu tespit edilmiştir [161, 162].

Yapılan ölçümde üretilen selenyum nanoparçacıkların zeta potansiyeli, $-20,43 \pm 0,41$ mV olarak hesaplanmıştır. Nanoparçacıklar üzerindeki yüksek negatif yük, bakteriyojenik nanopartiküllerin daha yüksek oranda stabiliteye sahip olduğunu göstermektedir [153]. Süspansiyondaki tüm parçacıklar büyük bir değere sahip negatif veya pozitif zeta potansiyeline sahipse birbirlerini itme eğiliminde olacakları için parçacıkların bir araya gelme eğilimi az olacaktır. Bununla birlikte, parçacıklar düşük zeta potansiyeli değerlerine sahipse, parçacıkların bir araya gelme ve agregatlar oluşturma eğilimi artacaktır. Üretilen selenyum nanoparçacıkları üzerindeki yüksek negatif yük, selenyum nanoparçacıklarının agregatlar oluşturmada yüksek stabilitesini korumasını sağlayacak ve bu parçacıklar çalışma için bir aydan uzun bir süre boyunca bile tutulduğunda değişikliğe uğramayacak ve amorf forma dönüşmeyecektir [163].

Literatürde SeNP'nin biyolojik üretimi ile ilgili yapılan çalışmalara örnek olarak Dhanjal ve Cameotra tarafından yapılan çalışmada, *Bacillus cereus* bakterisi aracılığıyla üretilen selenyum nanoparçacıkların da -46,86 mV zeta potansiyeline sahip olduğu hesaplanmış ve yüksek kararlılığa sahip olduğu belirtilmiştir [163].

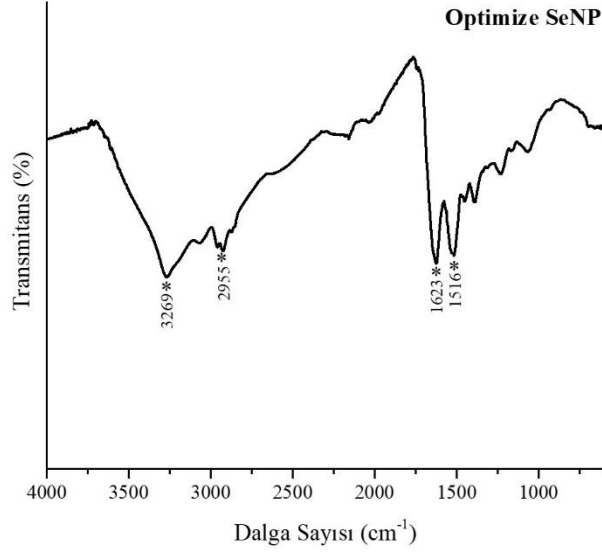
Providencia sp. DCX kullanılarak yapılan çalışmada ise sentezlenen selenyum nanoparçacıkların -25,6 mV zeta potansiyel değerine sahip olduğu ve kararlı yapıda olduğu belirtilmiştir [78].

Bu çalışmada sentezlenmiş olan selenyum nanoparçacığının da literatürdeki çalışmalara benzer şekilde kararlı yapıda olduğu tespit edilmiştir.

3.1.2.2. Zayıflatırılmış toplam yansıma - fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR FT-IR) analizi

Fourier Dönüşümü Kızılötesi (FT-IR), biyomoleküllerde bulunan fonksiyonel gruplardaki bağlarda meydana gelen değişikliklerin belirlenmesini sağlayan bir spektroskopi yöntemidir. Kızılötesi spektroskopi, bir materyaldeki atomların veya atom gruplarının titreşim enerjisi ile ilişkilidir. FT-IR, kızılötesi radyasyon sayesinde belirli bir dalga boyunda etkilenen moleküllerin titreşimini ve dönüşümünü ölçmektedir. Bu teknik, yapısal değişikliklerin tanımlanmasına yardımcı olarak etkileşimlerin doğası hakkında bilgi vermektedir [164].

Yapısal ve kimyasal yapının araştırılması amacıyla alınmış optimize selenyum nanoparçacıklarının FT-IR spektrumu Şekil 3.18’de verilmiştir.



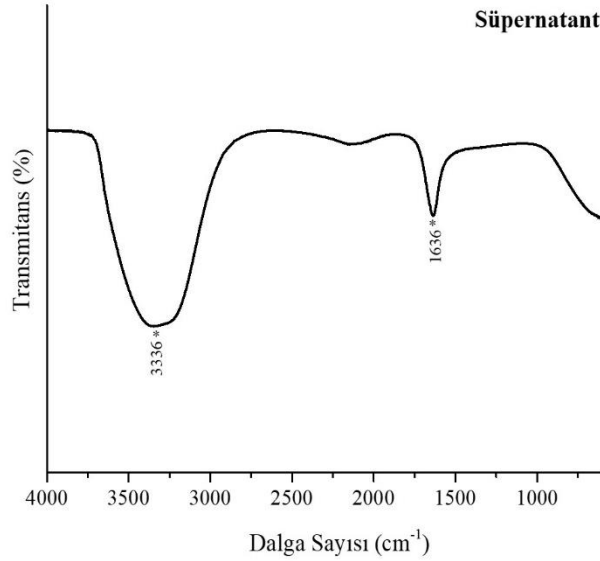
Şekil 3.18. Optimize edilmiş selenyum nanoparçacıkların FT-IR spektrumu.

Birinci bölge olarak adlandırılan $4000\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$ aralığında 3269 ve 2955 cm^{-1} 'de; üçüncü bölge olarak adlandırılan $2000\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ aralığında ise 1623 ve 1516 cm^{-1} 'de absorpsiyon bantları gözlemlenmiştir.

$1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ aralığında görülen absorpsiyon bantları, protein omurgasının en belirgin iki titreşiminden biri ve aynı zamanda en hassas spektral bölgesi olan ve neredeyse tamamen peptit bağlarının $\text{C}=\text{O}$ gerilme titreşimlerinden kaynaklanan amid I bandını temsil etmektedir. Amid I bandı bileşenlerinin frekansları, proteinlerin ikincil yapısal elementleri ile yakından ilişkilidir. Bununla birlikte Amid I bölgesinde ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$), her bir ikincil yapı tipi, benzersiz moleküler geometri ve hidrojen bağlanma modeli nedeniyle biraz farklı bir $\text{C}=\text{O}$ gerilme frekansına yol açabilmektedir. $1640\text{-}1620\text{ cm}^{-1}$ bölgelerindeki bantlar, spesifik olarak birçok bilim insanı tarafından proteinlerin ikincil yapılarında görülen yaygın bir motif olan β -yaprak yapısına atfedilmiştir. Protein omurgasının belirgin bir diğer titreşimi olan Amid II Bölgesi de %40-60 oranında NH bükülmesi ve %18-40 oranında CN gerilme titreşimini ifade eden $1480\text{-}1575\text{ cm}^{-1}$ aralığında absorpsiyon bantlarını göstermektedir [165].

3000 cm^{-1} dalga sayısının üzerinde gözlemlenen dar absorpsiyon bandları, doymamış bileşikler ve aromatik halkaları göstermektedir. Dar aralıkta incelendiğinde; 3010 ile 3040 cm^{-1} arasındaki dalga sayısında absorpsiyonun varlığı, basit doymamış olefinik bileşiklerin varlığını doğrulamaktadır [166]. 2818-2955 cm^{-1} arasında görülen titreşim ise C-H (CH_3) gerilmesine karşılık gelmektedir [167].

Sodyum selenit (Na_2SeO_3) indirgenmesinden sorumlu biyomolekül ve fonksiyonel grubun yorumlanması amacıyla indirgenmeyi sağlayan süpernatantın da FT-IR spektrumları elde edilmiş ve elde edilen spektrum Şekil 3.19'da verilmiştir.



Şekil 3.19. Sentez için kullanılan süpernatantın FT-IR spektrumu.

Birinci bölge olarak adlandırılan 4000-2500 cm^{-1} aralığında 3336 cm^{-1} 'de; üçüncü bölge olarak adlandırılan 2000-1500 cm^{-1} aralığında ise 1636 cm^{-1} 'de absorpsiyon bantları gözlemlenmiştir. Gözlemlenen bu bölgelerden 1636 cm^{-1} bandını içine alan 1680-1600 cm^{-1} aralığındaki bantlar proteinlerde bulunan Amid I grubuna atfedilmektedir. 3336 cm^{-1} ve civarındaki bantlar ise polisakkaritler ve proteinlerden gelen O-H ve N-H gerilme titreşimlerinden kaynaklandığı bilinmektedir [168].

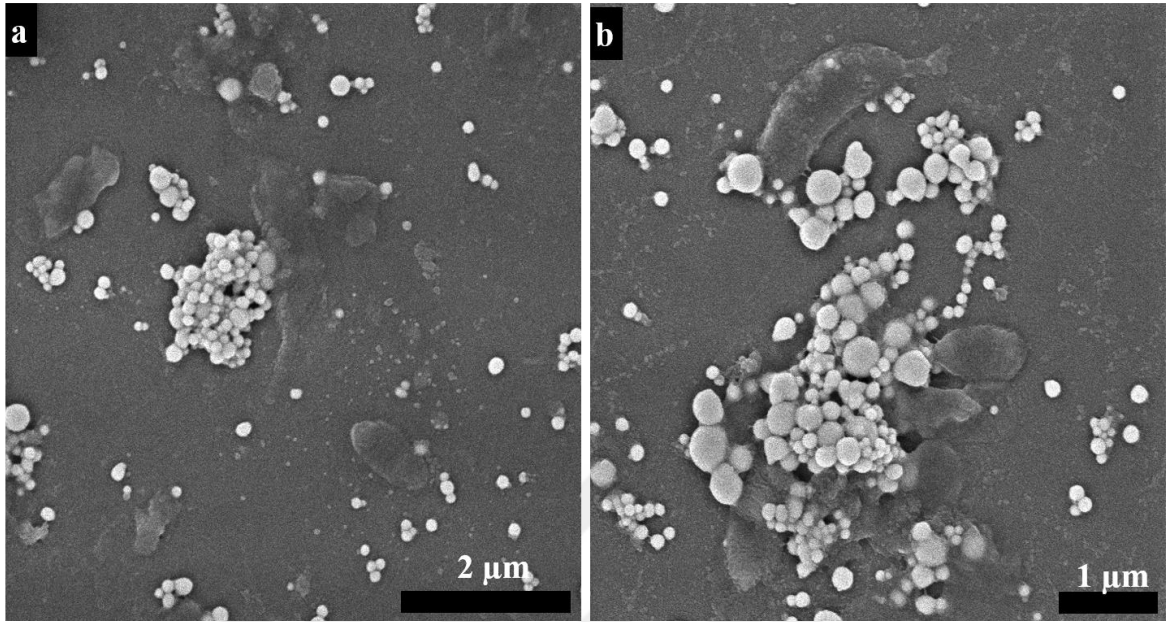
Bu iki spektrumda elde edilen bantların karşılık geldiği fonksiyonel gruplar değerlendirildiğinde; selenyum nanoparçacıkların sentez ve stabilizasyonunda süpernatantta

bulunan proteinlerin rol oynadığı sonucuna ulaşılmıştır. Literatürde çeşitli bakteri kaynaklı selenit indirgenmesinde nitrat redüktaz, membran bağımlı redüktaz, periplazmik dissimilasyon nitrat redüktaz gibi enzimlerin dahil olabileceği farklı indirgenme mekanizmalarının rol oynayabileceği hakkında yorumlara rastlanmaktadır [147, 153].

3.1.2.3. Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ve enerji yayımlı X-ışını (EDX) analizi

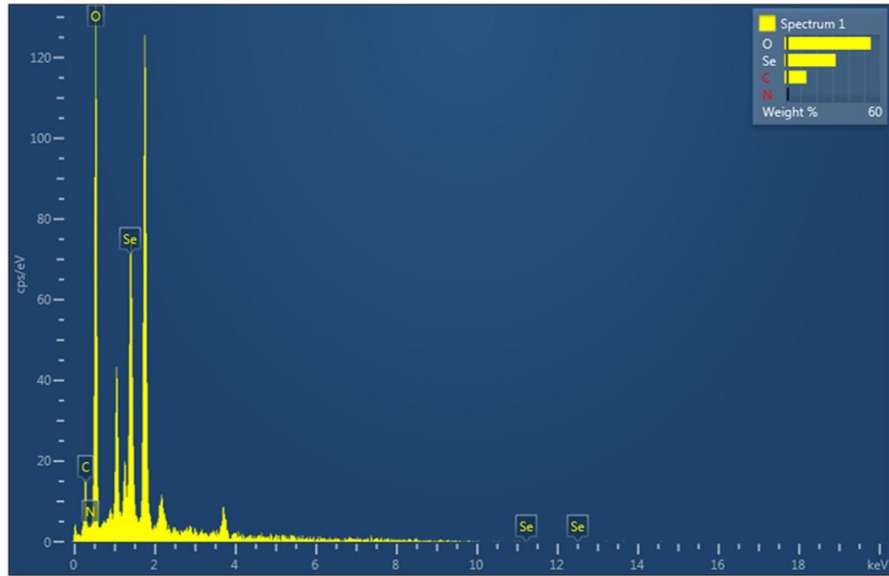
Nanomateryallerin boyut ve sayıca yoğunluklarının özelliklerinin kontrolünde önemli faktörlerden biri olduğu bilinmektedir. Nano ölçekteki materyallerin çalışılmasında yararlanılan yüksek çözünürlüklü karakterizasyon tekniklerden biri Taramalı Elektron Mikroskopisi ve bir diğeri de Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisidir [169]. Taramalı elektron mikroskobu (SEM), bir elektron ışınının bir örnekle etkileştiği, atomik bileşimi ve yüzey morfolojisini yansıtan farklı sinyaller ürettiği bir yüzey görüntüleme tekniğidir. Analiz edilen numunenin üç boyutlu görüntüsünü oluşturmak için numuneden yayılan geri saçılmış elektronları ve ikincil elektronları kullanır [170].

Sentezlenen SeNP'lerin iki farklı boyutta ölçeklendirilmiş SEM mikrografları Şekil 3. 20'de verilmiştir. 465 parçacık içeren spektrumda yapılan incelemede parçacık boyutunun ortalama $290,57 \pm 0,34$ nm olduğu bulunmuştur. Ancak nanoparçacıkların boyutlarının küçük olması sebebiyle geçirmeli elektron mikroskobu ile görüntüleme yapılmıştır.



Şekil 3.20. Selenyum nanoparçacıkların a) 2 μm ve b) 1 μm ölçeğinde alınan ölçeğinde alınan SEM mikrografları.

Sentezlenen selenyum nanoparçacıkların elemental kompozisyonunu belirlemek için EDX analizi yapılmış ve EDX spektrumu Şekil 3.21’de verilmiştir.



Şekil 3.21. Sentezlenen selenyum nanoparçacıkların EDX spektrumu.

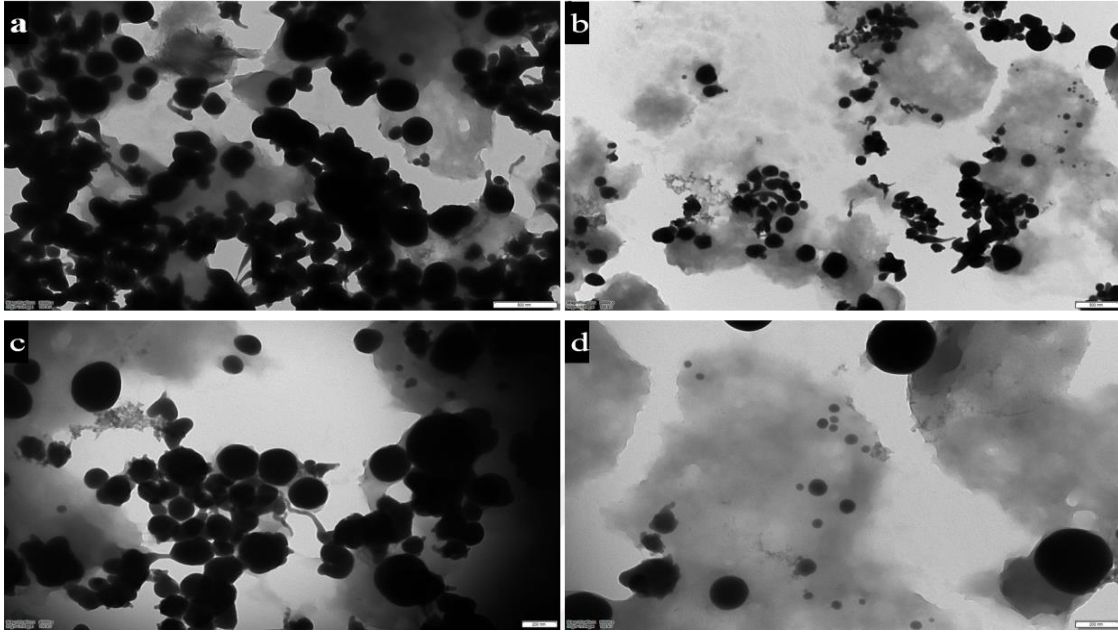
Şekil 3.21’de görüldüğü gibi, EDX spektrumu ile sentezlenen parçacığın selenyum nanoparçacık olduğu doğrulanmıştır.

3.1.2.4. Transmisyon elektron mikroskopisi (TEM)

Dinamik Işık Saçılımı (DLS) gibi görüntüleme dışı ölçüm yöntemleri, boyut dağılımı gibi istatistiksel sonuçlarda büyük partikül gruplarının ölçümü için daha uygun olup parçacık formlarının kesin olarak belirlenmesinde yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, partikül boyutu ve formunun izlenmesi ve kalibrasyonu için görüntülenmesi gerekmektedir. Yüksek çözünürlükleri ve yüksek görüntüleme hızları nedeniyle, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM), mikro ve nanoyapıların doğrudan görüntüleme ve boyutsal ölçümleri için kullanılan standart yöntemlerdir.

TEM görüntülerinde 100 keV’nin çok üzerinde elektron enerjilerinin kullanılması nedeniyle Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)’e oranla daha yüksek oranda lateral çözünürlük sağlamaktadır [171].

Sentezlenen selenyum nanoparçacıkların alınan TEM görüntüsü Şekil 3.20’de verilmiştir.



Şekil 3.22. Optimize edilmiş selenyum nanoparçacıkların (a) ve (b) 500 nm ölçeğinde alınan, (c) ve (d) 200 nm ölçeğinde alınan TEM mikrografları.

Alınan TEM görüntüsüne göre sentezlenen selenyum nanoparçacığının küresel şekilli olduğu ve parçacık boyutunun ortalama $104,46 \pm 50,82$ nm olduğu tespit edilmiştir.

Tabibi ve ekibinin 2020 yılında halofilik olan *Halomonas elongata* ve *Salinicoccus iranensis* bakterileri ile sentezledikleri selenyum nanoparçacıkların yapılan TEM ve SEM analizleri sonucunda 30-100 nm aralığında çapa sahip olduğu belirtilmiştir [172].

2020 yılında Abdollahnia vd. tarafından halofilik alg olan *Halogeometricum* sp. ve halofilik bakteri olan *Bacillus* sp. ile yapılan başka bir selenyum nanoparçacık sentez çalışmasında da TEM analizi esas alınarak parçacık boyutunun 29,5 – 354,9 nm ve 25,7 – 708,1 aralığında değişen; ortalama 111,6 ve 141,6 nm olduğu belirtilmiştir [152].

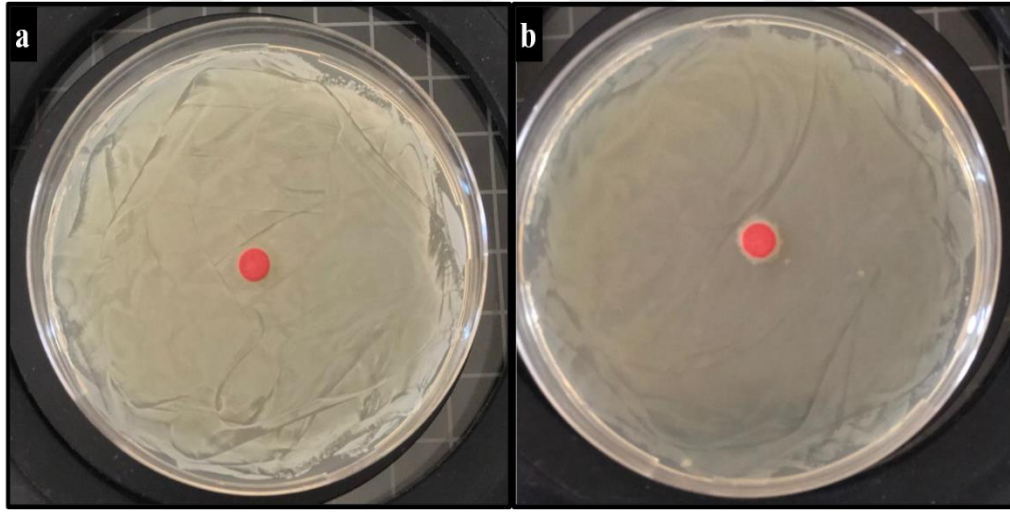
2015 yılında *Bacillus* sp. MSh-1 bakteri kullanılarak yapılan başka bir biyolojik selenyum nanoparçacık sentezi çalışmasında ise 80 – 220 nm arasında değişen çaplarda küresel yapıli nanoparçacıklar elde edilmiştir [173].

Burkholderia fungorum bakterisinin iki farklı suşu ile yapılan sentez çalışmasında ise sentezlenen selenyum nanoparçacıkların ortalama 170 nm ve 200 nm çapa sahip olduğu belirtilmiştir [174].

Bu çalışmada sentezlenen selenyum nanoparçacık boyutunun da literatürde bulunan çalışmalarla benzerlik göstermiştir. Aynı zamanda sentezlenen parçacığın boyutunun medikal veya diğer teknolojik alanlarda kullanım için ideal boyutta olduğu literatürde belirtilmiştir ancak ileri çalışmalarla doğrulanmalıdır [174].

3.1.2.5. Biyolojik selenyum nanoparçacıkların antibakteriyal aktivitesinin araştırılması

Sentezlenen SeNP'lerin %5 (w/v) konsantrasyonda Gram (+) *Staphylococcus aureus* (ATCC 23213) ve Gram (-) *Escherichia coli* (ATCC 25922) bakterilerine antibakteriyel etkisi, Kirby-Bauer Disk Difüzyon metodu kullanılarak gerçekleştirilmiş, 24 saat sonunda agarlarda meydana gelen zonlar Şekil 3.23'te verilmiştir. Agarlarda her iki bakteri suşunda da inhibisyon zonu oluşumu gözlemlenmemiştir.



Şekil 3.23. %5 SeNP'lerin Kirby-Bauer Antibakteriyal testi agar görüntüleri (a) *Staphylococcus aureus* (b) *Escherichia coli* bakterisi.

3.2. Sentezlenen Selenyum Nanoparçacığının *Chlorella vulgaris* Mikroalginde Oksidatif Strese Etkilerinin Araştırılması

3.2.1. Ön hazırlık

3.2.1.1. Kullanılacak SeNP konsantrasyonunun belirlenmesi

Birçok mikroalg türü için selenyum, oksidatif strese bağlı hasara karşı koruma sağladığı bilinmektedir. Ancak yüksek konsantrasyonlarda selenyum, mikroalglerde toksisiteye neden olabilmektedir [175, 176]. Bu nedenle sentezlenen SeNP'lerin *C. vulgaris* üzerinde toksisiteye sebep olmadan kullanılması için uygun SeNP konsantrasyonu belirlenmiştir. UV maruziyeti olmaksızın ve 1 saat UV maruziyetine bırakılarak dizayn edilen deney düzeneyinde 0,1; 10 ve 100 ppm SeNP içeren BG-11 besiyerine inokülasyon yapılarak *C.vulgaris* gelişimi üzerindeki etkileri optik yoğunluk ölçümü (OD₆₈₀) ve hücre sayımı yapılarak belirlenmiştir. Elde edilen veriler sırasıyla Tablo 3.1 ve 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Farklı SeNP konsantrasyonlarında UV maruziyeti yapılan ve yapılmayan kültürlerde 1 mL kültürde bulunan hücre sayısında (10^6) meydana gelen değişimler. (Üstsel simgeler gün bazında gruplar arası farklılığı göstermektedir.)

Deney Grubu	4. Gün	6. Gün	8. Gün
<i>C. vulgaris</i>	93,14 ± 2,07 ^a	193,75 ± 6 ^g	199,15 ± 25,4 ^j
<i>C. vulgaris</i> - SeNP _{0,1 ppm}	79,66 ± 6,59 ^c	182 ± 20,5 ^g	195,56 ± 4,1 ^j
<i>C. vulgaris</i> - SeNP _{10 ppm}	51,27 ± 4,5 ^e	174,81 ± 5 ^g	198,68 ± 9,9 ^j
<i>C. vulgaris</i> - SeNP _{100 ppm}	13,6 ± 0,4 ^f	16,56 ± 1,5 ^h	27,16 ± 4,1 ^{kl}
<i>C. vulgaris</i> - UV	65,75 ± 2 ^b	177,79 ± 8,9 ^g	297,02 ± 44 ^j
<i>C. vulgaris</i> - UV - SeNP _{0,1 ppm}	105,48 ± 4,2 ^d	174,81 ± 5 ^g	166,21 ± 124,8 ^{jk}
<i>C. vulgaris</i> - UV - SeNP _{10 ppm}	82,94 ± 2,15 ^c	180,48 ± 8,49 ^g	265,38 ± 9,4 ^j
<i>C. vulgaris</i> - UV - SeNP _{100 ppm}	9,02 ± 0,44 ^f	12,65 ± 1,13 ^h	32,54 ± 5,47 ^l

Tablo 3.2. Farklı SeNP konsantrasyonlarında UV maruziyeti yapılan ve yapılmayan kültürlerde optik yoğunluk (OD₆₈₀) değerlerinde meydana gelen değişimler (Üstsel simgeler gün bazında gruplar arası farklılığı göstermektedir.)

Deney Grubu	1. Gün	4. Gün	6. Gün	8. Gün
<i>C. vulgaris</i>	0,073 ± 0,01 ^{ab}	0,580 ± 0,02 ^c	0,765 ± 0,04 ^e	0,841 ± 0,06 ^h
<i>C. vulgaris</i> - SeNP _{0,1ppm}	0,102 ± 0,01 ^b	0,564 ± 0,02 ^c	0,691 ± 0,06 ^e	0,814 ± 0,06 ^h
<i>C. vulgaris</i> - SeNP _{10ppm}	0,092 ± 0,03 ^b	0,513 ± 0,04 ^c	0,672 ± 0,06 ^e	0,794 ± 0,06 ^h
<i>C. vulgaris</i> - SeNP _{100 ppm}	0,032 ± 0,01 ^a	0,083 ± 0,03 ^c	0,094 ± 0,02 ^f	0,094 ± 0,06 ^g
<i>C. vulgaris</i> - UV	0,095 ± 0,009 ^b	0,539 ± 0,01 ^c	0,747 ± 0,1 ^e	0,882 ± 0,1 ^h
<i>C. vulgaris</i> - UV - SeNP _{0,1ppm}	0,081 ± 0,03 ^{ab}	0,460 ± 0,02 ^c	0,548 ± 0,4 ^{ef}	0,632 ± 0,4 ^h
<i>C. vulgaris</i> - UV - SeNP _{10ppm}	0,089 ± 0,01 ^b	0,595 ± 0,03 ^d	0,793 ± 0,06 ^e	0,901 ± 0,006 ^h
<i>C. vulgaris</i> - UV - SeNP _{100 ppm}	0,032 ± 0,01 ^a	0,056 ± 0,03 ^d	0,086 ± 0,02 ^f	0,156 ± 0,07 ^g

Tablo 3.1’de verilen verilere göre, UV maruziyeti yapılmayan deney gruplarında 4. günde 0,1 ppm SeNP içeren deney grubunda hücre sayısı $79,66 \pm 6,5 \times 10^6$ olarak ölçülmüşken, 10 ppm SeNP içeren deney grubunda $51,27 \pm 4,5 \times 10^6$ ve 100 ppm SeNP içeren deney grubunda ise $13,6 \pm 0,4 \times 10^6$ olarak hesaplanmış olup SeNP konsantrasyondaki artışa paralel olarak hücre sayısında anlamlı bir düşüş kaydedilmiştir. 6, 8. Günlerde kontrol (*C. vulgaris*), 0,1 ppm ve 10 ppm SeNP içeren deney gruplarında hücre sayıları istatistiksel olarak benzer seyretmişken 100 ppm SeNP içeren deney grubunda anlamlı bir düşüş görülmüştür. UV maruziyeti yapılan deney grubunda ise; 0,1 ppm konsantrasyonda $105,48 \pm 4,2 \times 10^6$ ve 10 ppm SeNP konsantrasyonda $82,94 \times 10^6$ hücre sayısına ulaşılırken 100 ppm SeNP içeren deney grubunda hücre sayısı $9,02 \pm 0,44 \times 10^6$ düzeyinde kalarak ciddi oranda düşüş göstermiştir.

Tablo 3.2’de verilen optik yoğunluk değerleri incelendiğinde 4. günde 0,1 ppm ve 10 ppm sırasıyla elde edilen değerler $0,564 \pm 0,02$ ve $0,513 \pm 0,04$ iken 6. günde $0,691 \pm 0,06$ ve $0,672 \pm 0,06$ olarak bulunmuş ve bu günlerde 0,1 ppm ve 10 ppm SeNP içeren deney gruplarında logaritmik büyüme fazının uzadığı ve akabinde gelen durağan fazda SeNP’nin

büyümeye olumlu etki yaptığı gözlemlenmiştir. 6 ve 8. günler arasında geçilen durağan faz ile beraber büyüme hızında 10 ppm SeNP içeren deney grubunda azalma başlarken 0,1 ppm SeNP içeren deney grubunda daha yüksek seyretmiştir. Buna ek olarak, bütün deney gruplarında durağan faza girilmesi ile 8. günde canlının stres koşuluna adapte olarak normal büyüme kinetiğine yaklaştığı belirlenmiştir.

Deneyin geneline bakıldığında; UV stresinin 8. güne kadar olan zaman aralığında olduğu, durağan faza girilmesiyle algin normal fizyolojik duruma gelmeye başladığı gözlemlenmiş olup SeNP'nin canlının logaritmik büyüme fazının süresini arttırdığı ve durağan faza girmesini geciktirdiği tespit edilmiştir. 100 ppm SeNP içeren deney grubunda ise optik yoğunluk ve hücre sayısında kontrol ve diğer deney gruplarına kıyasla ciddi bir şekilde azalma olduğu ve SeNP'nin mikroalg büyüme kinetiğini olumsuz etkilediği belirlenmiştir.

UV maruziyeti gerçekleştirilen deney düzeneğinde SeNP'nin büyüme kinetiği üzerindeki etkisi 4. ve 6. günlerde anlamlı olduğu ve bu zamanlarda en etkili parçacık konsantrasyonunun 0,1 ppm olması sebebiyle 0,1 ppm SeNP, ana deneyde kullanılacak parçacık konsantrasyonu olarak seçilmiştir.

Abdel-Hamid vd. tarafından *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella* sp., *Monoraphidium concolutum*, *Monoraphidium contortum*, *Monoraphidium griffithi*, *Anabaena flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa* ve *Oscillatoria agardhii* alglerinin büyümesi üzerine selenyumun etkisinin araştırıldığı çalışmada, *S. obliquus* algi haricindeki bütün alglerde denenen 320, 100, 32, 10, 3,2; 1,0; 0,032; 0,01 ve 0,0032 ppm konsantrasyonlarda 100 ppm'e kadar selenyumun büyümeyi teşvik ettiği kaydedilmiştir [177].

Bu çalışmamızda da literatür ile uyumlu bir şekilde selenyumun *C. vulgaris* mikroalginde 0,1 ppm konsantrasyonda UV-C maruziyetiyle düşen büyümeyi büyümeyi teşvik ettiği belirlenmiştir.

3.2.1.2. UV-C maruziyet süresinin belirlenmesi

UV radyasyonunun hücreler üzerindeki etkisi, UV radyasyon şiddetinin maruziyet süresi ile çarpımına karşılık gelen UV doz kavramına bağlıdır [178]. Bu nedenle sentezlenmiş SeNP'ların *C. vulgaris* üzerinde oluşturulacak oksidatif strese etkisinin uygun şekilde araştırılabilmesi için UV-C maruziyet süresi belirlenmiştir. Bu amaçla aktif *C. vulgaris* kültüründen ayrı ayrı örnek alınarak 20 dakika, 1, 3 ve 6 saat boyunca UV-C ışınlarına maruz bırakıldıktan sonra tekrar aktifleştirilmiş taze besiyerine inoküle edilmiş ve 3, 7 ve 14. günlerde optik yoğunluk (OD₆₈₀) ve hücre sayımı yapılarak maruziyet süresi tespit edilmiştir.

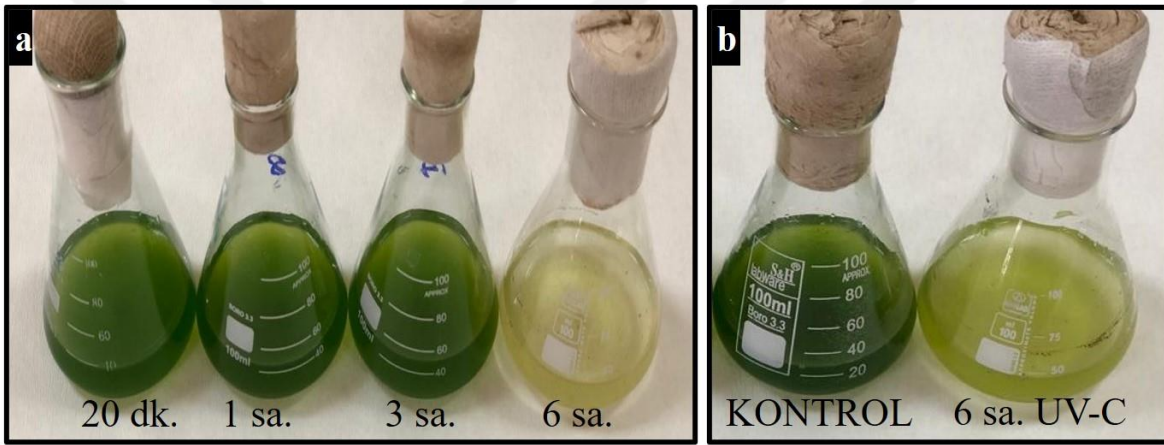
Tablo 3.3. Farklı UV-C maruziyet sürelerinde 1 mL kültürde bulunan hücre sayıları (10⁶).

Deney Grubu	3. Gün (hücre/mL)	7. Gün (hücre/mL)	14. Gün (hücre/mL)
<i>C. vulgaris</i>	93,43 ± 0,26	169,09 ± 3,46	188,56 ± 4,49
<i>C. vulgaris</i> - 20 dk. UV	91,70 ± 0,62	133,88 ± 4,76	182,70 ± 5,34
<i>C. vulgaris</i> - 1 sa. UV	76,08 ± 0,36	133,02 ± 10,86	175,78 ± 8,46
<i>C. vulgaris</i> - 3 sa. UV	60,56 ± 0,44	108,3 ± 0,78	174,98 ± 8,50
<i>C. vulgaris</i> - 6 sa. UV	23,22 ± 2,33	95,5 ± 3,38	174,02 ± 0,66

Tablo 3.3'te görülen hücre sayımı ve Tablo 3.4'te verilen optik yoğunluk değerleri dikkate alındığında UV maruziyet süresinin artışına paralel olarak hücre yoğunluğunda azalma görülmüştür. Kontrol grubuna kıyasla hücre sayım değerleri maruziyet süresine göre sırasıyla %1,85; %17,8; %35,19 ve %75,15 oranında azalma göstermiştir. 3. gün kontrol grubu 0,572 ± 0,02 değerinde optik yoğunluğa ve 93,43 ± 0,26 hücre/mL hücre sayım değerine ulaşırken 6 saat UV-C maruziyetine bırakılmış deney grubu 0,248 ± 0,018 optik yoğunluğa ve 23,22 ± 2,33 hücre/mL hücre sayım değerine ulaşabilmiştir.

Tablo 3.4. Farklı UV-C maruziyet sürelerinde kültürlerde optik yoğunluk (OD₆₈₀) değerlerinde meydana gelen değişim.

Deney Grubu	3. Gün	7. Gün	14. Gün
<i>C. vulgaris</i>	0,572 ± 0,02	0,926 ± 0,007	0,950 ± 0,03
<i>C. vulgaris</i> - 20 dk, UV	0,514 ± 0,0005	0,911 ± 0,011	0,933 ± 0,01
<i>C. vulgaris</i> - 1 sa, UV	0,513 ± 0,0020	0,923 ± 0,0025	0,921 ± 0,01
<i>C. vulgaris</i> - 3 sa, UV	0,425 ± 0,0010	0,893 ± 0,014	0,920 ± 0,01
<i>C. vulgaris</i> - 6 sa, UV	0,248 ± 0,018	0,843 ± 0,117	0,889 ± 0,04



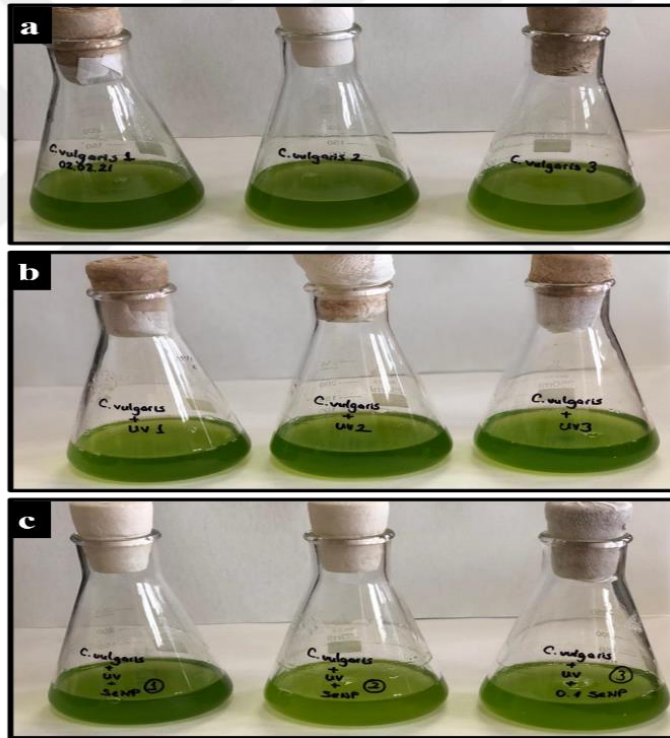
Şekil 3.24. UV maruziyeti sonrası 14. gün kültürlerde meydana gelen renk değişimi, (a) Sırasıyla 20 dakika, 1 saat, 3 saat ve 6 saat UV-C ışınına maruz bırakılan kültürler; (b) sırasıyla kontrol grubu ve 6 saat UV-C ışınına maruz bırakılan deney grubu.

Hücre sayım ve optik yoğunluk değerlerinde en yüksek azalmanın 6 saat maruziyet sonucunda gerçekleşmesi nedeniyle 6 saat maruziyet süresi olarak belirlenmiştir.

3.2.2. Sentezlenen selenyum nanoparçacıkların *Chlorella vulgaris* mikroalgi üzerinde oksidatif strese etkisi

Selenyumun hücresel metabolizmadaki fonksiyonunun selenoproteinlerle ilişkili olduğu bilinmektedir. Hücre redox potansiyelinin korunması süreçlerine dahil olan ve fonksiyonları bilinmeyen birçok protein ve glutatyon peroksidaz (GPX) gibi birçok enzim, selenoprotein yapısında bulunmaktadır [179]. Selenyumun sağlığa olan olumlu etkilerinin

selenyum içeren ve reaktif oksijen türlerini indirgeme ile daha az reaktif moleküllere dönüştürerek oksidatif stresi engelleyen antioksidan enzimler tarafından yönetildiği düşünülmektedir [180]. Bu bağlamda *Chlorella vulgaris* üzerine yapılan UV-C ışınlamasının meydana getirdiği hasara etkisini araştırmak amacıyla 6 saat UV-C maruziyetine bırakılan *C. vulgaris* - UV, UV maruziyetine etkisini belirlemek için *Citricoccus* sp. bakterisi süpernatantı kullanılarak elde edilen selenyum nanoparçacık ilave edilmiş *C. vulgaris* – UV - SeNP_{0,1ppm} ve kontrol *C. vulgaris* deney gruplarında 1, 3 ve 7. günlerde hidrojen peroksit, malondialdehit (MDA), optik yoğunluk (OD₆₈₀), klorofil (a+b) ve hücre sayımı değerleri alınarak incelenmiştir.



Şekil 3.25. UV maruziyeti sonrası kültürlerde 7. gün sonunda meydana gelen renk değişimleri (a) kontrol grubu, (b) 6 saat UV-C maruziyetine bırakılmış kültür, (c) 6 saat UV-C maruziyetine bırakılarak SeNP içeren besiyerinde gelişen kültür.

3.2.2.1. Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarının belirlenmesi

Tablo 3.5. 0,1 ppm SeNP konsantrasyonlarında UV maruziyeti yapılan, UV uygulanmayan ve kontrol grubu kültürlerinde hidrojen peroksit (H₂O₂) değerlerinde meydana gelen değişimler (Üstsel simgeler gün bazında gruplar arası farklılığı göstermektedir.)

Deney Grubu	1. Gün (µM)	3. Gün (µM)	7. Gün (µM)
<i>C. vulgaris</i>	1,208 ± 0,30 ^a	0,595 ± 0,77 ^c	0,323 ± 0,15 ^e
<i>C. vulgaris</i> - UV	1,565 ± 0,61 ^b	1,417 ± 0,23 ^d	1,224 ± 0,05 ^f
<i>C. vulgaris</i> - UV – SeNP _{0,1ppm}	1,224 ± 0,87 ^a	0,680 ± 0,29 ^c	0,561 ± 0,29 ^e

Tablo 3.5'te gösterilen hidrojen peroksit (H₂O₂) verileri incelendiğinde; 1, 3 ve 7. günlerde istatistiksel olarak en az iki grup farklı bulunmuştur (ANOVA $\alpha p < 0,005$). *C. vulgaris* kontrol grubuna kıyasla UV maruziyetine bırakılan *C. vulgaris* – UV deney grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış (ANOVA $\alpha p < 0,005$; TUCKEY $\alpha p < 0,001$) görülürken *C. vulgaris* – UV grubuna kıyasla *C. vulgaris* – UV- SeNP_{0,1 ppm} deney grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma (ANOVA $\alpha p < 0,005$; TUCKEY $\alpha p < 0,001$) görülmüştür. *C. vulgaris* ve *C. vulgaris* – UV- SeNP_{0,1ppm} deney grupları kendi aralarında istatistiksel olarak benzer (ANOVA $\alpha p < 0,005$; TUCKEY $\alpha p > 0,001$) bulunmuştur. Bütün gruplarda zamana paralel olarak hidrojen peroksit miktarlarında azalma görülmüştür. Meydana gelen azalmanın antioksidan enzimler kaynaklı olabileceği literatürde birçok çalışmada gösterilmiş olup çalışmamızda literatürü desteklemektedir [104, 115, 181].

C. vulgaris ile aynı taksonomik filum içerisinde incelenen *Scenedesmus quadricauda* kullanılarak yapılan başka bir UV maruziyet çalışmasında ise 1 saat UV-C (254 nm) ışınlaması yapıldığında; kültürde H₂O₂ birikiminin %61 oranında arttığı, meydana gelen H₂O₂ ve super oksit artışına bağlı olarak oksidatif stresin arttığı belirtilmiş ve bu durum UV fotonlarının fotokimyasal reaksiyonların gerçekleşmesini sağlayan kimyasal bağlarda hasara yol açabilecek enerjiye sahip olabileceği ve buna ek olarak, UV stresin ROS'un aşırı üretilmesinde payı olan kloroplast ve mitokondrilerdeki elektron transport sisteminde elektron kaçışını arttırarak meydana gelebileceği açıklanmıştır [182].

Benzer şekilde, Dummermuth ve ekibi tarafından hidrojen peroksit ile oluşturulmuş stres altında yapılan ve oksidatif strese enzimlerde meydana gelen değişimin incelendiği çalışmada, mikroalgler üzerinde artan hidrojen peroksit miktarları uygulanarak oluşturdukları yapay oksidatif stres sonucunda katalaz ve askorbat peroksidaz enzimlerinde meydana gelen değişimleri incelemiştir. *Polysiphonia arctica* alginde 24 saat içerisinde katalaz aktivitesinin hidrojen peroksit ile indüklendiği ve 8 gün boyunca kontrole oranla yüksek seyrettiği belirtilirken CAT aktivitesinde 1. ve 2. günlerde artış gözlemlenmiş, aktivite 4. günde kontrol düzeyine geldikten sonra kontrole oranla 6. günde % 400 civarında ve 8. günde %1000 oranında artış göstermiştir. Hidrojen peroksit bağlantılı bir diğer antioksidan enzim olan APX (askorbat peroksidaz) aktivitesinde ise 1. ve 2. günlerde kontrole oranla %200 civarında bir artış, 4. günde kontrol düzeyine düşüş, 6. günde %400 oranında artış ve 8. günde maksimum artış kaydedilmiştir [183].

Bu çalışmada UV maruziyetine paralel olarak artan H₂O₂ miktarı ve takip eden günlerde literatür örneklerinde belirtildiği gibi oksidan enzimlerin devreye girmesi sonucu meydana gelen azalma, literatürde bulunan örneklerle uyumluluk göstermektedir.

3.2.2.2. Malondialdehit (MDA) değerlerinin belirlenmesi

Malondialdehit değerlerinin belirlenmesi ile elde edilen değerler Tablo 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.6. 0,1 ppm SeNP konsantrasyonlarında UV maruziyeti yapılan, UV uygulanmayan ve kontrol grubu kültürlerinde malondialdehit (MDA) değerlerinde meydana gelen değişimler (Üstsel simgeler gün bazında gruplar arası farklılığı göstermektedir.)

Deney Grubu	1. Gün (µM)	3. Gün (µM)	7. Gün (µM)
<i>C. vulgaris</i>	0,103 ± 0,23 ^{ab}	0,010 ± 0,007 ^c	0,0127 ± 0,006 ^f
<i>C. vulgaris</i> - UV	0,172 ± 0,51 ^a	0,088 ± 0,160 ^d	0,0473 ± 0,033 ^f
<i>C. vulgaris</i> - UV – SeNP _{0,1ppm}	0,049 ± 0,14 ^b	0,041 ± 0,003 ^e	0,032 ± 0,006 ^f

Tablo 3.6'da verilen malondialdehit (MDA) değerleri incelendiğinde; 1. gün UV-C maruziyeti yapılmış *C. vulgaris* – UV deney grubunda MDA değeri 0,172 ± 0,51 µM olarak bulunmuşken UV-C maruziyeti yapılmış ve SeNP takviyeli deney grubunda ise MDA değeri

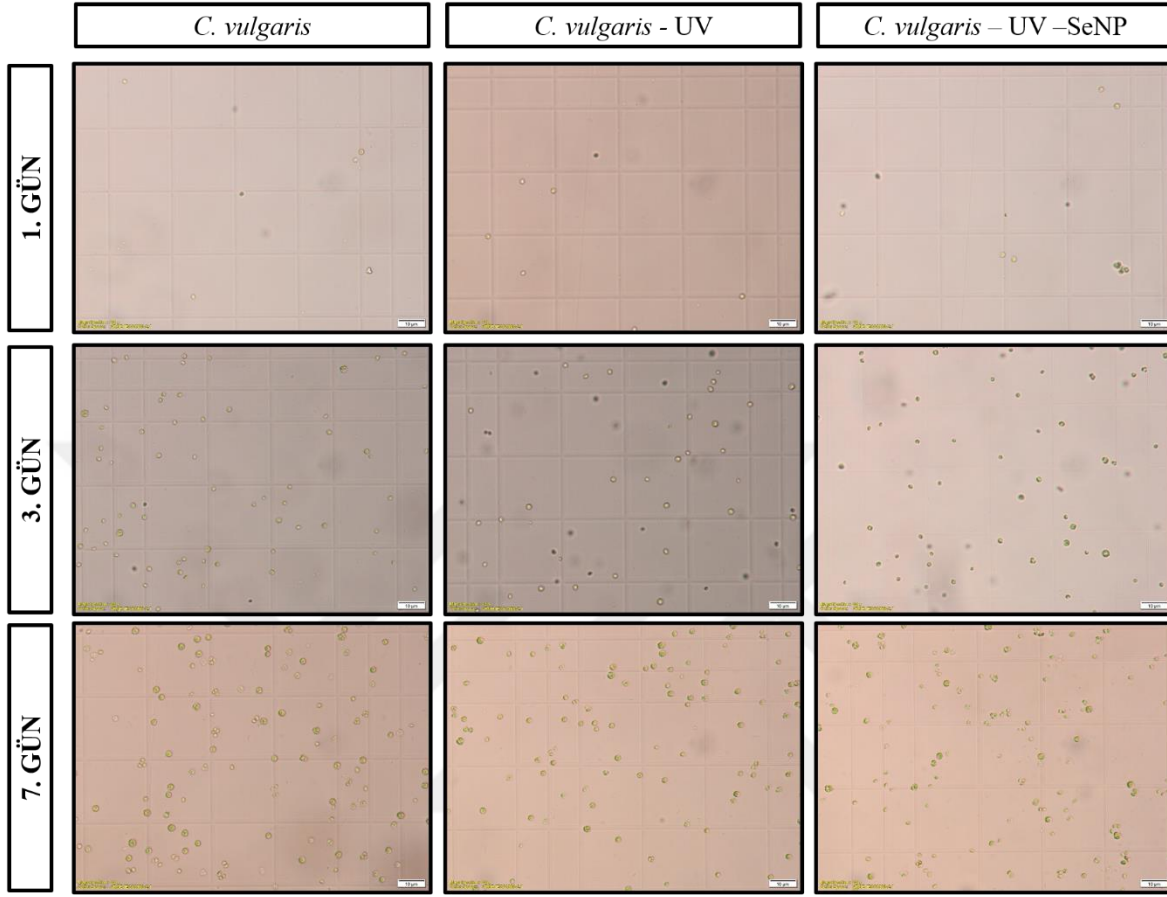
0,049 $\pm$ 0,14 μ M olarak bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı bir azalma (ANOVA α $p < 0,005$; TUCKEY α $p < 0,001$) göstermiştir. 3. gün verilerinde ise kontrol grubu 0,010 $\pm$ 0,007 μ M, UV - C maruziyeti uygulanmış grupta 0,088 $\pm$ 0,160 μ M ve UV-C maruziyeti sonrası SeNP takviyesi yapılmış grupta ise MDA değeri 0,041 $\pm$ 0,003 μ M olarak bulunmuş ve kontrole oranla *C. vulgaris* – UV ve *C. vulgaris* – SeNP_{0,1ppm} gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış kaydedilmiştir (ANOVA α $p < 0,005$; TUCKEY α $p < 0,001$). SeNP takviyesi yapılmış deney grubunda sadece UV-C maruziyeti yapılmış deney grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmiştir (ANOVA α $p < 0,005$; TUCKEY α $p < 0,001$). 7. gün MDA değerleri üç grup arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır (ANOVA α $p > 0,005$).

Ahmed ve ekibi tarafından 2017 yılında *Pavlova lutheri* mikroalginin UV-C maruziyetine bırakılarak yapılan benzer bir araştırmada 24. saatte kontrol grubundaki MDA düzeyi 0,178 $\pm$ 0,023 mmol iken UV-C ışını uygulanmış kültürde 0,786 $\pm$ 0,028 mmol olarak kaydedilmiş olup artış gözlemlenmiştir. 48. saatten sonra MDA düzeyi kontrol grubunda 0,786 $\pm$ 0,028 mmol iken deney grubunda 4,637 $\pm$ 0,08 mmol değerine ulaştığı; ancak 48. saatten sonra kontrol grubunun 0,654 $\pm$ 0,025 mmol ve deney grubunun ise 2,923 $\pm$ 0,149 mmol değerine ulaşarak azaldığı kaydedilmiştir [184].

Literatür incelendiğinde UV maruziyeti uygulanan kültürlerde MDA düzeyinde artış görüldüğü kaydedilmiş olup bu çalışmada elde edilen sonuçlarla uyumluluk göstermektedir.

3.2.2.3. Optik yoğunluk (OD₆₈₀) ve hücre dansitesinin belirlenmesi

Mikroalglerde meydana gelen oksidatif stresin en yaygın indikatörlerinden biri gelişme oranında meydana gelen düşüştür [115]. Bu nedenle UV-C ışın maruziyetinin büyüme oranında oluşturduğu etkiyi incelemek amacıyla 1, 3 ve 7. günlerde UV-spektrofotometresi kullanılarak 680 nm’de optik yoğunluk değeri ölçülmüş ve thoma lamı yardımıyla hücre sayımı yapılarak karşılaştırılmıştır. Hücre sayımı görüntüleri Şekil 3.26’da verilmiştir.



Şekil 3.26. Deney gruplarının 1, 3 ve 7. günlerde yapılan hücre sayım mikroskop görüntüleri.

Tablo 3.7’de verilen optik yoğunluk değerleri incelendiğinde; deneyin 1. gününde UV maruziyeti sonrası SeNP takviyeli ortamda yetiştirilen *C. vulgaris*- UV- SeNP_{0,1ppm} deney grubunun optik yoğunluk değeri $0,074 \pm 0,13$ iken UV-maruziyeti yapılan *C. vulgaris* – UV deney grubu $0,037 \pm 0,004$ olarak ölçülmüş olup istatistiksel olarak SeNP takviyeli deney grubunda anlamlı artış (ANOVA $\alpha p < 0,005$; TUCKEY $\alpha p < 0,001$) kaydedilmiştir. 3. gün bütün deney grupları istatistiksel olarak benzer (ANOVA $\alpha p > 0,005$) seyredirken 7. günde bütün deney grupları istatistiksel açıdan birbirinden anlamlı şekilde farklı (ANOVA $\alpha p < 0,005$; TUCKEY $\alpha p < 0,001$) bulunmuştur. *C. vulgaris* – UV grubu, kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalma gösterirken SeNP eklenmiş besiyerinde yetiştirilen deney grubu *C. vulgaris* – UV – SeNP_{0,1ppm}, kontrol ve UV maruziyeti yapılmış deney grubuna göre anlamlı artış göstermiştir (ANOVA $\alpha p < 0,005$; TUCKEY $\alpha p < 0,001$).

0,1 ppm SeNP konsantrasyonlarında UV maruziyeti yapılan, UV uygulanmayan ve kontrol grubu kültürlerinde optik yoğunluk (OD₆₈₀) değerlerinde meydana gelen değişimler Tablo 3.7’de verilmiştir.

Tablo 3.7. 0,1 ppm SeNP konsantrasyonlarında UV maruziyeti yapılan, UV uygulanmayan ve kontrol grubu kültürlerinde optik yoğunluk (OD₆₈₀) değerlerinde meydana gelen değişimler (Üstsel simgeler gün bazında gruplar arası farklılığı göstermektedir.)

Deney Grubu	1. Gün	3. Gün	7. Gün
<i>C. vulgaris</i>	0,056 ± 0,004 ^{ab}	0,333 ± 0,37 ^c	0,603 ± 0,006 ^d
<i>C. vulgaris</i> - UV	0,037 ± 0,004 ^a	0,316 ± 0,001 ^c	0,466 ± 0,008 ^e
<i>C. vulgaris</i> - UV – SeNP _{0,1ppm}	0,074 ± 0,13 ^b	0,343 ± 0,015 ^c	0,644 ± 0,005 ^f

Tablo 3.8 ve 3.9’da verilen hücre sayımı değer ve yüzdeleri incelendiğinde ise; 1. gün *C. vulgaris* – UV deney grubu, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ve %35,19 oranında azalma (ANOVA $\alpha p < 0,005$; TUCKEY $\alpha p < 0,001$) gösterirken *C. vulgaris* – UV – SeNP_{0,1ppm} grubu anlamlı ve %25,38 oranında artış göstermiştir ANOVA $\alpha p < 0,005$; TUCKEY $\alpha p < 0,001$). 3. günde kontrol grubuna göre, *C. vulgaris* – UV deney grubu %32,38 ve *C. vulgaris* – UV – SeNP_{0,1ppm} %27,48 oranında istatistiksel olarak anlamlı azalma (ANOVA $\alpha p < 0,005$; TUCKEY $\alpha p < 0,001$) göstermekle beraber kendi aralarında istatistiksel olarak benzer (ANOVA $\alpha p < 0,005$; TUCKEY $\alpha p > 0,001$) bulunmuştur. 7. günde *C. vulgaris* – UV grubu $506,47 \pm 24,85,10^6$ hücre/mL hücre sayısı ile kontrol grubuna göre %34,94 anlamlı azalma, *C. vulgaris* – UV- SeNP_{0,1ppm} grubu ise $642,13 \pm 16,42$ hücre/mL hücre sayısı ile %17,51 oranında anlamlı azalma göstermiştir ANOVA $\alpha p < 0,005$; TUCKEY $\alpha p < 0,001$). *C. vulgaris* – UV – SeNP_{0,1ppm} grubu *C. vulgaris* – UV grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ve %17,43 oranında artış göstermiştir (ANOVA $\alpha p < 0,005$; TUCKEY $\alpha p < 0,001$).

Tablo 3.8. 0,1 ppm SeNP konsantrasyonlarında UV maruziyeti yapılan, UV uygulanmayan ve kontrol grubu kültürlerinde 1 mL'de bulunan hücre sayısı (10^6) değerlerinde meydana gelen değişimler (Üstsel simgeler gruplar arası farklılığı göstermektedir.)

Deney Grubu	1. Gün (hücre/mL)	3. Gün (hücre/mL)	7. Gün (hücre/mL)
<i>C. vulgaris</i>	5,91 ± 0,61 ^a	432,13 ± 19,68 ^d	778,47 ± 9,65 ^f
<i>C. vulgaris</i> – UV	3,83 ± 0,65 ^b	292,20 ± 10,14 ^e	506,47 ± 24,85 ^g
<i>C. vulgaris</i> - UV – SeNP _{0,1ppm}	7,41 ± 0,71 ^c	313,4 ± 12,18 ^e	642,13 ± 16,42 ^h

Tablo 3.9. 0,1 ppm SeNP konsantrasyonlarında UV maruziyeti yapılan, UV uygulanmayan ve kontrol grubu kültürlerinde hücre dansitesinde meydana gelen değişim (Üstsel simgeler gün bazında gruplar arası farklılığı göstermektedir.)

Deney Grubu	1. Gün	3. Gün	7. Gün
<i>C. vulgaris</i>	%100	%100	%100
<i>C. vulgaris</i> – UV	%64,81	% 67,62	%65,06
<i>C. vulgaris</i> - UV – SeNP _{0,1ppm}	%125,38	% 72,52	%82,49

Tao ve ekibi tarafından 2010 yılında UV-C maruziyetinin *Chlorella vulgaris* üzerinde baskılama ve iyileşme sürecini incelemek üzere yapılan çalışmada; 40W UV-C lambası ile 49, 122, 244 ve 488 saniye boyunca maruziyet gerçekleştirilmiş ve 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13. günlerde örnekler alınarak incelemeler yapılmıştır. UV-C ile indüklenmiş membran hasarı ve devamında gelişen iyileşme sürecini incelemek üzere aldıkları hücre yoğunluğu verilerinde; maruziyetten sonraki bir gün içerisinde kontrol grubuna oranla büyümenin yavaşladığı; sonrasında kontrolle aynı modelde ilerlediği, bütün dozlarda 3. günde spesifik büyüme hızının ve hücre yoğunluğunun devamlı arttığı ancak büyüme hızının kontrole oranla düştüğü tespit edilmiştir. Akış sitometrisi ile membran hasarlı hücrelerin toplam hücrelere oranı (Pmd) alınmış ve maruziyetten sonra Pmd oranının maksimuma ulaştığı, ancak zamanla Pmd oranının azaldığı ve büyüme kinetiğinin kontrole yaklaştığı belirlenmiştir [185].

2020 yılında yapılan başka bir çalışmada *Chlorella vulgaris* kültürlerine 50-200 mJ.cm⁻² dozunda verilen UV-C maruziyetine bırakılıp ardından alt kültürleme yapılan

çalışmada 1, 3, 5, 7, 10 ve 18. günlerde örnek alınarak çalışmalar yapılmıştır. Büyüme eğrisi incelendiğinde; kontrol grubuna kıyasla hücre yoğunluğunun zamanla azaldığı ve ardından yükseldiği önemli bir büyüme inhibisyon eğilimi gösterdiği tespit edilmiştir. *C. vulgaris* inhibisyon periyodunun 1-3. gün arasında keskin bir şekilde gerçekleştiği ve ardından hızlı bir şekilde iyileşme sürecine girdiği gösterilmiştir. UV-C ışınlarının fotosentez sistemine anında zarar vermekle kalmadığı, aynı zamanda hücre zarında kademeli bir şekilde hasarlara da yol açtığı belirtilmiştir. Önceden yapılan çalışmalarda da, UV-C ışınlanmasının pirimidin dimerlerinin üretilmesine, D1 proteini için psbA ve fitosiyenin için cpc transkripsiyonunu engellediği; ancak 3 gün içinde onarıldığı ve bunlara ek olarak UV-C ışınlanmasının pigmentlerde ve D1 proteininde önemli düşüşlere de neden olabileceği bulunmuştur. Tüm bu verilere ek olarak, UV-C ışınlanmasının hem hücre içi hem de hücre dışında mikrokistin indirgenmesine, hücrelerin yerleşim oranının değişmesine, reaktif oksijen türlerinin artmasına ve ardından dolaylı olarak oksidatif hasara ve hücre bütünlüğünün bozulması ve ölüme yol açtığı gösterilmiştir [186].

UV ışınlanmasında koruyucu mekanizmalarda meydana gelen hasar sonucu oluşan değişikliklerin hücresel dengesizliğe neden olduğu, bu dengesizlik sonucu DNA molekülünde konformasyonel değişiklikler ve replikasyon, transkripsiyon ve translasyon aşamalarında bozulma oluşturduğu ve nihayetinde mikroalglerde büyüme oranının azaldığı ve ölüme yol açtığı bilinmektedir [187].

Murprayana vd. tarafından yapılan başka bir çalışmada, *Botryococcus braunii* mikroalginde ayrı ayrı UV-C ve nitröz asit mutajenleri kullanılarak büyüme oranındaki etkileri incelenmiş ve karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda nitröz asit uygulanmış deney grubunda spesifik büyüme oranı $0,11936 \text{ gün}^{-1}$ olarak bulunurken UV-C maruziyeti yapılan deney grubunda $0,08086 \text{ gün}^{-1}$ olarak bulunması dikkat çekmiştir. Büyümede kontrol grubuna ve nitröz asit deney grubuna kıyasla UV-C maruziyeti yapılmış deney grubunda daha yüksek oranda düşüş görülmesi, algin kendini UV-C kaynaklı yan etkilere adapte etmesi ve bunun sonucunda da alg büyümesinin düşmesi ile açıklanmıştır [188].

Bu çalışmada UV-C maruziyeti sonucunda alg büyümesinde görülen düşüşün literatür ile tutarlı olduğu ve sentezlenen selenyum nanoparçacığının bu düşüş üzerinde iyileştirici etki gösterdiği belirlenmiştir.

3.2.2.4. Klorofil (a+b) miktarının belirlenmesi

Citricoccus sp. bakterisi süpernatantı kullanılarak sentezlenmiş SeNP'ın 0,1 ppm konsantrasyonda *C. vulgaris* üzerindeki 6 saatlik UV-C maruziyeti sonrasında klorofil (a+b) miktarında 1, 3 ve 7. günlerde meydana getirdiği değişim Tablo 3.10'da verilmiştir. Verilere göre; 1. gün UV- ışını uygulanmış gruba kıyasla UV-ışını uygulandıktan sonra SeNP içeren ortamda yetiştirilmiş kültürde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlenmişken *C. vulgaris* – UV – SeNP_{0,1ppm} grubunda kontrole oranla klorofil (a+b) miktarında artış, *C. vulgaris* – UV grubunda ise kontrole oranla düşüş meydana gelmiş; ancak bu iki grup kontrole kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı fakat benzer bulunmuştur (ANOVA $\alpha p < 0,005$; TUCKEY $\alpha p > 0,001$). 3. gün verileri incelendiğinde kontrol grubunun klorofil (a+b) değeri $5,682 \pm 0,55$ $\mu\text{g/mL}$ iken *C. vulgaris* – UV grubunda $5,087 \pm 0,55$ ve *C. vulgaris* – UV – SeNP_{0,1ppm} grubunda $5,238 \pm 0,137$ $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiş ve istatistiksel açıdan sırasıyla %10,48 ve %8 oranında anlamlı azalma göstermiştir (ANOVA $\alpha p < 0,005$; TUCKEY $\alpha p < 0,001$). *C. vulgaris* – UV ve *C. vulgaris* – UV – SeNP_{0,1ppm} deney grupları kendi aralarında istatistiksel olarak benzer bulunmuştur (ANOVA $\alpha p < 0,005$; TUCKEY $\alpha p > 0,001$). 7. gün verilerinde de kontrol grubuna kıyasla *C. vulgaris* – UV ve *C. vulgaris* – UV – SeNP_{0,1 ppm} gruplarında azalma meydana gelse de aradaki farklar istatistiksel olarak benzer bulunmuştur (ANOVA $\alpha p > 0,005$).

Tablo 3.10. 0,1 ppm SeNP konsantrasyonlarında UV maruziyeti yapılan, UV uygulanmayan ve kontrol grubu kültürlerinde klorofil a ve b miktarında meydana gelen değişim (Üstsel simgeler gün bazında gruplar arası farklılığı göstermektedir.)

Deney Grubu	1. Gün ($\mu\text{g/mL}$)	3. Gün ($\mu\text{g/mL}$)	7. Gün ($\mu\text{g/mL}$)
<i>C. vulgaris</i>	$2,953 \pm 0,58^{ab}$	$5,682 \pm 0,55^c$	$7,193 \pm 0,2^e$
<i>C. vulgaris</i> – UV	$2,719 \pm 0,146^a$	$5,087 \pm 0,126^d$	$6,369 \pm 1,19^e$
<i>C. vulgaris</i> - UV – SeNP _{0,1ppm}	$3,039 \pm 0,85^b$	$5,238 \pm 0,137^d$	$6,645 \pm 1,31^e$

Al-Rashed ve ekibi tarafından 2016 yılında *Dunaliella salina* ve *Spirulina platensis* mikroalglerinde UV-B ışını maruziyeti sonucunda MDA, H₂O₂, antioksidan enzimler ve klorofil a, b içeriğinde meydana gelen değişimleri inceledikleri çalışmada UV-B ışınlarına maruz bırakılmış kültürlerde kontrol grubuna oranla klorofil a miktarının %36 ve %42 oranında, klorofil b miktarının ise %32 ve %42 oranında düştüğü belirtilmiştir.

Al-Badri vd. tarafından yapılan başka bir çalışmada, *Chlorococcum littorale* algi 5, 25, 50, 75, 100 ve 150 ppm selenyum içeren besiyerinde geliştirilerek klorofil a miktarında meydana gelen değişimler izlenmiştir. 6 gün boyunca 50 ppm konsantrasyona kadar selenyum içeren deney gruplarında klorofil a miktarında sürekli bir artış görülmüş ancak 50 ppm üstündeki konsantrasyonlarda anlamlı bir azalma kaydedilmiştir [189].

Bu çalışmada literatürdeki UV-C maruziyet çalışmalarına paralel olarak maruziyet sonrası klorofil içeriğinde düşüş meydana gelmiş; ancak bu düşüş ve sentezlenen selenyum nanoparçacığın etkisi ile meydana gelen değişim, istatistiksel olarak benzer bulunmuştur.



4. SONUÇ

Bu tez çalışması ile literatürde ilk defa, halofilik bir bakteri olan *Citricoccus* sp. bakterisi ile ekstrasellüler selenyum nanoparçacık sentezi gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasının ilk bölümünde, biyolojik selenyum nanoparçacık sentezi optimizasyon koşulları pH 8, 24 saat sentez süresi, 30 °C sıcaklık ve 150 rpm çalkalama koşulları olarak belirlenmiştir. Sentezlenen selenyum nanoparçacıkların karakterizasyonu UV-Vis spektrofotometre, SEM, TEM, DLS ve ATR FT-IR analizleri ile tamamlanmıştır. ATR FT-IR analizleri ile bakterinin selenyum nanoparçacık sentezinden sorumlu indirgeyici maddenin protein olduğu belirlenmiştir. TEM ve DLS analizleri ile nanoparçacıkların küresel şekilde yaklaşık 100 nm boyutunda ve yaklaşık -20 mV zeta potansiyeline sahip olduğu bulunmuştur.

Tez çalışmasının ikinci bölümünde biyojenik yollarla sentezlenen selenyum nanoparçacıkların bir model mikroalg türü olan *Chlorella vulgaris*'in UV-C ışını uygulamasına bağlı olarak oluşturulan stres koşullarına etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, mikroalglerde oksidatif stresin biyolojik belirteçleri olan hidrojen peroksit (H₂O₂), malondialdehit (MDA), klorofil (a+b) ve büyüme parametrelerinde meydana gelen değişim incelenmiş ve selenyum nanoparçacığının bu değişiklikler üzerine etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak, sentezlenen selenyum nanoparçacıkların *C. vulgaris*'in UV-C stresine karşı iyileştirici etkisi gösterilmiştir.

Mikroalgler birincil trofik seviyede olup gıda üretiminin %70'inden fazlasını oluşturması, biyodizel üretiminde kullanılabilmesi, içerdikleri vitamin, protein, karbonhidrat ve karotenoidler gibi değerli moleküller ile oldukça önem arz etmektedir. Bu çalışmada *C. vulgaris* mikroalgi üzerine uygulanan UV-C stresine karşı iyileştirici gücü olan nanoparçacığının birlikte kullanıldığında büyüme hızında, biyokütlede; lipit, karotenid gibi değerli bileşiklerin daha verimli bir şekilde elde edilmesine katkıda bulunacağı öngörülmektedir. Buna ek olarak, çalışmada sentezlenen selenyum nanoparçacığının boyutu ve potansiyel iyileştirici etkisi sayesinde ilaçların taşınmasında kullanılabilmesi de söz konusudur.

KAYNAKLAR

1. Sengupta, A., Kumar Sarkar, C. (Eds.), (2015). Introduction to Nano Basics to Nanoscience and Nanotechnology, 1st Edition., Springer Heidelberg, Berlin.
2. Chung, E.J., Leon, L., Rinaldi, C. (Eds.) (2020). Nanoparticles for Biomedical Applications, 1st Edition, Elsevier Inc., Amsterdam.
3. Qamar, S.A., Asgher, M., Khalid, N., Sadaf, M. (2019). Nanobiotechnology in health sciences: Current applications and future perspectives. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 22(101388), 1 - 32.
4. Gartland, K.M.A., Gartland, J.S. (2018). Opportunities in biotechnology. Journal of Biotechnology, 282, 38–45.
5. Shafiq, S.A., Al-Shammari, R.H., Majeed, H.Z. (2016). Study of Biosynthesis silver nanoparticles by *Fusarium graminearum* and test their antimicrobial activity. International Journal of Innovation and Applied Studies, 15(1), 43–50.
6. Prasad, R. (Ed.) (2019). Plant Nanobionics: Advances in the Understanding of Nanomaterials Research and Applications, 1, 1st Edition, Springer International Publishing, Cham.
7. Schodek, D., Ferreira, P., Ashby, M. (2009). Nanomaterials, Nanotechnologies and Design, 1st Edition., Butterworth-Heinemann, Oxford.
8. Cat, D.T., Pucci, A., Wandelt, K. (Eds.) (2009). Physics and Engineering of New Materials, 1st Edition, Springer, Berlin.
9. Dolez, P.I. (Ed.) (2015). Nanoengineering: Global Approaches to Health and Safety Issues, 1st Edition, Elsevier, Oxford.
10. Goddard III, W.A., Brenner, D., Lyshevski, S.E., Iafrate, G.J. (Eds.) (2007). Handbook of Nanoscience, Engineering and Technology, 1st Edition, CRC Press, New York.
11. Ramsden, J.J. (2016). Nanotechnology: An Introduction, 2nd Edition. Jeremy

Ramsden & Ventus Publishing ApS, Oxford.

12. Eigler, D.M., Schweizer, E.K. (1990). Positioning single atoms with a scanning tunnelling microscope. *Nature*, 344, 524–526.
13. Binnig, G., Quate, C.F., Gerber, C. (1986). Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, 56, 930–933.
14. Binnig, G., Rohrer, H. (1987). Scanning tunneling microscopy from birth to adolescence. *Reviews of Modern Physics*, 59(3), 615–625.
15. Iijima, S., Ichihashi, T. (1993). Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature*, 363(6430), 603-605.
16. Iijima, S., Ajayan, P.M., Ichihashi, T. (1992). Growth model for carbon nanotubes. *Physical Review Letters*, 69(21), 3100–3103.
17. Drexler, K.E. (1981). Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(9), 5275-5278.
18. Drexler, K.E (2006). *Engines of creation 2.0." The Coming Era of Nanotechnology, Twentieth Anniversary Edition*, Anchor Books Doubleday, New York.
19. Iijima, S. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 354, 56–58.
20. Harada, A., Kataoka, K. (1995). Formation of Polyion Complex Micelles in an Aqueous Milieu from a Pair of Oppositely-Charged Block Copolymers with Poly(ethylene glycol) Segments. *Macromolecules*, 28(15), 5294–5299.
21. National Research Council (2002). *Small Wonders, Endless Frontiers: A Review of the National Nanotechnology Initiative*. Washington, DC: The National Academies Press.
22. Nasrollahzadeh, M., Issaabadi, Z., Sajjadi, M., Sajadi, S.M., Atarod, M. (2019). Types of Nanostructures. *Interface Science and Technology*, 28, 29-30.

23. Boverhof, D.R., Bramante, C.M., Butala, J.H., Clancy, S.F., Lafranconi, W.M., West, J., Gordon, S.C. (2015). Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(1), 137–150.
24. Kolahalam, L.A., Kasi Viswanath, I. V., Diwakar, B.S., Govindh, B., Reddy, V., Murthy, Y.L.N. (2019). Review on nanomaterials: Synthesis and applications. *Materials Today Proceedings*, 18, 2182-2190.
25. Hong, N.H. (Ed.) (2019). *Nano-Sized Multifunctional Materials*, 1st Edition, Elsevier, Amsterdam.
26. Wang, Z., Hu, T., Liang, R., Wei, M. (2020). Application of Zero-Dimensional Nanomaterials in Biosensing. *Frontiers in Chemistry*, 8, 1–19.
27. Pokropivny, V. V., Skorokhod, V. V. (2007). Classification of nanostructures by dimensionality and concept of surface forms engineering in nanomaterial science. *Materials Science and Engineering*, 27(5-8), 990–993.
28. Abdulkareem Ghassan, A., Mijan, N.-A., Hin Taufiq-Yap, Y. (2020). Nanomaterials: An Overview of Nanorods Synthesis and Optimization. *Nanorods and Nanocomposites*, 11, 1–24.
29. Bashir, S., Liu, J.L. (2015). *Advanced Nanomaterials and Their Applications in Renewable Energy*, 1st Edition, Elsevier Inc., Amsterdam.
30. Bergman, C.P. and Machadi, F. (Eds.) *Carbon Nanomaterials as Adsorbents for Environmental and Biological Applications*, 1st Edition, Springer, Cham.
31. Shukla, A.K. (Eds.) (2020). *EMR / ESR / EPR Spectroscopy for Characterization of Nanomaterials Basic Concepts of Iron and Steel Making*, 1st Edition, Springer Nature, New Delhi.
32. Lupu, N. (Ed.) (2010). *Nanowires with Unimaginable Characteristics*, *Nanowires Science and Technology*, 1st Edition, InTech Open, London.

33. Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., Muller, R.N. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications. *Chemical Reviews*, 108(6), 2064–2110.
34. Tiwari, J.N., Tiwari, R.N., Kim, K.S. (2012). Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices. *Progress in Materials Science*, 57(4), 724–803.
35. Hasan, S. (2015). A Review on Nanoparticles : Their Synthesis and Types. *Research. Journal of Recent Sciences*, 4(ISC-2014), 1-3.
36. Ealias, A.M., Saravanakumar, M.P. (2017). A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 263(3), 2-16.
37. Machado, S., Pacheco, J.G., Nouws, H.P.A., Albergaria, J.T., Delerue-Matos, C. (2015). Characterization of green zero-valent iron nanoparticles produced with tree leaf extracts. *Science of The Total Environment*, 533, 76–81.
38. Hu, F.P., Wang, Z., Li, Y., Li, C., Zhang, X., Shen, P.K. (2008). Improved performance of Pd electrocatalyst supported on ultrahigh surface area hollow carbon spheres for direct alcohol fuel cells. *Journal of Power Sources*, 177(1), 61–66.
39. Metz, K.M., Tse, K.Y., Baker, S.E., Landis, E.C., Hamers, R.J. (2006). Ultrahigh-surface-area metallic electrodes by templated electroless deposition on functionalized carbon nanofiber scaffolds. *Chemistry of Materials*, 18(23), 5398–5400.
40. Salata, O. V. (2004). Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology*, 6, 1–6.
41. Kumar, N., Kumbhat, S. (2016). Unique Properties. *Essentials in Nanoscience and nanotechnology*, 1st Edition, John Wiley&Sons, New Jersey.

42. Liu, J.P. (Ed.) *Nanoscale Magnetic Materials and Applications*, 1st Edition, Springer, Boston.
43. Onubogu, K., Medina-Ramirez, I., Bashir, S., Luo, Z., Liu, J. (2011). Colloidal synthesis and nanocharacterization of engineered noble metal nanoparticles. *International Journal of Green Nanotechnology*, 3(2), 140-151.
44. Ramanathan, S., Gopinath, S.C.B., Arshad, M.K., Poopalan, P., Peruman, V. (2021). *Nanoparticles in Analytical and Medical Devices*, 1st Edition, Elsevier Inc., Amsterdam.
45. Avramescu, S.M. (Ed.) (2020). *Engineered Nanomaterials - Health and Safety*, 1st Edition, Edited Volume, InTech Open, London.
46. Satyanarayana, T. & Reddy, S.S. (2018). A Review on Chemical and Physical Synthesis Methods of Nanomaterials. *International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology*, 6(1), 2885–2889.
47. Amendola, V., Meneghetti, M. (2009). Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11(20), 3805-3821.
48. Ates, H., Bahceci, E. (2015). Nano Malzemeler için Üretim Yöntemleri. *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi Part C: Tasarım ve Teknoloji*, 32(2), 483-499.
49. Rao, C.N.R., Vivekchand, S.R.C., Biswas, K., Govindaraj, A. (2007). Synthesis of Inorganic Nanomaterials. *Dalton Transactions*, 34, 3728-3749.
50. Makhlof, A.S.H., Tiginyanu, I. (Eds.) (2011). *Nanocoatings Ultra-Thin Film*, A Volume in Woodhead Publishing in Metals and Surface Engineering, Elsevier, Cambridge.
51. Baig, N., Kammakam, I., Falath, W. (2021). Nanomaterials: A review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Materials Advances*, 2(6), 1821–1871.

52. Thomas, S., Sakho, E.H.M., Kalarikkal, N., Oluwafemi, S.O., Wu, J. (Eds.) (2019). *Nanomaterials for Solar Cell Applications*, 1st Edition, Elsevier, Amsterdam.
53. Portal, S., Corbella, C. (2019). *Functional Nanostructured Interfaces for Environmental and Biomedical Applications*, 1st Edition, Elsevier, Amsterdam.
54. Odularu, A.T. (2018). *Metal Nanoparticles: Thermal Decomposition, Biomedical Applications to Cancer Treatment, and Future Perspectives*. *Bioinorganic Chemistry and applications*, 2018(9354708), 1-6.
55. Sadeghzadeh-Attar, A., Sasani-Ghamsari, M., Hajiesmaeilbaigi, F., Mirdamadi, S. (2007). Template-based growth of TiO₂ nanorods by sol-gel process. *Semiconductor Physics, Quantum Electronics & Optoelectronics*, 10(1), 36–39.
56. Gürmen, S., Ebin, B. (2008). Nanopartiküller ve Üretim Yöntemleri - 1. *Metallurji Dergisi*, 150, 31–38.
57. Shukla, A.K, Irvani, S. (Eds.) *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*, 1st Edition, Elsevier, Amsterdam.
58. Ramos-Ruiz, A., Sesma-Martin, J., Sierra-Alvarez, R., Field, J.A. (2017). Continuous reduction of tellurite to recoverable tellurium nanoparticles using an upflow anaerobic sludge bed (UASB) reactor. *Water Research*, 108, 189–196.
59. Lampis, S., Zonaro, E., Bertolini, C., Cecconi, D., Monti, F., Micaroni, M., Turner, R.J., Butler, C.S., Vallini, G. (2017). Selenite biotransformation and detoxification by *Stenotrophomonas maltophilia* SeITE02: Novel clues on the route to bacterial biogenesis of selenium nanoparticles. *Journal of Hazard Materials*, 324, 3–14.
60. Raja, C.P., Jacob, J.M., Balakrishnan, R.M. (2016). Selenium Biosorption and Recovery by Marine *Aspergillus terreus* in an Upflow Bioreactor. *Journal of Environmental Engineering*, 142, 1–7.
61. Xiao, X., Ma, X.B., Yuan, H., Liu, P.C., Lei, Y. Bin, Xu, H., Du, D.L., Sun, J.F., Feng, Y.J. (2015). Photocatalytic properties of zinc sulfide nanocrystals

- biofabricated by metal-reducing bacterium *Shewanella oneidensis* MR-1. Journal of Hazardous Materials, 288, 134-139.
62. Pantidos, N., Horsfall, L. (2014). Biological Synthesis of Metallic Nanoparticles by Bacteria, Fungi and Plants. Journal of Nanomedicine&Nanotechnology, 5(5), 1.
 63. Faramarzi, S., Anzabi, Y., Jafarizadeh-Malmiri, H. (2020). Nanobiotechnology approach in intracellular selenium nanoparticle synthesis using *Saccharomyces cerevisiae*—fabrication and characterization. Archives of Microbiology, 202(5), 1203-1209.
 64. Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme, F.W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. Ecotoxicology and Environmental Safety. 45(3), 198–207.
 65. Prakash, A., Sharma, S., Ahmad, N., Ghosh, A., Sinha, P. (2010). Bacteria mediated extracellular synthesis of metallic nanoparticles. International Research Journal of Biotechnology. 1(5), 071-079.
 66. Das, V.L., Thomas, R., Varghese, R.T., Soniya, E. V., Mathew, J., Radhakrishnan, E.K. (2014). Extracellular synthesis of silver nanoparticles by the *Bacillus* strain CS 11 isolated from industrialized area. 3 Biotech, 4, 121–126.
 67. Nies, D.H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. Applied Microbiology and Biotechnology, 51(6), 730–750.
 68. Klaus, T., Joerger, R., Olsson, E. (1999). Silver-based crystalline nanoparticles, microbially Fabricated. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96(24), 13611–13614.
 69. Beveridge, T.J., Murray, R.G.E. (1980). Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 141(2), 876–887.
 70. Kalishwaralal, K., Deepak, V., Ramkumarpandian, S., Nellaiah, H., Sangiliyandi, G. (2008). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by the culture supernatant of *Bacillus licheniformis*. Materials Letters, 62(29), 4411–4413.

71. Wen, L., Lin, Z., Gu, P., Zhou, J., Yao, B., Chen, G., Fu, J. (2009). Extracellular biosynthesis of monodispersed gold nanoparticles by a SAM capping route. *J. Nanoparticle Research*, 11(2), 279–288.
72. Kalishwaralal, K., Deepak, V., Ram Kumar Pandian, S.B., Kottaisamy, M., BarathManiKanth, S., Kartikeyan, B., Gurunathan, S. (2010). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Brevibacterium casei*. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 77, 257–262.
73. Jha, A.K., Prasad, K., Kulkarni, A.R. (2009). Synthesis of TiO₂ nanoparticles using microorganisms. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 71, 226–229.
74. Nanda, A., Saravanan, M. (2009). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 5, 452–456.
75. Sunkar, S., Nachiyar, C.V. (2012). Biogenesis of antibacterial silver nanoparticles using the endophytic bacterium *Bacillus cereus* isolated from *Garcinia xanthochymus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(12), 953-959.
76. Ghorbani, H.R., Rashidi, R. (2013). Biosynthesis of gold nanoparticles by *Escherichia coli*. *Minerva Biotechnologica*. 25(3), 161–164.
77. Kundu, D., Hazra, C., Chatterjee, A., Chaudhari, A., Mishra, S. (2014). Extracellular biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using *Rhodococcus pyridinivorans* NT2: Multifunctional textile finishing, biosafety evaluation and in vitro drug delivery in colon carcinoma. *Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology*, 140, 194-204.
78. Zhang, H., Li, Z., Dai, C., Wang, P., Fan, S., Yu, B., Qu, Y. (2021). Antibacterial properties and mechanism of selenium nanoparticles synthesized by *Providencia* sp. DCX. *Environmental Research*, 194, 110630.
79. Jeevanandam, J., Chan, Y.S., Danquah, M.K. (2016). Biosynthesis of metal and metal oxide nanoparticles. *ChemBioEng Reviews*, 3, 55–67.

80. Maliszewska, I., Szewczyk, K., Waszak, K. (2009). Biological synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series*, 146(1), 012025.
81. Raliya, R., Tarafdar, J.C. (2013). ZnO Nanoparticle Biosynthesis and Its Effect on Phosphorous-Mobilizing Enzyme Secretion and Gum Contents in Clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba* L.). *Agricultural Research*, 2(1), 48-57.
82. Cuevas, R., Durán, N., Diez, M.C., Tortella, G.R., Rubilar, O. (2015). Extracellular biosynthesis of copper and copper oxide nanoparticles by *Stereum hirsutum*, a native white-rot fungus from chilean forests. *Journal of Nanomaterials*, 2015(789089), 1-7.
83. Gudikandula, K., Charya Maringanti, S. (2016). Synthesis of silver nanoparticles by chemical and biological methods and their antimicrobial properties. *Journal of Experimental Nanoscience*, 11(9), 714-721. –721.
84. Salem, S.S., Fouda, M.M.G., Fouda, A., Awad, M.A., Al-Olayan, E.M., Allam, A.A., Shaheen, T.I. (2021). Antibacterial, Cytotoxicity and Larvicidal Activity of Green Synthesized Selenium Nanoparticles Using *Penicillium corylophilum*. *Journal of Cluster Science*, 32, 351–361.
85. Tudu, S.C., Zubko, M., Kusz, J., Bhattacharjee, A. (2021). CdS nanoparticles (< 5 nm): green synthesized using *Termitomyces heimii* mushroom–structural, optical and morphological studies. *Applied Physics A*, 127(2), 1-9.
86. Mohamad, N.A.N., Arham, N.A., Jai, J., Hadi, A. (2014). Plant extract as reducing agent in synthesis of metallic nanoparticles: A review. *Advances Materials Research*. 832, 350–355 .
87. Mahdavi, M., Namvar, F., Ahmad, M. Bin, Mohamad, R. (2013). Green biosynthesis and characterization of magnetic iron oxide (Fe₃O₄) nanoparticles using seaweed (*Sargassum muticum*) aqueous extract. *Molecules*. 18(5), 5954–5964.
88. Vanathi, P., Rajiv, P., Sivaraj, R. (2016). Synthesis and characterization of Eichhornia-mediated copper oxide nanoparticles and assessing their antifungal activity against plant pathogens. *Bulletin of Materials Science*, 39(5), 1165–1170.

89. Cittrarasu, V., Kaliannan, D., Dharman, K., Maluventhen, V., Easwaran, M., Liu, W.C., Balasubramanian, B., Arumugam, M. (2021). Green synthesis of selenium nanoparticles mediated from *Ceropegia bulbosa* Roxb extract and its cytotoxicity, antimicrobial, mosquitocidal and photocatalytic activities. *Scientific Reports*, 11, 1–15.
90. Isnaeni, I.N., Indriyati, D., Sumiarsa, D., Primadona, I. (2021). Green synthesis of different TiO₂ nanoparticle phases using mango-peel extract. *Materials Letters*, 294, 129792.
91. Khan, S.A., Shahid, S., Hanif, S., Almoallim, H.S., Alharbi, S.A., Sellami, H. (2021). Green synthesis of chromium oxide nanoparticles for antibacterial, antioxidant anticancer, and biocompatibility activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 502.
92. Khatami, M., Mosazade, F., Raeisi, M., Ghasemi, M., Fazli, Z., Arefkia, K., Varma, R.S., Borhani, F., Khatami, S. (2021). Simplification of gold nanoparticle synthesis with low cytotoxicity using a greener approach: opening up new possibilities. *RSC Advances*, 11, 3288–3294.
93. Mehwish, H.M., Rajoka, M.S.R., Xiong, Y., Cai, H., Aadil, R.M., Mahmood, Q., He, Z., Zhu, Q. (2021). Green synthesis of a silver nanoparticle using *Moringa oleifera* seed and its applications for antimicrobial and sun-light mediated photocatalytic water detoxification. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(4), 105290.
94. Bhatia, S. (2016). *Natural Polymer Drug Delivery Systems: Nanoparticles, Plants and Algae*, 1st Edition, Springer International Publishing, Gurgaon.
95. Stankovic, S., Dikin, D.A., Domment, G.H., Kohlhaas, K.M., Zimney, E.J., Stach, E.A., Piner, R.D., Nguyen, S.T., Ruoff, R. (2006). Graphene-based composite materials. *Nature*, 442(7100), 282-286.
96. Yaragalla, S., Mishra, R.K., Thomas, S., Kalarikkal, N., Maria, H.J. (Eds.) (2018). *Carbon-Based Nanofillers and Their Rubber Nanocomposites: Carbon Nano-*

Objects, 1st Edition, Elsevier, Amsterdam.

97. Messarah, M., Klibet, F., Boumendjel, A., Abdenmour, C., Bouzerna, N., Boulakoud, M.S., El Feki, A. (2012). Hepatoprotective role and antioxidant capacity of selenium on arsenic-induced liver injury in rats. *Experimental Toxicologic Pathology*, 64(3), 167-174.
98. Forootanfar, H., Adeli-Sardou, M., Nikkhoo, M., Mehrabani, M., Amir-Heidari, B., Shahverdi, A.R., Shakibaie, M. (2014). Antioxidant and cytotoxic effect of biologically synthesized selenium nanoparticles in comparison to selenium dioxide. *Journal of trace Elements in Medicine and Biology*, 28(1), 75-79.
99. Tan, V. le C., Hinchman, A., Williams, R., Tran, P.A., Fox, K. (2018). Nanostructured biomedical selenium at the biological interface (Review). *Biointerphases*. 13(6), 06D301.
100. Tran, P.A., Webster, T.J. (2011). Selenium nanoparticles inhibit *Staphylococcus aureus* growth. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 1553–1558.
101. Shakibaie, M., Forootanfar, H., Golkari, Y., Mohammadi-Khorsand, T., Shakibaie, M.R. (2015). Anti-biofilm activity of biogenic selenium nanoparticles and selenium dioxide against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Proteus mirabilis*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 29, 235-241.
102. Biswas, D.P., O'Brien-Simpson, N.M., Reynolds, E.C., O'Connor, A.J., Tran, P.A. (2018). Comparative study of novel in situ decorated porous chitosan-selenium scaffolds and porous chitosan-silver scaffolds towards antimicrobial wound dressing application. *Journal of Colloid Interface Science*, 515, 78–91.
103. Kong, L., Yuan, Q., Zhu, H., Li, Y., Guo, Q., Wang, Q., Bi, X., Gao, X. (2011). The suppression of prostate LNCaP cancer cells growth by Selenium nanoparticles through Akt/Mdm2/AR controlled apoptosis. *Biomaterials*. 32, 6515–6522.
104. Rojkind, M., Domínguez-Rosales, J.A., Nieto, N., Greenwel, P. (2002). Role of

hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, 1872–1891.

105. Pisoschi, A.M., Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74.
106. Apel, K., Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Reviews Plant Biology*, 55, 373–399.
107. Matés, J.M., Pérez-Gómez, C., De Castro, I.N. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32, 595–603.
108. Maritim, A.C., Sanders, R.A., Watkins, J.B. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17, 24–38.
109. Nordberg, J., Arnér, E.S.J. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(11), 1287–1312.
110. Wu, J.Q., Kosten, T.R., Zhang, X.Y. (2013). Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 46, 200–206.
111. Ahmad, P., Jaleel, C.A., Azooz, M.M., Nabi, G. (2009). Generation of ROS and Non-Enzymatic Antioxidants During Abiotic Stress in Plants. *Botany Research International*, 2(1), 11-20.
112. Von Moos, N., Slaveykova, V.I. (2014). Oxidative stress induced by inorganic nanoparticles in bacteria and aquatic microalgae - State of the art and knowledge gaps. *Nanotoxicology*, 8, 605–630.
113. Foyer, C.H., Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*. 17(7), 1866–1875.

114. Pikula, K.S., Zakharenko, A.M., Aruoja, V., Golokhvast, K.S., Tsatsakis, A.M. (2019). Oxidative stress and its biomarkers in microalgal ecotoxicology. *Current Opinion in Toxicology*, 13, 8-15.
115. Cirulis, J.T., Scott, J.A., Ross, G.M. (2013). Management of oxidative stress by microalgae. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 91(1), 15-21.
116. Sorokin, C., Krauss, R.W. (1958). The Effects of Light Intensity on the Growth Rates of Green Algae. *Plant Physiology*, 33(2), 109.
117. Andreasson, K.I.M., Wängberg, S.Å. (2007). Reduction in growth rate in *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) and *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) induced by UV-B radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 86(3), 227-233.
118. Bar, E., Rise, M., Vishkautsan, M., Malis Arad, S. (1995). Pigment and Structural Changes in *Chlorella zofingiensis* upon Light and Nitrogen Stress. *Journal of Plant Physiology*, 146, 527–534.
119. Fischer, B.B., Wiesendanger, M., Eggen, R.I.L. (2006). Growth condition-dependent sensitivity, photodamage and stress response of *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to high light conditions. *Plant Cell Physiology*, 47, 1135–1145.
120. Jomova, K., Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 283, 65–87.1
121. Franklin, N.M., Stauber, J.L., Lim, R.P. (2001). Development of flow cytometry-based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 20(1), 160–170.
122. Xu, J., Li, M., Mak, N.K., Chen, F., Jiang, Y. (2011). Triphenyltin induced growth inhibition and antioxidative responses in the green microalga *Scenedesmus quadricauda*. *Ecotoxicology*. 20, 73–80.
123. Moldovan, L., Moldovan, N.I. (2004). Oxygen free radicals and redox biology of

- organelles. *Histochemistry and Cell Biology*, 122, 395–412.
124. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 219(1), 1.
 125. Venero, J.L., Revuelta, M., Atiki, L., Santiago, M., Tomás-Camardiel, M.C., Cano, J., Machado, A. (2003). Evidence for dopamine-derived hydroxyl radical formation in the nigrostriatal system in response to axotomy. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(1), 111-123.
 126. Schneider, C., Boeglin, W.E., Yin, H., Porter, N.A., Brash, A.R. (2008). Intermolecular peroxy radical reactions during autoxidation of hydroxy and hydroperoxy arachidonic acids generate a novel series of epoxidized products. *Chemical Research in Toxicology*, 21(4), 895-903.
 127. Pryor, W.A. (1989). On the detection of lipid hydroperoxides in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine*, 7, 177–178.
 128. Scott, M.D., Meshnick, S.R., Eaton, J.W. (1989). Superoxide dismutase amplifies organismal sensitivity to ionizing radiation. *Journal of Biological Chemistry*, 264(5), 2498-2501.
 129. Greenacre, S., Ischiropoulos, H. (2001). Tyrosine nitration: Localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radical Research*, 34, 541–581.
 130. Mannick, J.B., Schonhoff, C., Papeta, N., Ghafourifar, P., Szibor, M., Fang, K., Gaston, B. (2001). S-nitrosylation of mitochondrial caspase. *The Journal of Cell Biology*, 154, 1111–1116.
 131. Lasch, P., Petras, T., Ullrich, O., Backmann, J., Naumann, D., Grune, T. (2001). Hydrogen Peroxide-induced Structural Alterations of RNase A. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 9492–9502.
 132. Al-Rashed, S.A., Ibrahim, M.M., El-Gaaly, G.A., Al-Shehri, S., Mostafa, A. (2016).

Evaluation of radical scavenging system in two microalgae in response to interactive stresses of UV-B radiation and nitrogen starvation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(6), 706-712.

133. Gao, Q.T., Tam, N.F.Y. (2011). Growth, photosynthesis and antioxidant responses of two microalgal species, *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*, to nonylphenol stress. *Chemosphere*, 82, 346–354.
134. Aderemi, A.O., Novais, S.C., Lemos, M.F., Alves, L.M., Hunter, C., Pahl, O. (2016). Oxidative stress responses and cellular energy allocation changes in microalgae following exposure to widely used human antibiotics. *Aquatic Toxicology*, 203, 130–139.
135. Saxena, S.C., Joshi, P.K., Grimm, B., Arora, S. (2011). Alleviation of ultraviolet-C-induced oxidative damage through overexpression of cytosolic ascorbate peroxidase. *Biologia (Bratisl)*. 66(6), 1052–1059.
136. Prasad, S.M., Dwivedi, R., Zeeshan, M., Singh, R. (2004). UV-B and cadmium induced changes in pigments, photosynthetic electron transport activity, antioxidant levels and antioxidative enzyme activities of *Riccia* sp. *Acta Physiologiae Plantarum*, 26(4), 423.
137. Polle, A. (2001). Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiology*, 126(1), 445–462.
138. Wang, J., Zhang, H., Allen, R.D. (1999). Overexpression of an Arabidopsis peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. *Plant Cell Physiology*, 40(7), 725–732.
139. Ertit Taştan, B., Duygu, E., İlbaş, M., Dönmez, G. (2013). Utilization of LPG and gasoline engine exhaust emissions by microalgae. *Journal of Hazardous Materials*, 246–247, 173–180.
140. Heath, R.L., Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: II. Role

of electron transfer. Archives of Biochemistry and Biophysics, 125(3), 850-857.

141. Porra, R.J., Thompson, W.A., Kriedemann, P.E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. Biochimica Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 75(3), 384–394.
142. Shah, M., Fawcett, D., Sharma, S., Tripathy, S.K., Poinern, G.E.J. (2015). Green synthesis of metallic nanoparticles via biological entities. Materials, 8(11), 7278-7308.
143. Wadhwani, S.A., Gorain, M., Banerjee, P., Shedbalkar, U.U., Singh, R., Kundu, G.C., Chopade, B.A. (2017). Green synthesis of selenium nanoparticles using *Acinetobacter* sp. SW30: Optimization, characterization and its anticancer activity in breast cancer cells. International Journal of Nanomedicine, 12, 6841.
144. Diko, C.S., Zhang, H., Lian, S., Fan, S., Li, Z., Qu, Y. (2020). Optimal synthesis conditions and characterization of selenium nanoparticles in *Trichoderma* sp. WL-Go culture broth. Materials Chemistry and Physics, 246, 122583.
145. Mishra, R.R., Prajapati, S., Das, J., Dangar, T.K., Das, N., Thatoi, H. (2011). Reduction of selenite to red elemental selenium by moderately halotolerant *Bacillus megaterium* strains isolated from Bhitarkanika mangrove soil and characterization of reduced product. Chemosphere. 84, 1231–1237.
146. Zhang, H., Zhou, H., Bai, J., Li, Y., Yang, J., Ma, Q., Qu, Y. (2019). Biosynthesis of selenium nanoparticles mediated by fungus *Mariannaea* sp. HJ and their characterization. Colloids Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 571, 9–16.
147. Dwivedi, S., AlKhedhairi, A.A., Ahamed, M., Musarrat, J. (2013). Biomimetic Synthesis of Selenium Nanospheres by Bacterial Strain JS-11 and Its Role as a Biosensor for Nanotoxicity Assessment: A Novel Se-Bioassay. PLoS One. 8, 1–10.

148. El-Deeb, B., Al-Talhi, A., Mostafa, N., Abou-assy, R. (2018). Biological Synthesis and Structural Characterization of Selenium Nanoparticles and Assessment of Their Antimicrobial Properties. *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences*, 45, 135–170.
149. San Keskin, N.O., Akbal Vural, O., Abaci, S. (2020). Biosynthesis of Noble Selenium Nanoparticles from *Lysinibacillus* sp. NOSK for Antimicrobial, Antibiofilm Activity, and Biocompatibility. *Geomicrobiology Journal*, 37, 919–928.
150. Song, J.Y., Kim, B.S. (2009). Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32, 79–84.
151. Vanaja, M., Rajeshkumar, S., Paulkumar, K., Gnanajobitha, G., Malarkodi, C., Annadurai, G. (2013). Kinetic study on green synthesis of silver nanoparticles using *Coleus aromaticus* leaf extract. *Advances in Applied Science Research*, 4(3), 50–55.
152. Abdollahnia, M., Makhdoumi, A., Mashreghi, M., Eshghi, H. (2020). Exploring the potentials of halophilic prokaryotes from a solar saltern for synthesizing nanoparticles: The case of silver and selenium. *PLoS One*, 15, 1–18.
153. Kora, A.J. (2018). *Bacillus cereus*, selenite-reducing bacterium from contaminated lake of an industrial area: a renewable nanofactory for the synthesis of selenium nanoparticles. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 1-12.
154. Lade, B. D., & Shanware, A.S. (2020) *Phytonanofabrication: Methodology and Factors Affecting Biosynthesis of Nanoparticles*. Smart Nanosystems for Biosynthesis of Nanoparticles, 1st Edition, IntechOpen, London.
155. Anh, N.P., Thi Ai Mi, T., Huynh Thanh Linh, D., Thi Thuy Van, N., Tien Cuong, H., Van Minh, N., Tri, N. (2018). *Fortunella japonica* extract as a reducing agent for green synthesis of silver nanoparticles. *International Journal of Engineering & Technology*, 7(3), 1570-1575.
156. Turabik, M., Simsek, U.B. (2017). Effect of synthesis parameters on the particle size of the zero valent iron particles. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*, 47(7), 1033-

10433.

157. Srivastava, N., Mukhopadhyay, M. (2013). Biosynthesis and structural characterization of selenium nanoparticles mediated by *Zooglea ramigera*. *Powder Technology*, 244, 26–29.
158. Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337-351.
159. Clongston, J.D., Jeffrey, D., Patri, A.K. (2011). Zeta potential measurement. In *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery*. Humana press, Chara, 63-70.
160. Liao, D.L., Wu, G.S., Liao, B.Q. (2009). Zeta potential of shape-controlled TiO₂ nanoparticles with surfactants. *Colloids Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects*, 348(1-3), 270-275.
161. Sapsford, K.E., Tyner, K.M., Dair, B.J., Deschamps, J.R., Medintz, I.L. (2011) Analyzing nanomaterial bioconjugates: A review of current and emerging purification and characterization techniques. *Analytical Chemistry*, 83, 4453–4488.
162. Tekade, R. (2019). *Biomaterials and Biotechnology*, 1st Edition, Elsevier, Amsterdam.
163. Dhanjal, S., Cameotra, S.S. (2010). Aerobic biogenesis of selenium nanospheres by *Bacillus cereus* isolated from coalmine soil. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 1-11.
164. Faghihzadeh, F., Anaya, N.M., Schiffman, L.A., Oyanedel-Craver, V. (2016). Fourier transform infrared spectroscopy to assess molecular-level changes in microorganisms exposed to nanoparticles. *Nanotechnology for Environmental Engineering*, 1(1), 1.
165. Kong, J., Yu, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(8), 549-559.
166. Nandiyanto, A.B.D., Oktiani, R., Ragadhita, R. (2019). How to read and interpret ftir

spectroscopy of organic material. Indonesian Journal of Science and Technology, 4(1), 97-118.

167. Trivedi, M.K., Dahryn Trivedi, A.B., Khemraj Bairwa, H.S. (2015). Fourier Transform Infrared and Ultraviolet-Visible Spectroscopic Characterization of Biofield Treated Salicylic Acid and Sparfloxacin. Natural Products Chemistry & Research, 5(3), 3-5.
168. Christou, C., Agapiou, A., Kokkinofa, R. (2018). Use of FTIR spectroscopy and chemometrics for the classification of carobs origin. Journal of advanced research, 10, 1–8.
169. Liu, J., Lozano-Perez, S., Karamched, P., Holter, J., Wilkinson, A.J., Grovenor, C.R.M. (2019). Fore-scattered electron imaging of nanoparticles in scanning electron microscopy. Materials Characterization, 155, 109814.
170. Crucho, C.I.C., Barros, M.T. (2017). Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. Materials Science and Engineering: C, 80, 771-784.
171. Buhr, E., Senftleben, N., Klein, T., Bergmann, D., Gnieser, D., Frase, C.G., Bosse, H. (2009). Characterization of nanoparticles by scanning electron microscopy in transmission mode. Measurement Science and Technology, 20(8), 084025.
172. Tabibi, M., Soheil, S., Ali, M. (2020). Biosynthesized Selenium Nanoparticles Using Two Indigenous Halophilic Bacteria. Archives of Hygienes Sciences, 9(4), 275–286.
173. Shakibaie, M., Mohazab, N.S., Ayatollahi Mousavi, S.A. (2015). Antifungal activity of selenium nanoparticles synthesized by bacillus species Msh-1 against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. Jundishapur Journal of Microbiology, 8(9), e26381.
174. Khoei, N.S., Lampis, S., Zonaro, E., Yrjälä, K., Bernardi, P., Vallini, G. (2017). Insights into selenite reduction and biogenesis of elemental selenium nanoparticles by two environmental isolates of Burkholderia fungorum. New Biotechnology, 34,

1–11.

175. Ekelund, N.G.A., Danilov, R.A. (2001). The influence of selenium on photosynthesis and “light-enhanced dark respiration” (LEDR) in the flagellate *Euglena gracilis* after exposure to ultraviolet radiation. *Aquatic Sciences*, 63(4), 457-465.
176. Zhao, Y., Song, X., Cao, X., Wang, Y., Si, Z., Chen, Y. (2019). Toxic effect and bioaccumulation of selenium in green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Applied Phycology*, 31(3), 1733-1742.
177. Abdel-Hamid, M.I., Skulberg, O.M. (1995). Effect of selenium on the growth of some selected green and blue-green algae. *Lakes & Reservoirs: Research & Management*, 1(3), 205-211.
178. Artichowicz, W., Luczkiewicz, A., Sawicki, J.M. (2020). Analysis of the radiation dose in UV-disinfection flow reactors. *Water*, 12(1), 12.
179. Sun, X., Zhong, Y., Huang, Z., Yang, Y. (2014). Selenium accumulation in unicellular green alga *Chlorella vulgaris* and its effects on antioxidant enzymes and content of photosynthetic pigments. *PLoS One*. 9(11), e112270.
180. Sordillo, L.M. (2013). Selenium-dependent regulation of oxidative stress and immunity in periparturient dairy cattle. *Veterinary Medicine International*, 2013, 154045.
181. Marchitti, S.A., Chen, Y., Thompson, D.C., Vasiliou, V. (2011). Ultraviolet Radiation: Cellular Antioxidant Response and the Role of Ocular Aldehyde Dehydrogenase Enzymes. *Eye & Contact Lens*, 37, 206–213.
182. Kováčik, J., Klejdus, B., Bačkor, M. (2010). Physiological responses of *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) to UV-A and UV-C light. *Photochemistry and Photobiology*, 86(3), 612–616.
183. Dummermuth, A.L., Karsten, U., Fisch, K.M., König, G.M., Wiencke, C. (2003).

- Responses of marine macroalgae to hydrogen-peroxide stress. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 289(1), 103-121.
184. Ahmed, F., Schenk, P.M. (2017). UV-C radiation increases sterol production in the microalga *Pavlova lutheri*. *Phytochemistry*, 139, 25–32.
 185. Tao, Y., Zhang, X., Au, D.W.T., Mao, X., Yuan, K. (2010). The effects of sub-lethal UV-C irradiation on growth and cell integrity of cyanobacteria and green algae. *Chemosphere*. 78, 541–547.
 186. Li, S., Dao, G.H., Tao, Y., Zhou, J., Jiang, H.S., Xue, Y.M., Yu, W.W., Yong, X.L., Hu, H.Y. (2020). The growth suppression effects of UV-C irradiation on *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris* under solo-culture and co-culture conditions in reclaimed water. *Science of The Total Environment*, 713, 135374.
 187. Schmidt, É.C., Nunes, B.G., Maraschin, M., Bouzon, Z.L. (2010). Effect of ultraviolet-B radiation on growth, photosynthetic pigments, and cell biology of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) macroalgae brown strain. *Photosynthetica*. 48, 161–172.
 188. Murprayana, R., Pukan, M.S.H., Soedarmodjo, T.P., Widjaja, A., Wirawasista, H. (2021). The effects of UV-C and HNO₂ mutagen, pH and the use of commercial fertilizers on the growth of microalgae *Botryococcus braunii*. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 1053, 012095.
 189. Al-Badri, S.H.A., AL-Ebady, A.W.R. (2018). Effect Of Selenium on Antioxidant Enzymes and Content of Photosynthetic Pigments in algae *Chlorococcum littorale* Chihara. Nakayama &Inouye - University of Thi-Qar Journal, 13(3), 42-56.

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI: Sena Kardelen DİNÇ

Öğrenim Durumu: Yüksek Lisans

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Marmara Üniversitesi	Fen Bilimleri Enstitüsü	Biyoloji	Yüksek Lisans	2021
Türkiye	Marmara Üniversitesi	Fen Edebiyat Fakültesi	Biyoloji	Lisans	2017

İŞ TECRÜBESİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Görevi	Süresi
Türkiye	Ankara Hacı Bayram Veli Üniversitesi	Polatlı Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü	Araştırma Görevlisi	2019

ESERLER

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

A1. Kayhan, F.K., Esmer Duruel, H.E., Kızılkaya, Ş., **Dinç, S.K.**, Kaymak, G., Akbulut, C., Yön Ertuğ, N. D. **2020.** Toxic Effects of Herbicide Tribenuron-Methyl on Liver Tissue of Zebrafish (*Danio rerio*), Fresenius Environmental Bulletin, 29(12A), 11175-11179.

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler:

B1. Dinç, S.K., San Keskin, N.O. 2020. Reusable halophilic bacterium attached electrospun nanofibrous webs for chromium removal in wastewater, International Eurasian Conference on Biotechnology and Biochemistry, 16-18 December 2020, Ankara, Turkey.

B2. Dinç, S.K., San Keskin, N.O., Kayhan, F.E. 2020. Biogenic synthesis and structural characterization of selenium nanoparticles from halophilic bacteria, European Biotechnology Congress. 24-26 September 2020, Prague, Czech Republic.

B3. Kaymak, G., Esmer Duruel, H.E., Kızılkaya, Ş., **Dinç, S.K.,** Kayhan, F.E. 2019. Tribenuron Metil in Zebra Balığı *Danio rerio*'nın Kas Dokusu Üzerine Etkileri, ISPEC Uluslararası Mühendislik ve Fen Bilimleri Kongresi, Malatya, Türkiye.

B4. Kaymak, G., Esmer Duruel, H.E., Kızılkaya, Ş., **Dinç, S.K.,** Kayhan, F.E. 2019. The effects of fluoxetine-HCl on oxidative stress parameters of *Xiphophorus helleri*, International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, Ankara, Turkey.