

**KALSİYUM TABANLI NANOPARTİKÜLLERİN
BAKTERİ KULLANILARAK BİYOSENTEZİ
VE UYGULAMA ALANLARININ ARAŞTIRILMASI**

İlkgül AKMAYAN

Yüksek Lisans Tezi

Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı

Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı

Doç. Dr. Özlem BARIŞ

2015

Her hakkı saklıdır

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KALSİYUM TABANLI NANOPARTİKÜLLERİN BAKTERİ
KULLANILARAK BİYOSENTEZİ VE UYGULAMA
ALANLARININ ARAŞTIRILMASI**

İlkgül AKMAYAN

**NANOBİLİM VE NANOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı**

**ERZURUM
2015**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

Kalsiyum Tabanlı Nanopartiküllerin Bakteri Kullanılarak Biyosentezi ve Uygulama Alanlarının
Araştırılması

Doç. Dr. Özlem BARIŞ danışmanlığında, İlkül AKMAYAN tarafından hazırlanan bu çalışma, 13/07/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

Üye : Doç. Dr. Hatice ÖĞÜTÇÜ

Üye : Doç. Dr. Özlem BARIŞ

İmza :

İmza :

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 15.07/2015 tarih ve 28. / . 966 nolu kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KALSİYUM TABANLI NANOPARTİKÜLLERİN BAKTERİ KULLANILARAK BİYOSENTEZİ VE UYGULAMA ALANLARININ ARAŞTIRILMASI

İlkgül AKMAYAN

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı
Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özlem BARIŞ

Bu çalışmada, biyoyumlu materyal sentezi için özellikle tercih edilen biyosentez yoluyla kalsiyum tabanlı nanopartiküllerden en yaygın olan kalsiyum karbonatın oluşturulması amacıyla dört bakteri (*Bacillus arenosi* K64, *Peanibacillus polymyxa* K2, *Rhodococcus erythropolis* K85, *Bacillus atrophaeus* K101) ve beş farklı ortam (katı B-2, katı B-4, sıvı B-2, sıvı B-4 ve Ürel) ile yapılan denemeler sonucunda en uygun izolat (*Bacillus arenosi* K64) ve ortam (Ürel besiyeri) seçilerek partiküller elde edilmiştir. Doğru bakteri ve ortamın belirlenmesi için çeşitli ön denemeler yapılmış ve kısmi optimizasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Elde edilen partiküller SEM, EDAX ve XRD analiz yöntemleri kullanılarak karakterize edilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde partikül boyutunun iyileştirilmesi ile ilgili çalışmalara devam edilmesine karar verilmiştir. Elde edilen partiküllere uygun kullanım alanları belirlenmiştir.

2015, 74 sayfa

Anahtar Kelimeler: Nanopartikül, Kalsiyum Karbonat, Biyosentez, Bakteri

ABSTRACT

Master Thesis

BIOSYNTHESIS OF CALCIUM-BASED NANOPARTICLES BY USING BACTERIA AND DETERMINATION OF THEIR USE AREAS

İlkgül AKMAYAN

Atatürk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Nanoscience and Nanoengineering
Science of Nanobiotechnology

Supervisor: Assoc. Dr. Özlem BARIŞ

In the present study, four bacterial strain (*Bacillus arenosi* K64, *Peanibacillus polymyxa* K2, *Rhodococcus erythropolis* K85, *Bacillus atrophaeus* K101) and five different media (solid B-2, solid B-4, liquid B-2, liquid B-4 with Urea) were used to biosynthesis of calcium carbonate, described as important biosynthetic calcium based nanoparticles especially preferred for production of biocompatible materials. The most suitable isolate and medium were *Bacillus arenosi* K64 and the medium with Urea. Besides preliminary tests were done for determination of suitable isolates and media. Preliminary tests were also done for optimization of several conditions. The nanoparticles were characterized by using SEM, EDAX and XRD techniques. According to the results, it was concluded that further studies on the particule size should be done. Besides, use areas for the synthesized nanoparticles were described in the present study.

2015, 74 pages

Keywords: Nanoparticles, Calcium Carbonate, Biosynthesis, Bacteria

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji laboratuvarında yürütülmüştür.

Araştırmanın planlanmasından yürütülmesine ve sonuçlarının değerlendirilmesine kadar hiçbir destekten kaçınmayan ve üstün bilgilerini her an yanımda hissettiğim, tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Özlem BARIŞ'a ve Nanobiyoteknoloji Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmaların yürütülmesinde katkı sağlayan Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Analitik Kimya Laboratuvar çalışanları ve özellikle Doç. Dr. Tuba ÖZNÜLÜER ile Prof. Dr. Ümit DEMİR'e ve Sayın Jüri Üyesi Doç. Dr. Hatice ÖĞÜTÇÜ'ye teşekkür ederim. Ayrıca çalışmalarında destek olan Sayın Uzman Biyolog Halime GENÇ'e, Sayın YLÖ Abdussamed Yasin DEMİR'e, Sayın Araştırma Görevlisi Esra ARSLAN'a, Sayın YLÖ Selma SEZEN'e ve Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Laboratuvarı ekibine teşekkür ederim.

Ayrıca bu günlere gelmem için emek sarf eden babaannem Havva AKMAYAN'a ve değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

İlkgül Akmayan

Temmuz, 2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	11
2.1. Nanobilim, Nanoteknoloji ve Nanobiyoteknoloji.....	11
2.2 Nanoteknolojinin Tarihçesi.....	16
2.3. Nanoteknolojinin Görüntülenmesinde Kullanılan Bazı Cihazlar.....	17
2.3.1. Elektron mikroskopları.....	18
2.3.1.a. Taramalı elektron mikroskobu (SEM).....	18
2.3.1.b. İletim elektron mikroskobu (İEM).....	18
2.3.1.c. Analitik elektron mikroskobu (AEM).....	19
2.3.2. Tarama uçlu mikroskoplar (STM).....	19
2.3.2.a. Taramalı tünel mikroskobu (TTM).....	19
2.3.2.b. Atomik kuvvet mikroskobu (AKM).....	19
2.4. Biyomimetik ve Canlılardaki Nanoyapılar.....	20
2.5. Nanomalzemeler.....	21
2.6. Nanopartiküller.....	21
2.6.1. Nanopartiküllerin sınıflandırılması.....	22
2.6.2. Nanopartiküllerde boyutluluk.....	23
2.6.2.a. Bir boyutlu (1D) nanomateryaller.....	23
2.6.2.b. İki boyutlu (2D) nanomateryaller.....	23
2.6.2.c. Üç boyutlu (3D) nanomateryaller.....	24
2.6.3. Nanopartikül morfolojisi.....	24
2.6.4. Nanopartikül kompozisyonu.....	24
2.6.5. Nanopartiküllerin homojenliği ve topaklanması.....	24

2.7. Nanopartiküllerin Sentez Mekanizması	25
2.7.1. Nanopartiküllerin üretim metotları.....	26
2.7.1.a. Elektrokimyasal sentez	26
2.7.1.b. Ters misel/mikroemülsiyon metodu.....	26
2.7.1.c. Hidrotermal sentez.....	27
2.7.1.d. Sonokimyasal çöktürme (Depozisyon).....	27
2.7.1.e. Kimyasal indirgenme	27
2.8. Biyosentez	28
2.9. Nanopartiküllerin Biyosentezinde Kullanılan Mikroorganizmalar	29
2.10. Nanopartikül Çeşitleri	30
2.11. Kalsiyum Tabanlı Nanopartiküller ve Uygulama Alanları	30
2.12. Kalsiyum Karbonat Nanopartikülleri	31
2.12.1. Kalsiyum karbonat nanopartiküllerinin karakterizasyonu.....	32
3. MATERYAL ve YÖNTEM	33
3.1. Materyal.....	33
3.1.1. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar	33
3.1.2. Çalışmada kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı.....	33
3.1.3. Çalışmada kullanılan bakteriler	35
3.2. Yöntem	35
3.2.1. Bakterilerin canlandırılması	35
3.2.2. Bakterilerin B-4 katı besiyerinde geliştirilmesi.....	36
3.2.3. Bakterilerin B-2 katı besiyerinde geliştirilmesi.....	36
3.2.4. Bakterilerin B-4 sıvı besiyerinde geliştirilmesi.....	37
3.2.5. Bakterilerin B-2 sıvı besiyerinde geliştirilmesi.....	37
3.2.6. Bakterilerin üreli sıvı besiyerinde geliştirilmesi.....	37
3.2.7. Üreli besiyerinde pH optimizasyonu.....	38
3.2.8. Katı kültürlerde kristal oluşumunun gözlemlenmesi.....	39
3.2.9. B-4 ve B-2 sıvı kültürlerde partikül oluşumunun gözlemlenmesi.....	39
3.2.10. Üreli ortamda geliştirilen kültürlerde partikül oluşumunun gözlemlenmesi..	40
3.2.11. Sıvı kültürlerin çöktürülmesi ve yıkama işlemleri	40
3.2.12. Elde edilen Partiküllerinin Karakterizasyonu.....	41
3.2.12.a. SEM analizi	42

3.2.12.b. EDAX analizi	42
3.2.12.c. XRD Analizi	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	44
4.1. Kullanılan Bakterilerin Morfolojik ve Kültür Özellikleri	44
4.2. Bakterilerin Canlandırılması ve İnokulasyon İçin Saf Kültürlerin Eldesi.....	45
4.3. Bakterilerin B-4 Katı Besiyerinde Geliştirilmesi	45
4.4. Bakterisinin B-2 Katı Besiyerinde Geliştirilmesi.....	46
4.5. Bakterisinin B-4 Sıvı Besiyerinde Geliştirilmesi	47
4.6. Bakterilerin B-2 Sıvı Besiyerinde Geliştirilmesi.....	47
4.7. Bakterilerin Üreli Besiyerinde Geliştirilmesi.....	48
4.8. Üreli Besiyerinde pH Optimizasyonu	49
4.9. Katı Kültürlerde Kristal Oluşumunun Gözlemlenmesi	50
4.10. Sıvı Kültürlerde Partikül Oluşumunun Gözlemlenmesi.....	52
4.11. Sıvı Kültürlerden Elde Edilen Partiküllerin Hazırlanması.....	55
4.11.1. SEM görüntüleri	56
4.11.2. EDAX analizi	59
4.11.3. XRD analizi	61
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	62
KAYNAKLAR.....	70
ÖZGEÇMİŞ	75

SİMGELELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

g	Gram
L	Litre
M	Molar
ml	Mililitre (10^{-3})
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre (10^{-6})
μ M	Mikromolar
N	Normal
μ	Mikron
nm	Nanometre (10^{-9})
rpm	Dakikadaki devir sayısı
STM	Tarama Uçlu Mikroskopi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
AKM	Atomik Kuvvet Mikroskopi
EDAX	Enerji dağılımlı X-Ray Spektroskobu
İEM	İletim Elektron Mikroskobu
AEM	Analitik Elektron Mikroskobu
TTM	Taramalı Tünel Mikroskobu
XRD	X-Işınları Difraktometresi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Teknoloji kavramının temel bileşenleri.....	12
Şekil 2.2. Biyolojik bileşenlere kıyasla nano materyallerin boyutunu gösteren logaritmik uzunluk ölçeği ve nano ve mikro boyutunun tanımlanması.....	15
Şekil 2.3. Bilim ve teknolojideki temel gelişmeler.....	17
Şekil 2.4. Boyut, morfoloji, kompozisyon, homojenliği ve kümeleşme durumu açısından nanoyapıdaki materyallerin sınıflandırılması.....	25
Şekil 3.1. Etüv.....	36
Şekil 3.2. Çalkalayıcı.....	37
Şekil 3.3. Çalkalayıcı.....	38
Şekil 3.4. Işık mikroskobu.....	39
Şekil 3.5. Kamera entegre ışık mikroskobu.....	40
Şekil 3.6. Santrifüj.....	41
Şekil 3.8. XRD.....	43
Şekil 4.1. a. TSA besiyeri b. TSA'da gelişen kültür.....	45
Şekil 4.2. a. Katı B-4 besiyeri, b. Katı B-4'de gelişen kültür.....	46
Şekil 4.3. a. Katı B-2 besiyeri, b. Katı B-2'de gelişen kültür.....	46
Şekil 4.4. a. Sıvı B-4 besiyeri, b. Sıvı B-4 besiyerinde 3 günlük kültür, c. Sıvı B-4 besiyerinde 5 günlük kültür.....	47
Şekil 4.5. a. Sıvı B-2 besiyeri, b. Sıvı B-2 besiyerinde 3 günlük kültür, c. Sıvı B-2 besiyerinde 5 günlük kültür.....	48
Şekil 4.6. a. Üreli besiyeri, b. Üreli besiyerinde 3 günlük kültür, c. Üreli besiyerinde 5 günlük kültür.....	49
Şekil 4.7. K2, K85 ve K101 bakterilerinin Üreli besiyerinde gelişmesi.....	49
Şekil 4.8. Katı B-4'te 3 gün sonrasında oluşan kristal.....	50
Şekil 4.9. Katı B-4'te 5 gün sonrasında hızlı bir şekilde büyüyen kristaller.....	51
Şekil 4.10. Katı B-2 besiyerinde 5 günden sonra oluşan kristal.....	52
Şekil 4.11. Sıvı B-4 kültüründen hazırlanan yayma preparatın ışık mikroskobunda 10X4 büyütmedeki görünümü.....	53

Şekil 4.12. Sıvı B-2 kültüründen hazırlanan yayma preparatın ışık mikroskopunda 10X40 büyütmedeki görünümü.....	54
Şekil 4.13. <i>B. arenosi</i> K64 bakterisinin bulunduğu üreli besiyerine 140gram/Litre CaCl ₂ çözeltisinin ilavesi ile oluşan kalsiyum karbonat partikülleri.....	55
Şekil 4.14. SEM görüntüsü	59
Şekil 4.15. EDAX Analiz Sonucu.....	60
Şekil 4.16. XRD sonucu.....	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Mikroorganizmalar tarafından nanopartiküllerin sentezi	29
Çizelge 4.1. Bakterilerin katı ve sıvı kültürdeki özellikleri	44

1. GİRİŞ

Kalsiyum dünyada en bol bulunan elementlerden biri olup oksijen, silisyum, alüminyum ve demirden sonra en çok karşılaşılan beşinci elementtir. Kalsiyum adını Latince kireçtaşı anlamına gelen “*calx*” (kalsiyum oksit) tan türetilmiştir. Birçok doğal biyomineral, kalsiyum içermektedir. Gerek doğada gerekse canlıda, diş ve kemiklerde bolca bulunması ile birlikte bu elementin birçok önemli işlevi bulunmaktadır. Örneğin canlı için; kalsiyum bileşikleri kas kasılması ve sinir hücrelerinde sinyal iletimi gibi hücresel süreçlerde önemli rol oynamaktadır. Bitkilerde ise büyüme faktörü olarak önemli bir işlevselliğe hizmet eder (Becker 2005).

Kalsiyum iyonları neredeyse tüm hücre sistemlerinin fizyolojik süreçlerinde yer alır. İkinci mesaj sinyallerini kalsiyuma bağlı fosfat ve kinesisler ile iletim yoluna iletirler ve hücre iskeleti proteinlerini düzenlerler (Çavuş 2007).

Kalsiyum ve kalsiyum içeren yapılar ve/veya oluşumlar diğer tüm mevcut yapılar yahut oluşumlar gibi güneş sistemimizin büyük ve çok sıcak bir yıldızın patlamasıyla oluşmasından sonra ortaya çıkmıştır. Bu patlama yeni bir yıldız (güneş) ve güneş sistemimizin diğer bileşenlerini meydana getirdi. Gezegenimizin kökenine dayanan kayaçlar aşınmış olabileceklerinden şu ana kadar henüz keşfedilememiştir yalnız yeryüzünün değişik bölgelerinde 4 milyar yıllık kayaçlar bulunmuştur. Günümüze kadar bulunmuş durumda olan en eski kayaç tahminen 3,86 milyar yaşında olup Greenland’ın güney batısındaki Itsaq bölgesinde keşfedilmiştir. Eski zamanlara ait diğer kayaçlar Avustralya’nın batısındaki Warrawoona, Kule oluşumları ve Pilbara bölgesi ile Afrika’nın güneyindeki Swaziland ve Barberton bölgelerinde bulunmuştur. Bu kayaç oluşumlarının tümü yaklaşık 3,5 milyar yaşındadır. Eski kayaçlar sedimenter, volkanik ve karbonlu olmak üzere üç çeşittir. Oluşumları için suya ihtiyacı olan en eski sedimenter kayaçlar evrimsel olarak önemlidir ve canlılığın ilk oluşumuna dair kanıtlar sunmaktadır. Tüm bunlara ilaveten sedimenter kayaçların ana bileşeni kalsiyum karbonatlı (kalsit) yapılarıdır (Çökmüş 2009). Dolayısıyla canlılığa ait ilk bulgularda kalsiyum karbonatlı yapılara rastlanmaktadır. Yeryüzünde belki de ilk kez kayaçların

varlığıyla gün ışığına çıkan kalsiyum karbonat, yerkabuğunun ağırlıkça %4'ünü oluşturmaktadır (Al-Marzouqi *et al.* 2010). Doğadaki tebeşir, alçı, mermer, travertenler, kayaçlar ve mağaradaki sarkıtlar da kalsiyum bileşenlidir (Fang *et al.* 2014).

Kalsiyum içerikli karbonatlardan en yaygın olanı kalsit (CaCO_3) ve dolomit ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$) gibi kalsiyum karbonatlardır (Becker 2005). Doğada sık karşılaşılan kalsiyum karbonatlar genelde mikroorganizmaların gelişmesiyle oluşur. Genel olarak kalsiyum karbonat olarak bilinen yapılar farklı isimler alırlar. Bunun nedeni kristal yapılarının farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Kalsit (CaCO_3) trigonal kristalleşme, aragonit (CaCO_3) ortorombik (baklava biçiminde) kristalleşme, vaterit (CaCO_3) hegzagonal kristalleşme, monohidroksit ($\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) hegzagonal kristalleşme ve son olarak ikaite ($\text{CaCO}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) monoklinik kristalleşme göstermektedir. Bunlardan en bol bulunanı kalsittir. Aragonitin de bulunma miktarı fazladır fakat diğerleriyle çok az karşılaşmaktadır (Becker 2005). Bilinen kalsiyumun karbonat formları karbonik asit tuzlarından ve esterlerinden oluşmaktadır (Skinner and Jahren 2003). Ayrıca kalsiyumun karbonatlı formları gözenekli yapıya sahiptir ve bu sayede kalsit geçirgenliği gözenekleri aracılığıyla kontrol edilebilir (Al-Marzouqi *et al.* 2010). Bu özelliklere sahip karbonatlı yapıların oluşumu biyomineralizasyon ile ilişkilidir (Skinner and Jahren 2003).

Mikroorganizmaların buldukları çevredeki metallere ve minerallerle girdikleri fiziksel ve kimyasal etkileşimler sonucu biyomineralizasyon adı verilen olay meydana gelir. Bu etkileşimler; mikroorganizmaların canlılıklarını sürdürerek büyümelerini, metabolik aktivitelerini devam ettirebilmelerini ve nihayetinde hayatta kalmalarını sağlar. Bunun yanı sıra birçok mineral türü mikroorganizmalarla etkileşime girme yeteneklerinden dolayı biyojenik olarak adlandırılmaktadır. Diyatomlar ve foraminiferlere hücresel yapı sağlayan biyominerallerin meydana gelmesi jeolojik ve endüstriyel yönden önemli olduğu vurgulanmaktadır (Gadd and Raven 2010).

Biyomineralizasyon, jeomikrobiyolojik bir oluşum olup; fosfatlar, silikatlar, oksitler ve karbonatlar gibi mineraller ve bu minerallerin buldukları ortamlarda açığa çıkmaktadır (Gadd and Raven 2010).

Jeolojik ve kimyasal kristalizasyon mekanizmalara ilave olarak canlı organizmalar altmıştan fazla farklı mineral üretimine katılırlar. Biyolojik olarak üretilen mineraller, şaşırtıcı mekanik özelliklere sahiptir. Diş ve kemiklerde istikrarı sağlamada, vücudun korunmasında (salyangoz kabuklarının salyangozu koruduğu gibi) pek çok amaç için kullanılmış durumdadır. Biyolojik olarak öktürölmüş minerallerin yaklaşık yarısı suda çözünen kalsiyum bileşiklerini içerir. En önemlileri oktakalsiyum fosfat ya da farklı apatit türevlerinden oluşan birkaç kalsiyum fosfatın yanı sıra monohidroksit, aragonit, vaterit ve kalsiyum karbonat fazı olan kalsittir (Becker 2005).

Mineraller ekolojik çevrede ve özellikle de denizlerde önemli rol oynarlar. Denizlerdeki protozoalar aracılığıyla kalsiyum karbonatların mineralizasyonu ile atmosferdeki karbondioksit salınımı azalır. Atmosferdeki karbondioksit salınımını dengede tutmaya yardımcı olur (Becker 2005).

Mikrobiyal kaynaklı karbon döngüsü özellikle karbonatlı minerallerin çözünmesi ve öknelmesiyle ilişkilidir. Mikrobiyal topluluklar organik maddeye karşı karbon formlarının daha fazla oksitlenmesi ve azalması arasındaki dengeyi benzersiz bir şekilde değiştirme yeteneğine sahiptir. Alkalın karbonata ve pH'ya bağlı olarak karbondioksit, karbonat minerallerini oluşturmak için kalsiyum, magnezyum gibi katyonları bağlayabilen karbonat iyonları olarak suda mevcuttur. evre ve biyolojik aktivite arasındaki etkileşimin bir sonucu olarak mineral ökeme süreci biyolojik olarak mineralizasyona neden olur. Mikrobiyal mineralizasyon kayaçların oluşumunda ve ekolojide önemli rol oynar (Dupraz *et al.* 2009).

Siyanobakteriler, mercanlar, kokolitler, foraminifera, yumuşakçalar, ekinoid, eklembacaklılar kalsiyum karbonatlı yapılar barındırırlar (Skinner and Jahren 2003).

Omurgalılarda kemik ve dişlerin yapısı kalsiyum tabanlıdır. Kemik ve dişlerin yapısında bulunan kalsiyum fosfatlı bir yapı olan hidroksiapatit, eğik eksenli çoğunlukla hegzagonal yapıdadır (Becker 2005).

Bundan dolayı da kalsiyumun doğada ve canlılarda mevcut bulunma miktarı dikkat çekmektedir. Geleneksel fizik kanunlarının geçerli olduğu dünyadan kuantum fizik kanunlarının geçerli olduğu dünyaya yani nano boyuta indiğimizde ele almamız gereken bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır. Nano boyutun incelendiği bilim dalı olan nanobilim ve nanoteknoloji kapsamında partikül üretimi son yılların araştırma konularından bir tanesidir.

Nanopartiküller; en azından üç boyuttan birinde 1-100 nm aralığında olan partiküller olarak tanımlanır. Çok küçük boyutlarda olduklarından dolayı, birim hacim başına düşen büyük yüzey alanına, yüzey ve yüzey yakınındaki tabakalarda yüksek bir atom etkileşim oranına ve kuantum fizik kanunlarını ortaya çıkarma yeteneğine sahiptirler. Nanopartiküller; metal, metal oksitler, yarıiletkenler, polimerler, karbonlu malzemeler, organik veya biyolojik formlarda büyük kimyasal çeşitliliğe sahiptir. Bunlar ayrıca küre, silindir, disk, içi boş küre ve tüp gibi çeşitli şekillerde olup büyük morfolojik özellikler gösterirler. Nanopartiküller katı, sıvı ve gaz fazı yaklaşımlarına dayalı bir dizi sentetik yollarla üretilebilirler. Sentezlenen nanopartiküller nano ölçekte kimyasal olarak çok reaktif ve fiziksel olarak kümeleştikleri için onları stabilize etmek ve pasifleştirmek için çoğu durumda yüzey modifiyeleri yapılmalıdır. Ayrıca nanopartiküllerin belirli uygulamalarda ihtiyacı karşılamak için yüzeyleri işlevselleştirilir. Nanopartiküller, çeşitli nanoteknolojik uygulamalar için temel yapı taşı olarak hizmet eder (Nagarajan 2008).

Partiküllerin boyutlarının küçük olması nanopartiküllerin pek çok benzersiz özelliklerinin açığa çıkmasına yol açar. Nanopartiküllerin emilim ve ışınla etkileşimi dalga boyu, yüzey işlevselliği ve partikül boyutu tarafından kontrol edilebildiği için ilginç optik özellikler sergilerler. Nanopartikül boyutu ışığın kritik dalga boyunun altındaysa o

zaman geçirgenlik özelliği elde edilebilir. Nanopartiküllerin boyutu ve kimyasal yapısı sayesinde elektron ilgisi kontrol edilebilir (Nagarajan 2008).

Biyomedikal uygulamalar için nanoteknolojinin hızlı gelişmesi ile beyin kanser teşhisi ve tedavisi üzerine devrim niteliğinde bir etkiye sahip yeni geliştirilen partikül sistemleri beklenilmektedir. Multifonksiyonel nanopartiküller optik, termal ve magnetik özellikleri kapsamaktadır. Bu özellikler nanopartiküllerin klinik uygulamalarında tümör görüntüleme, tedavide ve terapötik (iyileştirici) işlevsellik ve görüntüleme kombinasyonunda öne çıkan yeni yaklaşımlardır (Cheng *et al.* 2014).

Nanopartiküller; kompozit polimerler, lipitler, proteinler, metaller veya yarı iletkenler gibi birçok malzemelerden yapılabilir. Çeşitli nanopartiküller top-down ya da bottom-up mühendislik teknikleri ile sentezlenmekte ve kompleks şekillerde (tüp, küre, çubuk gibi) tasarlanmaktadır (Cheng *et al.* 2014).

Bir nanopartikül sistemi; kendi fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak sıcaklık, görülebilir ışık, ultraviyole (UV), infrared (IR) gibi çevresel koşullara duyarlı olabilir. Pek çok nanopartikül sistemleriyle etkileşimde bulunan bazı faktörler de vardır. Bunlar: pH değeri ve yüzey yükü (itme/çekme kuvvetleri) içerir ve titreşim kuvvetleri, santrifüjleme, karıştırma gibi kolay ve etkili bir şekilde nanopartikül sistemine etki edebilir. Nanopartikül sisteminin önemli bir yönü atom tanecikli olmasıdır. Atom-atom etkileşimleri nanopartiküllerin şeklini, boyutunu, geometrisini ve oryantasyonunu (uyumu) belirler. Bu özellikler, çoğu gözlenmiş proteinler ve doğal biyomakinlerdeki belli nanopartikül sistemlerinin self-assembly (kendi-kendine düzenlenme) özelliğine büyük ölçüde katkı sağlamaktadır (Papazoglou and Parthasarathy 2007).

Kuantum mekanik kanunları nanopartiküllerin çevreleri ile etkileşimini kontrol eder. Genelde nanopartiküller bir sistemde kovalent bağlar, nanopartikülleri bir arada sağlam bir şekilde tutar. Sterik (yapısal) engel, elektrostatik etkileşim ve hidrojen bağları partikül-partikül etkileşimini belli bir dereceye kadar etkiler. Dolayısıyla bir

nanopartikül sistem modelini oluşturmak için yukarıda belirtilen niteliklerin kapsanması gerekmektedir (Papazoglou and Parthasarathy 2007).

Hedefe özgü ilaç tasarımında seçici bir nano model uygulaması çeşitli avantajlar barındırır. Bunlar, hedeflenmiş dağıtımda ilacın stabilitesi, fagositozun engellenmesi, epitel hücreleri arasında ilaç taşıyıcılarının kolay/pasif taşınımı, yüksek yüzey hacim oranı içerir. Dolayısıyla daha iyi performans sağlar ve hedef bölgelere uygun ilaç salınımı gerçekleşmiş olur. Güncel araştırmalar oluşturulan multifonksiyonel nanopartiküllerin hastalığın ilk başladığı evrelerde moleküler markerların non-invaziv görüntüleme tekniklerinde, tedavide hedefe yönelik ilaç dağıtımında, zararlı yan etkilerin azaltılmasında ya da engellenmesinde, hastalığın öldürücü aşamaya ulaşmadan önce lezyonların sınırlanmasında, yaşam kalitesinin en az seviyede kaybı ile ya da yaşam kalitesinin kaybının olmaması için kullanılmaktadır (Papazoglou and Parthasarathy 2007).

Klinik uygulamalarda multifonksiyonel nanopartiküllerin en büyük amacı hastaların hayatta kalmaları için iyileştirmek ve yaşam kalitesini arttırmaktır (Cheng *et al.* 2014).

Terapötik taşıyıcılar olarak nanopartiküllerin belli avantajları vardır. Bunlar: geliştirilmiş terapötik ajan sirkülasyonu, hedefe özgü ilaç dağıtım, kontrollü ilaç salınımı, yüksek yükleme kapasitesi ve birden fazla terapötik ajanın birlikte dağıtımınıdır. Kemoterapi ilaçlar gibi terapötik ajanlar için nanopartikül temelli dağıtım sistemi beyin tümörlerinin tedavisinde büyük bir etkiye sahiptir (Cheng *et al.* 2014).

Nanopartiküller organik ve inorganik malzemeler olmak üzere iki ana başlıkta sınıflandırılmaktadır. Karbon nanopartiküller organik nanopartiküllerdir. Magnetik nanopartiküller, mükemmel metal nanopartiküller (platinyum, altın ve gümüş) ve yarı iletken nanopartiküller (titanyum dioksit ve çinko oksit), inorganik nanopartiküller olarak sınıflandırılmaktadır (Asmathunisha and Kathiresan 2013).

Günümüzde çok çeşitli nanopartiküller bulunmaktadır. Altın ve gümüş nanopartiküllerine ait pek çok çalışma bulunduğu gibi metalik ve non-metalik partiküllere yönelik araştırmalar da oldukça çoktur. Nanopartiküller üretildikten sonra nerede kullanılacağından ziyade kullanım alanlarına göre üretilmektedir. İhtiyaca yönelik partikül geliştirilmesi ve bu partiküllerin elde edilme yönteminden iyileştirilmesine kadar pek çok literatür mevcuttur.

Kalsiyum tabanlı nanopartikül üretimi de doğada ve canlı bünyesinde bolca bulunan kalsiyum ihtiyacından dolayı sentezlenmiş olabilir. Nitekim doğayı taklit etme sanatı yani biyomimikri sayesinde araştırmalar gün geçtikçe ivme kazanmaktadır. Bunlardan birinde DNA temelli metalik nanoteller ve ağların üretimi amaçlanmaktadır (Niemeyer and Mirkin 2004).

Canlı bünyesinde bulunan biyomoleküler motorların nasıl çalıştığını analiz ederek nanoteknoloji alanında molekül düzeyindeki robotlar yani nanomakinelerin üretilip kullanılması da söz konusudur. Nanomakineler, moleküler fabrikalarda çalışır ve de karmaşık olan yapılarda çok küçük olan ana hatlar üzerinde montajlama yapabilirler. Moleküler iletkenlik ağlarını inşa etmede ve transistörler için elektrik devreleri olarak kullanılırlar. Devamlı olarak uyarlanabilir bir malzeme olarak içeride devriye gezebilir ve gerektiği yerde onarım yapmaları mümkün olmaktadır. Böylece nanomakinelerde bottom-up yaklaşımı temel alınır. Nanomakineler veya moleküler motorlar iki ana kategoride toplanır. Bunlardan ilki lineer motorlar ikincisi de döner motorlardır. Lineer motorlar, intraselüler filamentler boyunca hareket ettikçe kuvvet kazanırlar. Miyozin ve kinesine ilaveten lineer motorlar ayrıca DNA ve RNA boyunca hareket eden enzimleri de içerirler. Döner motorlar da büyük bir protein kompleksi içinde merkezi bir çekirdek etrafında dönerek dönme kuvveti üretirler. Bakteriyel hareketliliğin yönlendiren motorların yanı sıra ATP sentazı da içerir. Her iki kategori de molekülleri ve nanopartikülleri hareket ettirmede kullanılmaktadır (Niemeyer and Mirkin 2004). Doğadaki yahut da canlıdaki mevcut yapılardan yola çıkarak geliştirilen materyaller doğaya ya da canlıya zararının az olması kaydıyla geliştirilmesi hedeflenmektedir.

Kalsiyum tabanlı partiküllerin canlılığa zarar vermeden doğa dostu olarak kullanımına yönelik araştırmalar mevcuttur. Bu araştırmalar; biyomedikal uygulamalarda hedefe yönelik ilaç taşınımda görev alması, dental uygulamalarda da dolgu materyali olarak kullanılması, yine biyomedikal alanlarda hasar görmüş kemik yapılarının onarılmasında, implant tedavilerinde, kompozit oluşturmada (Maurya *et al.* 2013), gıda paketlenmesinde ve iyi bir partikül tutturucu olarak görev alması gibi birçok endüstriyel alanda kullanılmasıyla ilgili çalışmalar bulunmaktadır (El-Sheikh *et al.* 2013; Melo *et al.* 2013; Lv *et al.* 2014; Makarov *et al.* 2014; Paques *et al.* 2014; Swain *et al.* 2014; Wang *et al.* 2014).

Kalsiyum tabanlı materyallerin en bol bulunan formu olan kalsiyum karbonat gözenekli bir yapıya sahiptir (Al-Marzouqi *et al.* 2010). Bu porozlu yüzey nanopartikül kullanımında enzim, protein yahut herhangi bir nanopartikülün tutturulması açısından büyük bir avantaj sağlamaktadır. Bu sayede dağıtım sistemlerinde rol alabilmektedir.

Herhangi bir nanopartikül sentezlendiğinde toksisite, biyoyumluluk, biyobozunurluk gibi canlılık için önem arz eden niteliklerine bakılmaktadır. Kalsiyum tabanlı nanopartiküller biyoyumlu biyobozunabilen ve toksik olmayan malzemelerdir (Chua *et al.* 2013).

Kalsiyum tabanlı nanopartiküllerin endüstriyel alanda yaygın olarak tercih edilmesinde kullanımının kolay olması, maliyetinin az olması, toksisitesinin olmaması, aşındırıcı niteliğinin olmaması gibi büyük önem arz eden özellikleri bulunmaktadır. Ayrıca yağ endüstrisinde filtreli sızdırmayan kalıp için sondaj çamurunda ve oyuklardaki basıncı azaltmayı kontrol etmek için sondaj çamur yoğunluğunu arttırmada kullanılmaktadır (Maurya *et al.* 2013).

Kalsiyum tabanlı nanopartiküller uygulandıkları taş, mermer gibi alanlara ya da sentetik polimerlere kimyasal ve yapısal olarak yüksek derecede uyumluluk sağladığı gibi kemik ve diş gibi biyolojik materyaller ile de uyumluluğı önemlidir. (Rodriguez-Navarro *et al.* 2013).

Nanopartiküller fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak sentezlenmektedir (Niemeyer and Mirkin 2004). Nanopartikül sentezinde birden fazla yöntem ve teknik vardır. Her geçen gün bilim insanları yeni sentez metodlarıyla literatüre katkı sağlamaktadır. Son yıllar da en dikkat çeken yöntem ise biyosentez/biyolojik sentezdir.

Nanopartikül biyosentezi; çözümlerden hedef iyonları yakalayan yetenekli mikroorganizmaların kullanılmasından sonra mikrobiyel hücre aktiviteleri aracılığıyla üretilen enzimler sayesinde oluşturulan elementlerde azalan metallerin birikmesi olayıdır. Nanopartiküllerin biyosentezi iki şekilde sınıflandırılmaktadır. Birincisi; intraselüler sentez, ikincisi de ekstraselüler sentezdir. İntraselüler sentez; mevcut enzimlerdeki nanopartikülleri oluşturmak için mikrobiyel hücre içerisine iyonların taşınmasıyla oluşan sentez çeşididir. Nanopartiküllerin ekstraselüler sentezi ise mevcut enzimlerde iyonların azalması ve hücre yüzeylerinde metal iyonların yakalanmasını içeren bir sentezdir (Zhang *et al.* 2011).

Son yıllarda nanopartikül sentezinde mikroorganizmaların kullanımı gelişmiş durumdadır. Nanopartiküllerin biyolojik sentezinde bakteri, fungus ve aktinomisetler kullanılmaktadır. Bu organizmalar intraselüler ve ekstraselüler sentezleri gerçekleştirmektedir. Özellikle aktinomiset ve mayalardan ziyade bakteri ve funguslar daha kullanışlıdır (Zhang *et al.* 2011).

Üretilen malzemelerin biyoyumlu olması için yapılan araştırmalarda öne çıkan bir durum da sentez yöntemlerinin geliştirilmesidir. Bu nedenle araştırmalar sonucunda biyolojik sentez/biyosentez yöntemini deneyerek çeşitli canlı grupları üzerinde yapılan çalışmalar sonucu mikroorganizmaların daha kullanışlı olduğu anlaşılmıştır. Bunun yanında istenilen bir malzemenin üretiminde nano boyutta olmasıyla birlikte biyoyumlu, biyobozunan, toksisitesi az, çevre dostu olan malzemelerin üretilmesi ve geliştirilmesi hedeflenmektedir. Bu doğrultuda nanopartikül üretimi sonucu ortaya çıkan malzemeler de ticari olarak değer kazanmaktadır.

Planlanan bu çalışmadaki amaç, canlıya ve doğaya uygunluğu ile bilinen biyosentez yöntemiyle *Bacillus arenosi* K64 bakteri aracılığıyla canlıya ve doğaya son derece uyumlu olan kalsiyum tabanlı nanopartiküllerin sentezlenmesidir. Sentezlenen bu nanopartiküllerin uygulama alanları oldukça geniştir. Tıpta, ilaç dağıtım sistemlerinde, kompozit oluşturarak çeşitli alanlarda, kağıt endüstrisinde, dişilikte ve dolgu malzemesi olarak kullanılmasının yanında, doğada da bulunduğu için mimari de yahut restorasyon çalışmalarında da kullanılabilir. Araştırmalar yeni olduğundan kullanım alanları daha da genişleyebilir ya da kullanım alanlarındaki araştırmalar da iyileştirilebilir.

2. KURAMSAL TEMELLER

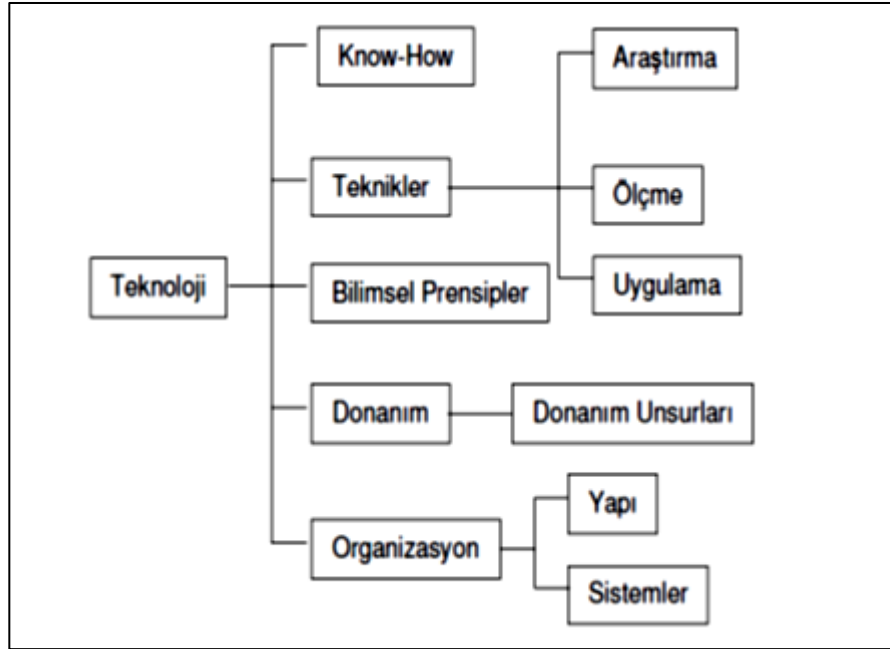
2.1. Nanobilim, Nanoteknoloji ve Nanobiyoteknoloji

Nanoteknoloji, nano ve teknoloji kelimelerinin bir araya gelmesiyle oluşmuş son yıllarda hızla gelişen yeni bir bilim dalıdır. Nanoteknolojinin etimolojisine bakacak olursak Yunanca “cüce” anlamına gelen (Dani 2012) nanos kelimesinden türetilmiştir. Teknik bir ölçü birimi olarak da kullanılan nano, herhangi bir birimin milyarda birini ifade eder ve çoğunlukla metre ile birlikte kullanılır. Teknoloji kelimesi ise Yunanca *tekhné* (el işi veya sanat) ve *logia* (herhangi bir alandaki çalışma) kelimelerinin birlikte kullanılmasıyla oluşmuştur (Kutucu 2010).

Teknoloji, insanoğlunun doğal şartları kontrol edebilmek amacıyla geliştirdiği uygulanabilir bilimsel veri ürünlerinin bütünü olarak tanımlanabilir (Kutucu 2010). İnsan yeryüzünde var olmaya başladığı günden bugüne öncelikle hayatta kalabilmek için çevresindeki yaşam formlarını ve yaşamsal ihtiyaçlarını gözlemleyerek bu doğrultuda gelecekte ileri teknolojiyi oluşturacak keşiflerin temelini atmıştır. Hayatta kalmayı başarabilen insan ırkı yaşamını kolaylaştıracak icatlarla ve kazandığı tecrübeleri yeni nesillere aktararak bilimin ve teknolojinin ilerlemesine katkı sağlamaya devam etmiştir.

Bilim, doğruluğu düşünce, gözlem ve deneylerle kanıtlanmış veya henüz kanıtlanmamış entelektüel bilgi birikiminin bütünüdür. Yüzyıllar içerisinde artan bilgi birikimi bilimlerin uzmanlık gerektirecek biçimde karmaşıklaşmasına neden olmuş ve bununla birlikte bilim ihtiyaçları doğrultusunda sistematik olarak ayrılmıştır (biyoloji, matematik, fizik, kimya gibi). Bilimin hızla ilerlemesi insan hayatını kolaylaştırırken, var oluşundan bu yana artarak biriken bilgi yığını, bilim dallarının da ayrılarak alt bilim dallarının ortaya çıkmasına neden olmuş ya da ihtiyaçları doğrultusunda alt bilim dalları yeni bilim dalları olarak çalışma alanı oluşturmuşlardır (nanoteknoloji, nanobiyoteknoloji ve moleküler biyoloji gibi).

Teknolojiyi oluşturacak temel bileşenler Şekil 2.1’de verilmiştir (Özer 2008).



Şekil 2.1. Teknoloji kavramının temel bileşenleri (Özer 2008)

Nanoteknoloji terimi ilk kez 1974’de Japon bilim adamı Norio Taniguchi tarafından kullanılmıştır (Ramsden 2005). Ancak Richard Feynman’ın 1959 yılında Caltech’de yaptığı konuşmayla nanoteknolojiye çok farklı bir bakış açısı kazandırmıştır. Feynman, ‘‘There’s plenty of room at the bottom’’ başlıklı konuşmasında, partiküller dünyasında keşfedilecek çok Şey olduğunu vurgulamış ve bir toplu iğnenin başı kadar küçük bir yapıya Britanica Ansiklopedisinin tamamının sığdırılabileceğini iddia ederek bilim insanlarının ufkunu genişletecek aynı zaman da bilim dünyasını uzun süre meşgul edecek bir tartışma konusunu açarak tarihe geçmiştir (Kutucu 2010).

Nanobilim ve nanoteknoloji yaklaşık 1-100 nanometre aralığındaki uzunluk ölçüsünde atomik, moleküler veya makro moleküler seviyede araştırma ve teknolojinin gelişmesini içerir. Bu küçük makineler (moleküller) gibi biyoloji ve kimyada nano boyutta olan nesnelerin yeniden adlandırılmasına fikrine neden olabilir. Buna verilebilecek en güzel örneklerden bir tanesi canlı sistemlerde enerjiyi sağlayan adenzin trifosfat (ATP) molekülünün sentezini katalizleyen ATP sentaz nanomotor olarak adlandırılabilir. Diğer

güzel bir örnek de birinden diğerine geçen lifleri yönlendirebilen aktin miyosin moleküler makinesidir. Benzer şekilde DNA da moleküler makinelere talimat veren bir depolama sistemi olarak hizmet eder. Nanobiyoteknoloji, canlı ya da cansız biyosistemleri anlamak ve dönüştürmek için nano ölçekteki teknikleri benimser ve de yeni cihazlar oluşturmak için biyolojik ilkeler ile malzemeleri kullanır (Abu-Salah *et al.* 2010).

Bilim adamlarının çoğu modern nanoteknolojinin başlangıcının Prof. Richard Feynman'ın 29 Aralık 1959 yılında Kaliforniya Teknoloji Enstitüsünde düzenlenen, Amerikan Fizik Topluluğu yıllık toplantısında yaptığı meşhur konuşmaya dayandığını düşünmektedir. Bu efsanevi konuşma “There's Plenty of Room at the Bottom” başlığı ile ünlüdür. Feynman, 20. yüzyılın en önemli fizikçilerinden birisidir. Kuantum Elektrodinamiğine yeni ufuklar açan çalışmasıyla 1965 yılında fizik dalında Nobel Ödülünü almıştır. Feynman, efsanevi konuşmasında molekül ve atomların doğrudan istenilen şekilde tasarlanabileceğini vurgulamıştır. Nanoteknoloji teriminden söz etmemesine rağmen onun orijinal söylemiyle “Küçük ölçekteki nesnelere kontrolü ve istenilen doğrultuda değiştirilmesinin problemleri hakkında konuşmak isterim” demiştir. Feynman, nanometrik ölçekteki çalışmaların olası benzerliklerini tanımlayan ilk insandır. Bu konuşmada dile getirilen pek çok fikir nanoteknoloji uygulamaları için oldukça fayda sağlamıştır ve gelecekteki pek çok yararlı faaliyetler için de zemin hazırlamaktadır (Yıldırım vd 2010).

Nanoteknoloji terimi ilk kez Tokyo Science Üniversitesinden Norio Taniguchi tarafından 1974 yılında açıklanmıştır. Taniguchi'nin günümüzde dahi geçerliliğini yitirmeyen nanoteknoloji tanımını; “Nano-teknoloji maddelerin bir atom veya molekül seviyesinde deformasyon, ayırma ve birleştirme süreçlerinden meydana gelmektedir” şeklinde yapmıştır (Yıldırım vd 2010).

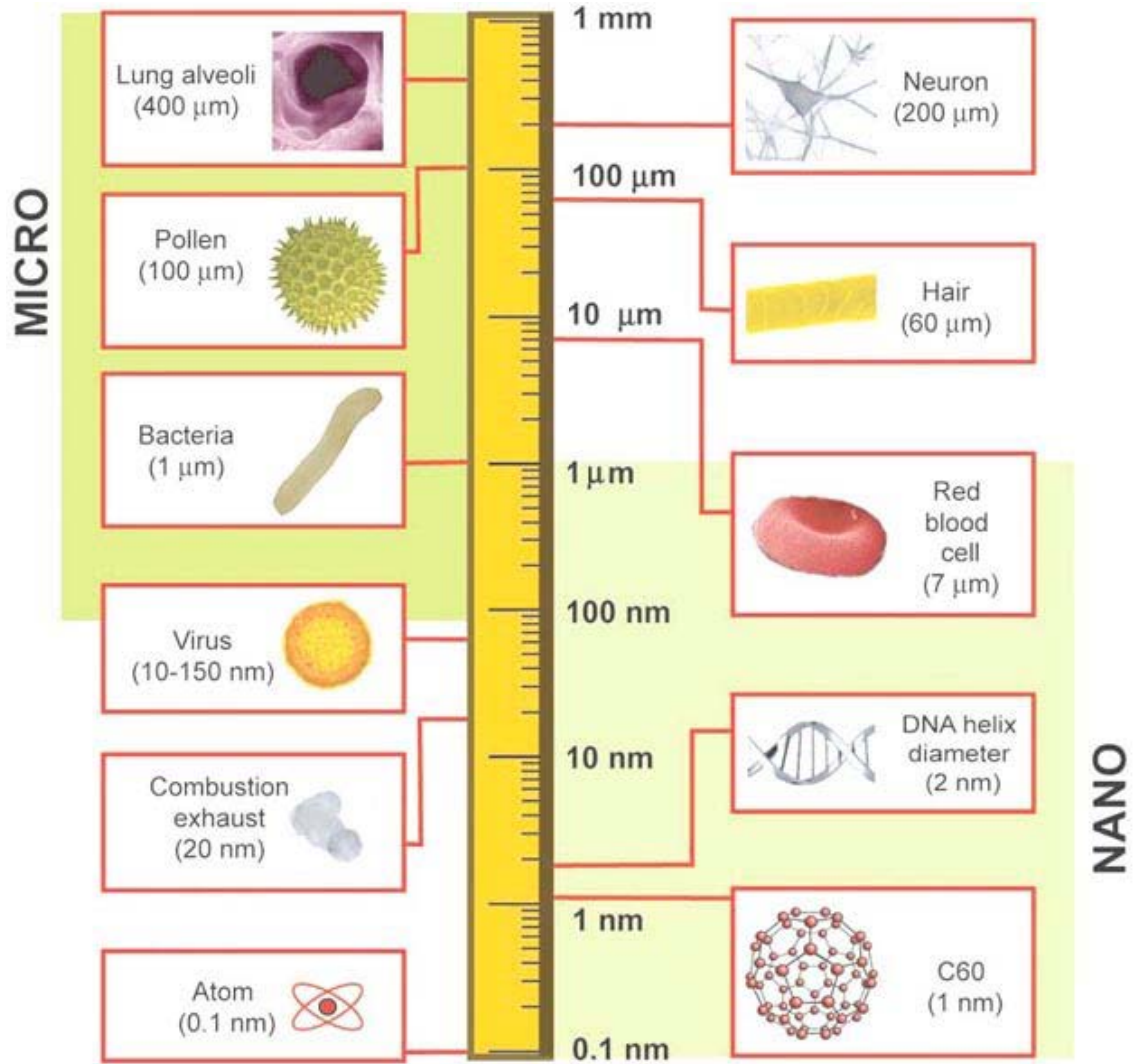
U.S. National Nanotechnology Initiative, nanoteknoloji tanımını “maddeyi 1 ile 100 nanometre ölçeğinde anlama ve kontrol etmeye ilişkin bilim, mühendislik ve teknoloji” şeklinde ifade etmiştir (Roco 2007). Yalnız nanoteknoloji sadece nano boyuttaki

malzemelerle çalışmak değil aynı zamanda nanoboyuttaki ölçüleri ve bileşenlerinden dolayı yeni özellik ve işlevselliğe sahip madde, cihaz ve sistemlerin geliştirmesini de kapsamaktadır. British Royal Society ve Royal Academy of Engineering kuruluşlarının ortak raporunda nanoteknoloji “şekil ve boyutların nano ölçekte kontrol edilerek yapıların, cihazların ve sistemlerin tasarımı, karakterizasyonu, üretimi ve uygulaması” olarak tanımlanmıştır (Yıldırım vd 2010).

Nanoteknolojinin en öne çıkan tanımı nano skalada boyut ve şeklin kontrolünün yapılabildiği malzemelerin, cihazların ve sistemlerin tasarlanması, karakterizasyonu, üretilmesi ve uygulanması şeklindedir (Abad *et al.* 2005; Ramsden 2009). Atom düzeyinde mühendislik de denilebilmektedir. The US Foresight Institute ise nanoteknolojiyi, “kullanışlı ve eşsiz özelliklere sahip malzeme ve cihazların üretiminin nano ölçüde madde yapısının kontrol edilebildiği ve git gide yükselen bir teknolojik gelişmeler grubudur” şeklinde tanımlamıştır (Scott *et al.* 2005; Ramsden 2009; Dani 2012).

Nanoteknoloji de bu teknolojiye ait kavramların nasıl kullanılacağı tartışmalı bir konudur ve bu anlamda kesin bir sınırlama yoktur. Ancak nanoteknoloji denildiğinde atom seviyesinde kontrol odaklı ortaklaşa bir bilim dalı olduğu unutulmamalıdır.

Nanometrenin büyüklük bakımından diğer birimlerle kıyaslanması Şekil 2.2’de verilmiştir.



Şekil 2.2. Biyolojik bileşenlere kıyasla nano materyallerin boyutunu gösteren logaritmik uzunluk ölçeği ve nano ve mikro boyutunun tanımlanması (Buzea *et al.* 2007' den uyarlanmıştır)

Atomlar yaklaşık 0,1 nanometre; saç teli ise yaklaşık 80.000 nm kalınlığında olduğunu göz önünde bulundurursak nanoteknolojinin atom ve moleküler düzeylerle ilgili olduğu ortaya çıkmaktadır. Bu doğrultuda nanobilim ve nanoteknolojinin amacı nano skalada malzeme ve sistem tasarlamak, geliştirmek ve günlük hayatımızda dahi kullanabileceğimiz ürünleri oluşturmaktır (Özer 2008).

Nanobiyoteknoloji; organik ve inorganik malzemelerden oluşan fonksiyonel nano yapıları üretmek için; hücreler, hücresel bileşenler, nükleik asitler ve proteinler gibi

optimize edilmiş evrim sayesinde biyolojik sistemlerin kullanılmasıyla ilişkili bir alandır (Fakruddin *et al.* 2012).

Nanobiyoteknoloji; malzeme bilimi, moleküler biyoloji, fizik, analitik kimya, biyoorganik ve biyoinorganik kimyanın katkıları ile kavramları, uygulamaları ve perspektifleri birleştirerek ileri biyoteknolojik ürünlerin araştırılması ve üretilmesi üzerine çalışmalar yapan multidisipliner bir bilim dalıdır (Niemeyer and Mirkin 2004).

Nanobiyoteknolojide gerçek zamanlı nano sensörler ve lab-on-chip tekniği gibi daha hassas ve duyarlı tanı yöntemleri için nano ölçekteki tekniklerin geliştirilmesi ve üretilmesini hedef almaktadır (Yıldırım vd 2010).

2.2. Nanoteknolojinin Tarihçesi

İnsanlar tarafından dekoratif amaçlı kullanılan yapay metal nano tarihi Roma dönemine dayanmaktadır. Britanya Müzesinde sergilenen yaklaşık 50-100 nanometre boyutunda gümüş ve altın nanopartiküllerinden yapılmış olan “Lycurgus Cup” iyi bir örnektir. Bu kupa yeşil ve kırmızı olmak üzere iki farklı renk yansıtır (Dani 2012). 1857 yılından sonra Michael Faraday altının optik özellikleri üzerine çalışmalar yaptığı sırada ilk metalik altın kolloidal çözeltiyi keşfetmiş ve farklı preperasyon metotları kullanılarak altın partiküllerin çeşitli renklerini tanımlamıştır (Dani 2012).

26 Aralık 1959 yılında Richard Feynman’ın Caltech’deki konuşmasıyla nanoteknolojinin tarihteki temelleri atılmıştır (Dani 2012). Feynman’ın “There’s plenty of room at the bottom” başlıklı unutulmaz konuşmasında aslında kastettiği şey keşfedilecek çok daha küçük boyutlarda yapıların olduğu ve bu yapılarda keşfedilebilecek yeni özelliklerin var olduğudur. Feynman, nanoteknolojide de, geleneksel fizik kanunlarının geçerli olduğu makro dünyadaki aygıtların çalışma şekline benzeyen tasarımların olabileceğinden söz etmiştir. Hatta bir toplu iğnenin başı kadar küçük bir alana Britanica Ansiklopedisinin tamamının sığdırılabileceğini söylemiştir (Özer 2008).

1981 yılında Heinrich Rohrer ve Gerd Karl Binning tarafından kendilerine Nobel ödülünü kazanmalarını sağlayan, atomik seviyede çözünürlükteki Tarama Tünel Mikroskobu keşfedilmiştir. Bundan beş yıl sonra (1986) Gerd Binning, C. F. Quate ve Ch. Gerber Atomik Kuvvet Mikroskobunu geliştirmişlerdir. 1989 yılında IBM’de kimyacı olan Ari Aviram her yıl nanoteknoloji konulu toplantılar düzenlemiştir. 1990 yılında IBM de görevli olan Don Eigler ve Erhard Schweizer, Xenon atomunu nikel bir yüzey üzerine atom atom işleyerek ‘‘IBM’’ logosunu yazmışlardır. 1985 yılında keşfedilen nanotüpleri 1991 yılında Sumio Lijima üretime geçirmiştir. 2000 yılında ABD’de Ulusal Nanoteknoloji İnisiyatifi oluşturulmuştur. 2006 yılında hedefe yönelik ilaç dağıtımı için nanoparçacıklar üretilmiştir (Roco 2007). Teknolojinin yıllara göre gelişim evresi Şekil 2.3’de verilmiştir.



Şekil 2.3. Bilim ve teknolojideki temel gelişmeler (Celep 2007)

2.3. Nanoteknolojinin Görüntülenmesinde Kullanılan Bazı Cihazlar

Gelişen teknolojiyi takip etmek için eldeki mevcut cihazlar yeterli gelmemekte ve bundan dolayı da basit kalmaktadır. Teknolojinin gelişmesiyle daha kompleks cihazların üretilmesi hız kazanmış durumdadır. Son yıllarda ortaya çıkan nanoteknolojiyi kavramak ve takip etmek adına nano boyutta üretilen malzemelerin görüntülenmesi gerekmektedir. Görüntüleme teknikleri içerisinde yer alan mikroskopların geliştirilmesiyle de bu amaca ulaşılmış durumdadır. Geliştirilen

mikroskopları, elektron mikroskopları ve taramalı uç mikroskopları olarak iki ana başlık altında toplayabiliriz (Özer 2008).

2.3.1. Elektron mikroskopları

Elektron mikroskopları görüntüyü 10 ile 1.000.000 kez arasında büyütmeyi sağlar. Bu kadar geniş aralıkta büyütmeyi sağlayan bu mikroskoplar, nanoteknolojide karakterizasyon işlemlerini yapmak için geliştirilmiştir (Williams and Adams 2007).

Elektron mikroskopları, incelenecek numune yüzeyini elektron bombardımanına tutar. Gönderilen elektronlardan bir kısmı saçılır bir kısmı da ışın demeti halinde yayılır. Yayılan bu ışınlar ve elektronlar farklı isimler alarak gruplandırılabilir. Malzeme atomlarının cinsleri ve bileşimlerine dair bilgiyi yayılan ışıklardan olan X-ışınları ve auger elektronları verirken malzemeyi oluşturan atomlar hakkında bilgiyi ise katot ışınları vermektedir. Birincil ve ikincil geri saçılan elektronlar da malzemenin atom ve yüzeyi hakkında bilgi vermektedir (Özer 2008).

2.3.1.a. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Taramalı Elektron Mikroskobu “SEM” olarak kısaltılmaktadır. Değişen kalınlıktaki yüzeylerin taranması için odaklanmış elektronlar kullanılarak yüksek çözünürlükte (5-10 nanometre) görüntü alımı sağlamaktadır. Gün geçtikçe daha yüksek çözünürlüğe sahip mikroskoplar da geliştirilmektedir (Özer 2008).

2.3.1.b. İletim elektron mikroskobu (İEM)

İletim Elektron Mikroskobu (İEM), yarı iletken ve kalınlığı 100 nanometreden az olan nano boyuttaki malzeme atomlarını yüksek enerjili elektron ışınları kullanarak analiz eder. Yaklaşık olarak 0.1 ile 0.2 nanometre civarında çözünürlüğe sahip olan bu mikroskop ile nano boyuttaki malzemelerin element ve bileşen miktarları, atom ve

moleküllerin düzenlerinin ve özelliklerinin daha iyi anlaşılması için önemlidir (Williams and Adams 2007).

2.3.1.c. Analitik elektron mikroskobu (AEM)

0.1 nanometreye kadar çok yüksek bir çözünürlüğe sahip olan bu mikroskop X-ışını ve elektron spektrometre gibi cihazların modifiye edilmesi ile oluşturulmuştur. Analitik Elektron Mikroskobu (AEM), malzemeye gönderilen elektronların malzemeden geçtiği esnada, elektronlarda meydana gelen enerji kaybını ölçerek demir ve nikel atomları ile karbon ve nitrojen atomları arasındaki farklılıkları gösterir. Ayrıca malzemelerin moleküler bağları ile elektrik iletkenliği ile ilgili de bilgi vermektedir (Özer 2008).

2.3.2. Tarama uçlu mikroskoplar (STM)

Malzemenin yüzey özelliklerini incelemek için ideal bir mikroskoptur. Maddelerin yüzeylerini tarayarak yükseklik değişimlerini, elektriksel değişimleri veya yüzeydeki diğer değişiklikleri kaydetmede tercih edilir (Özer 2008).

2.3.2.a. Taramalı tünel mikroskobu (TTM)

Taramalı Tünel Mikroskobu (TTM) 1986 yılında Nobel Fizik Ödülünü alan Heinrich Rohrer ve Gerd Karl Binning tarafından 1981 yılında keşfedilmiştir. İletken malzemelerin yüzey karakteristiklerini belirlemek için kullanılır. Atomik seviyede görüntülemeyi sağlar (Kaiser 2006).

2.3.2.b. Atomik kuvvet mikroskobu (AKM)

AKM, yüzey görüntüsünü angstrom (Å) (10^{-10} m) düzeyinden 100 mikrona (μ) kadar görüntüleyebilme yeteneğine sahiptir. AKM'de görüntünün alınabilmesi için 100 nanometreden daha küçük bir çapa sahip oldukça ince silikon bir uç kullanılmaktadır.

Silikon ucun malzeme yüzeyi üzerindeki hareketi esnasında malzeme üzerindeki atomlar ile silikon uçtaki atomlar arasında bir etkileşim gerçekleşir. Bu etkileşimler çerçevesinde silikon ucun yüksekliğinin ayarlanması suretiyle numune yüzeyine uygulanan kuvvetin sabit kalması sağlanır. Bu mekanizma ucun aşağı yukarı hareket değişimlerini kaydederek numune yüzeyinin üç boyutlu bir görüntüsü elde edilir (Özer 2008).

2.4. Biyomimetik ve Canlılardaki Nanoyapılar

Canlılarda bulunan DNA, proteinler, enzimler, kas kasılmasında görev alan miyosin, ATP üretiminde sentezi sağlayan ATP sentaz, bakterilerde bulunan flagella gibi yapılar, nanobilim ortaya çıkana dek sadece görevleri biliniyordu. Nanobilim ve nanoteknolojinin gelişmesiyle bu yapılara daha farklı bir gözle bakılmaya başlanmıştır. Nano boyuttaki maddelerin özellikleri incelendiğinde normal fizik kanunlarının geçerli olmadığı ve maddenin bilinenin aksine farklı özellikler gösterebileceğini ve bu özellikler baz alınarak yeni tasarımların gerçekleştirilebileceği öngörülmüştür. Dolayısıyla canlılardaki tüm yapılar tekrar ele alınarak yeniden incelenmiştir. Mikron boyutunda olduğu tahmin edilen yapıların özelliklerinin yanında nano boyutta yapılan karakterizasyonlar ile farklı özellikler gün ışığına çıkmıştır. Bu yapılar insanoğluna hizmet etmesi açısından bir model oluşturmaktadır. Bu modeller doğadan ilham alınarak yapılmaktadır ve bu yeniliklere biyomimikri denilmektedir. Böylece biyomoleküller olarak bilinen yapılar günümüzde nanomotor yahut nano işlevli malzemeler olarak anılmaktadır. Örneğin; ATP sentaz, kinesin, miyozin, bakteri flagellası birer nanomotor olarak kitaplara konu olmuş durumdadır. Ayrıca DNA genetik bilgi taşıyan kalıtım materyali olarak bilinmesinin yanında, taşıdığı bilgi kapasitesi baz alınarak çok küçük boyuta sığabilecek DNA tabanlı bilgisayarlar geliştirilmektedir. Proteinler, evrim süreçleri tarafından optimize edilmiş nano sistemleri meydana getirmiştir. Metalloprotein temelli cihazların geliştirilmesi tasarlanmıştır. Fotokromik protein özellik taşıyan bakteriyorodopsinin üç boyutlu optik hafızaya sahip oldukları keşfedilmiş ve buna dayalı cihazlar geliştirilmiştir (Niemeyer and Mirkin 2004; Goodsell 2004; Renugopalakrishnan and Lewis 2006).

2.5. Nanomalzemeler

Bir malzeme en azından bir boyutu sınırlandırıldığında benzersiz özellikler kazanırsa nanomalzeme olarak adlandırılmaktadır. Nanomalzemelerin kesin bir sınıflandırması yoktur. Ancak nanomalzeme denilince akla buckyball diğer bir deyişle fullerenler, karbon nanotüpler, nanofiberler, tek sıra atomlardan işlenmiş tek tabakalı yahut atomik düzeyde işlenmiş çok tabakalı filmler, grafen, kuantum dotlar, lipozomlar ve dendrimerler gelmektedir. Bunlardan kuantum dotları, fullerenleri, lipozomları ve dendrimerleri nanomalzeme kapsamında genel bir başlık olarak nanopartikül adı altında toplanabilmektedir (Işık 2010).

2.6. Nanopartiküller

Atomik ve moleküler uzunluk ölçüsünde en azından bir boyutu sınırlandırılmış olan parçacıklara nanopartiküller adı verilir. Nanopartiküller amorf veya kristal forma sahip olabilir ve yüzeyleri sıvı damlacıklar ya da gazlar için taşıyıcı olarak işlev görebilir. Bir dereceye kadar nanopartiküller, geniş yüzey alanı ve kuantum boyut etkileri gibi farklı özelliklerinden dolayı katı, sıvı, gaz ve plazma durumlarına ilaveten maddenin farklı bir durumu olarak düşünülebilir. Kristal formdaki nanopartikül materyallerine yaygın örnek olarak grafit ve elmas, ayrıca fullerenler ve karbon nanotüpler verilebilir (Buzea *et al.* 2007).

Nanopartikül sentezini içeren faaliyetler; özgün katalitik, elektronik, manyetik, kimyasal, fotoelektrokimyasal ve optik özelliklerinden dolayı ilgi alanı oluşturur. Nanopartiküllerin özgün özellikleri;

- 1) Kuantum sınırlama etkisi
- 2) Boyut etkisi ile elektronik enerji seviyesini ayarlama,
- 3) Nanopartiküller de içteki atomlarsa dıştaki atomların baskın davranışlarından dolayı kütle oranına göre yüzey alanının artması sayılmaktadır (Hulkoti and Taranath 2014).

Nanopartiküllerin olağan dışı fizikokimyasal özellikleri (yüzey yapısı, yüzey reaktivitesi, yüzey grupları ve kaplamaları, çözünürlük, yüzey morfolojisi, adsorblanan kimyasalların etkisi, şekil ve topaklanması) 100 nanometreden küçük olması kaydıyla (Habeeb 2013) atfedilmiştir (Hulkoti and Taranath 2014).

Nanopartiküller son zamanlarda yüksek derecede patojenik mikroorganizmalar için antimikrobiyal olarak ve ilaç dağıtımını gibi biyomedikal araştırma ve uygulamaları için tıp alanında kullanılmaktadır (Habeeb 2013).

Altın, gümüş, platin, alüminyum, çinko, karbon, titanyum, paladyum, demir ve bakır gibi metal nanopartiküller, vazgeçilmez ve teknolojik öneminden dolayı son zamanlarda muazzam bir ehemmiyet kazanmıştır (Hulkoti and Taranath 2014).

Nanopartiküllerin metalik olmayanları da bulunmaktadır. Bunlardan birisi de kalsiyum tabanlı nanopartiküllerdir. Kalsiyum tabanlı nanopartiküllerin kıymetli özellikleri vardır. Bunlar: biyoyumlu, biyobozunabilen, non-toksik, düşük maliyetli ve kolay kullanılabilirliğinin olmasının yanında kullanılabileceği alanların geniş olmasıdır (Chu *et al.* 2013; Maurya *et al.* 2013; Kisku *et al.* 2014).

2.6.1. Nanopartiküllerin sınıflandırılması

Nanopartiküller genel olarak boyutlarına, morfolojisine, homojenliğine, bileşimine ve topaklaşmasına göre sınıflandırılır. Nanopartiküllerin hareketi sınırlı değildir. Serbest halde çevrede kalabilir ve insanlarda ciddi sağlık sorunlarına yol açabilecek maruziyete neden olabilir. Buna karşın geniş bir nesneye sıkı bir şekilde bağlı olan nano yapıdaki elementleri içeren pek çok obje vardır ve sabit nanopartiküller düzgün işlendikleri zaman sağlık riski teşkil etmezler. Bu önemli ayrımın bir örneği, mükemmel derecede güvenli olan yanmaztaş (asbestos) materyalidir fakat nanometre ölçekte havayla taşınan (aerosol) kanserojen lifli partiküllerin üretimine ilişkin böyle bir yolda madende çalışırken ya da madenden çıkarıldığı zaman akciğerlerde emilimi kolay olduğundan sağlık için tehlikelidir. Aslında nanopartiküllerin çoğu non-toksik görünmektedir,

diğerleri de sağlığa faydalı görüldüğü halde toksik olmayan hale getirilebilir (Buzea *et al.* 2007). Nanopartiküllerin sınıflandırılması Şekil 2.4'te gösterilmiştir.

Nanopartikül sentezi ile ilişkili tüm konularda metal nanopartiküller, metal oksit nanopartiküller ve polimer nanopartiküller gibi literatürde yer alan çeşitli nanopartiküller vardır (Vaseem *et al.* 2010).

2.6.2. Nanopartiküllerde boyutluluk

Nanopartiküllerin morfolojisi ya da şekilleri toksisiteyi üzerine önemli bir rol oynadıkça bu boyut sayılarına dayalı sınıflandırma kullanışlı olmaktadır. Bu en-boy oranının genel bir konseptidir (Şekil 2.4) (Buzea *et al.* 2007).

2.6.2.a. Bir boyutlu (1D) nanomateryaller

Nanometre ölçeğindeki bir boyutlu (1D) malzemeler genel olarak ince filmler veya yüzey kaplamalardır. Ayrıca bilgisayar mikroçip devrelerini ve gözlükte yansımaları önleyici kaplamaları da içerir. İnce filmler yıllardır elektronik, kimya ve mühendislik gibi çeşitli alanlarda geliştirildi ve kullanıldı. İnce filmler, tek bir tabaka olarak adlandırılan sadece bir atom kalınlığında kontrollü bir şekilde büyütülebilir ve çeşitli yöntemler aracılığıyla depolanabilir (Buzea *et al.* 2007).

2.6.2.b. İki boyutlu (2D) nanomateryaller

İki boyutlu (2D) nanomateryallerin nano ölçekte iki boyuta sahiptir. Bunlar, küçük partikülleri süzme ve ayırma işlemlerinde kullanılan nano gözenekli filtreleri veya bir alt tabakaya sağlam bir şekilde bağlanan nanoyapılar ile iki boyutlu nanoyapılı filmleri içerir. Nano ölçek aralığındaki boyutlara sahip geniş bir en boy oranında olan serbest partiküller, iki boyutlu nano malzemeler olarak kabul edilir. Yanmaztaş (asbestos) lifleri iki boyutlu nanopartiküllere bir örnektir (Buzea *et al.* 2007).

2.6.2.c. Üç boyutlu (3D) nanomateryaller

Her üç boyutta büyüklükleri nanometrik skalada verilmiş malzemeler üç boyutlu (3D) olarak kabul edilir. Atomik ölçekte gözeneklilik, kolloidler ve çeşitli morfolojilere sahip serbest nanopartikülleri oluşturan koşullar altında depolanan ince filmleri içerir (Buzea *et al.* 2007).

2.6.3. Nanopartikül morfolojisi

Bir nanopartikülde dikkat edilecek özellikler arasında yüzey düzgünlüğü, küreselliği ve en-boy oranı yer almaktadır. Yüksek ve düşük en-boy oranına sahip partiküller arasında genel bir sınıflandırma vardır. Yüksek en-boy oranlı nanopartiküller, uzunluğu değişen çaplardaki nanoteller veya heliks, zikzak gibi çeşitli şekillere sahip nanotelleri ve nanotüpleri içerir. Küçük en-boy oranlı nanopartikül morfolojisi de küresel, oval, kübik, prizma, sarmal ya da sütun şeklindedir. Birçok nanopartikül yığını; toz, süspansiyon veya kolloidler olarak mevcuttur (Şekil 2.4) (Buzea *et al.* 2007).

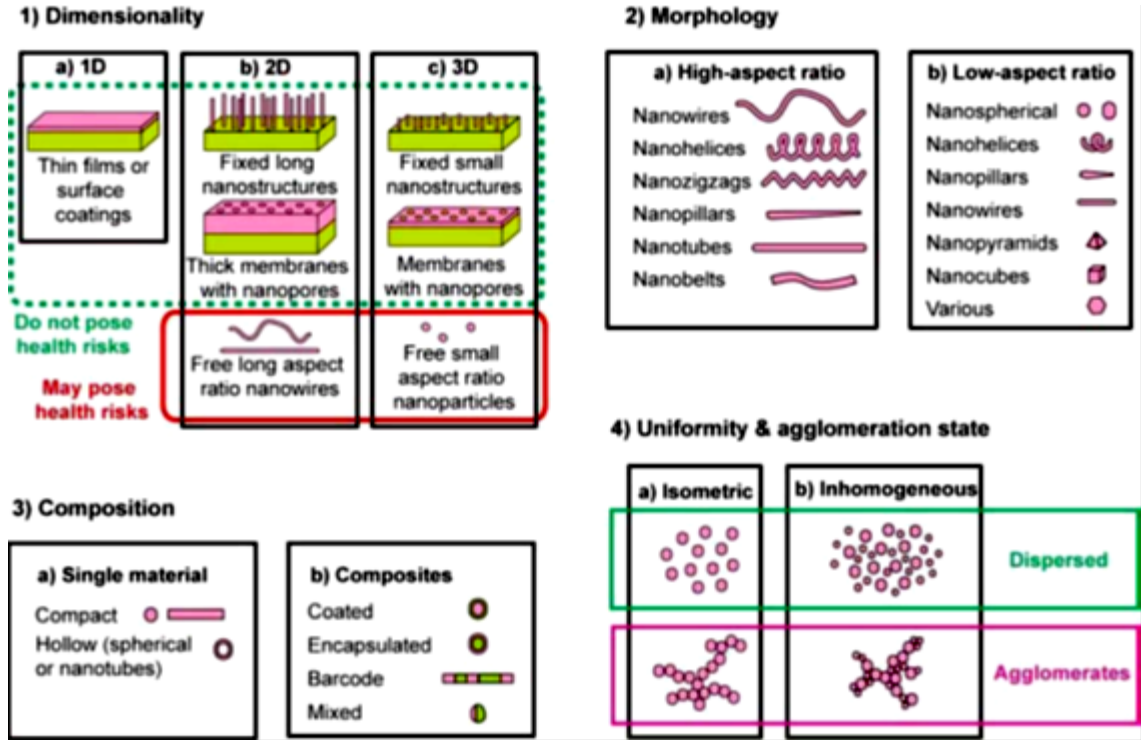
2.6.4. Nanopartikül kompozisyonu

Nanopartiküller, tek bileşenli bir malzemedan veya birkaç malzemedan oluşabilir (Şekil 2.4.). Doğada bulunan nanopartiküller çeşitli kompozitler ile malzeme yığınları halindedir. Oysa günümüzde saf ve tek bileşenli malzemeler çeşitli metotlarla kolay bir şekilde sentezlenebilmektedir (Buzea *et al.* 2007).

2.6.5. Nanopartiküllerin homojenliği ve topaklanması

Kimya ve elektro-manyetik özelliklere dayalı nanopartiküller; bir yığın halinde veya süspansiyonlar/kolloidler olarak dağılmış aerosoller halde bulunabilir (Şekil 2.4). Buna bir örnek verecek olursak, manyetik nanopartiküller; yüzeyleri manyetik olmayan bir malzeme ile kaplanmazsa bir yığın oluşturarak kümeleşme eğiliminde olur. Kümeleşen

nanopartiküller, toplanmanın boyutuna dayanarak daha büyük parçacıklar olarak davranabilir. Bu yüzden nanopartiküllerin kümeleşmesi, şekli, boyutu ve yüzey aktivitesi yeni malzemelerin sağlık ve çevre düzenlemesinde göz önünde bulundurularak karar verilmelidir (Buzea *et al.* 2007).



Şekil 2.4. Boyut, morfoloji, kompozisyon, homojenliği ve kümeleşme durumu açısından nanoyapıdaki materyallerin sınıflandırılması (Buzea *et al.* 2007)

2.7. Nanopartiküllerin Sentez Mekanizması

Nanopartiküllerde kullanılan biyolojik ajanların sentezinde kesin mekanizma şimdiye dek belirlenememiştir. Bu, nanopartiküllerin oluşumuna neden olan metal iyonlar ile farklı biyolojik ajanlarla farklı bir şekilde tepki verdiği içindir. Çoğu mikroorganizmalar intraselüler veya ekstraselüler inorganik malzemeler üretir fakat intraselüler ve ekstraselüler nanopartikül sentezi için oluşturulan mekanizma farklı biyolojik ajanlar ile farklı olmaktadır. İntraselüler metot mikrobiyal hücrelerde belli bir iyon taşınımını içerir. Nanopartiküllerin intraselüler sentezinde mikroorganizmaların hücre duvarı

önemli bir rol oynar. Bu mekanizma hücre duvarının oynadığı rol yükü ile ilgilidir. Hücre duvarında bulunan enzimler nanopartikül iyonlarını azaltır (Hulkoti and Taranath 2014).

2.7.1. Nanopartiküllerin üretim metotları

Nanopartikül sentez yöntemleri fiziksel, kimyasal ve biyolojik yolla olabilmektedir. Bu sentezlenme yollarından son yıllarda ki gelişmelere dayanarak sık kullanılan bazı teknikler geliştirilmiştir. Bu alışlagelmiş teknikler: elektrokimyasal sentez, ters misel/mikroemülsiyon metot, hidrotermal sentez, sonokimyasal çöktürme, kimyasal indirgenme teknikleridir.

Nanopartikül sentezinde aranılan özellik nano boyutta elde edilen nano parçacıkların homojen olması yani büyüklüklerinin ve şekillerinin uygulanabilecek alana göre istenilen şekilde olmasıdır (Yıldız 2011).

2.7.1.a. Elektrokimyasal sentez

Bir çözelti içerisindeki inorganik metallerle katı ve/veya sert yüzeylerde biriktirme yapılarak uygulanan bir yöntemdir. Oksijenle reaksiyona giren metaller ile çözültide bulunan metal iyonlarının katotta indirgenmesi ilkesine dayalı olarak çalışır. Bu sentezle elde edilen nanopartiküllerin saflık derecesi yüksek ve homojenliği fazladır (Tütünoğlu 2007; Yıldız 2011).

2.7.1.b. Ters misel/mikroemülsiyon metodu

Bir ya da birden fazla reaksiyonu eş zamanlı gerçekleştirebilen bir metottur. Bu metotla üretilen parçacıklar fiziksel/kimyasal parametrelerin değiştirilmesiyle morfolojisi istenilen hale getirilebilmektedir. Organik faz ara yüzeyi, yüzey aktif maddelerin ilavesiyle stabil olduktan sonra nano ölçekte su küreleri oluşur. Yüzey aktif maddesinin

suyla olan oranı değiştikçe su kürelerinde farklılaşmalar meydana gelmektedir. Bu doğrultuda ortaya çıkan oran 15'in altında olursa ters misel, stndeysel mikroemülsiyon sistemleri oluşmaktadır. Nano yapıdaki parçacıklar su küreleri olarak bilinen mikro reaktörlerde sentezlenirler. Parçacığın boyutu su kürelerinin boyutu ile ilişkilidir (Petit *et al.* 1994; Li 1998; Yıldız 2011).

2.7.1.c. Hidrotermal sentez

Hazırlanan numune otoklav benzeri kapalı sistemlere bırakılarak yüksek basınç altında optimize edilir. Böylece kontrol edilebilen morfoloji ve boyutta nanoparçacıklar elde edilebilmektedir (Tok *et al.* 2007; Tütünoğlu 2007; Yıldız 2011).

2.7.1.d. Sonokimyasal çöktürme (Depozisyon)

Kavitasyon olayı ile kimyasal gç kazanan ultrasonik enerji sonucunda meydana gelen sonokimyasal tepkimeler sayesinde nanoparçacıklar elde edilmektedir (Liu and Lin 2004; Tütünoğlu 2007; Yıldız 2011).

2.7.1.e. Kimyasal indirgenme

İndirgenme reaksiyonlarının geçerli olduğu bu yöntem de sulu ve organik bir çözücü faz içerisinde indirgeyici reaktif ile birlikte metal iyonları, metalik nanoparçacıklara dönüşmektedir (Tütünoğlu 2007; Yıldız 2011).

Nanopartikül retiminde geçerli olan bu yöntemlerin yanında bir de son yıllarda oldukça gündem de olan biyosentez yöntemi vardır.

2.8. Biyosentez

Nanopartikül üretiminde fiziksel ve kimyasal sentez metotlarına ilaveten yeni bir yaklaşım olan biyosentez ile nanopartikül eldesi son yıllarda üzerinde durulan ve araştırılan bir yöntem olup karşımıza çıkmaktadır. Nanopartikül sentezinde kullanılan metotların bazılarında toksik kimyasalların kullanımı kaçınılmaz olabilmektedir. Bu nedenle nanopartikül üretiminde zorunlu olarak yeşil sentez geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Ya bitki özütleri ya da mikroorganizmaların kullanıldığı nanopartiküllerin biyolojik yolla sentezi, fiziksel ve kimyasal yöntemlere alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Bu yöntem hem güvenilir hem de çevre dostu olarak sunulmaktadır (Hulkoti and Taranath 2014). İyi bilinen mikroorganizmalar metal iyonlarının azaltılması yoluyla toksik metallerin iyileştirilmesinde kullanılmaktadır. Nanopartikül sentezinde mikropların kullanımı oldukça yenidir. Nanopartiküllerin biyosentezinde, çözeltiden hedef iyonları yakalayan mikroorganizmaların kullanılması oldukça başarılı olmuştur. Nanopartiküller oluştukları yere göre intraselüler (hücre içi) ve ekstraselüler (hücre dışı) olmak üzere iki kategoride toplanır (Hulkoti and Taranath 2014). İntraselüler (hücre içi) metotta enzimlerin varlığında nanopartiküllerin oluşması mikrobiyal hücreler içerisinde iyonların taşınmasından oluşmaktadır. Nanopartiküllerin ekstraselüler (hücre dışı) metodu ise enzimlerin varlığında azalan iyonlar ve hücre yüzeyleri üzerinde metal iyonların yakalanmasını içerir (Zhang *et al.* 2011).

Şimdiye dek maya, aktinomisetler, mantarlar, S-layer bakteriler, diatomlar ve magnetotactic bakteriler gibi pek çok mikrop nanoyapılı mineral kristalleri ve metalik nanopartikülleri üretmek için kullanılmıştır. Ayrıca boyut, şekil, kompozisyon ve partiküllerin homojen dağılımının kontrolü de çalışılmıştır (Zhang *et al.* 2011).

Mikroplar üzerinde nanopartikül etkisi büyük dikkat çekmiştir. Nanopartiküller mikrop aktivitelerine yardım edebilmektedir. Çeşitli çalışmalarla mikrobiyolojik reaksiyon oranları üzerine nanopartikül etkisi araştırılmıştır. Reaksiyonlarda katalizör ilavesi, reaksiyon oranlarını değiştirmede yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Nanopartiküllü katalizörler, kullanışlı yüksek aktiviteye sahip belirli yüzeyler ve

benzersiz özelliklerinden dolayı sıkça kullanılan katalizörlerden daha popülerdir. Nanopartiküllü katalizörler çoğunlukla manyetik ve manyetik olmayan malzemelerden oluşmaktadır. Genel olarak nanopartiküllü katalizörler, mikropların aktivitesini arttırmak için hücrelerini bularak mikrobiyolojik reaksiyon hızını teşvik eder (Zhang *et al.* 2011).

2.9. Nanopartiküllerin Biyosentezinde Kullanılan Mikroorganizmalar

Bakteri, mantar, aktinomisetler ve mayalar dahil olmak üzere bir çok mikroorganizmanın intraselüler (hücre içi) veya ekstraselüler (hücre dışı) olacak şekilde mineral kristalleri ve metalik nanopartikülleri sentezleme yeteneğine sahip oldukları bulunmuştur. Bakteri ve mantarların kullanımıyla yapılan nanopartikül ile mayalar ve aktinomisetlerle yapılan nanopartikül biyosentezi kıyaslandığında en fazla ilgiyi bakteriler ve mantarlar çekmiştir. Nanopartikül sentezindeki son araştırmalarda kullanılan mikroorganizmalar Çizelge 2.1’de verilmiştir (Zhang *et al.* 2011).

Çizelge 2.1. Mikroorganizmalar tarafından nanopartiküllerin sentezi

Mikroorganizmalar	Ürünleri	Boyut (nm)
Bacteria		
<i>Klebsiella pneumonia</i>	Ag(0)	5–32
	Ag(0)	2–100
	Ag(0)	1–5
<i>Enterobacteria</i>	Ag(0)	28.2–122
<i>E. coli</i>	Au(0)	20
<i>Plectonema boryanum</i>	Pd(0)	1–20
<i>Shewanella algae</i>	Pt(0)	Around 5
<i>Lactobacillus</i>	TiO ₂	15–35
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ag(0)	160–180
<i>Bacillus subtilis</i>	Ag(0)	5–60
Fungi		
<i>Helminthosporum solani</i>	Au(0)	2–70
<i>Penicillium</i>	Au(0)	<135

Çizelge 2.1. (devam)

<i>Penicillium fellutanum</i>	Ag(0)	5–25
<i>Hormoconis resiniae</i>	Ag(0)	20–80
<i>Trichoderma reesei</i>	Ag(0)	5–50
<i>Fusarium oxysporium</i>	Ag	5–15
<i>Fusarium oxysporum</i>	Barium titanate	4–5
Yeast		
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Au(0)	15

2.10. Nanopartikül Çeşitleri

Çeşitli yöntemlerle sentezlenen çeşitli nanopartiküller bulunmaktadır. En çok araştırılan nanopartikül çeşitleri altın (Au) ve gümüşdür (Ag). Bunların haricinde çinko (Zn), titanyum (Ti), palladyum (Pd), kadmiyum (Cd) gibi elementler ve bu elementlerin oksijen (O) yahut selenyum (Se) gibi elementlerle oluşturdukları bileşiklerle ilgili de araştırmalar oldukça yaygındır. Nanopartiküller metalik elementlerden elde edildiği gibi metalik olmayan elementlerden de elde edilebilmektedir. Bunlardan biri de kalsiyumdur.

Kalsiyumun doğada ve canlı bünyesinde bulunması biyomimetik açıdan dikkat çekmektedir. Doğayı taklit ederek canlılara daha az zararı olacak şekilde yapılan tasarımlar büyük ilgi görmektedir. Nitekim kalsiyum da doğa ve canlıya barışık bir element olduğuna göre kalsiyuma dair yapılan araştırmaların artırılması ve kalsiyum tabanlı malzemelerin geliştirilmesi önem kazanmaktadır.

2.11. Kalsiyum Tabanlı Nanopartiküller ve Uygulama Alanları

Kalsiyum tabanlı nanopartiküller kullanım alanlarına göre; ya doğrudan ya da dolaylı olarak çeşitli şekillerde kullanılmaktadır. Kalsiyum tabanlı nanopartiküllerden en dikkat çeken formları kalsiyum karbonat ve kalsiyum fosfattır. Biyoaktif, biyoyumlu, biyobozunan ve non-toksik özellik göstermelerinden dolayı kullanım alanları oldukça

geniştir. Kalsiyum fosfat ve kalsiyum karbonat nanopartikülleri genelde tıp, dişçilik, ilaç dağıtım sistemleri gibi biyomedikal alanlarda kullanılmaktadır. Kalsiyum karbonat nanopartikülleri ayrıca endüstri de kağıt sanayinde de kullanılmaktadır (Bin *et al.* 2014).

Kalsiyum tabanlı nanopartiküllerin; kompozit oluşturmada, implant tedavisinde, ilaç dağıtımında, kemik dokularında ve iyi bir partikül tutturucu olarak çeşitli alanlarda kullanımını mümkündür.

2.12. Kalsiyum Karbonat Nanopartikülleri

Biyoaktif, biyobozunabilen, biyouyumlu ve non-toksik olan kalsiyum tabanlı nanopartiküller dişçilikte ve ortapedi de dolgu materyali olarak kullanılmaktadır. Kemik ve dişlerin yapısında kalsiyum bulunduğundan dolayı hem biyouyumlu hem de biyobozunan olduğu için canlıya bir zararı olmamaktadır. Non- toksik oluşu canlılardaki kullanım yaygınlığını arttırmada dikkat çeken bir parametredir. İlaç dağıtım sistemlerin de toksisiteyi azalttığı ve hafif asidik pH' da ilaç salınımı gerçekleştirdiği için hedefe özgü akıllı taşıyıcılar olarak kullanılmasına dair çalışmalar mevcuttur (Maurya *et al.* 2013).

Kalsiyum karbonat nanopartikülleri, kullanılabilirliğinin kolay olması, düşük maliyetli olması, non-toksik ve aşındırıcı özelliğinin olmamasından dolayı endüstride yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Kalsiyum karbonatın farklı tip ve boyutları mekanik ve termal özellikleri geliştirmek için polimerlerle birlikte kompozit halde kullanılmaktadır. Literatürde bildirilen polimerler; polietilen, polipropilen, akrilonitril butadiyen sitren, butadiyen kauçuğu, polimetilmetakrilat, polyester amit, poliüretan, polistren, polikarbonat ve sentetik yapıştırıcılardır. Ayrıca kalsiyum karbonat nanopartikülleri doku mühendisliği uygulamaları için polilaktikasit, kitosan ve gluten gibi biyopolimerlerde kullanılmaktadır. Oluşturulan kompozitler mükemmel mekanik özelliklere sahiptirler (Maurya *et al.* 2013).

Ambalajlama uygulamalarında kullanılan biyopolimerlerin zayıf mekanik özelliklerini geliştirmek için oluşturulan nano kompozitler, geleneksel teknolojilere yeni bir alternatif olarak görülmektedir. Geleneksel kompozitler ve polimerlere nazaran ısı direnci, bariyer özellikleri ve mekanik kuvvet açısından gelişme sergiler. Düşük maliyet, çevre uyumluluklarından dolayı gıda ambalaj uygulamalarında iyi bir malzeme seçimi olarak araştırılmaktadır. Bu araştırma doğrultusunda polivinil alkol (PVA) ile kalsiyum karbonat nanopartikülleri ile kompozit oluşturulmaktadır (Kisku *et al.* 2014).

Elde edilen nanopartiküllere uygun alanların aranabildiği gibi çalışma alanına uygun nanopartikül sentezide planlanabilir. Kalsiyum tabanlı nanopartikülleri ile oluşturulan nanokompozitler/kompozitler dişçilikte dentil tübül tıkanıklığının iyileştirilmesinde de kullanılmaktadır (Wang *et al.* 2014).

Omurga kemik tedavisinde ya da kalça kırıklarında implant uygulaması olarak kalsiyum karbonatlı nanopartiküller dolgu malzemesi olarak kullanılabilir.

2.12.1. Kalsiyum karbonat nanopartiküllerinin karakterizasyonu

Nanoteknoloji de genel olarak kullanılan karakterizasyon tekniklerinden bazıları; STM (Taramalı Tıp Mikroskopi), SPM (Taramalı Uç Mikroskopi), SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu), TEM (Geçirmeli Elektron Mikroskobu), AFM (Atomik Kuvvet Mikroskopi) ve MKM (Manyetik Kuvvet Mikroskobu) dir. Kalsiyum karbonat nanopartiküllerinin kullanım alanlarına göre karakterizasyon teknikleri farklılık göstermektedir. Genellikle, SEM, TEM, EDAX ve XRD ile karakterize edilmektedir. Bunun yanında kompozit oluşturmak isteniyorsa AFM ile de görüntü alınabilmektedir (Quester *et al.* 2013; Maurya *et al.* 2013).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar

1. Mikroskop (Boeco BM 180, GERMANY)
2. İnkübatör (Binder BD53, GERMANY)
3. Otoklav (HMC Hirayama Hiclava HV-50L, JAPAN)
4. Steril Kabin (Esco AC2-4E1, SINGAPORE)
5. Çalkalyıcı (Zhicheng ZHWY-200B, CHINA)
6. Magnetik Karıştırıcı (Daihan Scientific MSH 20A, KOREA)
7. pH Metre (InoLab pH730 wtw Series, GERMANY)
8. Derin Dondurucu (Nuaire-86 Ultralow Freezer, NU6613W37, U.S.A.)
9. Hassas Terazı (Mettler Toledo AL204, CHINA)
10. Buzdolabı (Beko BK9470, TÜRKİYE)
11. Saf Su Cihazı (GFL 2004, GERMANY)
12. Santrifüj (Hettich EBA 21, GERMANY)
13. Vorteks (Heidolph Reax Top, GERMANY)
14. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) (Zeiss EVO LS 10, GERMANY)
15. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) (Zeiss EVO LS 10, GERMANY) EDAX
16. XRD (Rigaku powder X-ray diffractometer) (INSPECT S50, U.S.A.)

3.1.2. Çalışmada kullanılan çözelti ve besiyerlerinin hazırlanışı

Trypticase soy agar (TSA): 40 g trypticase soy agar karışımı (Oxoid) 1 L saf su içerisine ilave edilmiştir. Besiyeri otoklavda steril edilmiştir. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır (Barış 2009).

Nutrient Broth (NB): 1 litre saf suya 13 gram nutrient broth ilave edilerek 121°C’de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. 45-50°C’ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır.

Kristal violet: 2 g kristal violet, 20 ml %95’lik etil alkolde çözülmüş ve son hacim steril saf su ile 100 ml’ye tamamlanmıştır. Amber şişe içinde buzdolabında muhafaza edilmiştir (Harley and Prescott 2002).

B-2 Katı Besiyeri (250 mL): Casein 1 gram, D-glukoz 0,25 gram, Tris 3 gram, maya ekstraktı 0,25 gram, Kalsiyum asetat 0,375 gram, Agar 3,75 gram, 250 mL saf su içinde çözümlenip pH 7.4’e ayarlanarak, otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir. 45-50°C’ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır (Demir *et al.* 2014).

B-2 Sıvı Besiyeri (250 mL): Casein 1 gram, D-glukoz 0,25 gram, Tris 3 gram, maya ekstraktı 0,25 gram, Kalsiyum asetat 0,375 gram, 250 mL saf su içinde çözümlenip pH 7.4’e ayarlanarak, otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir (Demir *et al.* 2014).

B-4 Katı Besiyeri (250 mL): Kalsiyum asetat 0,625 gram, maya ekstraktı 1 gram, glukoz 2,5 gram, agar 3, 75 gram, 250 mL saf su içinde çözümlenip pH =7’ye ayarlanarak, otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir. 45-50°C’ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır (Boquet *et al.* 1973; Barış 2009).

B-4 Sıvı Besiyeri (250 mL): Kalsiyum asetat 0,625 gram, maya ekstraktı 1 gram, glukoz 2,5 gram, 250 mL saf su içinde çözümlenip pH =7’ye ayarlanarak, otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir (Barış 2009).

Üreli Besiyeri (350 mL): 7 gram Üre, 3,5 gram NH₄Cl, 0,742 gram NaHCO₃, 1,05 gram Nutrient Broth 350 ml saf su içinde çözümlenip, pH= 8’e ayarlanmıştır. Filtre edilerek steril edilmiştir (De Muynck *et al.* 2010; Akoğuz 2014).

140 gram/L CaCl₂ Çözeltisi: 100 mL saf su içinde 14 gram CaCl₂ çözülerek Millex Syringe-driven Filter Unit marka 0,22 µ'lık steril filtre ile steril edilmiştir.

Yıkama Solüsyonları:

- Saf su
- n-Hexane puriss
- Ethanol absolute (%99'luk)

3.1.3. Çalışmada kullanılan bakteriler

Bacillus arenosi K64, *Paenibacillus polymyxa* K2, *Rhodococcus erythropolis* K85 ve *Bacillus atrophaeus* K101 Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Laboratuvarında bulunan kültür koleksiyonundan alınmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bakterilerin canlandırılması

Çalışmada kullanılacak bakteriler, -80°C'lik ultra derin dondurucuda muhafaza edilen kültürlerden alınarak aseptik koşullar altında trypticase soy agar (TSA) besiyerine ekilmiş ve 28°C'lik etüvde (Şekil 3.1) inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyonun sonunda iyi gelişen kolonilerden tekrar ekim (çizgi ekim) yapılarak izolatların saf olup-olmadıkları kontrol edilmiştir. Saf olduğu gözlemlenen izolatlar diğer çalışmalarda kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

3.2.2. Bakterilerin B-4 katı besiyerinde geliştirilmesi

TSA üzerinde geliştirilerek saf kültürleri hazırlanan bakterilerin genç kolonilerinden öze yardımıyla kristal oluşumunun gözlemlenmesi için hazırlanan B-4 katı besiyerine inoküle edilmiş ve 28°C'lik etüvde (Şekil 3.1) inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.3. Bakterilerin B-2 katı besiyerinde geliştirilmesi

TSA üzerinde geliştirilerek saf kültürleri hazırlanan bakterilerin genç kolonilerinden öze yardımıyla kristal oluşumunun gözlemlenmesi ve sıvı kültür denemeleri için hazır kültürlerin oluşturulması için hazırlanan B-2 katı besiyerine inoküle edilmiş ve 28°C'lik etüvde (Şekil 3.1) inkübasyona bırakılmıştır.



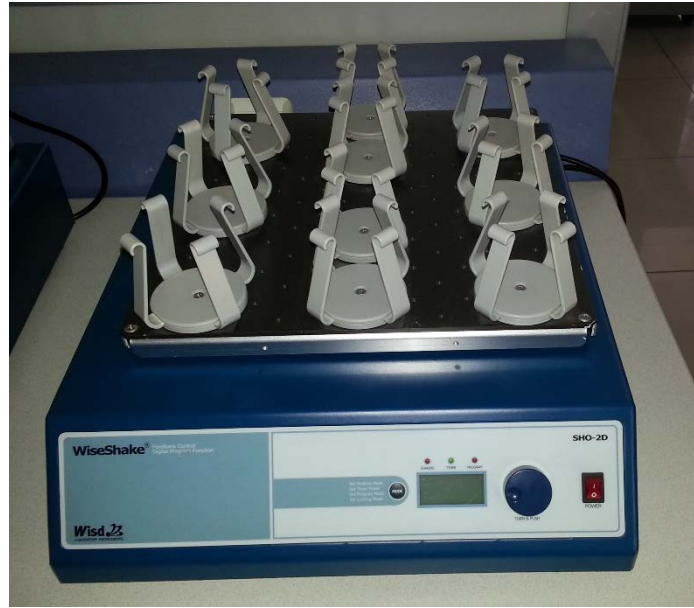
Şekil 3.1. Etüv

3.2.4. Bakterilerin B-4 sıvı besiyerinde geliştirilmesi

B-4 katı besiyerinde geliştirilen bakteriler genç kültürlerden sıvı ortamlarda partikül oluşumunun gözlemlenmesi ve bakterilerin geliştirilmesi için B-4 sıvı besiyerlerine ekilmiş ve beş gün oda sıcaklığındaki çalkalayıcıya (Şekil 3.2) bırakılmıştır.

3.2.5. Bakterilerin B-2 sıvı besiyerinde geliştirilmesi

B-2 katı besiyerinde hazırlanan genç kültürlerden sıvı ortamlarda partikül oluşumunun gözlemlenmesi ve bakterilerin geliştirilmesi için B-2 sıvı besiyerlerine ekilmiş ve beş gün oda sıcaklığındaki çalkalayıcıya bırakılmıştır.



Şekil 3.2. Çalkalayıcı

3.2.6. Bakterilerin üreli sıvı besiyerinde geliştirilmesi

TSA besiyerinde geliştirilen bakteriler genç kültürlerden üreaz aktivitesi kullanılarak CaCO_3 oluşumunu gözlemlemek için Üre içeren özel sıvı besiyerlerine inokülasyonlar

yapılmış ve kültür gelişimi takip edilerek bulanıklığın artması ve aktivitenin yükselmesi için 32°C'de çalkalayıcıda (Şekil 3.3) inkübe edilmiştir.



Şekil 3.3. Çalkalayıcı

3.2.7. Üreli besiyerinde pH optimizasyonu

Bakterilerin gelişimleri ve partikül oluşumlarını dikkate alınarak üreli besiyerinin pH optimizasyonu gerekliliği düşünülmüş ve bu amaçla 4 farklı pH değerinde denemeler planlanmıştır. Hazırlanan besiyerleri filtre ile sterilizasyon işlemi öncesi pH'ları 6, 7, 8 ve 9 olacak şekilde 1N NaOH ve 1N HCl kullanılarak ayarlanmıştır.

3.2.8. Katı kùltürlerde kristal oluşumunun gözlemlenmesi

En ideal bakteri izolatının seçilmesi ve kristal oluşumunun gözlemlenmesi için öncelikle hazırlanan B-4 ve B-2 katı kùltürlerinde ışık mikroskobunda (Şekil 3.4) doğrudan incelemeler yapılmış ve kristal oluşumlarının görüldüğü inkübasyon süresi, şekli ve boyutu belirlenmiştir. Kristal büyümesi gözlemleri kùltürlerin 1., 3., 5., 7., 10., 15., 21. ve 40. gününe kadar tekrar edilmiştir.



Şekil 3.4. Işık mikroskobu

3.2.9. B-4 ve B-2 sıvı kùltürlerde partikül oluşumunun gözlemlenmesi

Katı kùltürlerde yapılan incelemeler ışığında sıvı besiyerlerinde kurulan denemelerde de bakteri izolatlarının seçilmesi ve partikül oluşumunun sıvı ortamlarda gözlemlenmesi için hazırlanan B-4 ve B-2 sıvı kùltürlerinde ışık mikroskobunda (Şekil 3.5) yayma preparatlarda doğrudan ve basit boyama (kristal violet ile) sonrası incelemeler yapılmış ve partikül oluşumlarının görüldüğü inkübasyon süresi şekli ve boyutu belirlenmiştir. Bu işlemlerde daha yüksek büyütmelemlerde görüntüleri fotoğraflayabilmek için kamera ile

entegre ışık mikroskobu kullanılmıştır. İnceleme işlemi kristal büyümesini gözlemleyebilmek için kültürlerin 1., 3. ve 5. güne kadar tekrar edilmiştir.



Şekil 3.5. Kamera entegre ışık mikroskobu

3.2.10. Üreli ortamda geliştirilen kültürlerde partikül oluşumunun gözlemlenmesi

Üre içeren özel sıvı besiyerlerinde geliştirilen kültürler günlük takip edilerek bulanıklık artışının durduğu 3. gün inkübasyona son verilmiştir. Elde edilen kültürlerden yayma preparatlar hazırlanarak basit incelemeler yapılmış ve partikül oluşumu için gereken %2 oranında doygun CaCl_2 (140 g/L) ilavesi işlemine geçilmiştir. Bu işlem sonrası kültürde bulanıklığın değişimi gözlemlenmiş ve karakterizasyon işlemleri için çöktürme işlemi öncesi tekrar ışık mikroskobunda gözlemlenmiştir.

3.2.11. Sıvı kültürlerin çöktürülmesi ve yıkama işlemleri

Yapılan inceleme ve değerlendirmeler sonunda seçilen kültürlerden partiküllerin ayrılmasını sağlamak için santrifüj (Şekil 3.6) kullanılmıştır. 6000 rpm'de ortam ısısında 15 dk santrifüjlenerek çöktürme işlemi yapılmış ve sıvı faz dikkatlice

uzaklaştırılmıştır. Bu safhada elde edilen çökeltiler bakteri ile birlikte görüntülenmek için yıkanmadan kurutulan ve yıkanan örnekler olarak ikiye ayrılmıştır. Yıkanacak örnekler içi çöken katı faz önce saf su ile iki kez yıkanmış, sonra bakteriye ait organik kirleticilerden uzaklaştırılması amacıyla hegzan ile yıkanmış en son olarak kurutma işlemi öncesi etil alkol ile yıkanarak kuruması için 55°C'de 1 saat bekletilmiştir. Tüm yıkama işlemlerinde ilgili sıvı eklendikten sonra tüp vorteks yardımı ile karıştırıldıktan sonra 6000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiş ve sıvı faz uzaklaştırılmıştır.



Şekil 3.6. Santrifüj

3.2.12. Elde edilen Partiküllerinin Karakterizasyonu

Kurutma işlemleri sonunda elde edilen partiküller karakterizasyon işlemlerinin tamamlanması için SEM (Scanning Electron Microscopy = Taramalı Elektron Mikroskobu) (Şekil 3.7), EDAX (Energy dispersive X-ray spectroscopy = Enerji dağılımlı X-Ray Spektroskobu) (Şekil 3.7) ve XRD (X-Ray Diffractometer = X-Ray Difraktometre) (Şekil 3.8) analiz sistemleri kullanılmıştır.

3.2.12.a. SEM analizi

Elde edilen partiküllerin şekil ve boyutlarının belirlenmesi amacıyla hazırlanan preparatlar Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Analitik Kimya Laboratuvarında yer alan cihaz (Şekil 3.7) yardımı ile görüntülenmiştir.

3.2.12.b. EDAX analizi

Elde edilen partiküllerin içeriklerinin belirlenmesi amacıyla hazırlanan preparatlar Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Analitik Kimya Laboratuvarında yer alan cihaz (Şekil 3.7) yardımı ile analiz edilmiştir.



Şekil 3.7. SEM ve EDAX

3.2.12.c. XRD Analizi

Elde edilen partiküllerin kristal yapılarının belirlenmesi amacıyla hazırlanan preparatlar Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Analitik Kimya Laboratuvarında yer alan cihaz (Şekil 3.8) yardımı ile görüntülenmiştir.



Şekil 3.8. XRD

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kullanılan Bakterilerin Morfolojik ve Kültür Özellikleri

Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Bakterioloji Laboratuvarında kültür koleksiyonundan alınan bakterilerden,

Bacillus arenosi K64; çubuk şeklindeki bakterinin çapı 1, boyu 2,5 µm (mikrometre) dir ve uç kısmında endospor oluşturabilmektedir.

Peenibacillus. polymyxa K2; çubuk şeklinde olup 0,8 µm çapında ve yaklaşık 1,2 µm boyunda, hareketli ve endospor oluşturabilmektedir.

Rhodococcus erythropolis K85; çubuk şeklinde olup 1µ çapında ve yaklaşık 2 µm boyunda, hareketli olup ve endospor oluşturamamaktadır.

Bacillus atrophaeus K101; çubuk şeklinde olup yaklaşık 1 µ çapında ve yaklaşık 2-3 µm boyunda, hareketli ve endospor oluşturabilmektedir.

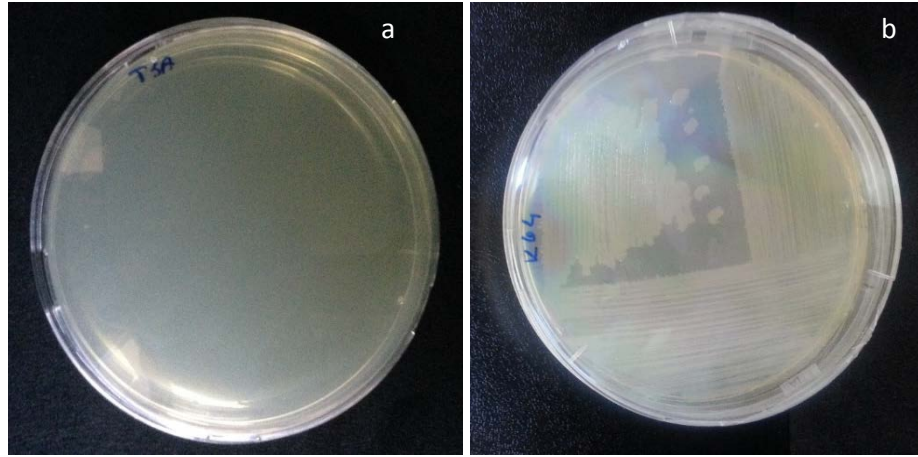
Bakterilerin katı ve sıvı kültürdeki özellikleri Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir (Barış 2009'den alınmıştır).

Çizelge 4.1. Bakterilerin katı ve sıvı kültürdeki özellikleri

Bakteri Adı	Katı Kültürdeki Özellikleri			Sıvı Kültürdeki Özellikleri
	Koloni Rengi	Koloni Şekli	Koloni Kıvamı	
<i>Bacillus arenosi</i> K64	Kül-Mavi	Düzensiz	Macun Kıvamında	Bulanık
<i>Peenibacillus. polymyxa</i> K2	Açık sarı-krem	Düzenli	Tereyağı Kıvamında	Bulanık
<i>Rhodococcus erythropolis</i> K85	Krem	Düzenli	Krem Kıvamında	Bulanık
<i>Bacillus atrophaeus</i> K101	Beyaz	Düzenli	Mukoid	Üstte pelikül

4.2. Bakterilerin Canlandırılması ve İnokulasyon İçin Saf Kültürlerin Eldesi

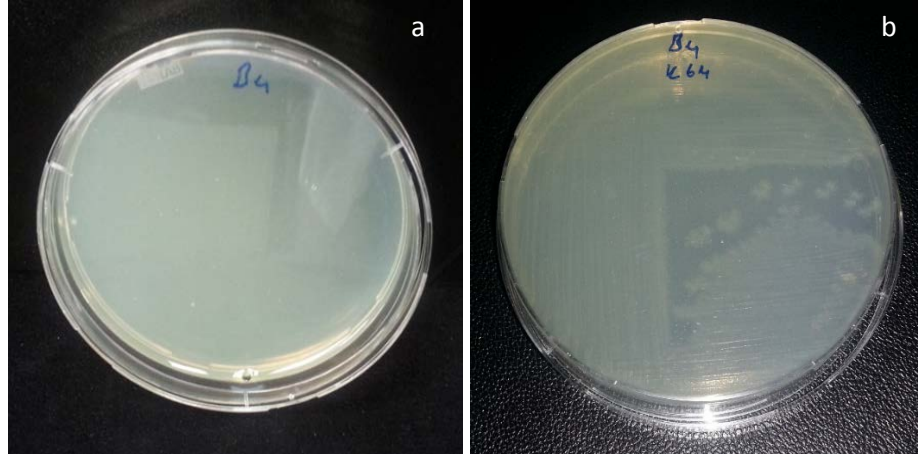
Çalışmada kullanılan tüm bakteriler tripticase soy agar üzerinde iyi gelişme göstermiş ve herhangi bir safsızlık gözlemlenmemiştir. Besiyeri ve kültürü gösteren görüntüler Şekil 4.1.a ve b'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. a. TSA besiyeri, b. TSA'da gelişen kültür

4.3. Bakterilerin B-4 Katı Besiyerinde Geliştirilmesi

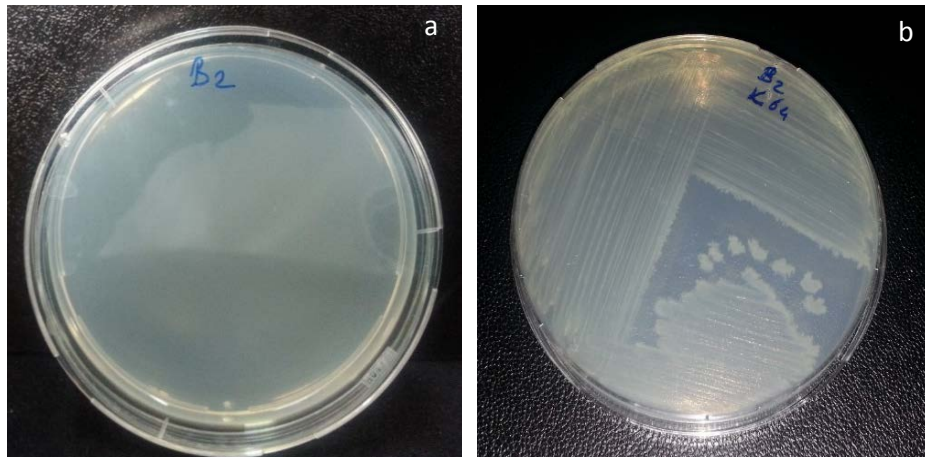
Tripticase soy agar (TSA)'da canlandırılan bakterilerin B-4 katı besiyerine ekimleri yapılmış ve inkübasyon sonunda gelişimler gözlemlenmiştir. Çalışmada kullanılan bütün bakteriler B-4 besiyerinde gelişmiş ve olgun koloniler oluşturmuşlardır. Besiyeri ve kültürü gösteren görüntüler Şekil 4.2.a ve b'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. a. Katı B-4 besiyeri, **b.** Katı B-4’de gelişen kültür

4.4. Bakterilerin B-2 Katı Besiyerinde Geliştirilmesi

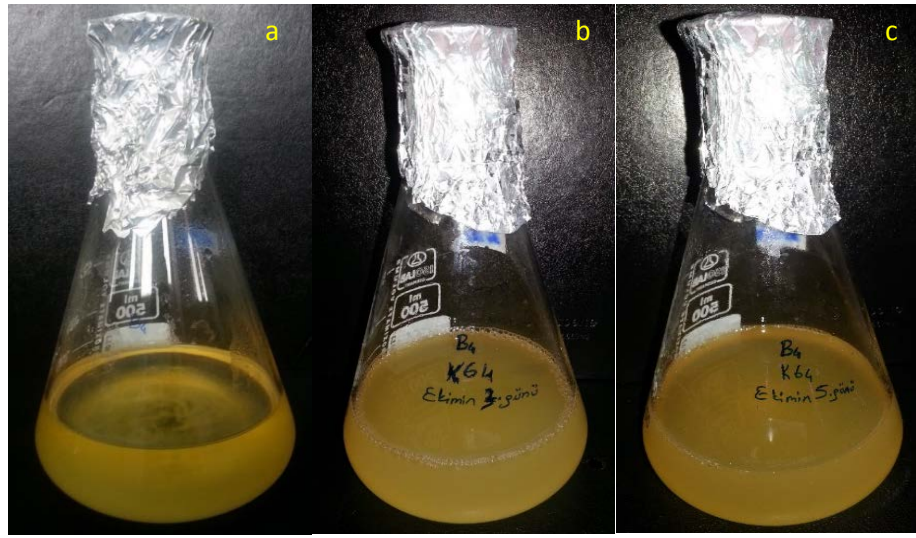
Tripticase soy agar (TSA)’da canlandırılan bakterilerin B-2 katı besiyerine ekimler yapılmış ve inkübasyon sonunda gelişimler gözlemlenmiştir. Çalışmada kullanılan bütün bakteriler B-2 besiyerinde diğer besiyerlerine göre biraz daha zayıf ve geç olmak kaydıyla gelişmiş ve olgun koloniler oluşturmuşlardır. Besiyeri ve kültürü gösteren görüntüler Şekil 4.3.a ve b’de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. a. Katı B-2 besiyeri, **b.** Katı B-2’de gelişen kültür

4.5. Bakterisinin B-4 Sıvı Besiyerinde Geliştirilmesi

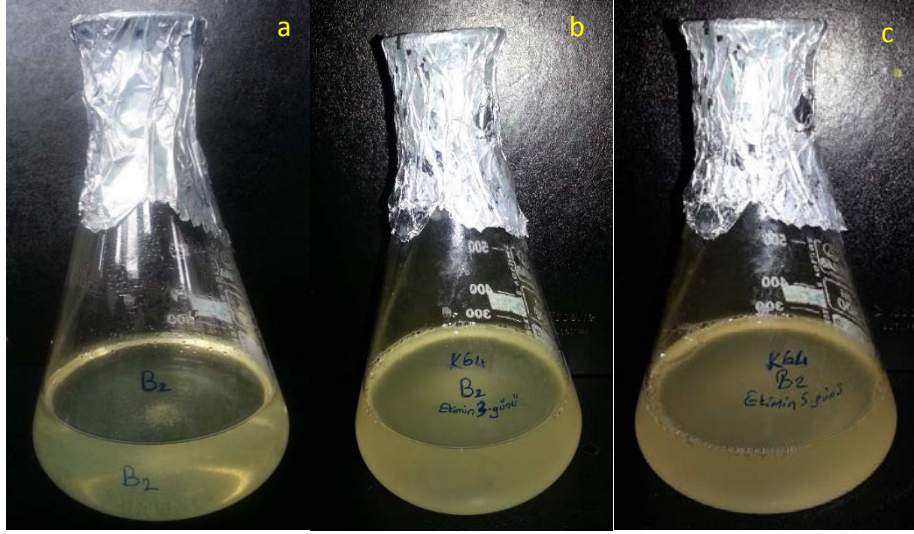
B-4 besiyerinde geliştirilen bakteriler ön adaptasyonu sağlanmış olarak sıvı B-4 besiyerine alınmış ve çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı ortamda çok daha yüksek hızla gelişen kültürlerde partikül oluşumu takip edilmiştir. Kültürün farklı günlerinde bulanıklığı gösteren görüntüler Şekil 4.4.a, b ve c'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. a. Sıvı B-4 besiyeri, b. Sıvı B-4 besiyerinde 3 günlük kültür, c. Sıvı B-4 besiyerinde 5 günlük kültür

4.6. Bakterilerin B-2 Sıvı Besiyerinde Geliştirilmesi

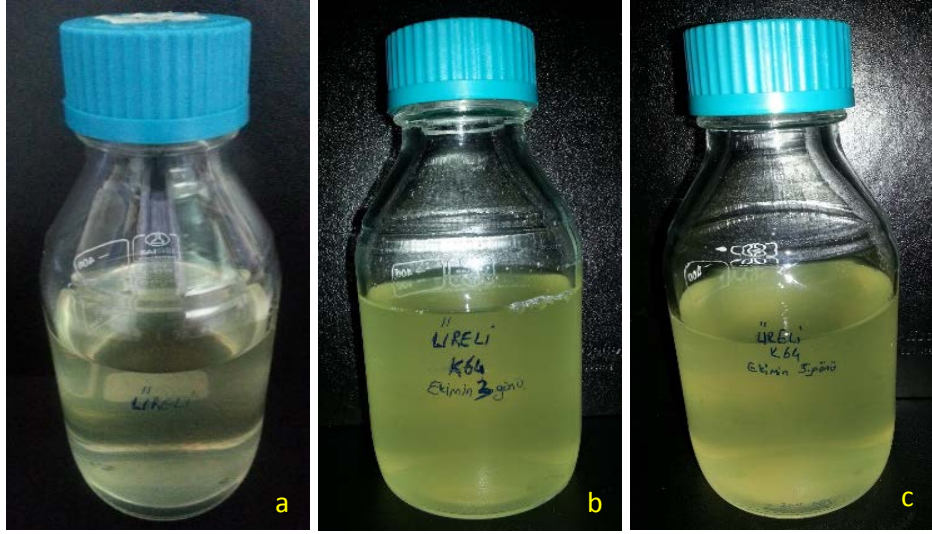
B-2 besiyerinde geliştirilen bakteriler ön adaptasyonu sağlanmış olarak sıvı B-2 besiyerine alınmış ve çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı ortamda katı B-2 besiyerine göre daha yüksek hızla gelişen kültürlerde partikül oluşumu takip edilmiştir. Kültürün farklı günlerinde bulanıklığı gösteren görüntüler Şekil 4.5.a, b ve c'de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. a. Sıvı B-2 besiyeri, **b.** Sıvı B-2 besiyerinde 3 günlük kültür, **c.** Sıvı B-2 besiyerinde 5 günlük kültür

4.7. Bakterilerin Üreli Besiyerinde Geliştirilmesi

TSA besiyerinde geliştirilen bakteriler Üreli sıvı besiyerine alınmış ve çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı ortamda bulanıklık artışı takip edilmiş ve bulanıklık artışının kesildiği gün belirlenerek inkübasyon 3. gün sonlandırılmıştır. *B. arenosi* K64 bakterisine ait kültürün farklı günlerinde bulanıklığı gösteren görüntüler Şekil 4.6.a, b ve c'de gösterilmiştir. Çalışmanın bu aşamasına kadar 4 bakteri ile yapılan denemelerin değerlendirilmesi sonucunda çalışmaya *B. arenosi* K64 ile devam edilmiştir. Bu bakteri ile devam edilmesinin sebebi; en iyi ve hızlı gelişen suş olmasının yanısıra özellikle üreli besiyerinde meydana getirdiği yüksek kültür hızı olarak belirtilebilir. Bu sonuçlara tartışmada ayrıca değinilecektir. Diğer bakterilerin üreli besiyerinde 7. Gün sonundaki görüntüleri Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



Şekil 4.6. a. Üreli besiyeri, **b.** Üreli besiyerinde 3günlük kültür, **c.** Üreli besiyerinde 5 günlük kültür



Şekil 4.7. K2, K85 ve K101 bakterilerinin Üreli besiyerinde gelişmesi

4.8. Üreli Besiyerinde pH Optimizasyonu

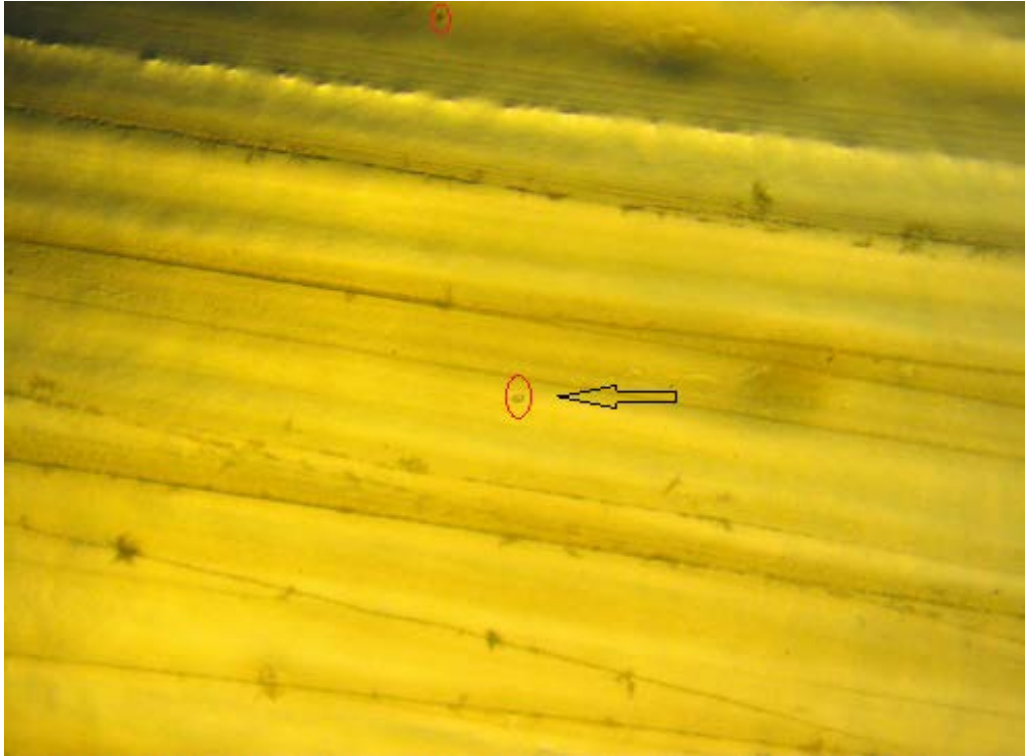
Dört farklı pH'da hazırlanan üreli besiyerlerinde bakterilerin gelişimleri dikkate alınarak en iyi sonucu veren deneme pH 8 olarak belirlenmiştir. Yapılan ilk

denemelerden sonra kurulan tüm denemelerde bu pH değeri ile üreli besiyeri hazırlanmıştır.

4.9. Katı Kültürlerde Kristal Oluşumunun Gözlemlenmesi

B-4 ve B-2 katı kültürlerde kristal oluşumunu gözlemek için ışık mikroskobu kullanılmış ve elde edilen sonuçlar kaydedilmiştir. Diğer çalışmalardan elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonucunda çalışmaya *B. arenosi* K64 bakterisi (NCBI'da kayıtlı GenBank numarası KR873397) kullanılarak devam edilmiştir.

B. arenosi K64 bakterisinin geliştirildiği B-4 katı kültüründe yapılan gözlemlerde 3. günden itibaren kristal oluşumu gözlenmeye başlanmıştır. B-4 katı besiyerinde kristal oluşumu 3. günden itibaren hızlı geliştiği ve kristallerin büyüdüğü 5. günde yoğun bir kristal oluşumu gözlemlenmiştir. Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da kristaller görülmektedir.

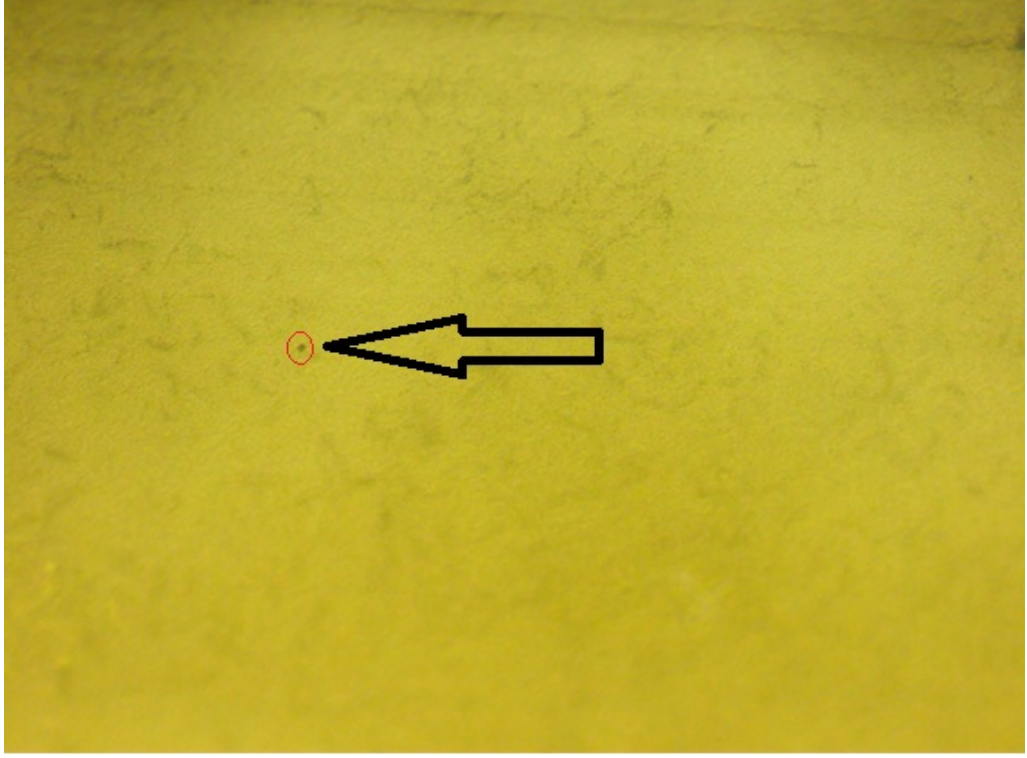


Şekil 4.8. Katı B-4'te 3 gün sonrasında oluşan kristal



Şekil 4.9. Katı B-4'te 5 gün sonrasında hızlı bir şekilde büyüyen kristaller

B. arenosi K64 bakterisinin geliştirildiği B-2 katı kültüründe 5. günden itibaren kristal oluşumu gözlenmeye başlanmıştır. B-2 katı besiyerinde kristal oluşumunun yavaş bir şekilde gerçekleştiği gözlemlenmiş ve Şekil 4.10'da kristal görülmektedir.

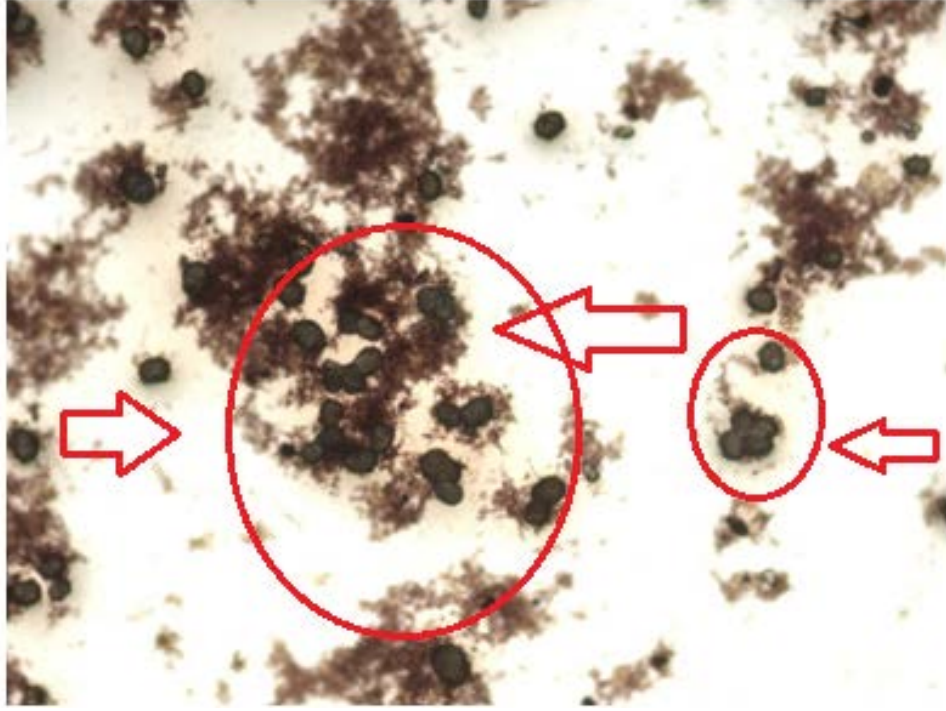


Şekil 4.10. Katı B-2 besiyerinde 5 günden sonra oluşan kristal

4.10. Sıvı Kültürlerde Partikül Oluşumunun Gözlemlenmesi

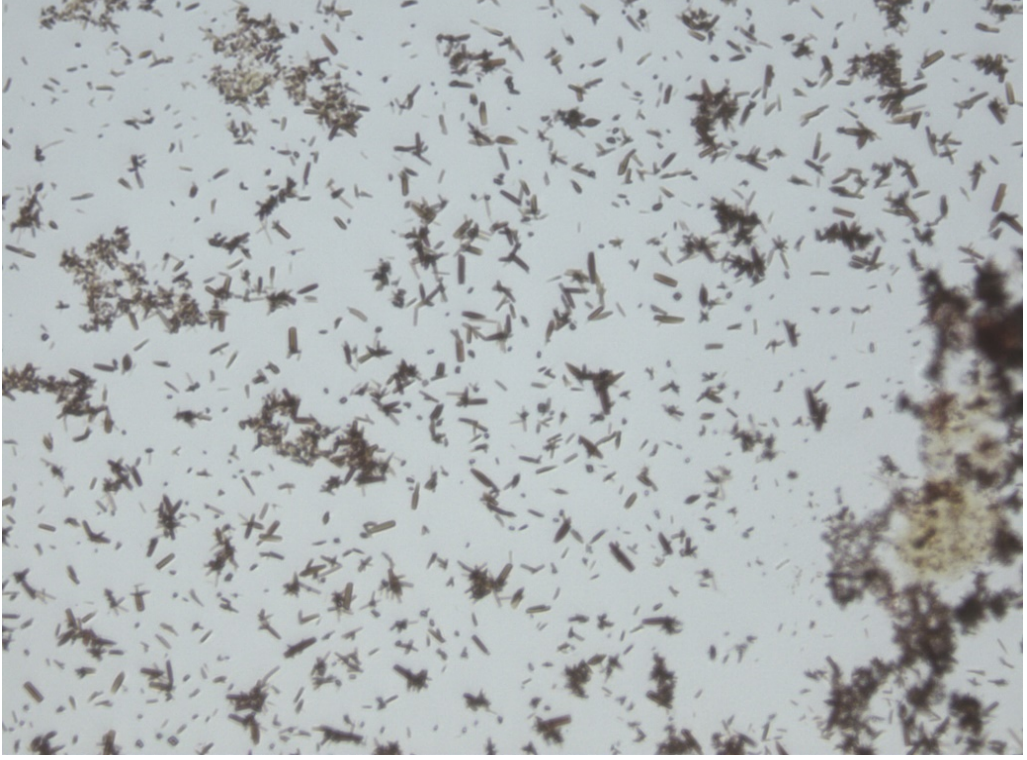
Sıvı kültürlerden hazırlanan yayma preparatlar önce doğrudan gözlemlenme sorunu olması veya partiküllerin gözlemlenememesi durumunda basit boyama işleminden sonra ışık mikroskopunda incelenmiştir. Görüntülerde daha yüksek büyütmelere ihtiyaç duyulması ve bu görüntülerin kaydedilmesi işlemini kolaylaştırmak için entegre kamerası bulunan mikroskop tercih edilmiştir. İncelenen preparatlardan elde edilen görüntüler kayıt altına alınmıştır.

B. arenosi K64 bakterisinin geliştirildiği B-4 sıvı kültüründen boyanarak hazırlanan preparatta ışık mikroskopu altında görülen partiküller Şekil 4.11'de gösterilmektedir.



Şekil 4.11. Sıvı B-4 kültüründen hazırlanan yayma preperatın ışık mikroskopunda 10X4 büyütmedeki görünümü

B-2 sıvı besiyerinde oluşan partiküller yavaş bir şekilde oluşmakta ve çok küçüktürler. Basit boyama yöntemiyle hazırlanan preparat ile elde edilen görüntü Şekil 4.12’de verilmiştir. Işık mikroskobu altındaki yapılan uzun incelemeler ve aramalar sonunda preparatta herhangi bir partikül gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.12. Sıvı B-2 kültüründen hazırlanan yayma preperatın ışık mikroskopunda 10X40 büyütmedeki görünümü

Hazırlanan ürel besiyerine doymun CaCl_2 (140 gram/Litre) çözeltisinin %2 oranında ilavesi ile hızlı bir şekilde oluşmaya başlamıştır ve partiküller Şekil 4.13'deki gibi beyaz renkte gözlenmiştir. Bir müddet beklendikten sonra oluşan partiküllerin dibe çöktüğü görülmüştür.



Şekil 4.13. *B. arenosi* K64 bakterisinin bulunduğu üreli besiyerine 140 gram/Litre CaCl_2 çözeltisinin ilavesi ile oluşan kalsiyum karbonat partikülleri

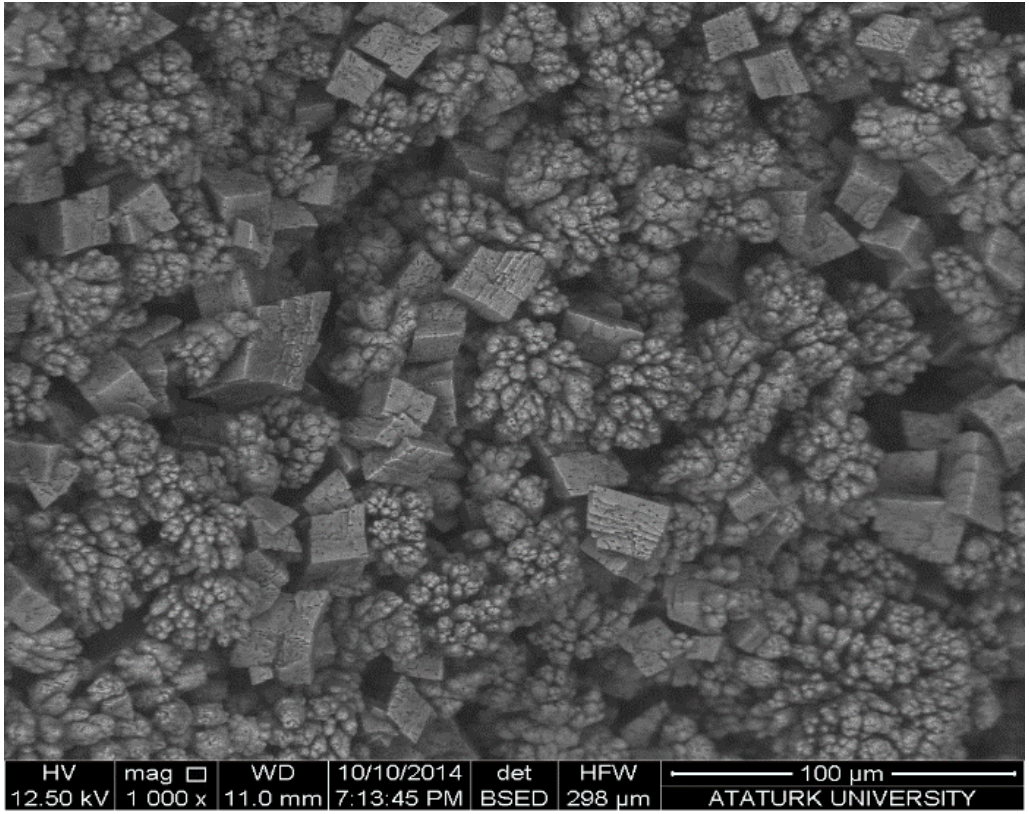
4.11. Sıvı Kültürlerden Elde Edilen Partiküllerin Hazırlanması

Tüm katı ve sıvı kültür denemeleri sonunda elde edilerek kullanılacak partiküllerin sıvı kültürlerden karakterizasyona taşınabileceği belirlenmiştir. Katı kültürlerde kristalin daha hızlı büyümesinde ve nanoboyutta partikül görüntülenmesinde diğer karakterizasyon tekniklerine uygun olmadığından dolayı sıvı kültürlerden elde edilen örnekler değerlendirmeye alınmıştır. Sıvı kültürlerden santrifüj yardımı ile ayrılabilen kitle hem yıkanmadan hemde çeşitli yıkama basamaklarından sonra görüntülenmiştir. Yıkanmadan yapılan incelemeler bakterinin partikül ile olan ilişkisinin belirlenmesi ve ortamda varlığının gösterilmesi amacıyla yürütülmüştür. Partikülün karakterize edilmesi amacıyla yapılan asıl çalışmalarda ise yıkama işlemleri ile gerek besiyeri kalıntıları gerek ise bakterilere ait kalıntılar uzaklaştırılmaya çalışılmıştır.

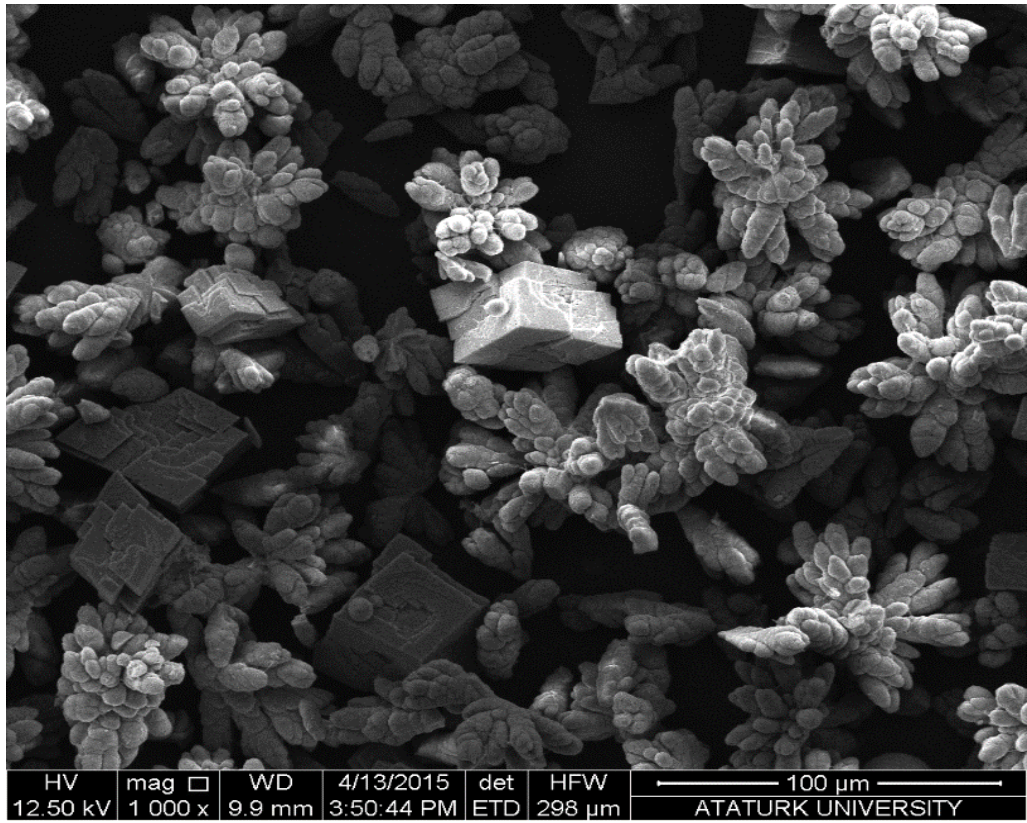
B. arenosi K64 bakterisi aracılığıyla biyosentez yöntemiyle elde edilen kalsiyum karbonat nanopartiküllerinin SEM, EDAX ve XRD analizleri yapılmıştır.

4.11.1. SEM görüntüleri

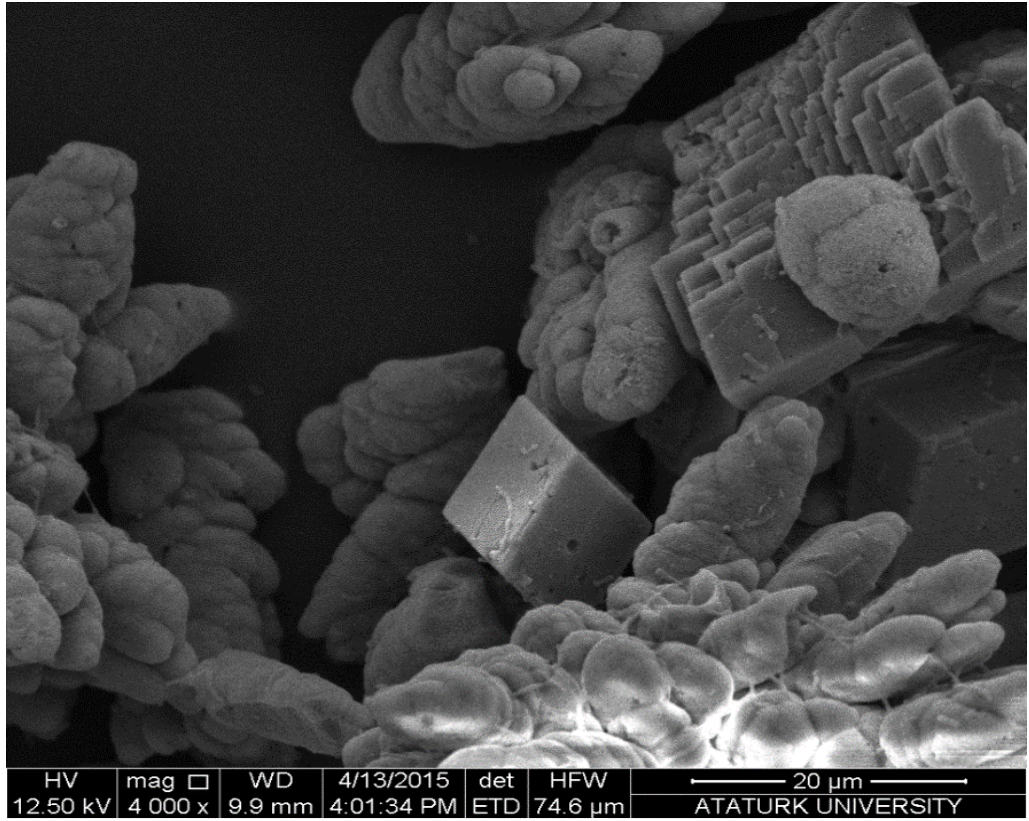
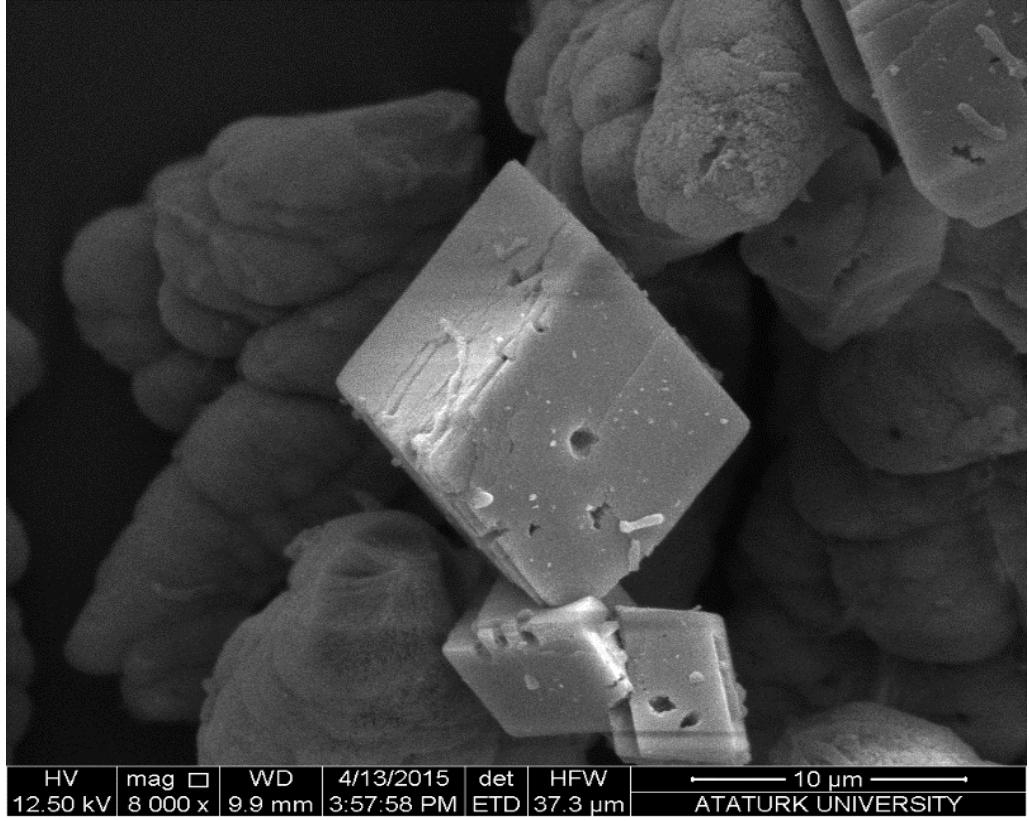
Üreli besiyerinde *B. arenosi* K64 bakterisi aracılığıyla biyosentez yöntemiyle elde edilen kalsiyum karbonat nanopartiküllerinin SEM görüntüleri Şekil 4.14'de gösterilmiştir. Elde edilen partiküllerin nano boyutta olması için çalışmalar devam etmektedir.



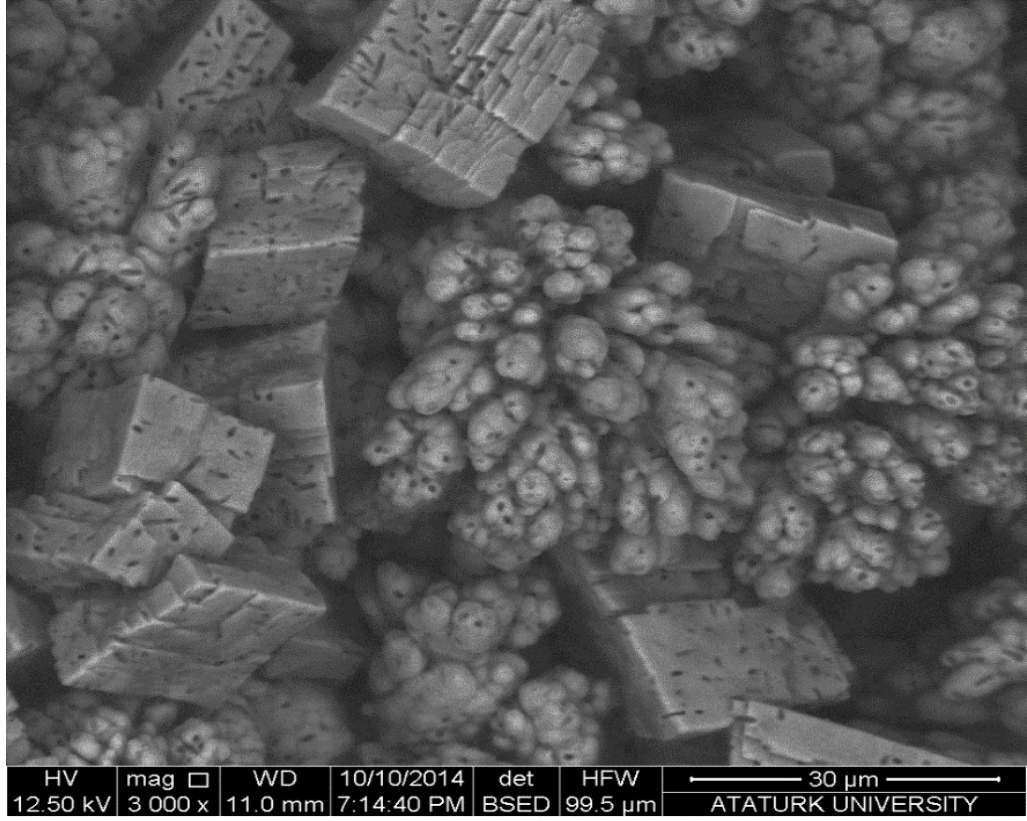
Şekil 4.14. SEM görüntüsü



Şekil 4.14. (devam)



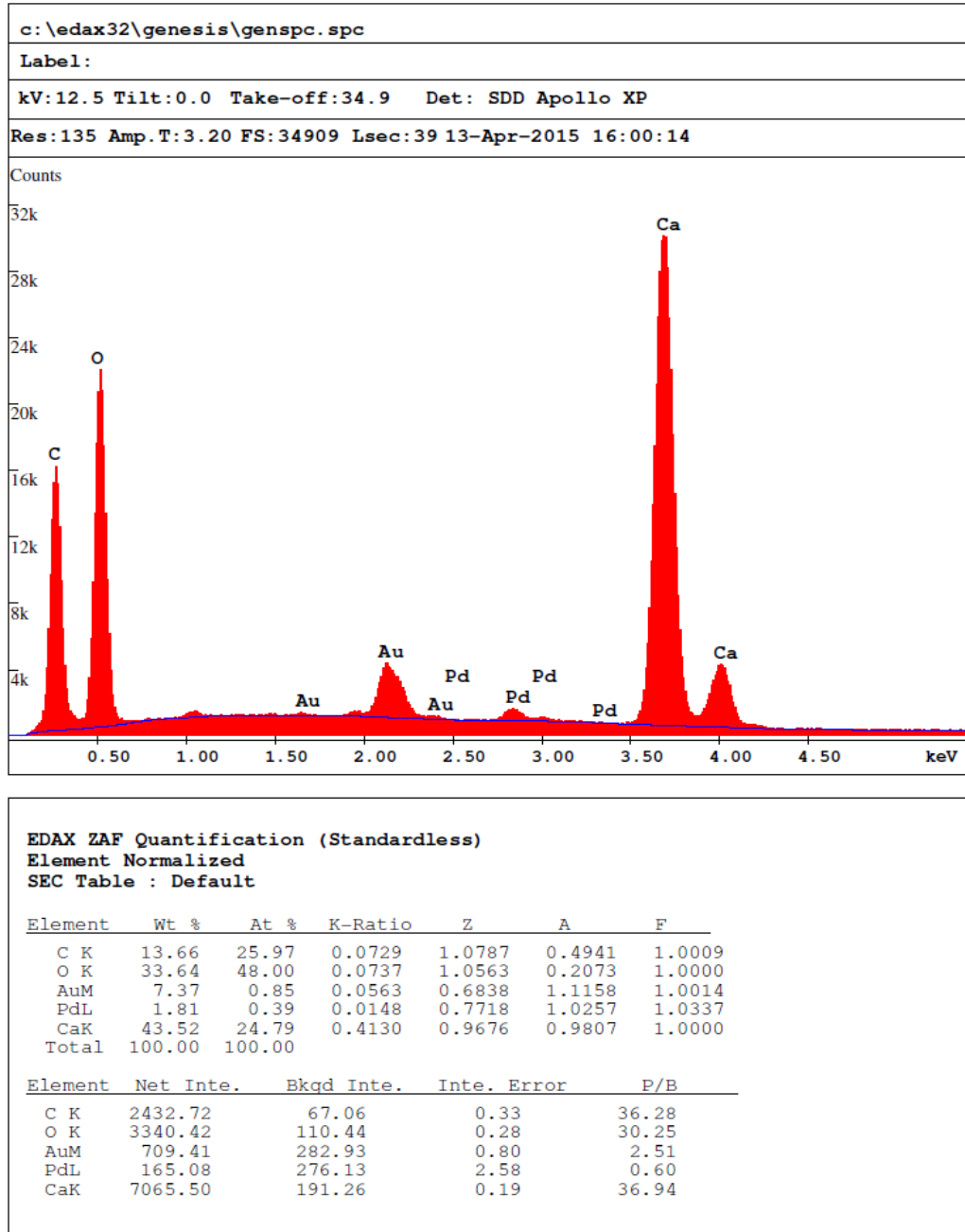
Şekil 4.14. (devam)



Şekil 4.14. (devam)

4.11.2. EDAX analizi

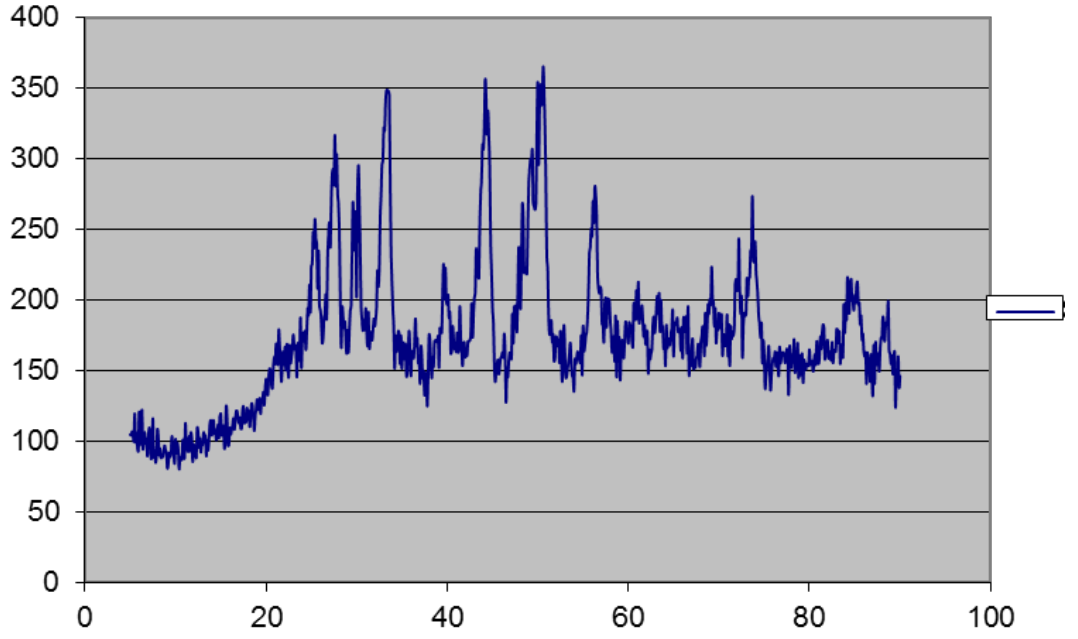
Elde edilen partiküller SEM ile görüntüledikten sonra entegre ünite yardımı ile EDAX analizi alınmış ve elde edilen grafik ve analiz tablosu Şekil 4.15’de gösterilmiştir.



Şekil 4.15. EDAX analiz sonucu

4.11.3. XRD analizi

Elde edilen partikülün yapısal analizi için XRD yöntemi kullanılmış ve elde edilen grafik Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



Şekil 4.16. XRD sonucu

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Canlı bilimi ile ilgilenen bilim insanları için kaliteli yaşamın sürekliliğinin araştırılması dikkat çeken bir konudur. Bu bağlamda öncelikli olarak canlı için gerekli olan materyallerin incelenmesi ise önem arz etmektedir. Bu nedenle belki de araştırmaya ilk başlanması gereken yer canlı bünyesinde bulunan elementlerin incelenmesi olabilir. Bu konuda da canlıda bol miktarda bulunan elementlerden başlamak gerekirse kalsiyumun ilk sıralarda yer alması kaçınılmazdır.

Kalsiyum canlıda bol bulunduğu gibi doğada da bol miktarda bulunmaktadır. Canlıların yaşamına olanak sağlayan gezegenimiz, dünyada canlılığın oluşumuna ait ilk gözlemler, kalsiyumlu bileşikler olan kalsitlerin kayalarda bulunmasıyla ortaya çıkmıştır (Çökmüş 2009). Gezegenimizin oluşumundan sonra meydana gelen kayalar, canlılığın sürdürülebilmesi için ihtiyaç duyulan suyun varlığının bir göstergesidir. Dolayısıyla kalsiyum doğa ve canlı ile iç içe olan ve canlılığın oluşmasından günümüze kadar gelen biyoçeşitliliğin varlığı ve devamı önem arz eden bir kanıt olarak karşımıza çıkmaktadır (Al-Marzouqi *et al.* 2010; Fang *et al.* 2014).

Kalsiyum canlılar için önemli görevlere sahiptir. Kompleks canlılar için sağlam bir yapı oluşturmasının yanı sıra kas kasılması, sinir hücrelerinde sinyal iletimi, büyüme faktörü olarak hücresel süreçlerde, ikinci mesaj sinyallerini kalsiyuma bağlı fosfat ve kinesisler ile iletim yoluna iletmede ve hücre iskeleti proteinlerini düzenlemede görev almaktadır. Kalsiyum iyonları neredeyse tüm hücre sistemlerinin fizyolojik süreçlerinde yer almaktadır (Becker 2005; Çavuş 2007).

Yeryüzünde bulunan elementler birbirleriyle etkileşim halinde buldukları için doğada serbest halde bulunmayabilirler. Nitekim kalsiyum da doğada çoğunlukla bileşikler halinde bulunmaktadır. Kalsiyumlu formlardan en sık karşılaşılanı karbonatlı yapılardır. Karbonatlı bileşiklerin farklı kristal yapıları ve içeriklerindeki farklılıklardan dolayı kalsit, dolomit, aragonit, vaterit ve ikaite gibi farklı isimler almaktadır (Skinner and Jahren 2003; Becker 2005).

Kalsiyum karbonatlar önemli ölçüde biyomineralizasyon ile oluşmaktadır. Biyomineralizasyon yine canlıların içinde olduğu bir olaydır. Canlıların özellikle mikroorganizmaların buldukları çevredeki metallerle ve minerallerle girdikleri fiziksel ve kimyasal etkileşimler sonucunda gerçekleşen olaya verilen isimdir (Gadd and Raven 2010).

Canlılar ile kalsiyumun doğrudan veya dolaylı ilişkisi vardır. Mikroorganizmaların çevreye sağladıkları katkı büyüktür ve yeryüzündeki döngülerin gerçekleşmesinde önemli payları vardır. Ayrıca denizlerdeki protozoalar aracılığıyla kalsiyum karbonatların mineralizasyonu ile atmosferdeki karbondioksit salınımı azalmaktadır. Bu sayede atmosfere salınan karbondioksiti dengede tutmaya yardımcı olmaktadır. Alkalin karbonata ve pH'ya bağlı olarak karbondioksit, karbonat minerallerini oluşturmak için kalsiyum, magnezyum gibi katyonları bağlayabilen karbonat iyonları olarak suda bulunmaktadır. Suda bulunması olayı canlılık için kalsiyum karbonatların gerekli olduğunun bir göstergesidir (Becker 2005; Dupraz *et al.* 2009).

Kalsiyum bir nanomalzeme olarak değerlendirilebilmektedir. Kalsiyumlu partiküller nano boyuta indirildiğinde hem farklı özellikler kazanıp kazanmayacağı hem de kullanım alanlarına göre avantajlı olup olmayacağı araştırılmaktadır. Son yıllarda konu ile ilgili çalışmalar dikkat çekici oranda artmaktadır (Ueno *et al.* 2005; Asanithi 2013; Melo *et al.* 2013; Wen *et al.* 2013; Bin *et al.* 2014; Cao *et al.* 2014; Chiang *et al.* 2014; Handley-Sidhu *et al.* 2014; Jang *et al.* 2014; Jeong *et al.* 2014; Jiang *et al.* 2014; Kutbay *et al.* 2014; Lin *et al.* 2014; Makarov *et al.* 2014; Panda *et al.* 2014; Paques *et al.* 2014; Preeti 2014; Shaikh and Supit 2014; Wang *et al.* 2014; Wu *et al.* 2014).

Yeryüzünde en sık karşılaşılan beşinci element olan ve canlılarda kemik ve dişlerin yapısında bol miktarda bulunan kalsiyum, nanopartikül olarak elde edildiğinde restorasyon çalışmalarında, kağıt endüstrisinde, tıp ve dişçilik gibi biyomedikal alanlarda kullanılabilmesi kaçınılmazdır (Liu *et al.* 2013; Wen *et al.* 2013; Makarov *et al.* 2014; Paques *et al.* 2014; Wu *et al.* 2014).

Kalsiyumlu bileşiklerin porozlu yüzeye sahip olması kullanım avantajı sunmaktadır. Özellikle de biyomedikal alanlarda kemik dokunun onarılması için uygun

biyobozunabilir bir nanomalzeme olarak karşımıza çıkmaktadır (Asanithi 2013; Wen *et al.* 2013; Wu *et al.* 2014).

Kalsiyum nanopartikülünün sentezlenmesi için çeşitli fiziksel veya kimyasal yöntemler bulunmaktadır. Ancak sentez yöntemleri hem sentezlenen madde için hem de doğa ve canlı için önem arz etmektedir. Biyolojik yolla sentez hariç diğer yöntemlerin hem çok pahalı olması hem de ağır kimyasalların kullanımından dolayı toksik maddelerin emilimine neden olabilir. Doğaya ve canlıya zararlı olmasından dolayı yeni yöntemler araştırılmakta ve son yıllarda oldukça önem kazanan biyosentez öne çıkmaktadır. Çevreye ve doğaya uyumlu bir yöntem olan biyosentez ile çevreye ve doğaya uyumlu bir malzeme olan kalsiyum sentezlenmesinin kullanım avantajları sağladığı konusunda literatür bilgileri mevcuttur (Hulkoti and Taranath 2014).

Diğer nanopartiküllerin sentez yöntemlerinde olduğu gibi kalsiyum tabanlı nanopartiküllerin sentezinde bazı kimyasal yöntemler kullanılmıştır. Bunlardan bazıları sol-jel metodu, presipitasyon, hidrotermal, ters mikroemülsiyon ve katı hal reaksiyonlarıdır. Ters mikro emülsiyon ve hidrotermal gibi metotlarla zayıf bir şekilde çöktürülmüş kalsiyum tabanlı nanomalzeme elde edilmiştir. Presipitasyon işlemi ise basit, düşük maliyetli ve endüstriyel üretim için uygundur fakat elde edilen nanomalzeme düşük kalitede büyük partiküllerin ve topaklanmaların oluşmasına neden olmaktadır (Cengiz *et al.* 2008).

Cengiz ve arkadaşları (2008), kalsiyum tabanlı nanopartikül sentez yöntemlerinin iyileştirilmesi için ilk kez CaP-Tris çözeltisini kullanmışlardır. Böylece fosfatlı yetiştirme ortamı sağlanarak, oluşan topaklanmanın önlenmesi için polietilen glikol (PEG) kullanmış ve ultrasonikasyon ile muamele etmişlerdir. Sentez yöntemlerini iyileştirmek ve geliştirmek için çeşitli araştırmalar yapılmış ve biyosentezin diğer yöntemlere kıyasla daha avantajlı olduğu vurgulanmıştır. Biyosentez ile biyoyumlu malzemelerin üretilmesi ve diğer yöntemler için kullanılan kimyasalların toksik ve pahalı olmasından dolayı bu metod son yıllarda daha dikkat çekmektedir (Asmathunisha and Kathiresan 2013; Hulkoti and Taranath 2014).

Biyosentez ile elde edilen partiküllerin hücre içinde mi yoksa hücre dışında mı olduğu (Handley-Sidhu *et al.* 2014; Hulkoti and Taranath 2014) özellikle belirlenmesi gereken bir konudur. Partikülün oluşma şekli ve yeri ile ilgili literatürde farklı yaklaşımlar olmakla beraber bu çalışmadaki kalsiyum karbonat partiküllerinin hücre dışında olduğu yapılan analizler sonucunda gösterilmiştir. Bunu kanıtlayan iki olgu vardır. Birincisi bakterileri ektiğimiz katı kültür ışık mikroskobu altında incelendiğinde kolonilerin dışında görülen kristallerin olması; ikincisi ve belki de en önemli kanıtı SEM’de görüntü alındığında bakterilerin oluşturdukları partikülde iz bırakmalarınıdır.

Mevcut literatürler dikkate alındığında özellikle metalik nanopartiküllerin, en çok da altın ve gümüş nanopartikülleri üzerinde çalışıldığı görülmektedir. Bu çalışma yoğunluğuna rağmen metalik olmayan nanopartiküller ile ilgili çalışmalar literatürde yetersizdir. Yapılan tüm literatür incelemeleri hem çok fazla kullanım alanı buldurması, hem çalışma sayısının yetersizliği hem de biyosentez yoluyla çalışma kolaylıkları bu çalışmada kalsiyum tabanlı nanopartiküllerin seçilmesinde büyük önem taşımaktadır.

Sentezlenen nanopartiküllerin özellikleri çok yönlü ve dikkatle araştırıldığında çok fazla kullanım alanları, önemli teknolojik ve medikal faydaları olduğu kadar göz ardı edilemeyecek zararlarının olduğu da bilinmektedir. Bu nedenle nanopartiküllerde aranan en önemli özellikler arasında, toksisitesinin hiç olmaması veya az olması, biyobozunurluk ve biyoyumluluk değerli parametreler olarak sıralanabilir. Bu özelliklerin kalsiyum tabanlı partiküllerde bulunması bu partiküllerin kıymetini arttırmaktadır (Cengiz *et al.* 2008; Liu *et al.* 2013; Lin *et al.* 2014).

Kalsiyum tabanlı nanopartiküllerin biyosenteziyle ilgili olarak mevcut literatürlerdeki yapılan çalışmalarda kullanılan mikroorganizmalar ve nanopartikül çeşitlerine dair araştırmalar çok yeterli olmadığından ön denemeler yapılmıştır. Bunun için de dört biyomineralizasyon yeteneği önceden bilinen bakteriyal izolat ile öncelikle katı besiyerleri hazırlanıp ışık mikroskobunda incelemeler yapıldıktan sonra sıvı besiyerleri ile denemeler yapılmıştır. Bu deneme çalışmaları birbirleriyle kıyaslanarak devam edecek çalışmalarda kullanılacak en iyi bakteri örneği gözlemlenmiş ve çalışmalara bu örnek ile devam edilmiştir.

Çalışmada kullanılan izolatlar *Bacillus arenosi*K64, *Paenibacillus polymyxa* K2, *Rhodococcus erythropolis* K85 ve *Bacillus atrophaeus* K101 bakterilerinin Tripticase soy agar (TSA)'da canlandırılmasında sorun olmamıştır.

Öncelikli olarak hazırlanan katı kültürlerin ışık mikroskopunda incelenmesindeki amaç ilk olarak B-4 ve B-2 besiyerlerinde bakterilerin gelişip gelişmeyeceğini görmek daha sonra ise kullanılan bakterilerin kristal oluşturup oluşturmadığını gözlemlemek ve kristal hakkında bilgi edinmektir. Katı kültürlerde gelişme gösteren bakterilerin ışık mikroskopu altında incelenmesiyle kristal oluşturabildikleri ve kristallerin bakterilerin koloni içinde ve/veya dışında oluşumları gözlemlenmiştir.

B-4 ve B-2 katı besiyerlerine ekilen bakterilerin B-4 katı besiyerinde, B-2'ye nispeten daha iyi geliştiği görülmüştür. Ayrıca B-2'deki kristal oluşumu B-4 katı besiyerine oranla daha yavaş ve daha küçüktür. Dolayısıyla çalışmaya devam etmek için B-2 ve B-4 katı besiyerlerindeki izolatların gelişimi ve de kristal oluşturmaları göz önüne alındığında B-2'de kristal oluşturma süresi uzun ve kristaller küçüktür. B-4'te ise kristal oluşum süresi üç gündür fakat üç günden sonra kristallerdeki büyüme hızının fazla olduğu görülmüştür. Katı kültürlerde ışık mikroskopuyla gözlemlenen partiküllerin izolasyonu SEM, EDAX ve XRD gibi karakterizasyon teknikleri için mümkün olmadığından çalışmalara sıvı besiyerleri ile devam edilmiştir.

B-2, B-4 ve Üreli sıvı besiyerleri ile yapılan çalışmalarda B-2 ve B-4'e katı besiyerlerinden sıvı besiyerlerine ekim yapılmıştır. Buradaki amaç bakterilerin besiyerlerine uyum sürecinin kısılması ve bakteri faaliyetinin kısa zamanda artmasını sağlamaktır. Üreli besiyerine ise TSA' da canlandırılan bakteriler ekilmiştir.

Hazırlanan sıvı besiyerleri katı besiyerleri ile karşılaştırıldığında katı B-2 kültürüne göre, sıvı B-2 kültüründe bakteriler daha hızlı gelişmiştir. Sıvı B-4 kültürde katı besiyerine oranla bakteriler daha iyi gelişmiştir. B-2 sıvı da partikül gelişimi gözlemlenmediği için B-2 sıvı besiyeri ile çalışmalara devam edilmemiştir. B-4 sıvı kültürlerde bakteriler iyi gelişmiş partiküllerin oluşumu da güzel bir şekilde gözlemlenmiştir fakat çöktürme ve yıkama işlemleri sonrası elde edilen çökelti miktarı karakterizasyon için yeterli olmadığından çalışmalara üreli besiyeri ile devam edilmiştir.

Hazırlanan sıvı besiyeri içerikleri dikkate alındığında mikroorganizma için gerekli olan karbon ve azot kaynağındaki farklılıklar, kullanılan tampondan (Tris) kaynaklanmaktadır.

Üreli besiyerindeki gelişimi iyileştirmek ve partikül oluşumunu arttırmak için pH optimizasyonuna gidilmiştir. Ortamın pH değerlerini 6, 7, 8 ve 9 olarak ayarlayarak optimum pH değeri bulunmaya çalışılmıştır. Bu dört farklı pH'da en iyi sonucu pH'sı 8 olan ortam sağlamıştır. Benzer çalışma literatürde de mevcuttur (De Muynck *et al.* 2010).

Hazırlanan besiyerleri içerisinde ve kullanılan mikroorganizmalar arasında en uygun olanının Üreli besiyeri olduğu ve kullanılan mikroorganizmalardan en uygun olanının da *B. arenosi* K64 olduğuna karar verilmiştir. B-4, B-2 ve Üreli sıvı besiyerlerine ekilen mikroorganizmaların gelişimi normaldir fakat yıkama ve çöktürme işlemlerinden sonra karakterizasyon için kullanılacak olan çökelti miktarının bütün besiyerlerinde yeterli olmadığı görülmüş sadece üreli besiyeri ile yapılan denemelerde yeterli kitleye ulaşılabilmiştir.

Çalışmada dört farklı izolat seçilmiş ve seçilen izolatlardan *B. arenosi* türüyle yapılan çalışmanın iyi sonuç göstermesi De Muynck *et al.* (2010) yapmış oldukları çalışmayla paralellik göstermektedir. Elde edilen kalsiyumun porozlu bir yüzeye sahip olduğu gösterilmiştir.

Boquet *et al.* (1973) laboratuvar şartları altında toprak bakterilerinin kalsiyum karbonat çöktürme yeteneklerini ilk ortaya çıkaran çalışmalar yapmışlardır. Önceki çalışmalar sadece sıvı besiyerindeki deniz bakterileri ile çalışılmışken Boquet *et al.* (1973) yaptıkları çalışmalarda kalsiyum karbonatın katı besiyerindeki toprak bakterileri tarafından kristal oluşumunu araştırmışlardır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre en iyi kristal oluşumunu B-4 besiyerinde elde etmişlerdir. Ayrıca test edilen organizmalar arasında çeşitli *Bacillus* türleri ve *Pseudomonas aeruginosa* kristal oluşturma yeteneklerini incelemek amacıyla gözlemlenmiştir. Bu veriler doğrultusunda, Boquet *et al.* (1973) kristal oluşumunun besiyerinin bir fonksiyonu olduğunu ve uygun şartlar altında çoğu bakterinin kristaller oluşturabileceği sonucuna varmışlardır.

Benzer bir çalışmada tuf ve travertenlerden izole edilen bakteriler tarafından kalsit oluşumu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Adolphe and Billy 1974). 1983 ve 1987 yılları arasında Castaner *et al.* (1999) kireçtaşının mikrobiyal kökenini kantlayan kalsiyum karbonatın mikrobiyal oluşumundan sorumlu farklı mekanizmaları araştırmışlardır. Daha sonraları Adolphe *et al.* (1989)'da ekstrem iklimlerdeki tabakalarda kalsit oluşumunun bakteriyel orjinini göstermişlerdir. Ayrıca, araştırmacılar bu tabakaların erozyona karşı önemli bir direnç gösterdiğini gözlemlemişlerdir (De Muynck *et al.* 2010).

Bu bilgiler ışığında çalışmalarda *Bacillus* türünün seçilmesi tesadüf değildir ancak literatürde partikül üretimi üzerine kullanılan mikroorganizma türleri hibrit materyallerin sentez çalışması için yeterli olmadığından üç farklı türde bakteri izolatu ile kıyaslama yaparak belli bir sonuca ulaşmaya çalışıldı.

Üreli besiyerine ekilen *B. arenosi* K64 bakterisinin üreaz aktivitesi yüksek olduğundan üreli besiyerine CaCl_2 ilavesiyle partiküllerin oluşumu hızlı ve büyük bir şekilde olmaktadır.

Kalsiyum tabanlı nanopartikül üretiminde kullanılma amacına göre farklı karakterizasyon teknikleri yapılmıştır. Bin *et al.* (2014) modifiye edilmiş nano kalsiyum karbonat dolu bir poliüretan kaplamann ısı direnci adlı literatür çalışmasında FTIR ile karakterizasyon yapılmıştır. Lin *et al.* (2014) boyut ve şekil kontrolü ile kalsiyum fosfat sentezindeki ilerleme adlı bir diğer çalışmada SEM, Handley-Sindhu *et al.* (2014) bakteriyel yolla kalsiyum fosfat nanobiyomineralleri üretimi adlı çalışmada ise SEM, TEM, XRD, XANES VE EXAFS ile karakterize edilmiştir.

Çalışmadaki bulgular ise biyomedikal alanlarda uygulanması üzere SEM, EDAX ve XRD ile karakterize edilmesi planlanarak analiz edilmiştir.

Çalışma sonuçlarından biri olan SEM, EDAX ve XRD görüntüleri literatürdeki SEM görüntüleriyle kıyaslandığında paralellik göstermektedir (Rodriguez-Navarro *et al.* 2013). Yine çalışma sonucunda elde edilen kalsiyum karbonat partikülleri yalıtkan olduğu için iletken bir malzemeye kaplanarak SEM, EDAX ve XRD görüntüleri

alınmıştır. Literatürde nano boyutta olan bu partiküllerin karakterizasyon sonuçları ile yapılan çalışmadaki partiküllerin analiz sonuçları benzerlik göstermektedir.

SEM görüntülerinin alınmasıyla tabaka tabaka büyüme gösteren kalsiyum karbonat kristalleri Rodriguez-Navarro *et al.* (2013) ile benzerlik göstermektedir. SEM ile EDAX aynı cihazda mevcut olduğundan EDAX sonucu analiz edilen malzemenin içeriğine dair bilgi vermektedir. Kalsiyum ve karbonatın olduğu piklerin yanında yer alan altın ve paladyum piklerinin nedeni kirletici olarak sayılan kaplama materyalinden kaynaklanmaktadır.

Araştırmada, XRD ile yapılan karakterizasyon sonucu literatür ile benzerlik göstermektedir (Rodriguez-Navarro *et al.* 2013; Wang *et al.* 2014). Yalnız çalışmadaki mevcut partikül biyosentez ile elde edildiğinden organik kirlilik, kaplama materyalinden kaynaklanan kirlilik ve partikülün büyük olmasından dolayı kalsiyum karbonat kristal yapısını belirleyen esas pikin yanında çeşitli piklerde bulunmaktadır. Bu piklerin giderilmesi ve partikül boyutunun nano boyuta indirgenmesi için çalışmalar devam edecektir. Yalnız elde edilen partikülün her ne kadar büyük olsa da kullanım alanları düşünüldüğünde değer kazanmaktadır. Porozlu yüzeye sahip olmasından dolayı partikül tutturma, protein tutturma ya da ilaç taşınımında kullanılması için olanak sağlamaktadır.

Sonuç olarak, yapılan çalışmalarda biyosentez ile nanopartikül üretimi için uygun bir besiyeri ve uygun bir bakteri izolatu seçilmesi önemlidir. Yapılan deneylerde Ürelî sıvı besiyerine ekilen üreaz aktivitesi yüksek olan *B. arenosi* K64 bakterisinin seçimi, dört farklı izolat ve beş farklı besiyeri ortamı arasında en iyi tercih olarak belirlenmiştir. Bu sayede hem bakterinin optimum faaliyet gösterebileceği ideal bir ortam hazırlanmıştır hem de partikül oluşumu için en ideal bakteri ve ortam belirlenmiştir. Karakterizasyon işlemi için SEM, EDAX ve XRD görüntülerinin alınmasıyla kristal boyutu, kristalin şekli, içerik analizi ve kristali tanımlamak için yapılan tekniklerdir. Bu bağlamda çalışmadaki veriler ile literatür verileri benzerlik göstermektedir. Ancak elde edilen partikülün boyutu ile ilgili optimizasyon çalışmaları yapılmaya devam edecektir.

KAYNAKLAR

- Abad, M., Ruiz, F., Pendón, J.G., González-Regalado, L., Tosquella, J., 2005. Tortonian ostracodes of Southwestern Europe Ostracodes tortoniens du Sud-Ouest de l'Europe. *Geobios*, 38, 563–573.
- Abu-Salah, K.M., Ansari, A.A. and Alokayan, S.A., 2010. DNA-based applications in nanobiotechnology. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010, 715295, p15.
- Adolphe, J.P. and Billy, C., 1974. Biosynthese de calcite par une association bacterienne aerobie. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris* 278, 2873-2875.
- Adolphe, J.P., Hourimèche, A., Loubière, J.F., Paradas, J., Soleilhavoup, F., 1989. Les formations carbonatées d'origine bactérienne. *Formations continentales d'Afrique du Nord. Bulletin de la Société géologique de France*, 8 (5), 55–62.
- Akoğuz, H., 2014. Kum Zeminlerin Biyolojik İyileştirilmesinde *Bacillus arenosi* Bakterisinin Kullanılabilirliğinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Al-Marzouqi, M.I., Budebes S., Sultan E., Bush I., Griffiths R., Gzara K.B.M., Ramamoorthy R., Husser A., Jeha Z., Roth J., Montaron B., Narhari S.R., Singh S.K., Coutansais X.P., 2010. Resolving carbonate complexity. *Oilfield Review Summer*, 22 (2), 40-55.
- Asanithi, P., 2013. Surface porosity and roughness of micrographite film for nucleation of hydroxyapatite. *Journal of Biomedical, Materials Research* 102A (8), 2590-2599.
- Asmathunisha, N. and Kathiresan K., 2013. A review on biosynthesis of nanoparticles by marine organisms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103, 283–287.
- Barış, Ö., 2009. Erzurum İlindeki Mağaralarda Damlatışı Oluşumunda Etkili Bakterilerin İzolasyonu Karakterizasyonu ve Tanısı, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Becker, A., 2005. Structural Characterisation of Biominerals and Biomimetic Crystallisation of Calcium Carbonate. PhD Thesis, Institut für Anorganische Chemie, aus Hattingen, der Universität Duisburg-Essen der Universität Duisburg-Essen, Deutschland.
- Bin, L., Song-Mei L., Jian-Hua Liu. and Mei Y., 2014. The heat resistance of a polyurethane coating filled with modified nano-CaCO₃. *Applied Surface Science*, 315, 241–246.
- Boquet, E., Boronat, A. and Ramos-Cormenzana, A., 1973. Production of Calcite (Calcium Carbonate) Crystals by Soil Bacteria is a General Phenomenon. *Nature*, 246, 527-529.
- Buzea, C., Blandino, I.I.P. and Robbie, K., 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* (2) ,4, MR17 - MR172.
- Cao, C., Li, H., Li, J., Liu, C., Yang, H., Li, B., 2014. Mechanical reinforcement of injectable calcium phosphate cement/silk fibroin (SF) composite by mineralized SF. *Ceramics International* 40, 13987-13993.

- Castanier, S., Le Metayer-Levrel, G., Perthuisot, J.-P., 1999. Ca-carbonates precipitation and limestone genesis the microbiogeologist point of view. *Sedimentary Geology*, 126 (1–4), 9–23.
- Celep, Ş., 2007. Nanoteknoloji ve Tekstilde Uygulama Alanları. Y. Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi, Adana, Türkiye.
- Cengiz, B., Gokce, Y., Yıldız, N., Aktas, Z., Calimli, A., 2008. Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 322, 29–33.
- Cheng, Y., Morshed R.A., Auffinger B., Tobias A.L. and Lesniak, M.S., 2014. Multifunctional nanoparticles for brain tumor imaging and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 66, 42-57.
- Chiang, Y.C., Lin, H.P., Chang, H.H., Cheng, Y.W., Tang, H.Y., Yen, W.C., Lin, P.Y., Chang, K.W. and Lin, C.P., 2014. A mesoporous silica biomaterial for dental biomimetic crystallization. *ACSNano*, 8 (12), 12502–12513.
- Chua, K.T., Ouc S.F., Chenf S.Y., Chiouc S.Y., Choua H.H. and Oud K.L., 2013. Research of phase transformation induced biodegradable properties on hydroxyapatite and tricalcium phosphate based bioceramic. *Ceramics International*, 39, 1455–1462.
- Çavuş, M., 2007. Kalsiyum Dinamiği. Y. Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gazi Üniversitesi, Ankara, Türkiye.
- Çökmüş, C., 2009. Mikroorganizmaların Biyolojisi. Palme Yayıncılık, 992s, Ankara, Türkiye.
- Dani, R.K., 2012. Exploring Physical Properties of Nanoparticles for Biomedical Applications. Doctor of Philosophy Department of Chemistry College of Arts and Sciences Kansas State University, Manhattan, U.S.A.
- De Muynck, W., De Beliea, N., Verstraeteb, W., 2010. Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. *Ecological Engineering* 36, 118–136.
- Demir, T., Baris, O., Zor, E., 2014. Investigation of *in vitro* Mineral Forming Bacterial Isolates from Subgingival Calculus. *The Archives of Clinical Experimental Surgery*, 3, 153-160.
- Dupraz, C., Pamela Reid R., Braissant O., Decho A.W., Norman R.S. and Visscher P.T., 2009. Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. *Earth-Science Reviews* 96 (3), 141–162.
- El-Sheikh, S.M., El-Sherbiny S., Barhoum A. and Deng Y., 2013. Effects of cationic surfactant during the precipitation of calcium carbonate nano-particles on their size, morphology, and other characteristics. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 422, 44– 49.
- Fakruddin, M., Hossain, Z., Afroz, H., 2012. Prospects and Applications of Nanobiotechnology: a Medical Perspective, *Journal of Nanobiotechnology*, 10, 31
- Fang, Q., Song B., Tee T.T., Sin L.T., Hui D. and Bee S.T., 2014. Investigation of dynamic characteristics of nano-size calcium carbonate added in natural rubber vulcanizate, 60, 561–567.
- Gadd, G.M. and Raven, J.A., 2010. Geomicrobiology of eukaryotic microorganisms. *Geomicrobiology Journal*, 27, 491-519.

- Goodsell, D. S., 2004. *Biotechnology : lessons from nature* Department of Molecular Biology The Scripps Research Institute La Jolla, California. A John Wiley & Sons, Inc., Publication, U.S.A.
- Habeeb, M.K., 2013. Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. *International Journal of Advanced Scientific and Technical Research*, 3 (1), 44-51.
- Handley-Sidhu, S., Hriljac, J.A., Cuthbert, M.O., Renshaw, J.C., Patrick, R.A.D., Charnock, J.M., Stolpe, B., Lead, J.R., Baker, S. and Macaskie, L.E., 2014. Bacterially produced calcium phosphate nanobiominerals: sorption capacity, site preferences, and stability of captured radionuclides. *Environmental Science & Technology*, American Chemical Society Publications, 48, 6891–6898.
- Harley, J.P. and Prescott, L.M., 2002. *Laboratory Exercises in Microbiology*, Fifth Edition New York: The McGraw–Hill Companies, 466p.
- Hulkoti, N.I. and Taranath T.C., 2014. Biosynthesis of nanoparticles using microbes— A review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 121, 474–483.
- Işık, K., 2010. Farklı Özellikteki Zno Nanopartiküllerinin Fibroblast hücreleri Üzerindeki Etkilerinin *İn Vitro* Olarak Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Jang, H.L., Jin, K., Lee, J., Kim, Y., Nahm, S.H., Hong, K.S. and Nam, K.T., 2014. Revisiting Whitlockite, the Second Most Abundant Biomineral in Bone: Nanocrystal Synthesis in Physiologically Relevant Conditions and Biocompatibility Evaluation. *ACS Nano* 8 (1), 634–641.
- Jeong, Y.H., Kim, E.J., Brantley, W.A., Choe, H.C., 2014. Morphology of hydroxyapatite nanoparticles in coatings on nanotube-formed Ti–Nb–Zr alloys for dental implants. *Vacuum*, 107, 297–303.
- Jiang, J., Zhang Y., Yang X., He X., Tang X. and Liu J., 2014. Assemblage of nano-calcium carbonate particles on palmitic acid. *Template Advanced Powder Technology*, 25 (2), 615–620.
- Kaiser, D., 2006. Notes toward a Nanotech Timeline. OSTI Working Paper, 6, 1-10.
- Kisku, S.K., Sarkar N., Dash S., Swain S.K., 2014. Preparation of Starch/PVA/CaCO₃ nanobiocomposite films: study of fire retardant, thermal resistant, gas barrier and biodegradable properties. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 16, 1664-1670.
- Kutbay, I., Yılmaz, B., Evis, Z., Usta M., 2014. Effect of calcium fluoride on mechanical behavior and sinterability of nano-hydroxy apatite and titania composites. *Ceramics International*, 40, 14817–14826.
- Kutucu, B., 2010. Nanoteknoloji ve Çift Duvarlı Karbon Nanotüplerin İncelenmesi. Y. Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
- Lin, K., Wu, C., Chang, J., 2014. Advances in synthesis of calcium phosphate crystals with controlled size and shape. *Acta Biomaterialia*, 10, 4071–4102.
- Liu, Q., Huang, S., Matinlinna, J.P., Chen, Z. and Pan, H., 2013. Insight into biological apatite: physiochemical properties and preparation approaches. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*, 2013, 929748, 13.
- Liu, Y.C. and Lin, L.H., 2004. New pathway for the synthesis of ultrafine silver nanoparticles from bulk silver substrates in aqueous solutions by sonoelectrochemical methods. *Electrochemistry Communications*, 6, 1163-1168.

- Lv, Y., Huang H., Yang B., Liu H., Li Y. and Wang J., 2014. A robust pH-sensitive drug carrier: Aqueous micelles mineralized by calcium phosphate based on chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 111, 101–107.
- Makarov, C., Cohen V., Raz-Pasteur A. and Gotman I., 2014. In vitro elution of vancomycin from biodegradable osteoconductive calcium phosphate–polycaprolactone composite beads for treatment of osteomyelitis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62, 49–56.
- Maurya, S.D., Purushothaman M., Santhana Gopala Krishnan P. and Kayak S.N., 2013. Effect of nano-calcium carbonate content on the properties of poly(urethane methacrylate) nanocomposites. *Journal of Thermoplastic Composite Material*. 2013, 1-17.
- Melo, M.A., Cheng L., Zhang K., Weir M.D., Rodrigues L.K. and Xu H.K., 2013. Novel dental adhesives containing nanoparticles of silver and amorphous calcium phosphate. *Dental materials*, 29 (2), 199–210.
- Nagarajan, R., 2008. In *Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization*; Eds: Nagarajan *et al.* ACS Symposium Series; American Chemical Society: s,465 Washington, U.S.A.
- Niemeyer, C.M. and Mirkin C.A., 2004. *Nanobiotechnology. Biomolecular Motors Operating in Engineered Environments*. Stefan Diez, Jonne H. Helenius and Jonathon Howard, p, 185-256.
- Özer, Y., 2008. *Nanobilim ve Nanoteknoloji: Ülke Güvenliği /Etkinliği Açısından Doğru Modelin Belirlenmesi*. T.C. Kara Harp Okulu Savunma Bilimleri Enstitüsü Teknoloji Yönetimi Ana Bilim Dalı, Y. Lisans Tezi, Ankara, Türkiye.
- Panda, N., Bissoyi, A., Pramanik, K., Biswas, A., 2014. Directing osteogenesis of stem cells with hydroxyapatite precipitated electrospun eri-tasar silk fibroin nanofibrous scaffold. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 25(13), 1440-1457.
- Papazoglou, E.S., Parthasarathy, A., 2007. *Bionanotechnology*, Morgan & Claypool. U.S.A. pp. 139.
- Paques, J.P., Sagis L.M.C., van Rijn C.J.M., van der Linden E., 2014. Nanospheres of alginate prepared through w/o emulsification and internal gelation with nanoparticles of CaCO₃. *Food Hydrocolloids*, 40, 182-88.
- Petit, C., Jain, T.K., Billoudet, F., Pileni, M.P., 1994. Oil in Water Micellar Solution Used To Synthesize CdS Particles: Structural Study and Photoelectron Transfer Reaction. *Langmuir*, 10, 4446-4450.
- Preety, V.H., 2014. Immobilization and Kinetics of Catalase on Calcium Carbonate Nanoparticles Attached Epoxy Support. *Appl Biochem Biotechnol* 172, 115–130.
- Quester, K., Avalos-Borja, M., Castro-Longoria, E., 2013. Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. *Micron*, 54-55, 1-27.
- Ramsden, J.J., 2005. What is nanotechnology? *Nanotechnology Perceptions*, 3-17.
- Ramsden, J., 2009. *Essential of Nanotechnology*. Jeremy Ramsden & Ventus Publishing ApS, 1-126.
- Renugopalakrishnan, V. and Lewis R.V., 2006. *Bionanotechnology: Proteins to Nanodevices*. Springer, WY, USA.
- Roco, M.C., 2007. National Nanotechnology Initiative – Past, Present and Future, *Handbook on Nanoscience, Engineering and Technology*, 2nd ed., 3.1-3.26.

- Rodriguez-Navarro, C., Suzuki A., Ruiz-Agudo E., 2013. Alcohol Dispersions of Calcium Hydroxide Nanoparticles for Stone Conservation. *American Chemical Society. Langmuir*, 29, 11457–11470.
- Scott, M.M., Wylie, C.J., Lerch, J.K., Murphy, R., Lobur, K., Herlitz, S., Jiang, W., Conlon, R.A., Strowbridge, B.W. and Deneris, E.S., 2005. A genetic approach to access serotonin neurons for in vivo and in vitro studies. *PNAS* 102 (45), 16472–16477.
- Shaikh, F.U.A. and Supit, S.W.M., 2014. Mechanical and durability properties of high volume fly ash (HVFA) concrete containing calcium carbonate (CaCO_3) nanoparticles. *Construction and Building Materials*, 70, 309–321.
- Skinner, H.C.W. and Jahren A.H., 2003. Biomineralization. *Treatise on Geochemistry*, 8, 117–184.
- Swain S.K., Dash S., Kisku S.K. and Singh R.K., 2014. Thermal and oxygen barrier properties of chitosan bionanocomposites by reinforcement of calcium carbonate nanopowder. *Journal of Materials Science and Technology*, 30 (8), 791-795.
- Tok, A.I.Y., Boey, F.Y.C., Dong, Z., Sun, X.L., 2007. Hydrothermal synthesis of CeO_2 nano-particles. *Journal of Materials Processing Technology*, 190, 217-222.
- Tütünoğlu, Ç., 2007. Nanoteknolojik Prosesler İle Nikel Tozu Üretimi. Y. Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.
- Ueno, Y., Futagawa, H., Takagi, Y., Ueno, A., Mizushima, Y., 2005. Drug-incorporating calcium carbonate nanoparticles for a new delivery system. *Journal of Controlled Release*, 103, 93–98.
- Vaseem, M., Umar A. and Hahn Y.B., 2010. ZnO Nanoparticles: Growth, Properties, and Applications. *Metal Oxide Nanostructures and Their Applications*, Ahmad Umar, Yoon-Bong Hahn. American Scientific Publishers, America, 1–36.
- Wang, R., Wang Q., Wang X., Tian L., Liu H., Zhao M., Peng C., Cai Q. and Shi Y., 2014. Enhancement of nano-hydroxyapatite bonding to dentin through a collagen/calcium dual-affinitive peptide for dentinal tubule occlusion. *Journal of Biomaterials Applications*, 29 (2), 268-277.
- Wen, Z., Zhang, L., Chen, C., Liu Y., Wu C., Dai, C., 2013. A construction of novel iron-foam-based calcium phosphate/chitosan coating biodegradable scaffold material. *Materials Science and Engineering C*, 33, 1022–1031.
- Williams, L. and Adams, W., 2007. *Nanotechnology Demystified*. The McGraw-Hill Companies, 362, USA.
- Wu, S., Liu, X., Yeung, K.W.K., Liu, C., Yang, X., 2014. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering R*, 80, 1–36.
- Yıldırım, A., Bardakçı F., Karataş M. ve Tanyolaç B., 2010. *Moleküler Biyoloji*. Nobel Yayın Dağıtım, 685s, Ankara, Türkiye.
- Yıldız, N., 2011. Gümüş Nanopartiküllerinin Liken Özü İle Biyosentezi, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, Ankara.
- Zhang, X., Yan S., Tyagi R.D. and Surampalli R.Y., 2011. Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates. *Chemosphere*, 82 (4) 489–494.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2006 yılında girdiği Kocaeli Üniversitesi Köseköy Meslek Yüksekokulu Fermantasyon Bölümü'nden 2008 yılında mezun oldu. 2008 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2012 yılında mezun oldu. Aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Nanobilim ve Nanomühendislik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.