

**SIFIR DEĞERLİKLİ DEMİR NANOPARTİKÜLÜNÜN (nZVI)  
TOPRAK MİKROORGANİZMALARI ÜZERİNE OLAN  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HAMDULLAH ÇİÇEK**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NANOTEKNOLOJİ VE İLERİ MALZEMELER  
ANABİLİM DALI**

**MERSİN  
TEMMUZ - 2019**

**SIFIR DEĞERLİKLİ DEMİR NANOPARTİKÜLÜNÜN (nZVI)  
TOPRAK MİKROORGANİZMALARI ÜZERİNE OLAN  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HAMDULLAH ÇİÇEK**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

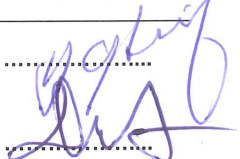
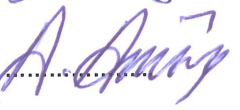

**NANOTEKNOLOJİ VE İLERİ MALZEMELER  
ANABİLİM DALI**

**Danışman  
PROF.DR. BİRGÜL MAZMANCI**

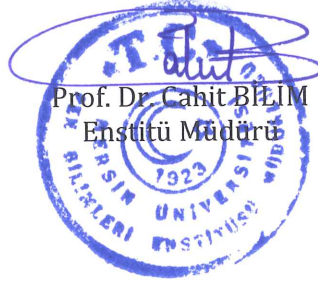
**MERSİN  
TEMMUZ - 2019**

## ONAY

Hamdullah ÇİÇEK tarafından Prof.Dr. Birgül MAZMANCI danışmanlığında hazırlanan "Sıfır Değerlikli Demir Nanopartikülünün (nZVI) Toprak Mikroorganizmaları Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması" başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 04/07/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği/çokluğu ile Yüksek Lisans olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Birgül MAZMANCI	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Elif ERDOĞAN ELİUZ	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Ali Osman ADIGÜZEL	

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19/07/2019 tarih ve 2019.29/953 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



*Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.*

## ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
  - Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
  - Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
  - Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
  - Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
  - Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
  - Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi
- beyan ederim.

## ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

16/07/2019

İmza / Signature



Hamdullah ÇİÇEK

## ÖZET

### SIFIR DEĞERLİKLİ DEMİR NANOPARTİKÜLÜNÜN (nZVI) TOPRAK MİKROORGANİZMALARI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Karbon, azot, fosfor ve kükürt döngüleri gibi biyojeokimyasal döngülerde ve kirleticilerin biyolojik bozunmasında toprak mikroorganizmaları bitki gelişimi ve iklim üzerine önemli etkilere sahiptir. Bu gibi işlevlerin korunması ve sürdürülmesi açısından nanoparçacıkların topraktaki mikrobik topluluklar üzerine potansiyel etkilerinin anlaşılması önem kazanmaktadır. Son birkaç yılda nano boyutta malzemelerin kimyasal kirlilik gideriminde kullanımına yönelik çalışmalar yapılmakta ve bu süreç nanoremediasyon olarak tanımlanmaktadır. Bu çalışmada Mersin'de tarımın yoğun olarak yapıldığı Adanalıoğlu bölgesindeki topraktan izole edilen bakteri türleri kullanılmıştır. Pestisitlerle kirlenmiş alanlarda yaşamaya adapte olmuş suşlar kullanılarak Sıfır Değerlikli Demirin doğal ortam üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, sıfır değerlikli demir nanopartikül sentezi sıvı fazda indirgenme metoduna dayalı borhidrür indirgeme metodu ile sentezlenmiştir. Daha sonra sıfır değerlikli demir nanopartikülünün kimyasal kirlilik üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, Adanalıoğlu bölgesindeki topraktan izole edilen bakteri türlerinin sıfır değerlikli demirle etkileşimi sonucu izole bakteri türleri üzerine anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Gözlemlenen bulgularda gösteriyor ki, izole edilen bakteriler sıfır değerlikli demire karşı bir direnç oluşturmaktadır. Bununla birlikte, nanopartiküllerin bölge mikroorganizma yaşamı üzerine etkilerini değerlendirebilmek için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Nanoremediasyon, Sıfır Değerlikli Demir, Adanalıoğlu, Toprak mikroorganizmaları

**Danışman:** Prof. Dr. Birgül MAZMANCI, Mersin Üniversitesi, Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler Ana Bilim Dalı

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF ZERO VALUE IRON NANOPARTICULA (nZVI) ON SOIL MICROORGANISMS

Soil microorganisms in biogeochemical cycles such as carbon, nitrogen, phosphorus and sulfur cycle and biological degradation of pollutants have important effects on the nature and climate of plants. It is important understandeth effectiveness of nanoparticles on soil microbial communities in ordertomaintainsuch functions. Inthelast years, nanoscale materials are used for the removal of chemical pollution and this process defined as a nanoremediation. Inthisstudy, bacteria isolated from soil in Adanalioğlu region, whereagriculture is intense in Mersin, wereused. The Effects of Zero-valued Iron on the natural environment are investigated using strain adapted to live in pesticide contaminated areas. Forthispurpose, zero-valent iron nanoparticle was synthesized by borohydride reduction method based on liquid phase reduction technique. Then, the effects of zero-valent iron nanoparticle on microorganisms are evaluated. As a result, there was no significant effect of zero iron particles on bacteria isolated from soil in Adanalioğlu. The observed findings show that Isolated Bacteria Have a resistance zero-valentin. However, more extensive field study are needed to evaluate the effects of nanoparticles on microorganism in the region.

**Keywords:** Nanoremediation, Zero-valuedIron, Adanalioğlu, Soilmicroorganisms

**Advisor:** Dr. Birgöl MAZMANCI, Mersin University, Department of Nanotechnologyand Advanced Materials

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca beni sürekli teşvik eden, her türlü desteğini benden esirgemeyen tez konumun seçilmesinde ve konuyla ilgili yapmış olduğum çalışmalarda bana yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Birgül MAZMANCI' ya, tez çalışmalarımın yürütülmesinde fikir, görüş ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Ali Osman ADIGÜZEL' e, sıfır değerlikli demir sentezin de bana yardımcı olan Prof. Dr. Meral TURABİK ve Utku Bulut ŞİMŞEK' e, her zaman yanımda olan benden desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Süha SADAK, Nicat NOVRUZLU, Şeyma Gülnaz YARLILAR ve Binnaz KIRBIYIK' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bugüne kadar bana göstermiş oldukları sonsuz sevgi ve güven için anneme ve babama çok teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER	x
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI</b>	<b>2</b>
2.1. KİRLENMİŞ TOPRAKLARIN TEMİZLENMESİ	3
2.1.1. NANOREMEDİASYON	3
2.2. SIFIR DEĞERLİKLİ DEMİR	4
2.2.1. Sıfır Değerlikli Demir Nanopartikül (SDDNP) Sentezi	5
2.3. TOPRAK MİKROORGANİZMALARİ	5
2.3.1. Toprak Mikroorganizmaların 16S rRNA Gen Dizisine Göre Tanımlanması	6
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b>	<b>8</b>
<b>3.1. Materyal</b>	<b>8</b>
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri	8
3.1.2. Agaroz Jel Elektroforezi ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) İçin Gerekli Çözeltilerin Hazırlanılması	8
<b>3.2. Yöntem</b>	<b>8</b>
3.2.1. Bakteri İzolasyonu İçin Toprak Örneklerinin Alınması	8
3.2.2. Bakterilerin topraktan izolasyonu	9
3.2.3. İzolatların saklanması	9
3.2.4. Bakteriyel Genomik DNA'nın ekstraksiyonu	9
3.2.5. İzolatların 16S rRNA gen dizisine göre tanımlanması	10
3.2.6. 16S rRNA Genlerinin PZR ile çoğaltılması	11
3.2.7. Çoğaltılan DNA'ların Agaroz Jel Elektroforezi ile Gösterilmesi	11
3.2.8. McFarland standardı ile bakteri sayılarının tahmini	11
3.2.9. Sıfır Değerlikli Demir İçeren Besiyerlerinin Hazırlanması	12
3.2.10. İnokülasyon	13
3.2.11. nZVI'nin izole edilen bakteriyel suşlara karşı biyolojik etkisinin disk difüzyon yöntemiyle belirlenmesi	13
3.2.12. Minimum İnhibe Edici Konsantrasyonun Belirlenmesi	13
<b>4. BULGULAR ve TARTIŞMA</b>	<b>15</b>
<b>4.1. BULGULAR</b>	<b>15</b>
4.1.1. Adana'da Mevkiinde Alınan Toprak Örneklerinden Bakteri Suşlarının Saflaştırılması	15
4.1.2. İzolatların 16S rRNA Gen Dizisine Göre Tanımlanması	15
4.1.3. Sıfır Değerlikli Demirin Bakteriler Üzerindeki Etkilerinin Gözlemlenmesi	19
<b>4.2 TARTIŞMA</b>	<b>25</b>
<b>5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER</b>	<b>27</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>28</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>31</b>

## TABLULAR DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 3.1.:</b> Nutrient agarbesiyerinin bileşenleri.	8
<b>Tablo 3.2.:</b> DNA ekstraksiyonu için gerekli malzemeler	9
<b>Tablo 3.3.:</b> McFarland standardı	11
<b>Tablo 4.1.:</b> <i>Stenotrophomonas</i> sp. HMD10 izolatının farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren sıvı besiyerlerinde üremesine bağlı olarak absorbans artışının gözlenip gözlemlenmediğine ilişkin veriler.	20
<b>Tablo 4.2.:</b> <i>Microbacterium</i> sp. HMD47 izolatının farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren sıvı besiyerlerinde üremesine bağlı olarak absorbans artışının gözlenip gözlemlenmediğine ilişkin veriler.	21
<b>Tablo 4.3.:</b> <i>Rhodococcus</i> sp. HKN21 izolatının farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren sıvı besiyerlerinde üremesine bağlı olarak absorbans artışının gözlenip gözlemlenmediğine ilişkin veriler.	21
<b>Tablo 4.4.:</b> <i>Micrococcus</i> sp. HMD03 izolatının farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren sıvı besiyerlerinde üremesine bağlı olarak absorbans artışının gözlenip gözlemlenmediğine ilişkin veriler.	22
<b>Tablo 4.5.:</b> <i>Streptomyces</i> sp. AK027 izolatının farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren sıvı besiyerlerinde üremesine bağlı olarak absorbans artışının gözlenip gözlemlenmediğine ilişkin veriler.	22
<b>Tablo 4.6.:</b> <i>Bacillus</i> sp. HMD01 izolatının farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren sıvı besiyerlerinde üremesine bağlı olarak absorbans artışının gözlenip gözlemlenmediğine ilişkin veriler.	23

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1.: Kıyı Akdeniz Tarım Havzaları	3
Şekil 2.2 : Ribozom kompleksi ve 16S rRNA geninin şeması.	7
Şekil 3.1.: nZVI'nın Sanikatör deki aşaması	12
Şekil 3.2: nZVI in seyreltme aşaması	14
Şekil 3.3: BK0605 suşunun karıştırıcıda bekletilmesi	14
Şekil 4.1.: Şekil 4.1. Stenotrophomonas genusu içerisinde yer alan tarama deneyleri sonucunda tespit edilmiş HMD10 izolatının neighbor-joining metoduna göre çizilmiş filogenetik ağaçtaki pozisyonu.	16
Şekil 4.2.: Microbacterium genusu içerisinde yer alan tarama deneyleri sonucunda tespit edilmiş HMD47 izolatının neighbor-joining metoduna göre çizilmiş filogenetik ağaçtaki pozisyonu.	16
Şekil 4.3.: Rhodococcus genusu içerisinde yer alan tarama deneyleri sonucunda tespit edilmiş HKN21 izolatının neighbor-joining metoduna göre çizilmiş filogenetik ağaçtaki pozisyonu.	17
Şekil 4.4.: Micrococcus genusu içerisinde yer alan tarama deneyleri sonucunda tespit edilmiş HMD03 izolatının neighbor-joining metoduna göre çizilmiş filogenetik ağaçtaki pozisyonu.	18
Şekil 4.5.: Streptomyces genusu içerisinde yer alan tarama deneyleri sonucunda tespit edilmiş AK027 izolatının neighbor-joining metoduna göre çizilmiş filogenetik ağaçtaki pozisyonu.	18
Şekil 4.6.: Bacillus genusu içerisinde yer alan tarama deneyleri sonucunda tespit edilmiş HMD01 izolatının neighbor-joining metoduna göre çizilmiş filogenetik ağaçtaki pozisyonu.	19
Şekil 4.7.: Bakterilerin bulanıklığının alttan görünüşü	24
Şekil 4.8.: Bakteri suşlarına sıfır değerlikli demir eklenmesinden hemen önceki görünüm	24
Şekil 4.9. Bakteri suşlarına sıfır değerlikli demir eklenmesinden hemen sonraki görünüm	24

## KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simge	Tanım
nZVI	Sıfır değerlikli demir nanopartikülü
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
NP	Nanopartikül
AgNP	Gümüş nanopartikülü
Pt	Platinyum
Au	Altın
Ag	Gümüş
Fe	Demir
Zn	Çinko
ZnO	Çinko Oksit
CuO	Bakır(II) Oksit
SDDN	Sıfır Değerlikli Demir Nanopartikül Sentezi
PBR	Geçirgen Reaktif Bariyerler
MİK	Minium İnhibe edici Konsantrasyonu
CTAB	Hekzadesiltrimetil-amonyumbromid
DSMO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
TBE	Tris Borat EDTA
EtBr	Etidiyum Bromür
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ORP	Oksidasyon-azaltma potansiyeli
PBC	Poliklorlu bifeniller

## 1. GİRİŞ

Toprak kirliliği; insanların, hayvanların ve bitkilerin sağlığına zarar veren maddelerin topraklarındaki varlığının neden olduğu bir bozulma sürecidir. Günümüzde tarım alanlarının yzlm giderek azalmakla birlikte, mevcut alanlardan yüksek ürün elde etmek için çok farklı kimyasal kullanılmaktadır. Kullanılan kimyasalların büyük kısmını hormonlar, zararlılarla mücadelede kullanılan pestisitler ve kimyasal gübreler oluşturmaktadır. Bu kimyasalların çoğunluğunun yarı ömrünün uzun olması toprakta kalmalarına neden olmakta toprak ve yeraltı suları kirlenmektedir. Buna bağlı olarak toprak kirliliği sorun olarak karŐımıza çıkmaktadır. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de tarım alanlarının iyileştirilmesi Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığının ncelik verdiği konulardan biridir. Remediasyon adı verilen bu süreçte nanopartikül kullanımı dünya üzerinde giderek önem kazanmaktadır.

Sıfır değerlikli demir nanopartikülü (nZVI) nanoremediasyonda oldukça fazla kullanılmaktadır. Karbon, azot, fosfor ve kükürt döngüleri gibi biyojeokimyasal döngülerde ve kirleticilerin biyolojik bozunmasında toprak mikroorganizmaları bitki gelişimi ve iklim üzerine önemli etkilere sahiptir. Bu gibi iŐlevleri korumak için nanoparçacıkların toprak mikroorganizmaları üzerindeki potansiyel etkilerini anlamak önemlidir. Ekosistem zerine nanopartiküllerin etkilerinin bilinmesi için yapılan ekotoksikolojik çalışmalarda toprak bakterileri yaygın olarak kullanılmaktadır. Ekotoksikolojik araŐtırmalarda nanopartikül içeren ürünlerin üretim ve kullanımları sonrası zararlı etki oluŐturdukları ortaya konmuŐken, nanoremediasyonla partiküllerin direk çevreye uygulanması daha da riskli bir durum oluŐturabilir. Mikroorganizmalar buldukları ortam koŐullarına uyum sağlayarak farklı fizyolojik yanıtlar oluŐturabilir. Buradan yola çıkararak planlanan bu çalışmada Mersin bölgesi topraklarından izole edilen mikroorganizmalar üzerine kimyasal kirlilik gideriminde kullanılan nZVI'nin etkilerinin araştırılması planlanmıŐtır. Bu amaçla; nZVI'nin tarımın ve kimyasal kullanımının yoğun olduğu Mersin Adanalioğlu bölgesinden izole edilen bakteri türleri üzerine etki potansiyelinin ortaya konması amaçlanmıŐtır.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

Toprak yenilenemeyen doğal kaynaklardandır ve oluşumu çok uzun süre gerektirir. Toprak makro-mikroorganizmaların yaşam alanı olup bitkilerin yetişme ortamıdır. FAO'nun raporlarına göre her yıl insanlara 15-20 milyon ton gıda maddesi gerekmektedir. Artan nüfusun besin ihtiyacını karşılamak için daha geniş tarım alanlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Dünyanın yüzölçümü sınırlı olduğundan bu ihtiyacı karşılayacak üretim için yeni alanların tarıma açılması mümkün değildir. Bu nedenle üretim için toprak çok yoğun şekilde kullanılmaktadır. Yoğun kullanım toprağın yılda birden fazla ekilmesi, bitki gelişimi ve ürün zararlılarına karşı kimyasalların kullanımı olarak tanımlanabilir. Pestisitler ürün zararlılarına karşı kullanılan kimyasallardır. Günümüzde farklı fizikokimyasal özellikleri ve kimyasal yapıları olan çeşitli pestisit grupları bulunmaktadır. Pestisit kullanımı Avrupa ve ülkemizde önemli çevre sorunlarına yol açmaktadır [1]. Pestisit kullanımının artmasıyla birlikte halk sağlığı ve çevreye etki potansiyeli de artmıştır. Pestisitler; hava, toprak, su kaynaklarına besin zinciri yoluyla hayvan ve insanlara zarar vermektedir. Pestisitlerin bu potansiyel zararlarının ortaya çıkmasından sonra Avrupa komisyonu bir direktif (2009/128/EC) yayınlamıştır. Bu direktifle pestisit kullanımına sınırlamalar getirilmiş, bazı pestisitlerin kullanımı yasaklanmıştır [1]. Ülkemiz genelinde hektar başına kullanılan pestisit miktarı AB ülkelerinden azdır [2]. Buna karşın, ülkemizde pestisit tüketimi oldukça heterojen olduğundan, Akdeniz, Ege ve Marmara Bölgelerinde pestisit kullanımı gelişmiş ülkeler düzeyine yaklaşmaktadır [3,4]. Ülkemizde Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı toprak kalitesinin arttırılması ve tarımda yaşanan olumsuz etkilerin azaltılması yönünde çalışmalar başlatmıştır. Bakanlığın çalışmaya karar verdiği projeler çerçevesinde yapılan toplantılara ait sonuç raporlarında (i) Tarımda kullanılan gübre ve pestisitlerin aşırı kullanımlarının önlenmesi için, kayıt ve denetim mekanizmasının işletilmesi (ii) Sanayi ve kentsel kaynaklı sulama suyu kirliliğine bağlı olarak topraklarda oluşan çoraklaşma ve ağır metal kirliliğinin önlenmesi, (iii) kirlenmiş toprakların ıslah edilmesi gibi öncelikli konular belirlenmiştir (Şekil 2.1.)[5].



Şekil 2.1. Kıyı Akdeniz Tarım Havzaları [5]

## 2.1. KİRLENMİŞ TOPRAKLARIN TEMİZLENMESİ

### 2.1.1. NANOREMEDİASYON

Çevrenin korunması ve kirliliği, dünya çapında ele alınması gereken önemli konulardan birini temsil eder. Depolama alanlarındaki, petrol sahalarındaki, üretim alanlarındaki ve endüstriyel tesislerdeki tehlikeli maddelerle kirlenme, özel mülklerde olmak üzere askeri tesisler, insanların sağlığı ve çevre kirliliği açısından ciddi risk oluşturduğu [6] bunların yanında, son yıllarda ağır metallerin de neden olduğu toprak kirliliği dünya çapında giderek artan boyutlarda sıkıntılar oluşturmaktadır [7]. Madencilik, askeri faaliyetler, imalat ve endüstriyel veya evsel çamurun toprak uygulaması gibi antropojenik faaliyetler metal kirliliğinin ana kaynaklarıdır. Toprakta metallerin birikmesi, toprak mikroorganizmaları ve bitki geliştiricileri üzerinde olumsuz etkilere neden olabilir [8,9]. Bazı metaller (örneğin Fe, Cu, Mn ve Zn) bitkiler için temel mikro besin maddeleridir ve önemli biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonlara sahiptir [9,10]. Bu nedenle, birçok yerde iyileştirme stratejisinin temel amacı, potansiyel olumsuz etkileri en aza indirerek, topraktaki metal kullanılabilirliğini azaltmaktır. Son zamanlarda, Jadhav ve arkadaşları tarafından su akiferlerinde yüksek klorür konsantrasyonları ve düşük çözünmüş

oksijen seviyeleri (0.75 mg / L) ile birlikte pestisit, yağ, gres, ağır metaller ve diğer toksik kimyasal kalıntılarının olduğu izlenmiştir. [11].

Nanoremediasyon, atıkların neden olduğu kirliliğin tespit edilmesinde, izlenme, önlenme ve iyileştirilmesinde rol oynayarak çevre temizliği için yeni ve etkili bir çözüm yöntemlerindedir [12]. Günümüzde kullanılan ısı uygulama, kimyasal oksidasyon, sürfaktan/ko-solvent yöntemiyle temizleme gibi pahalı ve uzun süren, etkinliği yetersiz olan yöntemler artık yerlerini hızlı, ucuz ve daha etkili olan nanoremediasyon tekniklerine bırakmaktadır [13,14]. Nano ölçekli sıfır değerli demir (nZVI), bu amaçla şu anda en yaygın olarak kullanılan materyaldir. nZVI, arsenik ve krom gibi ağır metallerin, pestisidlerin (Lindane, DDT), klorlu solventlerin (PCE, TCE, DCE) uzaklaştırılması için kullanılmıştır [15].

Nanoremediasyon, nano ölçekli zeolitler, metal oksitler, karbon nanotüpler ve lifler, bimetalik nanopartiküller gibi reaktif nanomateryaller kullanılarak kirleticilerin dönüşümü ve detoksifikasyonunu içeren uygulamalardır. Bu tekniğin avantajları düşünüldüğünde, çevresel nanoteknoloji (E-nano) yeraltı suyu iyileştirme, petrol sızıntısı dekontaminasyonu, atıksu arıtma ve su arıtma gibi çeşitli çevresel uygulamalarda kullanılmaya başlanmıştır [16,17]. Madencilik, askeri faaliyetler, imalat, endüstriyel tarım, evsel atık, uzun süreli sulama gibi antropojenik faaliyetler metal kirliliğinin ana kaynaklarıdır [18, 19]. Ağır metal kirleticilerin nanoremediasyonunu sağlamak veya mobilitesini azaltmak için çeşitli stratejiler kullanılmıştır [20, 21]. Ağır metallerin yüzey ve yüzey altı su kaynaklarından uzaklaştırılması için nZVI'nın yanı sıra agarozla stabilize edilmiş nZVI ve doğal / sentetik goetit nZVI başarıyla uygulanmıştır. Benzer şekilde su birikintilerindeki ağır metaller, heksaklorobenzen, klorlu ve patlayıcı bileşikler gibi kirleticilerin detoksifikasyonunda da bimetalik nanopartiküller Ag / Fe; Ni / Fe; için Cu / Fe kullanılmıştır [22,23].

## 2.2. SIFIR DEĞERLİKLİ DEMİR

nZVI partiküllerinin çapı 10 ila 100 nm arasında değişmekle birlikte, bazı satıcılar "nanopartiküller" olarak mikrometre ölçekli demir tozları satmaktadır. Tipik olarak, nZVI'e herhangi bir soy metal (örneğin, paladyum, gümüş, bakır) eklenebilir. İkinci metal kendisi ve Fe arasında katalitik bir sinerji yaratır ve ayrıca toprağa enjekte edildikten sonra nanopartiküllerin dağılımına ve hareketliliğine yardımcı olur [24,25]. Bu nanopartiküller ikiden fazla da farklı metaller de içerebilir. İkinci metal genellikle daha az reaktiftir ve Fe oksidasyonunu veya elektron transferini desteklediğine inanılmaktadır [25]. Bazı soy metaller, özellikle paladyum, kloruzlaştırma ve hidrojenasyonu katalize eder ve iyileştirmeyi daha verimli hale getirebilir [25,26].

nZVI'nın bitkilere olan etkisi ile ilgili olarak, çalışmaların çoğu laboratuvar ölçeğinde yapılmıştır ve uzun vadeli veriler halen yetersizdir. El-Temseh ve Joner, farklı nZVI konsantrasyonlarının keten, arpa ve çimi tohumlarının çimlenmesi üzerindeki etkilerini incelemişler ve 250 mg/L nZVI'ya kadar olan konsantrasyonlarda önemli bir etkinin olmadığını rapor etmişlerdir [27]. Gil-Díaz vd., %1 (%0,14 Fe<sub>0</sub>) ve %10 (%1,4 Fe<sub>0</sub>) oranında bir ticari nZVI süspansiyonunun, arpa ve genel fide tohumlarının çimlenmesinde fitotoksisite yaratmadığı sonucuna varmışlardır [28].

Fe'nin çevresel kirleticilerle (özellikle klorlu çözücülerle) reaksiyonunun altında yatan kimyası, mikrometre ölçeğinde nZVI PRB'lerde kapsamlı bir şekilde çalışılmış ve uygulanmıştır [29]. Klorlu çözücüler için iki ana bozulma yolu vardır: beta eliminasyonu ve indirgeyici klorlama. Beta eliminasyonu, en sık kirletici maddelerden biri olan Fe partikülü ile doğrudan temas ettiğinde meydana gelir.

### **2.2.1. Sıfır Değerlikli Demir Nanopartikül (SDDNP) Sentezi**

Sıfır değerlikli demir nanopartikül sentezi sıvı fazda indirgeme metoduna dayalı bor hidrür indirgeme metodu ile sentezlenebilmektedir. Çözelti hazırlamada kullanılan ultra saf su ve yıkama amacıyla kullanılan etanol içerisindeki oksijenin uzaklaştırması için 10 dakika azot atmosferinde ultrasonik etkiye tabi tutulur. Hazırlanan FeCl<sub>3</sub> .6H<sub>2</sub>O, NaBH<sub>4</sub> ve HTAB ayrı ayrı 5 dakika tekrar azot atmosferine tabi tutulduktan sonra üç boyunlu bir balon içerisinde sentez işlemi gerçekleştirilir. Öncelikle reaksiyon ortamına FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O ve HTAB çözeltileri alınarak 15 dakika azot atmosferinde karıştırılıp birbiriyle kompleks yapması sağlanır. Peristaltik pompa yardımıyla NaBH<sub>4</sub> çözeltisi sisteme damla damla eklenir. Tüm bu deneylerde hacimsel olarak kullanılan demir çözeltisi/sodyum bor hidrür çözeltisi oranı 1,0'dır (V/V=1). NaBH<sub>4</sub> eklenmesini bittikten sonra 15 dakika daha azot atmosferi altında karıştırma işlemi sürdürülür. Sentez işlemi bittikten sonra oluşan çözelti santrifüj tüpüne aktarılarak, 13,500 rpm hız ve 25°C sıcaklıkta 15 dakika santrifüjlenerek SDDNP tanecikleri süzüntüden ayrıştırılır. Ardından yıkama işlemi için, SDNNP tanecikleri etanol ile ultrasonik ortamda dağıtılıp tekrar santrifüjlenir, bu yıkama işlemi üç kez tekrarlanır. En son santrifüjde ayrılan tanecikler vakumlu etüvde 70°C sıcaklık ve 10 bar basınç altında 3 saat kurutulur [30]. Kurutma sonrasında oksitlenmeyi engellemek için numuneler içerisinde azot atmosferi barındıran cam numune tüplerinde saklanır.

### **2.3.TOPRAK MİKROORGANİZMALARI**

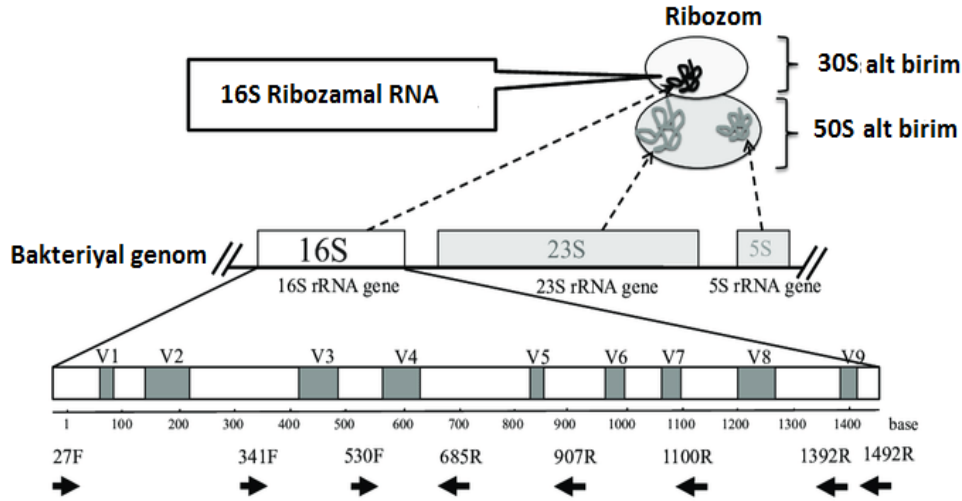
Toprak, kaya malzemelerinin in situ hava koşullarının veya su, rüzgâr veya buzla taşınan mineral maddenin birikmesi sonucunda kara yüzeylerini kaplayan ince örtü olarak kabul edilir [31]. Toprak yalnızca kum, silt, kil gibi mineral fraksiyonlardan ve çeşitli ayrışma düzeyindeki organik ve inorganik maddelerden değil mikroskobik ve makroskobik boyutta canlıları da yapısında barındırmaktadır. Çok sayıda bakteri, mantar, alg, virüs, protozoa gibi mikroorganizmalar, toprak omurgasızlarından omurgalılara kadar değişen canlılar, karmaşık bir etkileşim içinde toprak yapısında bulunurlar. Toprak bu canlıların çoğalmaları ve varlıklarını sürdürmeleri için iyi bir gelişme ortamıdır. Bu canlılar, toprağın gelişimi, kimyasal ve fiziksel özellikleri ile verimliliği üzerinde önemli rol oynarlar. Toprağın biyolojik sistemi, toprak biliminin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Çünkü, organizmalar olmadan toprağın oluşması ve işlevlerini yerine getirmesi mümkün değildir. Mikroorganizmalar toprak faunası işbirliği ile çeşitli hayvan ve bitki kalıntılarını ayrıştırarak başlangıçtaki mineral maddelerin açığa çıkmasında etken olurlar. Bu esnada üretmiş oldukları metabolitler ve ara ürünler ile toprağa yoğun bir biyokimyasal nitelik kazandırır. Bu aktiviteler sonucu oluşan son ürünlerden öncelikle bitkiler yararlanır. Bu nedenle toprakların verimliliği, toprakta bulunan organizma aktiviteleri ile çok yakından ilgilidir. Bitkilerin gereksinimi olan karbon, azot, fosfor, kükürt, demir, magnezyum v.b elementler, mikroorganizmalar tarafından bitkilerin yararlanacağı şekle çevrilir. Mikroorganizmalar bu tür işlemleri kendi besin ve enerji gereksinimlerini sağlarken oluştururlar. Örneğin, bitkilerin yararlanamadığı atmosferdeki element azot ( $N_2$ =dinitrojen) mikroorganizmalar tarafından tutularak (fiksasyon) bitkilerin yararlanabileceği şekillere çevrilir [32]. Toprak mikrobik toplulukları, karbon, azot, kükürt ve fosfor gibi birkaç biyojeokimyasal döngüde yer alırlar [33]. Bu nedenle, mikrobik toplulukların yapısında ve bileşiminde küçük bir karışıklık bile çevresindeki ortamda değişikliklere neden olabilir ve bunun tersi de mümkündür.

### **2.3.1. Toprak Mikroorganizmalarının 16S rRNA Gen Dizisine Göre Tanımlanması**

Mikroorganizmaları tespit etmek için kültürden bağımsız metotlar, geleneksel kültür bazı metotlara paralel olarak, 1970'lerde ortaya atılan 16S rRNA gen sekanslarına dayalı bakterilerin sınıflandırılması o günden bugüne bir hayli geliştirilmiştir. Kültür bağımsız moleküler teknolojilerin gelişmesi ve yayılmasıyla mikrobiyal çalışmalarda devrim niteliğinde ilerlemeler olmuştur. Bu teknolojilerin gelişimi, kültüre bağımlı yöntemler gibi geleneksel yöntemlerle tespit edilemeyen mikroorganizmaların araştırmasına önemli ölçüde katkıda bulunmuştur [34]. Ribozom, canlı proteinlerin hepsinde bulunan, biyolojik protein sentezinde (translasyon) önemli bir rol oynayan çoğul proteinler ve RNA alt ünitelerinin bir kompleksidir. Ribozom

yapısının ve 16S rRNA geninin şeması, Şekil 2.2.'de gösterilmiştir. Ribozom iki ana bileşenden oluşur: küçük ribozomal alt birim (prokaryotik hücrelerde 30S ribozomal alt birim) ve büyük alt birim (prokaryotik hücrelerde 50S ribozomal alt birim). Her alt birim bir veya daha fazla ribozomal RNA (rRNA) molekülü ve çeşitli ribozomal proteinler içerir. 16S rRNA geni, bakteri ve archealar dahil olmak üzere tüm prokaryotik hücrelerde bulunan 30S ribozomal alt ünitesinin bir ribozomal RNA molekülünü kodlar. 23S rRNA ve 5S rRNA, 50S ribozomal alt ünitesinde bulunan rRNA alt birimleridir. Ribozomun bileşenlerini kodlayan genler çoğunlukla korunmuştur, bu da yapılarının önemli fonksiyonlarından dolayı zaman içinde çok az değiştiği ve mRNA'yı proteinlere dönüştürdüğü anlamına gelir. Bu nedenle, genler “ev tutma genleri” olarak kullanılır. Üç alanın (Eukarya, Bakteri ve Archaea) sınıflandırılması, rRNA gen sekanslarına dayanan filogenetik ağaç uyarınca önerilir [35].

16S rRNA geni, çeşitli nedenlerden dolayı bakterileri tanımlamak için yaygın olarak kullanılan bir araçtır. Bu nedenlerden ilki, gen nispeten kısadır (yaklaşık 1.500 bp). İkincisi, 16S rRNA gen dizisinde, çoğu bakteri arasında (korunmuş bölge) ortak olan ve dokuz farklı bölgeye (hiper değişken bölgeler) ayrılan on bölge vardır (Şekil2.2) ve bazı evrensel primerler korunmuş bölgelerde kurulur [36]. Üçüncüsü, kamuya açık veri tabanlarına kaydedilen gen dizileri büyük ölçüde artmaktadır, çünkü gen dizisi bakteriyel taksonomik çalışmalarda tanımlama ve sınıflandırma için önemli bilgilerdir.



**Şekil 2.2. Ribozom kompleksi ve 16S rRNA geninin şeması.** Beyaz ve gri kutular sırasıyla korunmuş bölgeleri ve aşırı değişken bölgeleri gösterir. Kalın oklar, *Escherichia coli*'nin 16S rRNA gen dizisinde universal primerlerin yaklaşık konumlarını gösterir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Sıfır değerlikli demirin “minimum inhibe edici konsantrasyonunun” (MİK) tespit edildiği çalışmalarda içeriği Tablo 3.1’ de belirtilen Nutrient Broth besiyeri kullanılmıştır. Besiyerleri hazırlandıktan sonra pH’ları HI2211 phOPR Meter model pH metre ile ölçülmüş ve 1 M NaOH ve 1 M HCl çözeltileri ile 7.0’ a ayarlanmıştır. Daha sonra, besiyerleri 121 °C, 1 atm basınç altında 15 dk otoklavlanmak suretiyle steril hale getirilmiştir.

**Tablo 3.1.**Nutrient agar besiyerinin bileşenleri.

Bileşen	Miktar
Pepton	5 g/L
Meat Ekstrat	3 g/L
Agar	18 g/L

##### 3.1.2. Agaroz Jel Elektforezi ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) İçin Gerekli Çözeltilerin Hazırlanması

27 İleri primer (AGA GTT TGA TCA TCA TGG CTC AG) ve 1492 geri primer (TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T) liyofilize halde Sentromer DNA Teknolojileri’nden temin edildikten sonra 100 µM stok çözeltisinin hazırlanması için üzerlerine 634 µL nükleazsız su ve 670 µL nükleazsız su ilave edilmiştir. Hazırlanan bu çözelti 1/10 oranında seyreltilerek 10 µM’lık çalışma çözeltisi hazırlanmıştır.

DNA merdiveni (DNA ladder) hazırlanması için 10 µL 6X yükleme boyası, (Thermo Scientific) 40 µL nükleazsız distile su ve 10 µL DNA belirteci (marker=merdiven) (Thermo Scientific Generuler 100 bp Plus DNA Ladder) karıştırılmıştır.

Jellerdeki DNA’nın görüntülenmesi için 10 mg/mL EtBr hazırlanmıştır. Hazırlanan bu solüsyonda 100 mL’lik jel içerisine 5 µL çalışma sırasında eklenmiştir.

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. Bakteri İzolasyonu İçin Toprak Örneklerinin Alınması

Bakterilerin izole edileceği toprak materyalini Mersin ilinde tarımın yoğun olarak yapıldığı Akdeniz ilçesi Adanalıoğlu mahallesin den toplandı. Toplanan toprak örnekleri bir kaşık yardımı

ile steril örnek toplama poşetine aktarılmıştır. Toplama poşetlerinin üzerine örneklerin alındığı bölgeler ve konumlar not edilerek, bakteriyel izolasyon çalışmaları için laboratuvara getirilmiştir.

### 3.2.2. Bakterilerin topraktan izolasyonu

Toprak örnekleri alınarak soğuk zincir ile laboratuvarı taşınmış ve kullanılıncaya kadar kısa bir süre için + 4 °C de muhafaza edilmiştir. Laboratuvara getirilen toprak örnekleri homojenize edildikten sonra 1 g toprak örneği, otoklavda 121 °C ve 1 atm basınçta 15 dk bekletilerek steril edilmiş 100 mL'lik Ringer çözeltisi içerisine aseptik koşullarda aktarılmış ve toprağın sıvı içerisinde dağılmasını sağlamak için 5 dk süresince çalkalanmıştır. Ringer çözeltisi içindeki toprak 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup> oranında seyreltilmiş ve her bir seyreltmeden 100 µL alınarak Luria-Bertani besiyeri ( 10 g/L kazein, 5 g/L maya özütü, 10 g/L NaCl ve 15 g/L agar) yüzeyine yayılmıştır.

Yayma işleminden sonra petriler 30 °C' de 2-7 gün inkübe edilmiş ve oluşan koloniler gözlemlenmiştir. Şekil, yayılım, renk gibi morfolojik olarak farklılığı göze çarpan koloniler tespit edilmiş ve ardı ardına tekrarlanan çizgi ekim yöntemi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırma işlemi, seçilen kolonilerin ardı arkasına çizgi ekim yöntemi ile pasajlanması ile gerçekleştirildi.

### 3.2.3. İzolatların saklanması

Saflaştırılan koloniler numaralandırıldıktan sonra hem % 20'lik gliserol stoklarında -20 °C' de hem de nutrient agar ile hazırlanmış yatık agarlı tüplerde +4 °C'de saklandı. Stoklanan bakteriyel suşlar daha sonraki çalışmalarda tekrar kullanılmadan önce nutrient agar besiyerinde taze olarak geliştirilmiştir.

### 3.2.4. Bakteriyel Genomik DNA nın ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu çözeltisi hazırlanması için tablo 3.2.' deki kimyasallar kullanılmıştır.

**Tablo 3.2.:** DNA ekstraksiyonu için gerekli malzemeler

---

TE tamponu
%10 Sodyum dodesil sülfat (SDS)
20 mg/ml proteinaz K
5 M NaCl
CTAB / NaCl çözeltisi
24: 1 kloroform / izoamil alkol
25: 24: 1 fenol / kloroform / izoamil alkol

izopropanol  
% 70 etanol

---

Bakteri şusu 5 ml'lik bir sıvı kültürü ile inoküle edildi. Kültür doymuş olana kadar uygun koşullarda (yani uygun ortam, ilaç seçimi, sıcaklık) bir gece çoğaltılması için bekletildi. Bir gecenin sonunda kültür alınır ve 1.5 ml' si 10000 dev/dak hızda 5 dakika boyunca mikrosantrifüjde çöktürüldü. Mikrosantrifüj den çıkarılan kültürün süpernatant kısım pipetle alınıp atıldı. Kalan çökeltiyle 567 µL TE tamponu içerisinde mikropipet yardımıyla çözdürüldü. Çözelti içerisine 30 µL SDS ve 3 µL proteinaz K çözeltileri eklenerek karıştırılır ve 37°C de 1 saatte inkübe edildi. Bu aşamada hücreler lizis olur ve tüp içindeki sıvı saydamlaşır. Üzerine 100 µL 5 M NaCl eklenip karıştırıldı. Daha sonra 80 µL CTAB/NaCl çözeltisi eklenir ve karıştırılıp 65 °C de 10 dakika tutuldu. Yaklaşık olarak eşit hacimde (0.7 ila 0.8 ml) Fenol / Kloroform / Isoamil-alkol eklenip, tekrar karıştırılıp 5 dakika boyunca mikrosantrifüjde döndürüldü. Bu ekstraksiyon CTAB-protein / polisakarit komplekslerini uzaklaştırmak için yapılır. Santrifüjden sonra süpernatant kısmı atılır. Eşit miktarda kloroform / izoamil alkol eklenir, iyice ekstrakte edilir ve 5 dakika boyunca mikrosantrifüjde döndürülür. Bazı bakteri suşları ile, kloroform özümlemesinden sonra oluşan arayüz, süpernatanın kolayca çıkarılmasını sağlayacak kadar kompakt değildir. Bu gibi durumlarda, ara birimin çoğu herhangi bir süpernatanın çıkarılmasından önce steril bir kürdan ile temizlenebilir. Kalan CTAB çökeltisi daha sonra fenol / kloroform özümlemesinde uzaklaştırılır.

Süpernatantı temiz bir tüpe aktarılır. Nükleik asitleri çökeltmek için 0,6 hacim izopropanol eklenir (NaCl konsantrasyonu zaten yüksek olduğundan tuz ilave etmeye gerek yoktur). DNA çöktürülünceye kadar karıştırılır ve DNA'nın iplikçikler şeklinde çökeldiği gözle görülebilir. DNA, 10000 dev/dak hızda 10 dakika santrifüjlenerek çöktürülür. Artık CTAB'yi çıkarmak için DNA'yı % 70 etanol ile yıkanır. Tüp ters çevrilir 5 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilir. Alkol tamamen uçar. Çökelti 100 µL TE tampon içinde yeniden çözülür ve tüpe parmakla yavaşça vurularak DNA çözdürülür.

### **3.2.5. İzolatların 16S rRNA gen dizisine göre tanımlanması**

İzolatlar, 16S rRNA gen dizilerinin karşılaştırılması ile moleküler olarak tanımlanmıştır. Bu yöntemde, stoktan taze besiyerine aktarılarak geliştirilmiş izolatlardan önce genomik DNA ekstraksiyonu yapılmış daha sonra ilgili gen bölgesi PZR ile çoğaltılmış ve son olarak ta çoğaltılan gen dizileri NCBI veri tabanında daha önce farklı araştırmacılar tarafından deponit edilmiş dizilerle karşılaştırılmıştır.

### 3.2.6. 16S rRNA Genlerinin PZR ile Çoğaltılması

PZR reaksiyon karışımı 3 µL bakteriyel genomik DNA, 3 µL 10X TBE tamponu, 2,4 µLMgCl, 0,8 µLdioksinükleotid (dNTP) solüsyonu, 0,8 µL 10 mM 27 forward primer solüsyonu, 0,8µL 10 mM 1492 reversprimer solüsyonu, 0,25 µLTaq DNA polimeraz ve 18,95 mL distile sudan oluşturulmuştur. Termal döngüleyicideki 16S rRNA gen bölgesinin çoğaltılması (i) 94 °C'de 300 saniye, (ii) 94°C'de 45 saniye ve 51°C'de 60 saniye, 72 °C'de 60 saniye ve 72 °C'de 600 saniye olmak üzere 35 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.7. Çoğaltılan DNA'ların Agaroz Jel Elektrofrezisi ile Gösterilmesi

Agaroz jel elektrofrezisi için % 1'lik agaroz TBE tamponu içerisinde mikrodalga fırında ısıtılarak çözündürülmüş ve uygun sıcaklıkta (50-60 °C) içerisine 10 mg/mL'likEtBr çözeltisinden 4 µL (100 mL'likagaroz çözeltisi için) ilave edilmiştir. Daha sonra, elektrofrez tankı içerisine dökülerek donmaya bırakılmıştır.

Her bir damla yükleme boyası ile 3 µL örnek karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir ve örnekler DNA standardıyla birlikte 50 mA'de 20-30 dk yürütülmüştür. Yürütme işlemi sonrasında her bir hattaki DNA bandı ya da bantları UV ışık altında görüntülenmiştir (Quantum-ST4, Montreal Biotech).

### 3.2.8. McFarland standardı ile bakteri sayılarının tahmini

McFarland Standardı, baryum klorür ve sülfürik asidin kimyasal bir çözeltisidir; bu iki kimyasal madde arasındaki reaksiyon, ince bir çökelti, baryum sülfat üretilmesine neden olur. İyi çalkalandığında, bir McFarland Standardının türbiditesi, aşağıda belirtildiği gibi bilinen konsantrasyondaki bir bakteri süspansiyonu ile görsel olarak karşılaştırılabilir [37].

**Tablo 3.3.** :McFarland standardı

McFarland Standart	%1BaCl <sub>2</sub> (ml)	%1H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ml)	Yaklaşık Bakteriyel Süspansiyon / mL
0.5	0.05	9.95	1.5 x 10 <sup>8</sup>
1.0	0.10	9.90	3.0 x 10 <sup>8</sup>
2.0	0.20	9.80	6.0 x 10 <sup>8</sup>
3.0	0.3	9.7	9.0 x 10 <sup>8</sup>
4.0	0.4	9.6	1.2 x 10 <sup>9</sup>

5.0	0.5	9.5	$1.5 \times 10^9$
6.0	0.6	9.4	$1.8 \times 10^9$
7.0	0.7	9.3	$2.1 \times 10^9$
8.0	0.8	9.2	$2.4 \times 10^9$
9.0	0.9	9.1	$2.7 \times 10^9$
10.0	1.0	9.0	$3.0 \times 10^9$

Bakteri artışının ve bulanıklığını tespit eden McFarland çözeltileri ile kıyaslanmasında kültürden gelecek etkiyi kaldırmak için bakteri süspansiyonu santrifüj edilip fizyolojik tuzlu su ile yıkanır ve bakteri süspansiyonun gerçek hacmine getirilerek spektrofotometrede (600 nm) kıyaslanması yapılır [38].

### 3.2.9. Sıfır Değerlikli Demir İçeren Besiyerlerinin Hazırlanması

Farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren besiyerlerinin yapılması için ilk olarak 256 µg/mL nZVI içeren stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti seyreltmeler gerçekleştirilmeden önce oda sıcaklığında ardı ardına 10 dk ve 5 dk süresince Şekil 3.1.'da gösterildiği gibi sonikatörde bekletilmiştir. Sonikasyonla süspansiyon içerisindeki materyalin agregasyonu kısmen engellenmiştir.



**Şekil 3.1.:** nZVI'nin sonikatördeki aşaması

Daha sonra materyal içermeyen Luria Bertani besiyeri kullanılarak stok besiyeri seyreltilerek 256 g/mL, 128 g/mL, 64 g/mL, 32 g/mL, 8 g/mL, 4 g/mL, 2 g/mL, 1 g/mL nZVI içeren besiyerleri Şekil 3.2.'deki gibi hazırlanmıştır. Daha sonra, hazırlanan besiyerleri otoklavlanmak suretiyle tekrar steril edilmiştir.

### **3.2.10. İnokülasyon**

Çizgi ekim yöntemiyle saflaştırılan ve moleküler yöntemlerle cins seviyesinde tanımlanan farklı izolatlar çalkalamalı inkübatörde 37 °C de 24 saat süresince inkübe edildi. Kültürlerdeki üremeye karşılık gelen absorbans değerleri ölçüldü. Ölçülen değer Mc farland standardı ile karşılaştırıldıktan sonra son konsantrasyon  $1.5 \times 10^8$  olacak şekilde seyreltmeler hazırlanmıştır ve hazırlanan seyreltmeler inokülasyon stoğu olarak kullanılmıştır. [39].

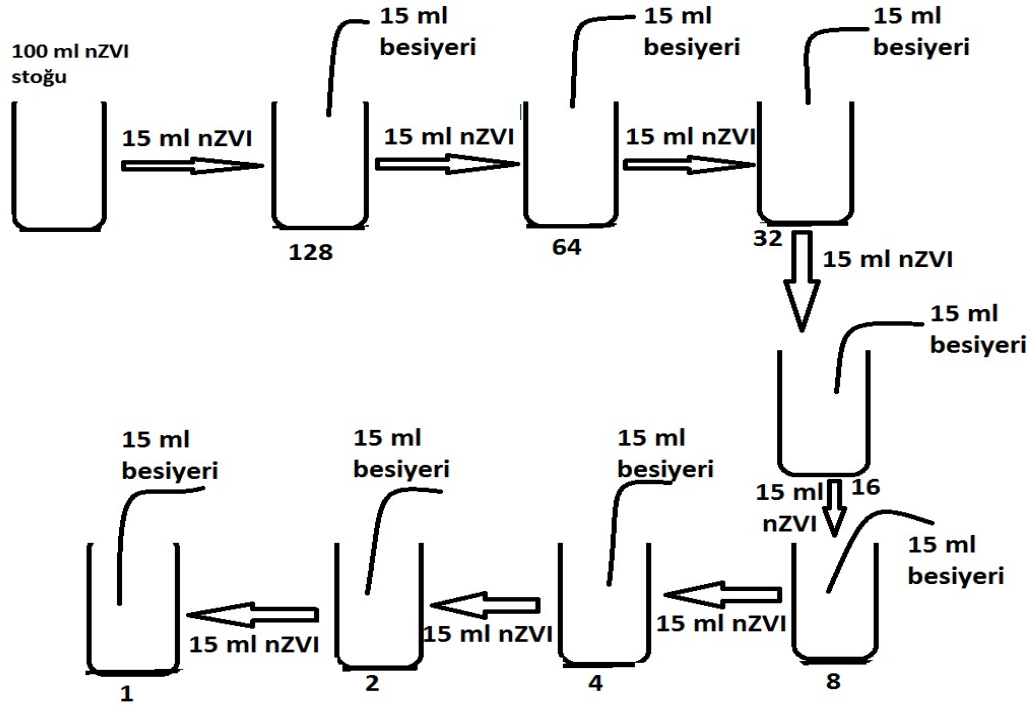
### **3.2.11. nZVI 'nin izole edilen bakteriyel suşlara karşı biyolojik etkisinin disk difüzyon yöntemiyle belirlenmesi**

Disk difüzyon yöntemi ile nZVI nin bakteriler üzerine biyolojik etkisinin belirlenmesi nutrient agar besiyeri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Agar yüzeyine inokülasyon stoğundan 100 µL si aktararak yayıldıktan sonra agar yüzeylerine 30 µL 256 µg/mL nZVI süspansiyonu emdirilen diskler yerleştirilmiş ve petriler 48 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda antimikrobiyal etkiden kaynaklanan disk çevresinde şeffaf zon oluşumu gözlemlenmiştir.

### **3.2.12. Minimum İnhibe Edici Konsantrasyonun Belirlenmesi**

MİK, bir gecelik inkübasyondan sonra mikroorganizmaların gözle görülebilir üremesini inhibe edecek olan antimikrobiyal maddelerin en düşük konsantrasyonudur [40]. MİK testi, Basile ve arkadaşlarının (1998) belirttiği şekilde, Broth seyreltme metoduyla yapılmıştır [41,42]. İnokulum olarak 100 µL inokülasyon stoğu kullanılmıştır [43].

Farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren besiyerlerine bakteriyel izolatların inokülasyonu gerçekleştirildikten sonra erlenler 37°C'de 60 saat süreyle inkübe edilmiştir [44]. İnkübasyondan sonra, besiyerlerinde bakteriyel üremenin göstergesi olarak bulanıklıktaki değişiklikler incelenmiştir. Bulanıklık tayini spektrofotometrede 600 nm dalga boyundaki absorbansın değişimi ile ölçülmüştür.



Şekil 3.2: nZVI in seyreltme aşaması



Şekil 3.3: BK0605 suşunun karıştırıcıda bekletilmesi

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1.BULGULAR

#### 4.1.1. Adanalıoğlu Mevkiinde Alınan Toprak Örnekerinden Bakteri Suşlarının Saflaştırılması

Adanalıoğlu mevkiinde seracılık yapımının yoğun olduğu bölgelerden toplanan toprak örnekerinden çizgi ekim yöntemiyle bakteri türleri saflaştırıldı. Gerçekleştirilen saflaştırma işlemi sonucunda 9 bakteri suşu izole edildi. İzole edilen suşlar HMD10, HMD47, HKN21, HMD03, AK027, HMD01, HMD05, HMD09, HMD07 olarak kodlandı. Bunlar arasından MD10, HMD47, HKN21, HMD03, AK027 ve HMD01 izolatlarından DNA izolasyonu yapılabilirken kalan 3 izolattan PZR de kullanılmak üzere yeterli miktarda DNA izolasyonu gerçekleştirilemedi.

#### 4.1.2 İzolatların 16S rRNA Gen Dizisine Göre Tanımlanması

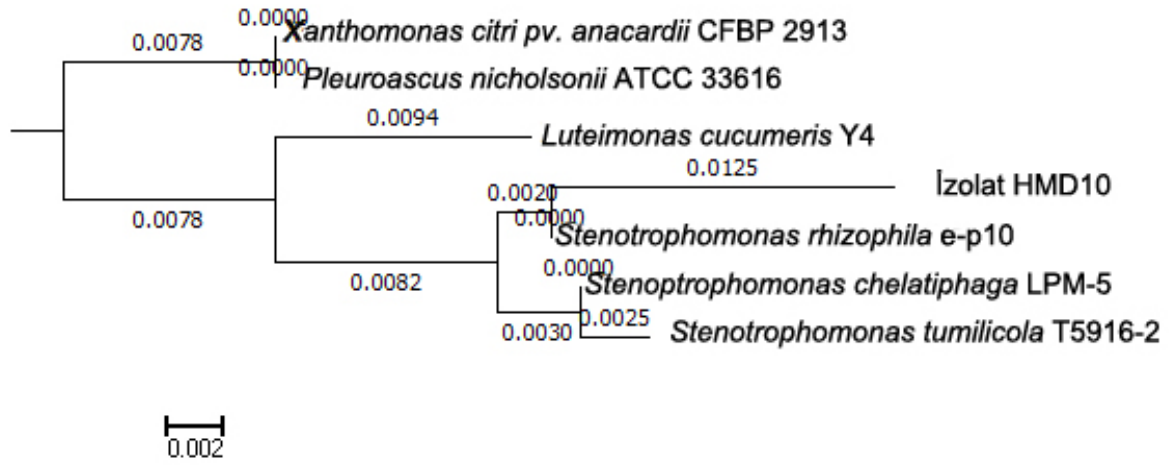
Tarama deneyleri sonucunda izolatların 16S rRNA geni PZR ile çoğaltıldıktan sonra agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. DNA miktarı ve kalitesi ise (260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki absorbanlarının oranı) NanoDrop ile tespit edilmiştir

PZR ürünleri “Applied Biosystems® 3500 Series Genetic Analyzers” marka cihaz ile Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit kullanılarak dizilendikten sonra diziler BLAST yardımıyla NCBI veri tabanında bulunan 16S rDNA dizileri ile karşılaştırılmış ve dizi eşleşmesine göre izolatlara en yakın türler tespit edilmiştir. Ayrıca bu karşılaştırmalara dayanılarak neighbour-joining metodu ile MEGA 6 programında filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur.

İzolatlardan elde edilen 16S rDNA gen dizilerinin NCBI veri tabanında bulunan 16S rDNA gen dizileri ile karşılaştırmaları sonucunda yakın ilişkili oldukları belirlenen bakteri türleri ve ilgili gen dizisi arasındaki benzerlikler tespit edilmiştir. Her bir izolatın 16S rDNA gen dizilerine dayalı filogenetik pozisyonları Mega 6 programı kullanılarak neighbor-joining metodu ile çizilmiştir.

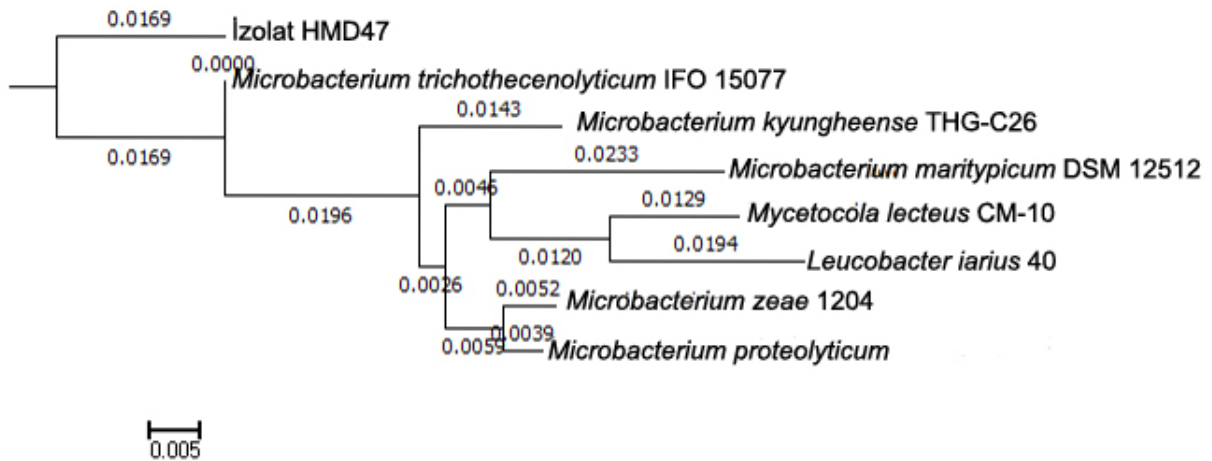
İzolat HMD10 na ait 16S rRNA gen dizisinin NCBI BLAST veri tabanında farklı tip suşların 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırılmıştır. Buna göre 16S rRNA gen dizilerinin *Stenotrophomonas rhizophila* e-p10 % 98 benzerlikte olduğu tespit edilmiştir. *Stenotrophomonas chelatiphaga* LPM-5 ve *Stenotrophomonas tumulicola* T5916-2-1b ile % 97 benzerlik bulunmuştur. Buna ilaveten *Luteimonas cucumeris* Y4 %96 ve *Xanthomonas citri* pv. *Anacardii* %94 16S rRNA gen dizisi ile benzerlik saptanmıştır. Tür seviyesinde kesin bir ayırım yapabilmek için izolatın

biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerinin de araştırılarak karşılaştırılması gerekliliği ortaya çıkmıştır. İzolat HMD10'un filogenetik ağaçtaki pozisyonu Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.1.** *Stenotrophomonas* genusu içerisinde yer alan tarama deneyleri sonucunda tespit edilmiş HMD10 izolatının neighbor-joining metoduna göre çizilmiş filogenetik ağaçtaki pozisyonu.

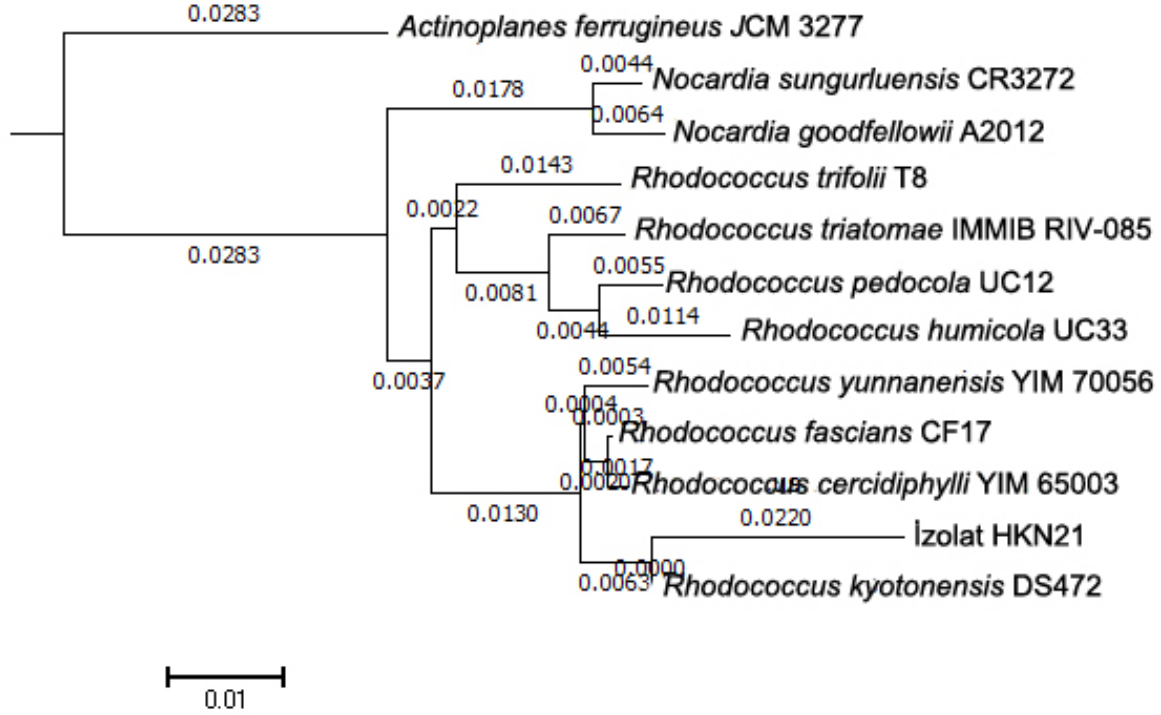
İzolat HMD47'nin 16S rRNA gen dizisinin göre NCBI veritabanındaki dizilerle karşılaştırılması yapıldığında *Microbacterium trichothecenolyticum* IFO 15077 %97 benzerlik olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra *Microbacterium zeae* 1204, *Microbacterium proteolyticum* %92, *Microbacterium kyungheense* THG-C26 %91 ve *Mycetocola lacteus* CM-10 *Microbacterium maritpicum* DSM 12512 %89 benzerlik olduğu belirlenmiştir. İzolat HMD47'nin Mega programı yardımı ile çizilen filogenetik ağaçtaki pozisyonu Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.2.** *Microbacterium* genusu içerisinde yer alan tarama deneyleri sonucunda tespit edilmiş HMD47 izolatının neighbor-joining metoduna göre çizilmiş filogenetik ağaçtaki pozisyonu.

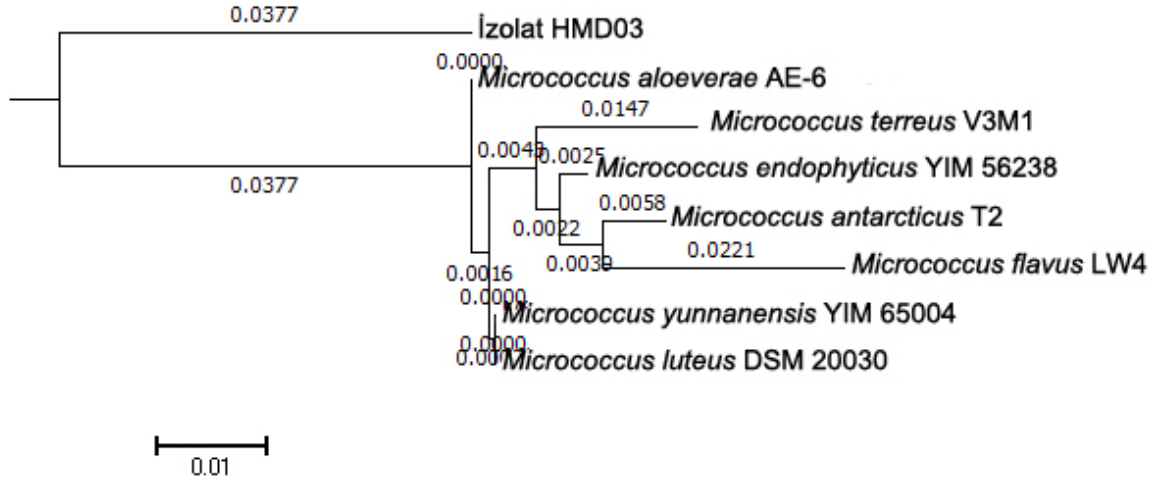
İzolat HKN21'in 16S rRNA gen dizilerinin *Rhodococcus kyotonensis* DS472, NTS12 %97 benzerlik olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, *Rhodococcus fascians* CF17 ve *Rhodococcus*

*cercidiphylli* YIM 65003'e %95, *Rhodococcus yunnanensis* YIM 70056'ya %94, *Rhodococcus trifolii* T8 *Rhodococcus triatomae* IMMIB RIV-085 %92 benzerlik görülmüştür. İzolat HKN21'in filogenetik ağaçtaki pozisyonu Şekil 4.3.'de gösterilmektedir.



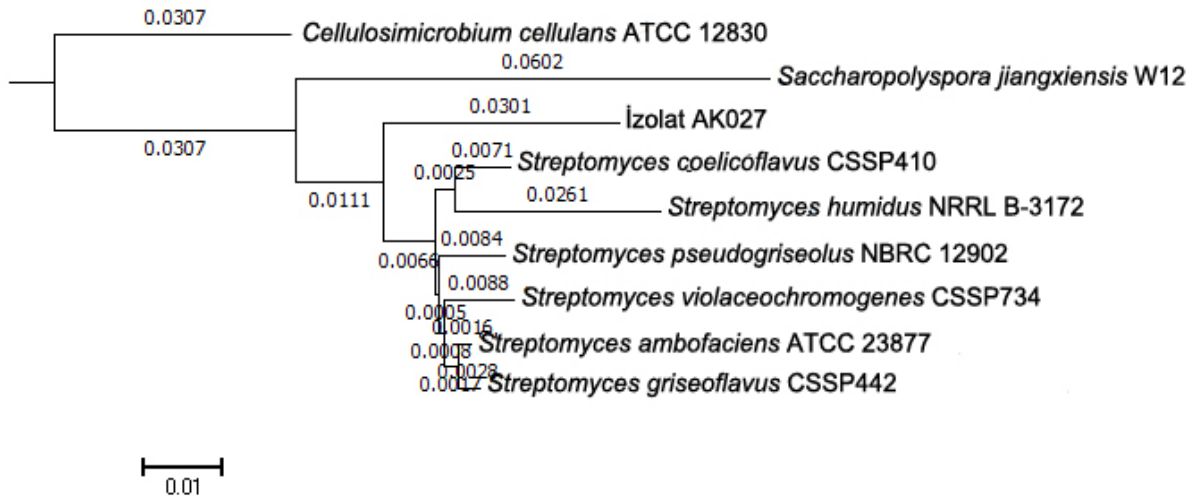
**Şekil 4.3.** *Rhodococcus* genusu içerisinde yer alan tarama deneyleri sonucunda tespit edilmiş HKN21 izolatının neighbor-joining metoduna göre çizilmiş filogenetik ağaçtaki pozisyonu.

İzolat HMD03'ün 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırılması sonucunda *Micrococcus aloeverae* AE-6 %93 oranında benzer olduğu tespit edilmiştir. *Micrococcus luteus* DSM 20030, *Micrococcus yunnanensis* YIM 65004 %91'lik benzerlik tespit edilmiştir. Ayrıca *Micrococcus endophyticus* YIM 56238 %90, *Micrococcus antarcticus* T2 ve *Micrococcus terreus* V3M1 %89 *Micrococcus flavus* LW4'e ise %88 benzerlik tespit edilmiştir. İzolat HMD03'ün filogenetik ağaçtaki pozisyonu Şekil 4.4.'da gösterilmektedir.



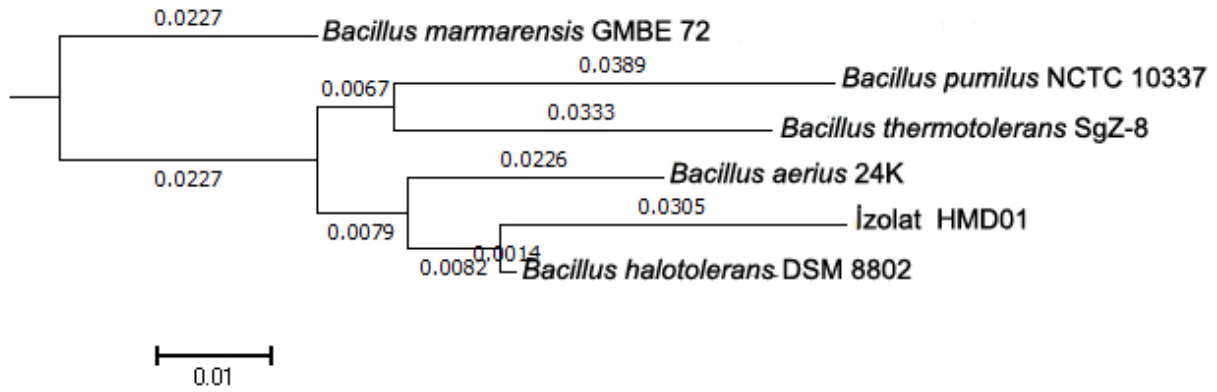
**Şekil 4.4.** *Micrococcus* genusu içerisinde yer alan tarama deneyleri sonucunda tespit edilmiş HMD03 izolatının neighbor-joining metoduna göre çizilmiş filogenetik ağaçtaki pozisyonu.

16S rRNA gen dizisi analizi sırasında izolat AK027'nin *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877, *Streptomyces viola ceochromogenes* CSSP734 ve *Streptomyces griseoflavus* CSSP442'nin arasında %94 oranında benzerlik meydana gelmiştir. Bununla birlikte, izolatın 16S rRNA gen dizisinin *Streptomyces coelicoflavus* CSSP410 ile %93, *Streptomyces humidus* NRRL B-3172 ile %91, *Saccharopolyspora jiangxiensis* W12 ve *Cellulosimicrobium cellulans* ATCC 12830 %88 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. İzolat AK027'nin filogenetik ağaçtaki pozisyonu Şekil 4.5.'de gösterilmektedir.



**Şekil.4.5.** *Streptomyces* genusu içerisinde yer alan tarama deneyleri sonucunda tespit edilmiş AK027 izolatının neighbor-joining metoduna göre çizilmiş filogenetik ağaçtaki pozisyonu.

İzolat HMD01'e ait 16S rRNA gen dizisinin *Bacillus halotolerans* DSM 8802'den elde edilen dizilerle karşılaştırılması sonucunda %96 benzerlik gözlemlenmiştir. Aynı zamanda elde edilen dizilerin *Bacillus aerius* 24K %92 oranla, *Bacillus pumilus* NCTC 10337 %91 oranla, *Bacillus marmarensis* GMBE 72'ye %90 oranla ve *Bacillus thermotolerans* SgZ-8 %89 oranla da 16S rRNA gen dizileri ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. İzolat K30701'in Mega programı yardımı ile çizilen filogenetik ağaçtaki pozisyonu Şekil 4.6. da gösterilmiştir.



**Şekil 4.6.** *Bacillus* genusu içerisinde yer alan tarama deneyleri sonucunda tespit edilmiş HMD01 izolatının neighbor-joining metoduna göre çizilmiş filogenetik ağaçtaki pozisyonu.

#### 4.1.3. Sıfır Değerlikli Demirin Bakteriler Üzerindeki Etkilerinin Gözlemlenmesi

Yeni sentezlenmiş organik yada inorganik kimyasallar, sürfektanlar, antibiyotikler, kirleticiler ve nanopartiküller gibi bir çok maddenin bakteriler üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi için birden fazla yöntem kullanılabilir. Bunların başlıcaları; disk difüzyon testi ile MİK ve MBC değerlerinin tespit edilmesidir. Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında sıfır değerlikli demirin Adana ili ilçesindeki topraklardan izole edilmiş HMD10, HMD47, HKN21, HMD03, AK027 ve HMD01 bakterileri üzerine etkileri ilk olarak disk difüzyon testi ile çalışılmıştır. Çalışma neticesinde; sıfır değerlikli demir emdirilen diskler etrafında antibakteriyel etki belirteci olarak herhangi bir şeffaf zon gözlemlenmemiştir. Şeffaf zon gözlemlenmemesinin sebebi diske emdirilen materyalin difüze olamamış olmasıdır. Bundan dolayı, sıfır değerlikli demirin bakteriler üzerine etkisi bakteriler üzerine olan MİK değerlerinin tespiti ile değerlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan materyale benzer şekilde suda çözünürlüğü olmayan ve görece boyutları büyük olan bu gibi birçok metal parçacığın antibakteriyel özelliklerinin disk difüzyon testiyle değerlendirilmesinin oldukça zor olduğu bundan dolayı da bu gibi materyallerin MİK ve MBC testleri ile gerçekleştirilmesi gerektiği birçok çalışmada belirtilmiştir.

Sıfır değerlikli demirin Adanalıoğlu ilçesi topraklarından izole edilen bakteriler için MİK değerleri inkübasyon başlangıcı ve sonundaki bakteriyel üreme kaynaklı absorbans artışına göre tespit edilmiştir. Farklı yoğunluklarda sıfır değerlikli demir bulunduran besiyerlerinde belirli zaman aralıklarında *Stenotrophomonas* sp. HMD10, *Microbacterium* sp. HMD47, *Rhodococcus* sp. HKN21, *Micrococcus* sp. HMD03, *Streptomyces* sp. AK027, *Bacillus* sp. HMD01 izolatlarının üremesinden kaynaklı absorbans artışının gözlenip gözlemlenmediğine ilişkin veriler sırasıyla Tablo 4.1. , Tablo 4.2. , Tablo 4.3. , Tablo 4.4. , Tablo 4.5. , ve Tablo 4.6. da sunulmuştur. Pozitif kontrol olarak izolatların nZVI içermeyen besiyerindeki gelişimleri, negatif kontrol olarak ta farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren bakterisiz besiyerleri kullanılmıştır.

*Stenotrophomonas* sp. HMD10 izolatının test edilen tüm konsantrasyonlarda ve tüm sürelerde üreme gösterdiği tespit edilmiştir. Yalnızca 256 µg/mL konsantrasyonunda nZVI içeren besiyerinde ilk 24 saatte üreme gözlemlenmemiştir. Aynı besiyerlerinde 32., 48. ve 60. saatlerde üremeye bağlı absorbans artışı gözlemlenmiştir. İlk 24 saat sonrasında absorbans artışı gözlemlenememesinin sebebi ise bakterilerin logaritmik fazdan durgun faza geçmiş olması olarak yorumlanmıştır. Bu durum büyük olasılıkla bakterinin nZVI'ye karşı mutasyonal adaptasyonundan kaynaklı olabileceği için nZVI'nin *Stenotrophomonas* sp. HMD10'ye karşı MİK değeri 128 µg/mL olarak değerlendirilmiştir.

**Tablo 4.1.:** *Stenotrophomonas* sp. HMD10 izolatının farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren sıvı besiyerlerinde üremesine bağlı olarak absorbans artışının gözlenip gözlemlenmediğine ilişkin veriler.

Zaman (saat)	nZVI konsantrasyonu (µg/mL)								
	256	128	64	32	16	8	4	2	1
6	-	-	+	+	+	+	+	+	+
12	-	+	+	+	+	+	+	+	+
24	-	+	+	+	+	+	+	+	+
32	+	+	-	-	-	-	-	-	-
48	+	+	-	-	-	-	-	-	-
60	+	-	-	-	-	-	-	-	-

+: absorbans artışı gözlemlendi

-: absorbans artışı gözlemlenemedi

*Microbacterium* sp. HMD47 izolatının farklı konsantrasyonlarda nZVI çeren sıvı besiyerlerinde üremesi incelenmiş ve 0-64 µg/mL nZVI içeren besiyerlerinde 24 saat süresince üreme olduğu gözlemlenmiştir. Fakat, 256 ve 128 µg/mL nZVI içeren besiyerlerinde ilk 24 saat içerisinde üreme gözlemlenmemiştir. Bu zaman süresinden sonra üreme artışının gözlemlenememesi

bakteriyel izolatin logaritmik fazdan durgun faza geçmesinden kaynaklanmaktadır. Bundan dolayı nZVI 'nın *Microbacterium* sp. HMD47'ye karşı MİK değeri 128 µg/mL olarak değerlendirilmiştir.

**Tablo 4.2.:** *Microbacterium* sp. HMD47 izolatinın farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren sıvı besiyerlerinde üremesine bağlı olarak absorbans artışının gözlenip gözlemlenmediğine ilişkin veriler.

Zaman (saat)	nZVI konsantrasyonu (µg/mL)								
	256	128	64	32	16	8	4	2	1
6	-	-	+	+	+	+	+	+	+
12	-	-	+	+	+	+	+	+	+
24	-	-	+	+	+	+	+	+	+
32	-	+	+	+	-	-	-	-	-
48	-	+	-	-	-	-	-	-	-
60	+	+	-	-	-	-	-	-	-

+: absorbans artışı gözlemlendi

-: absorbans artışı gözlemlenemedi

*Rhodococcus* sp. HKN21 izolatinın 0-128 µg/mL lik besiyerlerinde üreme eğrisinin durgun fazına kadar üreme gösterdiği değerlendirilmiştir. Bununla birlikte, 256 µg/mL'lik besiyerlerinde herhangi bir zaman diliminde gelişim göstermediğinden MİK değeri 256 µg/mL olarak tespit edilmiştir.

**Tablo 4.3.:** *Rhodococcus* sp. HKN21 izolatinın farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren sıvı besiyerlerinde üremesine bağlı olarak absorbans artışının gözlenip gözlemlenmediğine ilişkin veriler.

Zaman (saat)	nZVI konsantrasyonu (µg/mL)								
	256	128	64	32	16	8	4	2	1
6	-	+	+	+	+	+	+	+	+
12	-	+	+	+	+	+	+	+	+
24	-	+	+	+	+	+	+	+	+
32	-	+	+	+	+	+	-	-	-
48	-	+	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: absorbans artışı gözlemlendi

-: absorbans artışı gözlemlenemedi

*Micrococcus* sp. HMD03 izolatının 0-128 µg/mL nZVI içeren besiyerlerinde yaklaşık 32. saat olarak tespit edilen üreme eğrisinin durgun fazına kadar üreme gösterdiği gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, 256 µg/mL'lik besiyerlerinde herhangi bir zaman diliminde gelişim göstermediğinden MİK değeri 256 µg/mL olarak tespit edilmiştir.

**Tablo 4.4.:** *Micrococcus* sp. HMD03 izolatının farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren sıvı besiyerlerinde üremesine bağlı olarak absorbans artışının gözlenip gözlemlenmediğine ilişkin veriler.

Zaman (saat)	nZVI konsantrasyonu (µg/mL)								
	256	128	64	32	16	8	4	2	1
6	-	+	+	+	+	+	+	+	+
12	-	+	+	+	+	+	+	+	+
24	-	+	+	+	+	+	+	+	+
32	-	+	+	+	+	+	+	+	+
48	-	+	+	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: absorbans artışı gözlemlendi

-: absorbans artışı gözlemlenemedi

*Streptomyces* sp. AK027 izolatı için ilk 6 saatte farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren sıvı besiyerlerinin tümünde üremenin gerçekleşmediği gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin bakterinin besiyerine adaptasyonunun gerçekleştiği lag fazının uzun sürmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. İzolatın üremesinden kaynaklı olarak 0-64 µg/mL nZVI içeren besiyerlerinde 600 nm dalga boyunda absorbans artışı gözlemlenmiş olmasına rağmen 128 ve 256 µg/mL nZVI içeren besiyerlerinde absorbans artışına rastlanamamıştır. nZVI'nin *Streptomyces* sp. AK027'ye karşı MİK değeri 128 µg/ mL olarak belirlenmiştir.

**Tablo 4.5.:** *Streptomyces* sp. AK027 izolatının farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren sıvı besiyerlerinde üremesine bağlı olarak absorbans artışının gözlenip gözlemlenmediğine ilişkin veriler.

Zaman (saat)	nZVI konsantrasyonu (µg/mL)								
	256	128	64	32	16	8	4	2	1
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	+	+	+	+	+	+	+
24	-	-	+	+	+	+	+	+	+
32	-	-	+	+	+	+	+	+	+

<b>48</b>	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<b>60</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: absorbans artışı gözlemlendi

-: absorbans artışı gözlemlenemedi

*Bacillus* sp. HMD01 izolatu için ilk 24 saatte f-64 µg/mL nZVI içeren besiyerlerinde 600 nm dalga boyunda absorbans artışı gözlemlenmiştir. Bu zaman diliminin ötesinde absorbans artışının gözlemlenmemesi bakterinin üreme döngüsünde durgun faz dönemine geçmesindedir. Aynı zaman dilimi içerisinde 128 ve 256 µg/mL nZVI içeren besiyerlerinde absorbans artışı gözlemlenmemiştir. Benzer konsantrasyonlarda 24 saat ve sonrasında görülen üreme ise büyük olasılıkla mutasyonal adaptasyondan kaynaklanmaktadır. *Bacillus* sp. HMD01'e karşı nZVI'nin MİK değeri 128 µg/ mL olarak belirlenmiştir.

**Tablo 4.6.:** *Bacillus* sp. HMD01 izolatının farklı konsantrasyonlarda nZVI içeren sıvı besiyerlerinde üremesine bağlı olarak absorbans artışının gözlenip gözlemlenmediğine ilişkin veriler.

Zaman (saat)	nZVI konsantrasyonu (µg/mL)								
	256	128	64	32	16	8	4	2	1
<b>6</b>	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<b>12</b>	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<b>24</b>	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>32</b>	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>48</b>	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<b>60</b>	+	+	-	-	-	-	-	-	-

+: absorbans artışı gözlemlendi

-: absorbans artışı gözlemlenemedi



**Şekil 4.7.:** Bakterilerin bulanıklığının alttan görünüşü



**Şekil 4.8.:** Bakteri suşlarına sıfır değerlikli demir eklenmesinden hemen önceki görünüm



**Şekil 4.9.** Bakteri suşlarına sıfır değerlikli demir eklenmesinden hemen sonraki görünüm

## 4.2 TARTIŞMA

Gerçekleştirilen bu çalışma kapsamında; toprağın iyileştirilmesi amacıyla nano-yöntemlerin kimyasal kirliliğin gideriminde kullanılırken oluşturabileceği potansiyel yan etkiler değerlendirilmiştir.

Çalışmada nZVI nanoparçacıklarının etkisinin gözlemleneceği mikroorganizmalar Adanalıoğlu'ndan alınan toprak örneklerinden izole edilmiştir. Toprak örneklerinden çizgi ekim yöntemiyle nutrient agar yüzeyinde koloni şekli ve rengi gibi farklı morfolojik görünüme sahip toplamda 9 bakteri suşu izole edilmiştir. Bunlar arasından altı tanesinin (izolat HMD10, izolat izolat HMD47, izolat HKN21, izolat HMD03, izolat AK027 ve izolat HMD01) genomik DNA'ları izole edilebilmiş ve 16S rRNA gen bölgesi evrensel primerler yardımıyla çoğaltılabilmektedir.

Çoğaltılan 16S rRNA gen bölgelerine ait nükleotid dizileri BLAST ile NCBI veri tabanında depozit edilmiş başka 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırılmıştır. Buna göre; izolat HMD10, izolat izolat HMD47, izolat HKN21, izolat HMD03, izolat AK027 ve izolat HMD01'nin sırasıyla *Stenotrophomonas*, *Microbacterium*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Streptomyces* ve *Bacillus* genusları içerisinde sınıflandırılabilirliği sonucu ortaya çıkarılmıştır.

Bu çalışmada sıfır değerlikli demir için elde edilen MİK değerleri *Stenotrophomonas* sp. HMD10, *Microbacterium* sp. HMD47, *Rhodococcus* sp. HKN21, *Micrococcus* sp. HMD03, *Streptomyces* sp. AK027 ve *Bacillus* sp. HMD01 için sırasıyla 128 mg/mL, 128 mg/mL, 256 mg/mL, 256 mg/mL, 128 mg/mL ve 128 mg/mL olarak tespit edilmiştir.

Alavi ve arkadaşları *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. marcescens*, *P. Aeruginosa* suşları üzerine yaptıkları çalışmada Zn nanopartikülleri için MİK değerlerini 5-15 µg/mL olarak ölçmüşlerdir. Elde edilen bu MİK değerleri bu çalışmada elde edilen MİK değerlerinden daha düşüktür [45].

Duffy ve arkadaşlarının *Salmonella* suşları üzerine yaptıkları çalışmada Ag nanopartikülleri için MİK değerlerini 12,5-25 µg/mL, CuO nanopartikülleri için 100 µg/mL'den büyük, ZnO nanopartikülleri içinse 312,5-625 µg/mL olarak tespit etmişlerdir. *Campylobacter* üzerine yaptıkları çalışmada ise Ag nanopartikülleri için MİK değerlerini 3,125-6,25 µg/mL, CuO nanopartikülleri için 6,25-12,5 µg/mL, ZnO nanopartikülleri içinse 25-50 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Bu MİK değerleri bu çalışmada elde edilen MİK değerlerinden daha düşüktür [46].

Rajivgandhi ve arkadaşlarının *P. Aeruginosa* ve *K. pneumoniae* üzerine yaptıkları çalışmalarda MİK değerlerini 20 nm Au nanopartikülleri için 1009-2015 µg/mL, 50 nm Ag nanopartikülleri için 40 µg/mL, 491 nm ZnO nanopartikülleri için 800 µg/mL, 23 nm CuO için 150-250 µg/mL olarak belirlemişlerdir. Bu MİK değerleri de bu çalışma sonucu elde edilen MİK değerlerinden görece daha düşüktür [47]. Bu sonuçlar da gösteriyor ki; sıfır değerlikli demirin MİK değerleri diğer nanoparçacıklara göre daha düşüktür. Bu nedenle sıfır değerlikli demirin mikroorganizmalar üzerine inhibe edici etkisi diğer nanopartiküllere göre daha az etkide

bulunduğu görülmektedir. Bu da sıfır değerlikli demirin bir çok nanoparçacığa göre mikrobiyal yaşam üzerine olumsuz etkilerinin daha az olduğunu göstermektedir.

Bu çalışma sonucunda sıfır değerlikli demirin toprak mikroorganizmaları üzerinde herhangi bir olumsuz etkide bulunmadığı görülmüştür. Bu da nZVI'nin nanobiyoremediasyon teknolojisi çalışmaları için elverişli bir araç olarak kullanılabilceğini düşündürmektedir.

Demir, nikel, paladyum gibi nano-ölçekli elementler ve sıfır değerlikli metaller krom ve arsenik gibi geçiş metalleri ile etkileşime girebilmektedir. Bu gibi farklı toksik maddelerle kontamine olmuş yerlerde kalıcı organik maddelerin stabilize edilmesi için nano-ölçekli elementler sıklıkla kullanılmaktadır. Küçük boyutlarından (genellikle 100 nm'den az), yüksek yüzey alanından ve benzersiz kimyasal özelliklerinden dolayı, nanopartiküller yoğun şekilde çalışılmış ve artan sıklıkta uygulanmaktadır [48, 49].

1990'larda, nano ölçekteki Fe, başlangıçta indirgeyici olarak borohidrit kullanılarak, 10 ila 100 nm arasında değişen partiküller üretmek için Fe (II) ve Fe (III) 'den sentezlenmiş ve laboratuvar çalışmalarında incelenmiştir. Zhang ve arkadaşlarının çalışmalarında, nano ölçekli Fe parçacıklarının, klorlu organik çözücüler, organoklorin pestisitler ve poliklorlu bifeniller (PCB'ler) de dahil olmak üzere çeşitli ortak çevresel kirleticilerin transformasyonu ve detoksifikasyonunda çok etkili olduğunu göstermiştir. Zhang'a (2003) göre, Fe aracılı reaksiyonlar, hızlı oksijen tüketimi, diğer potansiyel oksidanlar ve hidrojen üretimi tarafından oluşturulan çözelti redoks potansiyelinde bir pH'da bir artış veya bir azalma üretmelidir. Kesikli reaktörler 2-3 pH artışı ve -500 ila -900 mV aralığında bir oksidasyon-azaltma potansiyeli (ORP) üretir. Buna karşın, bazı diğer mekanizmaların kimyasal değişiklikleri azalttığı saha uygulamalarında pH ve ORP'nin daha az etkide bulunması beklenir. pH'ı 1'e kadar bir ORP artışı gösteren ve -300 ila -500 mV aralığında bir ORP gösteren bir başka öncül çalışma da bu değerlendirmeyi desteklemektedir[50,51]. Zhang (2003) ayrıca, Fe nanoparçacıklarının değiştirilmesinin, iyileştirme sürecinin hızını ve verimliliğini artırabileceğini göstermiştir.

## 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada tarımın yoğun olarak yapıldığı ve tarım ilaçlarının yoğun olarak kullanıldığı Adanalıoğlu bölgesinden 6 bakteri suşu tanımlanmıştır.

Sentezlenen nZVI in bakteriler üzerine etkisi kapsamında belirlenen MİK değeri oldukça yüksek bulunmuştur. Bu sonuç izole edilen türlerin nanopartikül toksisitesine dirençli olduğunu göstermektedir. nZVI ve biyoremediasyonun birlikte kullanımı, kirlenmiş sahaların eski haline getirilmesi için yeni bir stratejidir. Dekontaminasyon işlemlerinde üretilen atıkların hacmini azaltan ve dolayısıyla sanayi üzerindeki etkilerini minimum düzeye indiren geri dönüşüm alternatiflerinin uygulanmasına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle teknolojik ve tarımsal faaliyetler nedeniyle kirleticilerin artan olumsuz ekolojik etkileri söz konusudur. Bu olumsuz etkilerin giderilmesi amacıyla araştırmalar yapılmaktadır. nZVI, toksik olmaması, ucuz, bol ve üretilmesi nedeniyle yoğun ilgi görmektedir. Dolayısıyla, nanoteknolojik yaklaşım çevresel kireticilerin etkilerini azaltma konusunda pratik bir alternatif çözüm yolu sunmaktadır. Adanalıoğlu tarım topraklarından izole edilen türler nZVI ile yapılacak remediyaşyon için dirençli sayılabilir. Bakteriler için ekolojik bir risk oluşturmamaktadır. Besin zincirine nüfuz etme kabiliyetlerinden (biyobirikim) ve ayrıca toprakta bulunan diğer hedef olmayan kirleticilerin yayılmasını kolaylaştırma ihtimalinden dolayı nanopartiküllerin ekosistem üzerine etkilerinin kapsamlı şekilde değerlendirilmesi önemlidir. Bu nedenle, nanomalzemelerin sediment ve topraklardaki davranışının ve toksisite derecesinin çok iyi anlaşılması gerekir.

Aynı alanda mevcut kimyasal kirlilik tespit edilerek, nZVI in kimyasalları temizleme potansiyeli ile birlikte ekotoksik risklerin belirlenmesi bu alanda yapılacak çalışmalar için mevcut eksikliklerin çoğunu giderecektir.

## KAYNAKLAR

- [1] Riah, Wassila, et al. 2014. "Effects of pesticides on soil enzymes: a review". *Environmental Chemistry Letters* 12.2 257-273.
- [2] Durmuşoğlu, E., Tiryaki, O., Canhilal, R., 2010. "Türkiye'de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Dayanıklılık Sorunları", VII. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ankara, Bildiriler Kitabı 2: 589-607.
- [3] Delen, N., N. Tosun, S. Toros, S. Öztürk, A. Yücel, S. Çalı, 1995. "Tarım ilaçları kullanımı ve üretimi". Türkiye Ziraat Mühendisliği IV. Teknik Kongresi. T.C. Ziraat Bankası Kültür Yayınları No: 26, 1015-1028.
- [4] Delen, N., Durmusoglu, E., Günçan, A., Güngör, N., Turgut, C., Burçak, A. 2005. "Türkiye'de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Duyarlılık Azalışı Sorunları", Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi, 629-648.
- [5] (<http://www.tarim.gov.tr/Konular/Tarim-Arazileri-Degerlendirme/Projeler>);
- [6] US Environmental Protection Agency (USEPA), 2009. National priorities list (NPL). Available: (<http://www.epa.gov/superfund/sites/npl/>).
- [7] Wu, Y., et al., 2014. Removal of para-nitrochloro benzene from aqueous solution on surfactant-modified nanoscale zero-valent iron/grapheme nano composites. *Environ. Technol.* 35, 2698-2707.
- [8] Pahlsson, A.B., 1989. Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants. *Water Air Soil Pollut.* 47, 287e319.
- [9] Vamerali, T., Bandiera, M., Mosca, G., 2010. Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review. *Environ. Chem. Lett.* 8, 1e17.
- [10] Nagajyoti, P.C., Lee, K.D., Sreekanth, T.V.M., 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ. Chem. Lett.* 8, 199e216.
- [11] Jadhav, S.D., Jadhav, M.S., Jawale, R.W., 2013. Study of chloride and nitrate concentration of Mula Mutha River in Pune city (Maharashtra). *Int J Chem Life Sci* 2, 1140-1142.
- [12] Rajan, S. Nanotechnology in ground water remediation. *Int J Environ Sci Dev* 2, (2011), 182-187.
- [13] Ball, A.S. The use of microorganisms for bioremediation: Proceedings of Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) on environmental use of microorganisms (2012).
- [14] Löffler, F.E., Edwards E.A. Harnessing microbial activities for environmental cleanup. *Curr Opin Biotechnol* 17, (2006), 274-284.
- [15] Karn, B., Kuiken, T., Otto, M. (2009). Nanotechnology and in situ remediation: A review of the benefits and potential risks. *Environ Health Perspect* 117, 1823-1831
- [16] Pawlett M., Ritz K., Dorey R. A., Rocks S., Ramsden J., Harris J. A. Title: The impact of Zero-valent Iron Nanoparticles upon Soil Microbial Communities is Context Dependent (2013).
- [17] Ghasemzadeh, G., Momenpour, M., et al. Applications of nanomaterials in water treatment and environmental remediation. *Front Environ Sci Eng* 8, (2014), 471-482.
- [18] Aminiyan, M.M., et al., 2016. Heavy metal pollution affected by human activities and different land-use in urban topsoil: a case study in Rafsanjan city, Kerman province, Iran. *Eurasian J. Soil Sci. (Ejss)* 5, 97.
- [19] Fan, T., et al., 2008. Biosorption of cadmium(II), zinc(II) and lead(II) by *Penicillium simplicissimum*: isotherms, kinetics and thermodynamics. *J. Hazard. Mater.* 160, 655-661.
- [20] Hu, X.J., et al., 2011. Adsorption of chromium (VI) ethylenediamine-modified cross linked magnetic chitosan resin: isotherms, kinetics and thermodynamics. *J. Hazard. Mater.* 185, 306-314.
- [21] Feng, Y., et al., 2010. Adsorption of Cd (II) and Zn (II) from aqueous solutions using magnetic hydroxyapatite nanoparticles as adsorbents. *Chem. Eng. J.* 162, 487-494.
- [22] Koutsospyros, A., Pavlov, J., Fawcett, J., Strickland, D., Smolinski, B., Braida, W. Degradation of high energetic and insensitive munitions compounds by Fe/Cu bimetal reduction. *J Hazard Mater* (2012). 219-220, 75-81.

- [23]. Yan, W., Herzing, A.A., Li, X.Q., Kiely, C.J., Zhang, W.X., Structural evolution of Pd-Doped nanoscale zero-valent iron (nZVI) in aqueous media implications for particle gain and reactivity. *Environ Sci Technol* (2010) 44, 4288–4294.
- [24] Saleh N, Sirk K, Liu YQ, Phenrat T, Dufour B, Matyjaszewski K, et al. 2007. Surface Modifications enhance nano iron transport and NAPL targeting in saturated porous media. *Environ Eng Sci* 24(1):45–57.
- [25] U.S. EPA. 2008b. Nanotechnology for Site Remediation: Fact Sheet. EPA 542-F-08-009. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency. [accessed 20 October 2009].
- [26] Zhang W-X, Elliott DW. 2006. Applications of iron nanoparticles for ground water remediation. *Remediation* 16(2):7–21.
- [27] El-Temsah, Y.S., Oughton, D.H., Joner, E.J., 2012. Effects of nano-sized zero-valent iron on DDT degradation and residual toxicity in soil: a column experiment. *Plant Soil* 368 (1e2), 189e200.
- [28] Gil-Díaz, M., Alonso, J., Rodríguez-Valdes, E., Pinilla, P., Lobo, M.C., 2014b. Reducing the mobility of arsenic in brownfield soil using stabilised zero-valent iron nanoparticles. *J. Environ. Sci. Health A* 49 (12), 1361e1369.
- [29] Matheson LJ, Tratnyek PG. 1994. Reductive dehalogenation of chlorinated methanes by iron metal. *Environ Sci Technol* 28(12):2045–2053.
- [30] Turabik, M.; Simsek, U. Sıfır Değerlikli Demir Nanopartikül Sentezi ve Çeşitli Sentez Parametrelerinin Parçacık Boyutu ve Yapısı Üzerine etkisi (2016).
- [31] Nortcliff S., Bannick Claus G., Schulte-Bisping H., Litz N., Soil, 1. Definition, Function, and Utilization of Soil Chapter · December 2006
- [32] Haktanır K., Arcaç S. (1997). Toprak Biyolojisi.
- [33]. Lyon D. Y., Thill A., Rose J., and Alvarez P. J. J. “Alvarez, ecotoxicology and impact of nanomaterials,” in *Environmental Nanotechnology: Application and Impacts of Nanomaterials* (2007), M. R. Wiesner and J. Y. Bottero, Eds., McGraw-Hill, New York, NY, USA.
- [34] Fukuda K\*, Ogawa M., Taniguchi H. and Saito H., 2016. Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene review.
- [35] Woese CR, Kandler O & Wheelis ML (1990): Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4576-4579
- [36] Lane DJ (1991): 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. (Stackebrandt E & Goodfellow M, ed). John Wiley & Sons Ltd, New York pp 115-175
- [37] McFaland Standard – For in vitro use only- . Dalynn Biologicals, 2002. Catalogue No. TM50-TM60.
- [38] GÜRGÜN V., HALKMAN A. Kadir Standarda Dayalı Sayım Yöntemleri<sup>1</sup>
- [39] ATAMAN M. Antimikrobiyal Peptidlerin Çeşitli Enfeksiyon Etkilerine Karşı İn Vitro Antibakteriyel Etkilerinin Araştırılması
- [40] Dask, K., Tiwari, R.K.S., Shrivastava, D.K.. (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *J Med Plants Res*, 4 (2), 104-111.
- [41] Tortella tortulosa (Hedw.) Limpr. Özülerinin Antimikrobiyal Aktivitesi \*Ergin Murat ALTUNER<sup>1</sup>, Barbaros ÇETİN<sup>2</sup>, Cumhur ÇÖKMÜŞ<sup>2</sup>
- [42] Basile A., Vuotto ML., Ielpo TL., Moscattello V., Ricciardi L., Giordano S., Cobianchi RC. 1998. Antibacterial activity in *Rhynchostegium riparoides* (Hedw.) Card. Extract (Bryophyta). *Phytotherapy Research*, 12: 146 - 148.
- [43] Baris, O., Gulluce, M., Sahin, F., Ozer, H., Kilic, H., Ozkan, H., Sokmen, M., Ozbek, T. (2006). Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae). *Turkish J Biol*, 30, 65-73.
- [44] Lourens, A.C.U., Reddy, D., Baser, K.H.C., Viljoen, A.M., Van Vuuren, S.F. (2004). In vitro biological activity and essential oil composition of four indigenous South African *Helichrysum* species, *J Ethnopharmacol*, 9, 253-258.

- [45] Alavia M., Karimia N. and Salimikiab I. phytosynthesis of zinc oxide nanoparticles and its antibacterial, anti-quorum sensing, antimotility, and antioxidant capacities against multidrug resistant bacteria.
- [46] Lesley L. Duffy, Megan J. Osmond-McLeod, Jonathan Judy, Thea King, Investigation into the antibacterial activity of silver, zinc oxide and copper oxide nanoparticles against poultry-relevant isolates of Salmonella and Campylobacter, Food Control (2018), doi: 10.1016/j.foodcont.2018.05.008
- [47] Rajivgandhia G., Maruthupandyb M., Muneeswarand T., Ramachandran G., Manoharana N., Queroc F. , Anandd M. , Songb J.-M. , Biologically synthesized copper oxide nanoparticles enhanced intracellular damage in ciprofloxacin resistant ESBL producing bacteria
- [48] Nanobioremediation: Integration of nanoparticles and bioremediation for sustainable remediation of chlorinated organic contaminants in soils
- [49] Thome, A., Reddy, K.R., Reginatto, C., Cecchin, I., 2015. Review of nanotechnology for soil and groundwater remediation: Brazilian perspectives. Water, Air Soil Pollut. 226, 1e20.
- [50] Elliott DW, Zhang WX. 2001. Field assessment of nanoscale bimetallic particles for ground water treatment. Environ Sci Technol 35:4922-4926.
- [51] Glazier R, Venkatakrisnan R, Gheorghiu F, Walata L, Nash R, Zhang W. 2003. Nanotechnology Takes Root. Civil Eng 73(5):64-69.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı ve Soyadı** :Hamdullah ÇİÇEK  
**Doğum Tarihi** :06/10/1989  
**E-mail** :cicekhamdullah@gmail.com  
**Öğrenim Durumu** :Yüksek Lisans

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Mersin	2009-2014
Yüksek Lisans	Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler	Mersin	2016-2019

## ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

- 1.
- 2.
- 3.