T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇEVRE DOSTU YOLLARLA METAL NANOYAPILARIN SENTEZİ VE BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Şule BULUT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler Anabilim Dalı

Ağustos-2019
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇEVRE DOSTU YOLLARLA METAL NANOYAPILARIN SENTEZİ VE BAZI BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Şule BULUT

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yasemin ÖZTEKİN
2. Danışman: Doç. Dr. Ahmet UYSAL

2019, 48 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Yasemin ÖZTEKİN
Doç. Dr. Serdar KARAKURT
Dr. Öğretim Üyesi İlker AKIN

Çağımız sorunlarından en büyüğü olan globalleşen nüfusla birlikte teknoloji, bireysel ve küresel problemlerin çözümünde, her zaman olduğu gibi günümüzde de son derece vazgeçilmez olduğu gerçeğini kabul etmiş ve mevcut yaşam standartlarını en üst seviyeye çıkartmayı hedef edinmiştir. Bu hedef doğrultusunda teknoloji, son yılların gözdesi olarak nanoteknoloji ile tıp, gıda, enerji, sanayi gibi birçok alanda hayatımıza önemli kolaylıklar sağlamıştır. Nanoteknoloji kavramı ile nanoyapılar bilim insanlarının dikkatini çekmiş, kimyasal fiziksel ve biyolojik sentezleri ile sağlık, gıda, savunma ve bunun gibi birçok alanda uygulamaları mevcut hale gelmiştir.

Nanoyapıların sentezi için son zamanlarda kimyasal kullanımının zararlarını en aza indirmeyi hedefleyen yeşil kimya yöntemi tercih edilmektedir. Nanoyapı sentezinde kullanılan çevre dostu olan bu yöntem, insan yaşamına olumlu etkilerde bulunurken kimyasal kullanımını azaltıp çevreye verilen hasarı daha aza indirgemesiyle yapılan çalışmaları daha da anlamlı kılmaktadır. Nanoyapıların insan sağlığı için tehdit haline gelmiş kimyasallar, mantarlar, virüsler ve bunun gibi yapılara karşı koruyucu önlemlerin alınmasına dair çalışmaları mevcuttur.

Bu tez çalışmasında çevre dostu bir yöntem olan yeşil kimya ile nanoyapıların sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem ile gül, nar ve kahve varlığında sentezlenen altın nanoyapıların özelliklerine kaynak materyalinin etkisi incelenmiştir. Taramalı elektron mikroskobu sonuçları ile nanoyapıların kaynak değişimine dayalı şekilsel farklılıklarının olduğu, geçirimli elektron mikroskobu ile boyutlarının 5-90 nm arasında olduğu ve ultraviyole ve görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi ölçümlerinde de üç farklı kaynaktan sentezlenen şekilsel farklılığa sahip altın nanoyapıların farklı absorbans değerleri gösterdiği tespit edilmiştir. Sentezlenen altın nanoyapıların insanlar ve hayvanlar için patojen olan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, *Staphylococcus aureus* (MRSA)ATCC 43300, *Salmonella typhimurium* NRRLE 4463, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Listeria monocytogenes* NRRL B33314, *Staphylococcus epidermidis* NRRL B-4268 üzerinde antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Gül ile sentezlenen altın nanoyapıların oldukça düşük konsantrasyonda dahi diğer kaynaklar ile sentezlenen altın nanoyapılara oranla antimikrobiyal etkisinin daha fazla olduğu belirlenmiştir. Mutajenik etkinin araştırılmasında uygulanan Ames testi sonuçlarına göre de kaynakları farklı olan üç farklı şekle sahip altın nanoyapıların mutajen olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ışığında kullanımı sınırlandırılan bu maddelerin kullanım sınırlarının genişletilebileceği öngörülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Altın nanoyapı, antimikrobiyal aktivite, çevre dostu sentez, mutajenite

ABSTRACT

MS THESIS

GREEN SYNTHESIS OF METAL NANOPARTICLES AND INVESTIGATION OF SOME BIOLOGICAL ACTIVITIES

Sule BULUT

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN ADVANCED MATERIALS AND NANOTECHNOLOGY

Advisor: Prof. Dr. Yasemin OZTEKIN
2nd Advisor: Assoc. Prof. Dr. Ahmet UYSAL

2019, 48 Pages

Jury
Prof. Dr. Yasemin OZTEKIN
Assoc. Prof. Dr. Serdar KARAKURT
Assist. Ptof. Dr. Ilker AKIN

Together with the globalizing population, which is one of the biggest problems of our time, technology has accepted the fact that it is extremely indispensable in the solution of individual and global problems as well as today and aims to maximize the current living standards. In line with this objective, technology has provided important facilities to our lives in many fields such as medicine, food, energy and industry with nanotechnology as a favorite of recent years. With the concept of nanotechnology, nanostructures have attracted the attention of scientists, application areas such as health, food, defense and many other areas have become available with their chemical physical and biological synthesis,

Green chemistry method which aims to minimize the damages of chemical use, is preferred for the synthesis of nanostructures. This environmentally friendly method used in the synthesis of nanostructures has a positive impact on human life, while reducing the use of chemicals and minimizing the damage done to the environment makes the studies more meaningful. Nanostructures have also been working to take protective measures against chemicals, fungi, viruses and the like that threats.

In this thesis, the synthesis of nanostructures was carried out with green chemistry, which is an environmentally friendly method. The effect of source material on the properties of gold nanostructures synthesized in the presence of rose, pomegranate and coffee was investigated with this method. It was determined from the scanning electron microscope results that the nanostructures had different shapes based on source change, from the tunneling electron microscope results that their dimensions were between 5-90 nm and from the ultraviolet and visible spectroscopy measurements different absorbance values were recorded due to structural differences of gold nanostructures synthesized from three different sources. The effects of nanostructures with these morphological differences on antimicrobial activities against standard microorganisms as *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, *Staphylococcus aureus* (MRSA)ATCC 43300, *Salmonella typhimurium* NRRLE 4463, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Listeria monocytogenes* NRRL B33314, *Staphylococcus epidermidis* NRRL B-4268 which have pathogenic effect for humans and animals were investigated. It was determined that the gold nanostructures synthesized from rose had more antimicrobial effect than gold nanostructures synthesized by other sources even at very low concentration. According to Ames test results, gold nanostructures with different sources are not mutagenic. From these results, it is envisaged that the limits of use of these substances can be extended.

Keywords: Antimicrobial activity, gold nanostructure, green synthesis, mutagenicity

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Yasemin ÖZTEKİN danışmanlığında tamamlanarak, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler Ana Bilim Dalı'na Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmuştur.

Yüksek Lisans tezimi yöneten ve çalışmalarım süresince maddi ve manevi desteğini esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Yasemin ÖZTEKİN'e ve biyolojik çalışmaların yapılabilmesi için laboratuvar imkânlarını bana sunan, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan 2. Danışmanım Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Programı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ahmet UYSAL'a sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen değerli annem, babam ve abime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı 16201080 numaralı proje ile maddi olarak destekleyen, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Şule BULUT
KONYA-2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET **1**

ABSTRACT **2**

ÖNSÖZ **3**

İÇİNDEKİLER **4**

SİMGELER VE KISALTMALAR **6**

1. GİRİŞ **7**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **10**

3. MATERYAL VE YÖNTEM **14**

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 14
3.2. Kullanılan Cihazlar 14
3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması 14
3.3.1. Sentez için kullanılan çözeltilerin hazırlanması 14
3.3.2. Mutajenite ve antimikrobiyal uygulamalar için kullanılan besiyeri ve çözeltilerin hazırlanması 15
3.4. Nanoyapıların Sentezi 18
3.4.1. AuNY-G Sentezi 19
3.4.2. AuNY-N Sentezi 19
3.4.3. AuNY-K Sentezi 19
3.5. Altın Metaline Ait Nanoyapıların Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi 20
3.5.1. Antimikrobiyel aktivitenin belirlenmesi 20
3.5.1.1. Sıvı mikrodilüsyon (broth dilution) yöntemi 20
3.5.2. Salmonella/mikrozom test sistemi ile mutajenik potansiyelin belirlenmesi (Ames testi) 21
3.5.2.1. Kullanılan test suşları 21
3.5.2.2. Test suşlarının üretilmesi 21
3.5.2.3. Kendiliğinden geri dönen koloni sayısının kontrolü 22
3.5.2.4. Master plakların hazırlanışı 23
3.5.2.5. Sitotoksik dozun hesaplanması 23
3.5.2.6. Pozitif kontrol 23
3.5.2.7. Negatif kontrol 24
3.5.2.8. Mutajenite deneyi (Ames/Salmonella/mikrozom testi) 25
3.5.2.9. S9 karışımı yokluğunda deneyin yapılması 25
3.5.2.10. S9 karışımı varlığında deneyin yapılması 26
3.5.2.11. Mutajenite deneyi sonuçlarının değerlendirilmesi 27

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA **28**

4.1. Altın Nanoyapıların Karakterizasyonu 28
4.1.1. Ultraviyole ve görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi ile yapılan karakterizasyon 28
4.1.2. Taramalı elektron mikroskobu ile yapılan karakterizasyon 29

4.1.3. Geçirimli elektron mikroskobu ile yapılan karakterizasyon 30
4.2. Altın Nanoyapıların Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi 31
4.3. Altın Nanoyapıların Mutajenik Aktivite Sonuçları 33

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 39

KAYNAKLAR 41

ÖZGEÇMİŞ 45

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

b-NADP	:	B-nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
DMSO	:	Dimetilsülfoksit
HBA	:	Histidin/Biyotin/Ampisilin agar
MGA	:	Minimal glukoz agar
MİK	:	Minumum inhibüsyon değeri
NA	:	Nutrient agar plakları
NB	:	Nutrient broth
RFA	:	Rekombinant faj antikorların
S9	:	Mikrozomal Enzim Ekstresi
2-AA	:	2-aminoantrasen
2-AF- 2	:	Aminofluoren
4-NPDA	:	4-nitro-o-fenilendiamin
50XVB	:	Vogel-Bonner minimal medium

1. GİRİŞ

Artan nüfusa bağlı olarak, teknoloji; yaşamsal açıdan vazgeçilemez bir alan halini alıp insanların yaşam standartlarını daha iyiye taşıyan bir araç olma yönünde hızla ilerlemektedir. Son yıllarda daha özel bir alan olan nanoteknoloji oldukça popülerleşmiş ve bu alanda çeşitli çalışmalar ön plana çıkmaya başlamıştır (Bindhu ve Umadevi, 2014; Lokina ve ark., 2014; Cakić ve ark., 2016) . Nanoteknoloji alanının elektronik, biyomalzeme, ilaç, enerji üretimi ve sağlık gibi birçok alanda getirdiği yenilikler oldukça fazla ilgi görmüş, benimsenmiş ve birçok yönde fayda sağlamıştır (Hoshyar ve ark., 2016; Kashale ve ark., 2016). Nanoteknoloji, nanoyapı kavramını da beraberinde getirerek nanoyapıların bilim dünyasına girmesini sağlamış ve nanoyapıların boyutları, şekilleri ve yüzey morfolojilerindeki özellikler sebebiyle birçok alanda heyecan uyandıran çalışmalara önayak olmuştur (Prakash ve ark., 2013; Byranvand ve Kharat, 2014; Roshni ve Ottoor, 2015). Nanoyapıların boyutları küçüldükçe yüzeylerinin hacimlerine olan oranı arttığından makro ölçülerdeki hallere göre mekanik, iletkenlik, optik ve magnetik gibi özellikleri farklılık göstermektedir. Bir diğer taraftan yapılan çalışmalarda nanoyapıların şekilsel farklılıkları ilgi çekmiş, kullanılan yöntem, konsantrasyon, kimyasal maddelerin çeşitliliğine göre nanoyapıların yüzey morfolojilerinde farklılıklar olduğu tespit edilmiştir (Byranvand ve Kharat, 2014; Islam ve ark., 2015). Şekilsel farklılıkların uygulama alanlarında etkili olup olmadığı merak uyandırmıştır (Dhand ve ark., 2016; Owaid ve ark., 2017; Reddy, 2017). Nanoyapılar bu ilgi çekici özellikleri sebebiyle pek çok teknoloji temelli uygulama alanlarında da tercih sebebi olmuştur (Es'haghi ve ark., 2016).

Son yıllarda ilerleyen teknolojinin eğitim, sağlık, tıp, enerji, biyomalzeme gibi birçok alanda pozitif etkileri olduğu kadar çevre kirliliği, doğal kaynakların azalması, hareketsiz yaşam gibi istenmeyen olumsuz sonuçları da olmuştur. Bu olumsuz sonuçların giderilmesi için yeni çalışma yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır. Bu doğrultuda bilim dünyası ilgisini *"yeşil kimya"* olarak anılan ve organizmaya zararlı olabilecek madde kullanımını azaltmaya çalışan araştırmalara yönlendirmiştir. Yeşil kimya, tehlikeli ve zehirli maddelerin kullanımını ve üretimini en aza indirmek veya ortadan kaldırmak için kimyasal ürünlerin geliştirilmesini, süreçlerin organize edilmesini, yeni ürünlerin tasarlanmasını ve uygulanmasını hedef almaktadır (Aswathy Aromal ve Philip, 2012; Mochochoko ve ark., 2013). Nanoyapılar kimyasal, fiziksel ve biyolojik olarak sentezlenebilmektedir ancak sentezinin basit ve çevre dostu olması

sebebiyle biyolojik sentez yönteminin tercih edildiği çalışmalar nanoyapılara ait uygulamaları daha anlamlı kılmaktadır (Ahmad ve ark., 2013; Malekshahi Byranvand ve Nemati Kharat, 2014; Elumalai ve Velmurugan, 2015; Patra ve ark., 2015; Angel Ezhilarasi ve ark., 2016; Dhanemozhi ve ark., 2017).

Sentezlenen nanoyapıların biyolojik olarak bakteri üzerindeki etkileri, virüsler, mantarlar, kimyasallar ve benzeri yapılara karşı koruyuculuğu, ilaç kullanımında ilacın seçeceği hücreye ulaşımı, tıpta görüntüleme tekniklerine olan yardımı ve bunun gibi daha birçok konuda etkinliği araştırılmış ve olumlu gelişmeler sağlanmıştır (Patra ve ark., 2015; Ahmad ve ark., 2017). Ancak sentezlenen nanoyapıların birçok olumlu biyolojik aktiviteye sahip olmasının yanında, kullanımını sınırlandıran ve mutasyona neden olan mutajenik etkilerinin de olması muhtemeldir. Büyük moleküller ile kıyaslandığında nanoyapıların uygun fizikokimyasal özellikleri taşıdıklarında vücut hücrelerine daha kolay adapte olabildikleri belirtilmiştir (Guigas ve ark., 2017). Tıbbı uygulamalarda yer alması için de bu nanoyapıların biyouyumlu olup toksik olmaması gerekmektedir.

Kanser araştırmaları, biyosensör uygulamaları ve antibakteriyel aktivitelerin incelenmesi gibi çalışmalarla nanoyapılara ait uygulamaların biyolojik alanda da her geçen gün arttığı görülmektedir (Beik ve ark., 2019; Chen ve ark., 2019; Gao ve ark., 2019; Gemmi ve ark., 2019; Hepokur ve ark., 2019; Park ve ark., 2019). Ancak bu biyolojik çalışmalar arasında nanoyapılar, diğer çalışmalara nazaran antibakteriyel etkilerinin ve mutajenik aktivitelerinin araştırıldığı çalışmalarda daha fazla boy göstermektedir (Cakić ve ark., 2016; Hoshyar ve ark., 2016; Muthukumar ve ark., 2016). Antimikrobiyal etkinin araştırılması amacıyla çalışmalarda genellikle sıvı mikrodilüsyon (broth microdilution) yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntem, bir antimikrobiyal ajanın bir mikroorganizmanın üremesini inhibe etmek için gerekli olan minimum konsantrasyonunu belirlemek amacıyla uygulanmaktadır. Mutajenik aktivitelerin araştırılmasında ise Dr. Bruce Ames tarafından bulunan Ames Test yöntemi uygulanmaktadır. Salmonella/mikrozom test sistemi olarak da bilinen Ames Testi, gen mutasyonlarının oluşumunda öncülük edebilecek genetik hasarların meydana gelişine sebep olabilecek maddelerin tespit edilmesinde geniş ölçüde kabul gören, kısa zamanlı bakteriyel test sistemidir (Maron ve Ames, 1983). Bu test sisteminde bakteri gelişimi için gerekli olan histidin amino asidinin sentezine engel teşkil eden mutasyonlar içeren Salmonella suşları kullanılmaktadır. Böylece histidin yokluğunda mutant suşlar büyüyememekte ve koloni oluşturamamaktadırlar. Önceden mutasyon

geçirmiş gen bölgelerinde meydana gelebilecek yeni mutasyonlar, yeniden histidin sentezleme fonksiyonunu tekrar kazandırabilmekte ve hücre gelişimine izin verebilmektedir. Test edilen kimyasal maddenin Salmonella typhimurium His (-) (histidin okzotrofu) mutantlarını His (+) (prototrof; yabani tip) haline çevirme gücü ölçülmektedir. Bu nedenle, Salmonella/mikrozom testi geri dönüşüm çalışmalarında geçerliliğini kabul ettirmiş bir yöntemdir (Maron ve Ames, 1983).

Bu tez çalışmasında, gül, nar ve kahveden çevre dostu yollarla farklı nanoşekillere sahip altın nanoyapılar sentezlenmiş, ultraviyole ve görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi, taramalı elektron mikroskobu ve geçirimli elektron mikroskobu ile karakterize edilmiştir. Yapılan karakterizasyonlar sonucunda ultraviyole ve görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi ile yapılan ölçümlerde 540 nm dalga boyunda farklı absorbans değerlerinde spektrumların kaydedilmiş, taramalı elektron mikroskobu ile yapılan ölçümlerde farklı morfolojik görüntülerin alınmış ve geçirimli elektron mikroskobu ile yapılan ölçümlerde ise kaynağa bağlı olarak boyutlarının 5-90 nm arasında olması sonucu nanoyapıların şekilsel farklılığı kanıtlanmıştır. Sentezlenen altın nanoyapıların insan ve hayvanlar için patojen olan *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (MSSA), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Candida albicans* gibi mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile ve organizmaya zararlı olası mutajenik etkilerinin olup olmadığı ise *Salmonella typhimurium* suşları kullanılarak Ames Testi ile araştırılmıştır. Gül ile sentezlenen altın nanoyapıların (AuNY-G) antimikrobiyal etkisinin düşük dozlarda dahi etkili olduğu, nar ve kahve ile sentezlenen altın nanoyapıların da (sırasıyla, AuNY-N ve AuNY-K) önemsenecek oranda antimikrobiyal aktivitesi olduğu tespit edilmiştir. Sentezlenen nanoyapıların mutajenik etkilerinin de olmadığı görülmüştür. Farklı şekillerdeki altın nanoyapıların antimikrobiyal aktivite ve mutajenik etkilerinin araştırıldığı çalışmalar azınlıkta olması sebebiyle sunulacak veriler önem arz etmektedir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Abdel-Raouf ve ark. (2017) kloroaurikasidin 0,01 M 100 mL galaxaura elongata ekstraktı ile muamelesi sonucu altın nanoyapı sentezi gerçekleştirmişlerdir. Sentezlenen altın nanoyapıları geçirimli elektron mikroskobu, ultraviyole ve görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi ve fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi ile karakterize etmişlerdir. Altın nanoyapıların çubuk, kesik üçgen, altıgen şeklinde üç farklı morfolojiye sahip olduğunu ve bu altın nanoyapıların 3,85-77,13 nm boyutları arasında olduğunu rapor etmişlerdir. Biyosentez ile elde edilen bu nanoyapıların *Staphylococcus aureus, Staphylococcus aureus (MRSA), Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa* patojenik bakterileri üzerinde antimikrobiyal etkisinin olduğunu belirtmişlerdir.

Ahmad ve ark. (2013) biyosentetik bir yolla mantardan altın ve gümüş nanopartiküller sentezlemiş ve geçirimli elektron mikroskobu ile karakterize etmişlerdir. Altın nanoyapıların sentezi için 0,01 M 15 mL kloroaurikasit çözeltisini 15 mL ekstrakt ile karıştırmış, karışıma 20 mL su ilave ederek seyrelmesini sağlamışlar ve 35°C'de 48 saat sonunda çözeltide renk değişimi olduğunu belirtmişlerdir. Gümüş nanoyapıların sentezi için de 0,01 M 15 mL gümüş nitrat çözeltisini ekstrakt ile karıştırmış ve 15 dakika sonunda çözeltide renk değişiminin başladığını belirtmişlerdir. Sentezledikleri altın ve gümüş nanoyapıların sırasıyla ortalama 5 nm ve 30 nm boyutunda, 18,9 m^2/g ve 184,4 m^2/g yüzey alanlarına sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı zamanda sırasıyla 540 ve 450 nm dalga boylarında kaydedilen absorbans değerlerinin nanopartiküllerin oluşumunu desteklediğini belirtmişlerdir. *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitelerini incelemiş ve sonuç olarak test mikroorganizmalarının büyümelerini kısıtlama konusunda etkili olduğunu ancak gümüş nanopartiküllerin yüzey alanının altın nanoyapılara göre çok daha yüksek olması sebebiyle daha yüksek bakteri yok edici özelliğe sahip olduğunu ve bunun yanı sıra *Escherichia coli* adlı gram negatif bakterinin altın ve gümüş nanopartiküllere *Staphylococcus aureus* adlı gram pozitif bakteriden daha duyarlı olduğunu rapor etmişlerdir.

Alvarez ve ark. (2016) çevre dostu yollarla hint incirinden altın nanoyapı sentezi gerçekleştirmiş, sentezlenen nanoyapıların boyutlarının 10-20 nm arasında ve fiziksel olarak altıgen, üçgen ve küresel şeklinde olduklarını belirtmişlerdir. Bu yapılar üzerinde yapılan modelleme çalışmalarında modellenen nanoyapı kümelerinin, kümeleştiği

bölgelerde 100 atomun altında olanların biçimsel bir şekil oluşturmadığını rapor etmişlerdir.

Bindhu ve Umadevi (2014) ananastan altın nanoyapı sentezi gerçekleştirmiş, ultraviyole ve görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi ile altın nanoyapıların 546 nm dalga boyunda absorbans değerleri olduğunu ve geçirimli elektron mikroskobu ölçümlerinde tanecik boyutunun ortalama 16 nm olduğunu tespit etmişlerdir. Sentezlenen altın nanoyapıların suda bulunan gram pozitif ve gram negatif bakteri olan *Staphylococcus aureus Pseudomonas aeruginosa* patojenlerine karşı antibakteriyel aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir. Bu nedenle bu nanopartiküllerin su saflaştırma proseslerinde bakterilerin büyümesini önleyici olarak kolaylıkla uygulama alanı bulabileceği sonucuna varmışlardır.

Bindhu ve Umadevi (2015) pancar ekstraktı ile altın nanoyapı sentezlemiş, sentezledikleri nanopıları geçirimli elektron mikroskobu, ultraviyole ve görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi ve X-ışını difraktometresi ile karakterize etmişlerdir. Ultraviyole ve görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi sonuçlarında 534 nm dalga boyunda absorbans verdiğini rapor etmişlerdir. Sentezlenen nanoyapıların hem gram pozitif ve gram negatif *Escherichia coli, Pseudomonas aeroginosa, Staphylococcus aureus, Streptococcus aureus* bakterilerinin büyümesini engellemede rol aldıklarını hem de sentezlenen nanoyapıların yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Byravand ve Kharat (2014) nar suyu ile altın nanoyapı sentezi gerçekleştirmiş, kullanılan nar suyu konsantrasyonlarındaki değişikliğin yüzey morfolojilerini değiştirdiğini geçirimli elektron mikroskobu, taramalı elektron mikroskobu, X-ışını difraktometresi, ultraviyole ve görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi ölçümleri ile ortaya koymuşlardır. Yapılan karakterizasyon ölçümleri sonucunda altın nanoyapıların 520 nm dalga boyunda absorbans verdiğini, küresel ve çubuk şeklinde ve 50 nm boyutunda olduğunu rapor etmişlerdir. Çevre dostu yolların farklı nanoyapıların sentezleri için de kullanılabileceğine ve konsantrasyon değişimi ile metal nanoyapıların fiziksel özelliklerinde de değişiklikler olabileceğine dikkat çekmişlerdir.

Cakic ve ark. (2015) dekstran sülfat stabilizatörlüğünde gümüş nitrat ve dekstran sülfatın sodyum tuzuna ait sulu çözeltilerinden gümüş nanoyapı sentezlemiş, sentezlenen nanoyapıları ultraviyole ve görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi, taramalı elektron mikroskobu, enerji dağılımı spektrometresi, X-ray difraksiyon ve fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi ile karakterize etmişlerdir. Ultraviyole ve

görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi ile yapılan karakterizasyonda 420 nm dalga boyunda en yüksek absorbans değerine ulaşıldığını, taramalı elektron mikroskobu ile yaptıkları analizlerde nanoyapı boyutlarının 10-60 nm arasında olduğunu rapor etmişlerdir. Sentezlenen nanoyapıların, *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus luteus*, *Bacillus subtilis* ATTC 6633, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Escherichia coli* ATTC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATTC 700603 ve *Proteus vulgaris* ATTC 8427 bakterilerine karşı kuvvetli antibakteriyel aktivite ve *Candida albicans* ATTC 2091 bakterisine karşı ise antifungal aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Hoshar ve ark. (2016) çiğdem ve gardenya çiçeklerinde bulunan doğal bir karotenoid bileşik olan krosini indirgeyici olarak kullanarak altın nanoyapıları sentezlemiş, bu nanoyapıları geçirimli elektron mikroskobu, X-ışını difraktometresi, ultraviyole ve görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi ile karakterize etmişlerdir. Geçirimli elektron mikroskobu ile yapılan ölçümlerde altın nanoyapı boyutlarının 20 nm olduğunu ve morfolojik olarak küresel şekle sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Ultraviyole ve görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi ile yaptıkları karakterizasyonda 520 nm dalga boyunda absorbans verdiğini belirtmişlerdir. Sentezlenen nanoyapıların meme kanseri hücrelerini 24 ile 48 saat arasında olumsuz yönde etkileyerek büyümelerini yavaşlattığını rapor etmişler ve farmakolojik olarak kullanılabilir olduğunu öne sürmüşlerdir.

Kim ve ark. (2017) gallik asit metodunu kullanarak altın nanoyapılar sentezlemiş ve altın nanoyapıların canlı yaşam formlarına uyumluluğunu test etmişlerdir. Sentezlenen nanoyapıları geçirimli elektron mikroskobu, X-ışını difraktometresi, ultraviyole ve görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi ile karakterize etmişlerdir. Altın nanoyapı boyutlarının 8-10 nm arasında olduğunu, ultraviyole ve görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi ile 530 nm dalga boyunda absorbans verdiğini rapor etmişlerdir. Nanoyapıların, glikoz ve sığır serum albümini gibi biyomoleküllerle beraber kullanımını ve canlı yaşam formları üzerinde uyumluluğunu test etmişlerdir. Yapılan testler sonucunda altın nanoyapıların bu biyomoleküllerle bir arada uygulandığında toksik etkisinin daha az olması sebebiyle canlı yaşam formlarına uygun olduğunu rapor etmişlerdir.

Lokina ve ark. (2014), indirgeyici bileşenler içeren nar suyunu kullanarak altın nanoyapılar sentezlemişlerdir. Biyosentezi gerçekleştirilen altın nanoyapıları geçirimli elektron mikroskobu ile karakterize etmiş, üçgenimsi ve spiral benzeri yapılardan

oluşan nanoyapı boyutlarının 5-20 nm arasında olduğunu rapor etmişlerdir. Sentezlenen nanoyapıların; *Candida albicans* (ATCC 90028), *Aspergillus flavus* (ATCC 10124), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25175), *Salmonella typhi* (ATCC 14028) ve *Vibrio cholerae* (ATCC 14033) bakterilerine karşı kuvvetli antibakteriyel aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Muthukumar ve ark (2016) pervane çiçeği ve carica papaya meyvesinden elde ettikleri ekstraktların karışımını kullanarak altın nanoyapılar sentezlemiş ve elde edilen biyouyumlu altın nanoyapıların kanserli hücrelerin seçilimindeki etkisini incelemişlerdir. Sentezlenen altın nanoyapıların geçirimli elektron mikroskobu görüntülerinde küresel şekle sahip olduğunu rapor etmişlerdir. İki ekstraktın karışımı kullanılarak sentezlenen altın nanoyapıların hem *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Proteus vulgaris, Escherichia coli* bakterileri hem de kanser hücrelerine karşı aktif olduğunu belirtmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar doğrultusunda sentezlenen altın nanoyapıların, protein ve ilaçlar ile uyumlu hareket edip kanserli hücrelerin seçilmesine katkıda bulunduğunu belirtmişlerdir.

Sadeghi ve ark. (2015) stevia rebaudiana bitkisi ekstraktı ile altın nanoyapılar sentezlemişlerdir. Altın nanoyapıları geçirimli elektron mikroskobu, taramalı elektron mikroskobu, ultraviyole ve görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi ve fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi ile karakterize etmişler, sentezlenen altın nanoyapıların 5-20 nm boyutlarında ve kübik şeklinde olduğunu, ultraviyole ve görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi ile alınan ölçümlerde ise 550-560 nm arasında absorbans verdiğini belirtmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu tez çalışmasında farklı şekillere sahip altın nanoyapıların sentezi için başlangıç maddesi olarak tetrakloroaurik asit (Sigma–Aldrich, Germany) kullanılmıştır. Biyolojik uygulamalar için sodyum azid (Merck, Germany), 2-aminoflouren (Merck, Germany), 2-aminoantrasen (Merck, Germany) ve 4-nitro-o- fenilendiamin (Merck, Germany), Mueller Hinton Broth (Merck, KGaA Darmstad, Germany), D-glukoz 6-fosfat, β-NADP, D-biyotin, ampisilin trihidrat (Sigma-Aldrich, Germany), L-histidin-HCl monohidrat (Merck, KGaA Darmstad, Germany), Nutrient Broth No:2 (Oxoid, Unipath Ltd, Basngstoke Hampshire, England), S9 fare karaciğer fraksiyonu (Moltox, U.S.A) kullanılmıştır.

3.2. Kullanılan Cihazlar

Sentezlenen altın nanoyapıların karakterizasyonları dalga boyu tarama aralığı 175 nm ile 2600 nm arasında olan UV-Vis absorpsiyon Hitachi-U4100 UV-Vis-NIR marka ultraviyole ve görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi, Zeiss Evo marka taramalı elektron mikroskobu ve JEOL JEM-2100 marka geçirimli elektron mikroskobu ile yapılmıştır. Biyolojik uygulamalarda mikroorganizmaların ihtiyaç duydukları ısıyı sağlayıp çalkalama işlemini gerçekleştirmek için inkübatör, numunelerin ve çevrenin kontaminasyonunu engellemek amacıyla ekim kabini, malzemelerin ve çözeltilerin sterilizasyonu için ise otoklav kullanılmıştır.

3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1. Sentez için kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Altın nanoyapıların sentezi için kaynak olarak Rosaceae familyasından Rosa türü gül, Punicaceae familyasından Punica granatum, L. türü nar ve Rubiacea familyasından coffea arabica türü kahve kullanılmıştır. Gül, nar ve kahve kaynaklı altın nanoyapıların sentezinde kullanılacak çözeltilerin hazırlanışı sırası ile aşağıda verilmiştir.

Altın nanoyapı 1 (AuNY-G) sentezi için kullanılan çözeltilerin hazırlanması:

$HAuCl_4$ çözeltisi : 0,19 g kloroaurik asidin 50,0 mL saf suda çözeltisi hazırlanmıştır.

Gül suyu karışımı : Rosaceae familyasından Rosa türü gülün taç yaprakları saf su ile yıkanıp kurutulmuş, 1,00 g gül yaprağı alınıp ince ince kesilerek, 100,0 mL saf su içerisine atılmış, 40°C'de 30 dakika karıştırılmış ve gül yaprakları süzülerek sıvı kısımdan ayrılmıştır.

Altın nanoyapı 2 (AuNY-N) semtezi için kullanılan çözeltilerin hazırlanması:

$HAuCl_4$ çözeltisi : 0,19 g kloroaurik asidin 50,0 mL saf suda çözeltisi hazırlanmıştır.

Nar suyu karışımı : Punicaceae familyasından Punica granatum, L. türü narın kabuğu soyulduktan sonra 100,0 g nar tanesi tartılıp sıkılarak suyu çıkarılmış ve %50 oranında saf su ile seyreltilmiştir.

Altın nanoyapı 3 (AuNY-K) sentezi için kullanılan çözeltilerin hazırlanması:

$HAuCl_4$ çözeltisi : 0,04 g kloroaurik asidin 50,0 mL saf suda çözeltisi hazırlanmıştır.

Kahve karışımı : Rubiacea familyasından coffea arabica türü kahveden 5,00 g tartılmış, üzerine 100,0 mL su ilave edilerek 40°C'de 20 dakika karıştırılmış ve süzülerek kahve parçaları sıvı kısımdan ayrılmıştır.

3.3.2. Mutajenite ve antimikrobiyal uygulamalar için kullanılan besiyeri ve çözeltilerin hazırlanması

Salmonella/mikrozom test sistemi uygulamalarında kullanılan besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanışları aşağıda verilmiştir.

Vogel-Bonner minimal medium (50xVB tuzları); minimal glukoz agar (MGA) ve Histidin/biyotin/ampisilin agar (HBA) plaklarında kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Bunun için, 10,0 g $MgSO_4.7H_2O$, 670,0 mL 45°C'deki saf su içerisinde çözülmüştür. Çözelti üzerine sırasıyla 100,0 g sitrik asit monohidrat, 500,0 g K_2HPO_4, 175,0 g $NaHNH_4PO_4.4H_2O$ ilave edilmiştir. Toplam hacim 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 20 dakika steril edilmiş, karanlıkta oda sıcaklığında saklanmıştır.

Histidin/biyotin çözeltisi; mutajenite deneyinde kullanılmak üzere ve 90,0 mL top agara 10,0 mL olarak eklenecek şekilde 0,5 mM olarak hazırlanmıştır. Bunun için,

0,0309 g D-Biyotin 250,0 mL saf su içerisinde çözücü kaynama noktasına ulaşana kadar çözülmüştür. Çözelti üzerine 0,024 g L-Histidin-HCl ilave edilmiş, 0,22 µm membran filtre ile otoklavda 110°C'de 20 dakika steril edilmiş ve +4°C'de saklanmıştır.

Kristal viyole çözeltisi; suşların kristal viyoleye duyarlılıklarının, dolayısıyla rfa mutasyonunu taşıyıp taşımadıklarının kontrolünü sağlamak üzere %0,1'lik olarak hazırlanmıştır. Bunun için, 0,10 g kristal viyole 100,0 mL saf su içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan çözelti ışık geçirmeyen bir şişede +4°C'de saklanmıştır.

Biyotin çözeltisi; genotip kontrolü ve HBA plaklarında kullanılmak üzere %0,13'luk olarak hazırlanmıştır. Bunun için, 0,13 mg D-biyotin 100,0 mL saf su içerisinde çözücü kaynama noktasına ulaşana kadar çözülmüştür. Otoklavda 110°C'de 20 dakika steril edilmiş ve +4°C'de saklanmıştır.

Histidin çözeltisi; genotip kontrolü ve HBA plaklarında kullanılmak üzere %0,5'lik olarak hazırlanmıştır. Bunun için, 0,50 g L-Histidin-HCl 100,0 mL saf su içerisinde çözücü kaynama noktasına ulaşana kadar ısıtılıp çözülmüştür. Otoklavda 110°C'de 20 dakika steril edilmiş ve +4°C'de saklanmıştır.

Glikoz çözeltisi; MGA ve HBA plaklarında kullanılmak üzere %20'lik olarak hazırlanmıştır. Bunun için, 20,00 g glikoz 100,0 mL saf su içerisinde tamamen çözülmüş, otoklavda 110°C'de 20 dakika steril edilmiş ve +4°C'de saklanmıştır.

Ampisilin çözeltisi; suşların ampisiline dirençlilik özelliğinin kontrolünde ve R plazmiti taşıyan suşların master plaklarında kullanılmak üzere 8,0 mg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Bunun için, 0,80 g ampisilin trihidrat 0,02 N 100,0 mL NaOH ile çözeltisi hazırlanmış, 0,45 µm filtrede süzülmüş ve +4°C'de saklanmıştır.

2-aminofluoren (2-AF); pozitif kontrol plaklarında kullanılmak üzere 2,0 mg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti 200 µg/plak başına olmak üzere dimetilsülfoksitle (DMSO) kullanılmıştır. Bunun için 0,020 g 2-AF, 10,0 mL DMSO'ya eklenmiş ve +4°C'de saklanmıştır. TA 98 suşu için S9 fraksiyonu varlığında uygulanmıştır.

4-Nitro-o-fenilendiamin (4-NPDA); pozitif kontrol plaklarında kullanılmak üzere 2,0 mg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Bunun için 0,020 g 4-NPDA, 10,0 mL DMSO'da çözülmüş ve oda sıcaklığında saklanmıştır. TA 98 suşu için S9 fraksiyonuna ihtiyaç duymamaktadır.

Sodyum azid çözeltisi pozitif kontrol plaklarında her plağa 10,0 mg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan sodyum azid çözeltisinden her plak için 0,010 g

sodyum azid 100,0 mL saf su içerisine eklenmiş ve bu çözelti +4°C'de saklanmıştır. TA 100 suşu için S9 fraksiyonuna ihtiyaç duymamaktadır.

2-aminoantrasen çözeltisi (2-AA); pozitif kontrol plaklarında kullanılmak üzere 5 µg/µL olacak şekilde hazırlanmıştır. Bunun için 0,005 g 2-AA 100,0 mL DMSO'ya ilave edilip karıştırılmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır. TA 100 suşu için S9 fraksiyonu varlığında uygulanmıştır.

Histidin/biyotin plakları (HB agar); histidin gereksinim deneyinde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. 15,0 g agar ve 864,0 mL saf su karıştırıldıktan sonra 110°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. 25 dakika bekletilerek 45°C'ye soğutulup %20'lik 100,0 mL glikoz çözeltisine 20,0 mL 50XVB tuzları ve 10,0 mL histidin çözeltisi eklenmiştir. Çözelti biraz daha soğuduktan sonra 0,5 mM biyotin çözeltisinden 6,0 mL eklenip, karıştırılıp petri kutularına 25.0 mL olacak şekilde dağıtılmış ve +4°C'de saklanmıştır.

Histidin/biyotin/ampisilin plakları (HBA agar); ampisiline dirençlilik testinde ve master plaklarda kullanılmak üzere hazırlanmıştır. 15,0 g agar saf su ile karıştırılıp otoklavlanmıştır. Sonrasında 45°C'ye soğutulup %20'lik 100,0 mL glikoz çözeltisine 20,0 mL 50XVB tuzları ve 10,0 mL histidin çözeltisi eklenmiştir. Çözelti biraz soğuduktan sonra 0,5 mM 6,0 mL biyotin çözeltisi ve 3150 µL ampisilin çözeltisi eklenip petri plaklarına 25,0 mL olarak dağıtılmış ve +4°C'de saklanmıştır.

Minimal glikoz agar plakları (MGA); mutajenite deneyinde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. 880,0 mL saf suya 15,0 g agar ilave edilip karıştırıldıktan sonra otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan alınıp oda sıcaklığında 25 dk bekletilerek 45°C'ye soğutulmuştur. İçerisine %20'lik 100,0 mL glikoz çözeltisi ve 20,0 mL 50XVB tuzları eklenip karıştırılmış ve çözelti her petri kutusuna 25,0 mL olacak şekilde dağıtılmıştır.

Top (üst) agar; mutasyon deneyinde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Bunun için 1000 mL saf suya 6,0 g agar ve 5,0 g NaCl eklenmiş, manyetik karıştırıcıda karıştırılarak homojen çözelti elde edilmiş ve otoklavda 110°C'de 20 dakika steril edilmiştir.

Nutrient agar plakları (NA); gecelik kültürün 1,0 mL'sindeki bakteri sayısını bulma ve genotip kontrolünü (a. Kristal viyole b. UV duyarlılığı) sağlamak üzere hazırlanmıştır. 1000 mL saf su içerisine 15,0 g agar, 25,0 g oxoid nutrient broth no:2 eklenip karıştırılarak çözünmesi sağlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiş, petri kutularına 30,0 mL olacak şekilde dağıtılmış ve +4°C'de saklanmıştır.

KCl ve $MgCl_2$ tuzlarından oluşan tuz karışımı; mutajenite deneyinde S9 karışımda kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Bunun için 500,0 mL saf suya 0,4 M olacak şekilde 40,7 g $MgCl_2.6H_2O$ ve 1,65 M olacak şekilde 61,5 g KCl eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Otoklavda 110°C'de 20 dakika steril edilmiş, oda sıcaklığında veya +4°C'de saklanmıştır.

Nutrient broth sıvı kültür ortamı (NB); bakterilerin bir gecelik sıvı kültürlerinin hazırlanmasında kullanılmak üzere hazırlanmıştır. 200,0 mL saf suya 5,0 g Oxoid nutrient broth no:2 eklenmiş ve karıştırılmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiş ve karanlık bir ortamda oda sıcaklığında saklanmıştır.

0.2 M Sodyum-Fosfat tamponu (pH 7,4); mutajenite deneyinde S9 karışımda kullanılmak üzere hazırlanmıştır. 500,0 mL saf suya, 0,2 M 60,0 mL NaH_2PO_4 ve 0,2 M 440,0 mL Na_2HPO_4 eklenmiş, manyetik karıştırıcıda karıştırılarak homojen çözelti elde edilmiş, otoklavda 121°C'de 20 dakika steril edilmiş ve oda sıcaklığında karanlıkta saklanmıştır.

b-NADP çözeltisi; mutajenite deneyinde S9 karışımı için kullanılmak üzere hazırlanmıştır. 0,22 mm por çaplı filtrelerle steril edilen 10,0 mL saf suya 76,0 g b-NADP eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. -20°C'de saklanmıştır.

Glikoz-6-fosfat çözeltisi; mutajenite deneyi için S9 karışımı hazırlanmasında kullanılmak üzere 1,0 M olacak şekilde hazırlanmıştır. Bunun için; 0,22 mm por çaplı filtrelerle steril edilen 2,5 mL saf suya 0,705 g glikoz-6-fosfat eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve -20°C'de saklanmıştır.

Rat karaciğeri mikrozomal enzimleri ve kofaktörlerinden oluşan S9 karışımı mutajenite deneyinde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. 19,75 mL saf suya sırasıyla 25,0 mL 0,2 M fosfat tamponu (pH 7,4), 0,1 M 2,0 mL b-NADP, 1,0 M 250,0 µL Glikoz-6-fosfat çözeltisi, 1,0 mL $MgCl_2$-KCl tuz karışım ve 2,0 mL Rat karaciğeri S9 fraksiyonu eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karışım deneye yakın bir zaman diliminde hazırlanmıştır.

3.4. Nanoyapıların Sentezi

Altın metaline ait farklı şekillerde nanoyapıların sentezinde çevre dostu (green chemistry) olarak ifade edilen ve kullanılan kimyasal miktarının minimum tutulduğu sentez yöntemi uygulanmıştır. Altın metaline ait şekilsel farklılıklara sahip üç farklı altın nanoyapının sentezinin işlem basamaklarına dair bilgiler aşağıda verilmiştir.

3.4.1. AuNY-G Sentezi

AuNY-G sentezi için kaynak olarak Rosaceae familyasından Rosa türü gül kullanılmış ve Noruzi ve arkadaşlarına ait sentez metodunda küçük değişiklikler yapılmıştır (Noruzi ve ark., 2011). Gülün taç yaprakları ayrılmış, yapraklar saf su ile yıkanıp kurutulmuş, 1,00 g alınıp ince ince kesilerek, 100,0 mL saf su içerisine atılmış, 40°C'de 30 dakika karıştırılmış ve gül yaprakları süzülerek ayrılmıştır. Hazırlanan gül suyundan 5,0 mM 50,0 mL $HAuCl_4$ çözeltisine 8,0 mL ilave edilmiş 80°C'de 560 rpm hızla 21 dakika karıştırılmıştır. Sarı renkten mor renge doğru olan renk değişimi ile altın nanoyapıların oluşumuna dair gözlem yapılmıştır.

3.4.2. AuNY-N Sentezi

AuNY-N sentezi için kaynak olarak Punicaceae familyasından Punica granatum, L. türü nar kullanılmış ve Byranvand ve Kharat'a ait sentez metodunda küçük değişiklikler yapılmıştır (Byranvand ve Kharat, 2014). Narın kabuğu soyulduktan sonra 100,0 g nar tanesi tartılıp sıkılarak suyu çıkarılmış ve %50 oranında saf su ile seyreltilmiştir. 60°C'de 450 rpm hızda karıştırılan 0,5 mM 50 mL $HAuCl_4$ çözeltisi içerisine elde edilen nar suyundan 1,0 mL ilave edilmiş ve 21 dakika boyunca karıştırılmıştır. Sarı renkten mor renge doğru olan renk değişimi ile altın nanoyapıların oluşumuna dair gözlem yapılmıştır.

3.4.3. AuNY-K Sentezi

AuNY-K sentezi için kaynak olarak Rubiacea familyasından coffea arabica türü kahve kullanılmıştır. Temin edilen kahveden 5,00 g alınarak 100,0 mL su ile 40°C'de 20 dakika karıştırılıp sonrasında süzülmüştür. 1,0 mM 50 mL $HAuCl_4$ çözeltisi içerisine hazırlanan karışımdan 2,0 mL ilave edilmiş, ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda 80°C'de 550 rpm hızla 15 dakika karıştırılmıştır. Sarı renkten mor renge doğru olan renk değişimi ile altın nanoyapıların oluşumuna dair gözlem yapılmıştır.

3.5. Altın Metaline Ait Nanoyapıların Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi

3.5.1. Antimikrobiyel aktivitenin belirlenmesi

Sentezlenen nanoyapıların antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek amacıyla sıvı mikrodilüsyon (broth microdilution) yöntemi kullanılmış, bazı modifikasyonlar uygulanmıştır (Koc ve Uysal, 2016).

3.5.1.1. Sıvı mikrodilüsyon (broth dilution) yöntemi

Sentezlenen altın nanoyapıların antimikrobiyal testleri için 96 adet "U" tipi kuyucuklara sahip, steril mikrotitrasyon pleyti (Brand) kullanılmıştır. 96 kuyucuğa sahip pleytlerin her kuyucuğuna 100'er µL Muleller Hinton Broth (MHB) besiyerinden ve pleytlerin ilk kuyucuklarına 100'er µL çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan altın nanoyapılardan (AuNY-G:1875,2 µg/mL; AuNY-N stok:193 µg/mL; AuNY-K:378,6 µg/mL) konulmuştur. En baştaki kuyucuktan itibaren diğer kuyucuklara sırasıyla altın nanoyapıların konsantrasyonları yarı yarıya azaltılarak ilave edilmiştir.

McFarland 0,5 bulanıklığındaki bakteri süspansiyonundan ($1x10^8$ kob/mL) steril serum fizyolojik içerisinde 10^{-2} seyreltme yapılarak mL'sinde 10^6 bakteri olan süspansiyon hazırlanmış ve bu süspansiyonlardan her kuyucuğa 100'er µL aktarılarak kuyucuklardaki son bakteri konsantrasyonunun $5x10^5$ kob/mL olması sağlanmıştır (Koc ve Uysal, 2016).

Yapılan bu çalışmaya paralel olarak farklı pleytlerde, kontrol antibiyotiği gentamisin ve bakterilerin pozitif üremeleri test edilmiştir. Sonrasında pleytlerin kapakları kapatılarak 37ºC'de 18 saat inkübasyon için bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda renklenme için kuyucuklara %0,5'lik 20,0 µL 2,3,5-trifeniltetrazolyum klorid çözeltisi eklenerek 37ºC'de 30 dakika daha inkübasyona devam edilmiştir. İnkübasyon sonunda pleytlerdeki üreme kontrol edilmiş, gözle görülür bir üreme olmadığı (renklenmeyen alanlar), yani üremenin inhibe olduğu en az çözelti konsantrasyonu minimum inhibasyon konsantrasyonu olarak kabul edilmiştir.

3.5.2. Salmonella/mikrozom test sistemi ile mutajenik potansiyelin belirlenmesi (Ames testi)

3.5.2.1. Kullanılan test suşları

Yapılan çalışmada *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilmiştir.

Suşların genotip özellikleri ise aşağıda veilmiştir:

TA 98 : his D 3052, rfa, Δuvr B, +R

TA 100 : his G 46, rfa, Δuvr B, +R

TA 98 : suş adı

his D 3052 : histidin mutasyonu

rfa : lipopolisakkarit. UDP (üridin di fosfat) galaktoz ve UDP glikoz dönüşümünde etkilidir.

Δuvr B : DNA onarım sisteminde kesip çıkarma görevini üstlenen enzimi kodlayan uvrB genindeki delesyon sonucu oluşur.

+R faktörü : DNA onarımını arttırarak mutajene karşı hassasiyeti arttırır.

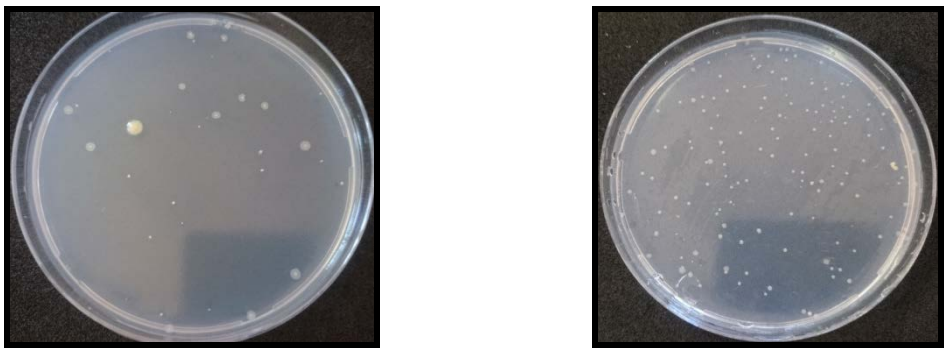
3.5.2.2. Test suşlarının üretilmesi

Mutajenite çalışmalarında *Salmonella typhimurium* standart bakteri suşları kullanılmıştır. Bakteri kültürünün 1,0 mL'sinde 1-2x10^9 Koloni Oluşturan Birim (kob) olması beklenmektedir. *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100'ün üreme eğrilerinin çıkarılması için içerisinde 63,0 µL ampisilin çözeltisi ve 20,0 mL nutrient broth bulunan erlenlere, master plaklardan veya histidin/biyotin agar plaklarından tek koloni alınarak ekim yapılmıştır. Etüvde 37ºC'de 140 rpm çalkalama ile 16 saat inkübe edilip, bu sürenin sonunda elde edilen kültürden 0,5 mL örnekler alınarak 20,0 mL nutrient broth içeren erlenlere ekim yapılmıştır. 37ºC'de 110 rpm'de çalkalanarak inkübe edilip, bakteri kültüründen belirli zaman aralıklarında alınan örneklerin, spektrofotometrede 650 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Buna paralel olarak alınan örnekler belirli oranlarda (10^{-6} ve 10^{-7}) serum fizyolojik ile sulandırılarak, nutrient agarlı plaklara 0.1 mL olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bu ekim sırasında bakterilerin homojen dağılımını sağlamak amacı ile bakteri kültürleri 50°C'deki 2,00 mL üst agara karıştırılmış ve çalkalandıktan sonra hızlı bir şekilde plakların yüzeyine dağıtılmıştır.

Plaklar 37ºC'lik etüvde bir gece inkübe edildikten sonra koloni sayımı yapılıp *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 test suşlarının zamana karşı absorbans değerleri ve mililitredeki canlı bakteri sayıları belirlenerek üreme tabloları hazırlanmıştır. Bir mililitredeki koloni oluşturan birim (kob/mL); sulandırma faktörünün plaktaki koloni sayısı ve 10 ile çarpılması sonucu hesaplanmıştır (Durak ve ark., 2016).

3.5.2.3. Kendiliğinden geri dönen koloni sayısının kontrolü

Bu bakterilerin kolonileri, oksotrofik mutant bakterilerin geliştiği bir besiyerinde kolayca gözlenebilmektedir. Bu çalışmada da kendiliğinden geriye dönüş frekansını saptayabilmek için minimal glukoz agar plakları hazırlanmıştır. Bacto agar (%0,6) ve NaCl (%0,5) içeren 100 mL'lik üst agar, 110°C'de 20 dakika otoklavda steril edildikten sonra, 45°C'lik su banyosunda bekletilmiştir. Homojen agar çözeltisinden 10,0 mL steril bir cam tüp içerisine alınıp içine 0,5 mM histidin/biyotin çözeltisinden 10,0 mL eklenmiştir. Bu karışım 2,5 mL'lik porsiyonlar şeklinde steril tüplere dağıtılmış ve tüplere her suşun gecelik kültüründen 0,1 mL eklenmiştir. Düşük devirde tüp çalkalayıcıda karıştırıldıktan sonra, karışım soğutulmadan plağa dökülmüş ve sekiz şeklinde hareket ettirilerek yayılması sağlanmıştır. 37°C'de 48-72 saat inkübasyon süresinden sonra geriye dönen kolonilerin sayımı yapılmış, bu deney her suş için tekrarlanmış ve ortalama değerleri hesaplanmıştır (Şekil 3.1.) (Maron ve Ames, 1983).



a **b**

Şekil 3.1. Kendiliğinden geriye dönen koloni sayılarının kontrolü: **a)** *Salmonella typhimurium* TA 98, **b)** *Salmonella typhimurium* TA 100

3.5.2.4. Master plakların hazırlanışı

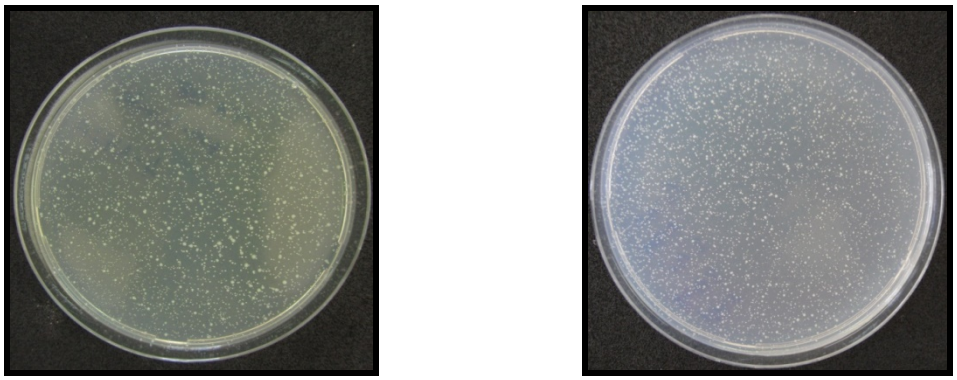
Bakteri suşlarının iki ay süre ile (+4°C'de) saklanabilmesi için master plaklar hazırlanmıştır. Genetik işaretleri doğrulanan suşlar, histidin/biyotin/ampisilin içeren plaklara ekilmiş ve daha sonraki kültür hazırlama çalışmaları, iki ay süre ile bu plaklardan yapılmıştır (Maron ve Ames, 1983).

3.5.2.5. Sitotoksik dozun hesaplanması

Mutajenite deneyi öncesinde çalışmanın sağlıklı olarak değerlendirebilmesi için, sentezlenen farklı şekilllere sahip altın nanoyapıların sitotoksik etkileri incelenmiştir. Uygun miktarda *Salmonella typhimurium* TA 100 suşu bulunan kültürden serum fizyolojik kullanılarak 10^{-1}, 10^{-2},10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} ve 10^{-7} oranlarında seyreltme yapılmıştır. Sitotoksik etkinin belirlenmesinde her zaman 10^{-7} oranındaki kültür ile işlemler yapılmıştır. İçinde 2'şer mL üst agar bulunan tüplere, bakteri kültüründen 0,1 mL ve altın nanoyapıların farklı konsantrasyonlarından 0,1 mL eklenmiştir. Karışım iyice çalkalandıktan sonra nutrient agarlı besiyeri plaklarının yüzeyine hızlı bir şekilde dökülüp yayılmış ve plaklar 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra plaklardaki koloni sayıları, kontrol plaklarındaki bakteri sayıları ile karşılaştırılarak toksik olmayan dozlar saptanmıştır. Sitotoksik dozun, LD_{50}'den daha az olması gerekmektedir (Dean ve ark., 1985). Deneme plaklarındaki koloni sayısı, kontrol plağındaki koloni sayısının yarısının altında olmaması durumunda, doz toksik olarak kabul edilmemektedir (Maron ve Ames, 1983).

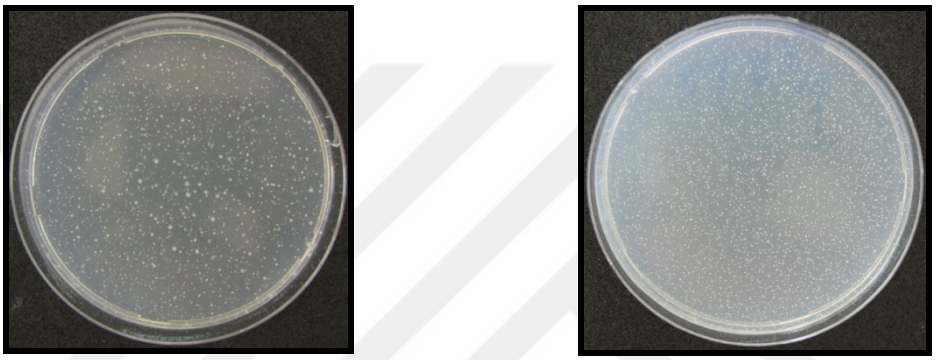
3.5.2.6. Pozitif kontrol

Bilinen standart mutajenik etkili kimyasal bazı maddelere karşı bakterilerin tepkilerini gözlemlemek üzere bu mutajenler, pozitif kontrol sağlamak amacıyla esas denemeye paralel olarak incelenmiştir. *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu için indirekt mutajen olan, 2-aminoflouren S9 karışımı varlığında ve direkt mutajen olan 4-nitro-o-fenilendiamin S9 karışımı yokluğunda kullanılmıştır (Şekil 3.2.). *Salmonella typhimurium* TA 100 için direkt mutajen olarak S9 karışımı varlığında 2-aminoantrasen, yokluğunda sodyum azid kullanılmıştır. (Şekil 3.3.)



a **b**

Şekil 3.2. *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu üzerine **a)** S9 karışımı yokluğunda 4-nitro-o-fenilendiaminin mutajenik etkisi, **b)** S9 karışımı varlığında 2-Aminoflourenin mutajenik etkisi

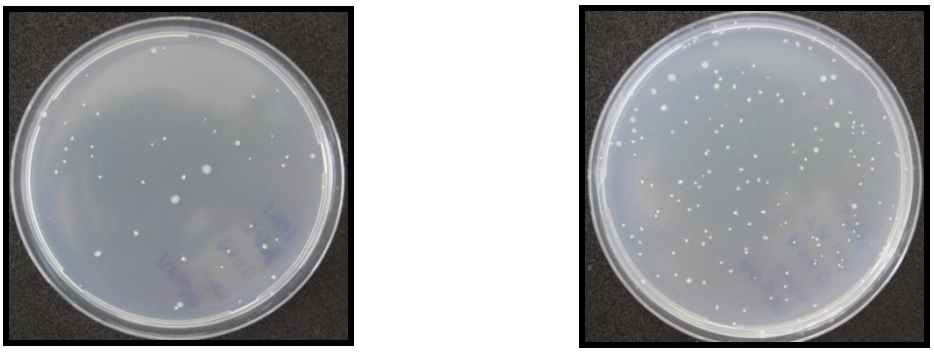


a **b**

Şekil 3.3. *Salmonella typhimurium* TA 100 suşu üzerine **a)** S9 karışımı yokluğunda sodyum azidin mutajenik etkisi. **b)** S9 karışımı varlığında 2-Aminoantrasenin mutajenik etkisi

3.5.2.7. Negatif kontrol

Pozitif mutajen maddelerden 4-nitro-o-fenilendiamin, 2-aminoantrasen ve 2-aminofloureni çözmek için kullanılan DMSO'nun, altın nanoyapıları ve kontrol mutajenlerden sodyum azidi çözmek için kullanılan suyun, her iki bakteri suşu üzerine etkilerinin olup olmadığını kontrol etmek amacı ile negatif kontrol deneyi yapılmıştır. Bu denemede uygun konsantrasyondaki bakteri kültüründen 0,1 mL ve spektrofotometrik saflıktaki DMSO veya sudan 0,1 mL alınarak, içerisinde 2,5 mL üst agar bulunan tüpe aktarılıp karışım minimal glukoz agarlı plakların yüzeyine dağıtılmıştır. Plaklar 37°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılıp bu sürenin sonunda negatif kontrol plakları ile revertant plaklarındaki bakteri sayıları karşılaştırılmıştır. Bu sayıların benzer veya yakın olması, negatif kontrolü doğruladığını göstermiştir (Şekil 3.4.).



a **b**

Şekil 3.4. DMSO'nun negatif kontrol ajanı olarak kullanılması: **a)** *Salmonella typhimurium*n TA 98 suşu üzerine etkisi, **b)** *Salmonella typhimurium*n TA 100 suşu üzerine etkisi

3.5.2.8. Mutajenite deneyi (Ames/Salmonella/mikrozom testi)

Sentezlenen nanoyapıların mutajenitelerinin değerlendirilmesinde Salmonella mikrozom test sistemi kullanılmıştır (Maron ve Ames, 1983). Denemelerde Maron ve Ames (1983) tarafından tarif edilen "*standart plak inkorporasyon*" yöntemi baz alınmıştır. Bu yöntemde; S9 karışımı varlığı ve yokluğunda iki farklı çalışma yapılmıştır.

3.5.2.9. S9 karışımı yokluğunda deneyin yapılması

Test maddesinin metabolik ürünlerinin mutajen olup olmadığını araştırmak amacıyla mikrozomal enzim ekstresi (S9 Fraksiyonu) kullanılmaktadır.

Bu deney için ilk önce gecelik kültür hazırlanmıştır. 140 rpm'de 16 saat çalkalanan gecelik kültürden sabah saat 09:00'da 500,0 µL alınarak taze kültür hazırlanmış ve 6,5 saat boyunca 110 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Bakteri kültürünün 6,5 saat sonundaki üreme sayısının bu deney için uygun olduğu görülmüştür.

6,5 saat sonunda, su banyosunda 45ºC'de tutulan ve tüplere 2,5 mL olarak dağıtılmış olan üst agara (tüplere dağıtmadan önce 90,0 mL top agara 0,5 mM 10,0 mL histidin/biyotin çözeltisi eklenmiştir) sırasıyla önce sodyum-fosfat tampon çözeltisinden 500,0 µL, daha sonra test maddesinin değişik konsantrasyonlarından eklenmiş ve 100,0 µL 6,5 saatlik taze bakteri kültüründen eklenmiştir. Tüpler düşük hızda vortekslenerek minimal glikoz agar (MGA) plakları yüzeyine dökülüp sekiz şeklinde hareket ettirilerek karışımın homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır.

Deneyde her bir doz için 3 ayrı plak kullanılmış ve deneye paralel olarak pozitif ve negatif kontroller de yapılmıştır.

- Kontrol için (3 petri): Sodyum-fosfat tampon çözeltisinden 500,0 µL ve bakteri kültüründen 100,0 µL üst agara eklenmiştir.

- DMSO negatif kontrol için (3 petri): Sodyum-fosfat tampon çözeltisinden 500,0 µL, DMSO'dan 100,0 µL ve bakteri kültüründen 100,0 µL üst agara eklenmiştir.

- Pozitif kontrol için (3 petri): Sodyum-fosfat tampon çözeltisinden 500,0 µL, pozitif kontrol 100,0 µL ve bakteri kültüründen 100,0 µL üst agara eklenmiştir. Agarın donması beklenmiş ve plaklar ters çevrilerek 37ºC'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda petrilerdeki bakteri kolonileri sayılmıştır.

3.5.2.10. S9 karışımı varlığında deneyin yapılması

Bu deney için öncelikle gecelik kültür hazırlanmıştır. 140 rpm'de 16 saat çalkalanan gecelik kültürden sabah saat 09:00'da 500,0 µL alınarak taze kültür hazırlanmış ve 6,5 saat boyunca 110 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edilmiştir. Bakterinin gecelik taze kültürü hazırlanmış ve birkaç saat sonrasında yeniden pasajlanarak 6,5 saatlik taze kültür elde edilmiştir. Daha önceden hazırlanmış olan ve su banyosunda 45ºC'de tutulan 2,5 mL olarak dağıtılmış olan üst agara, sırasıyla önce 500,0 µL S9 karışımı, daha sonra 100,0 µL test maddesinin değişik konsantrasyonları ve 100,0 µL 6,5 saatlik taze bakteri kültüründen eklenmiştir. Vortekslenen tüplerin MGA plaklarına dökülmüş ve sekiz şeklinde hareket ettirilerek homojen bir dağılım sağlanmıştır.

Deneyde her bir doz için 3 ayrı plak kullanılmıştır. Deneye paralel olarak pozitif ve negatif kontroller de yapılmıştır.

- Kontrol için (3 petri): S9 karışımından 500,0 µL ve bakteri kültüründen 100 µL üst agara eklenmiştir.

- DMSO negatif kontrol için (3 petri): S9 karışımında 500,0 µL, DMSO'dan 100,0 µL ve bakteri kültüründen 100,0 µL üst agara eklenmiştir.

- Pozitif kontrol için (3 petri): S9 karışımından 500,0 µL, pozitif kontrol ve bakteri kültüründen de 100,0 µL üst agara eklenmiştir.

Agarın donması beklenip ve plaklar ters çevrilmiş 37°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda petrilerdeki koloniler sayılmıştır.

3.5.2.11. Mutajenite deneyi sonuçlarının değerlendirilmesi

Salmonella/mikrozom test sisteminde bir maddeye mutajen denilebilmesi için, bu maddenin mutajenik etkisiyle histidin (+) hale gelen prototrof bakteri hücre sayılarının, kendiliğinden geriye dönen (revertant) koloni sayısının en az iki katı olması gerekmektedir. Bununla birlikte bu sayı kendiliğinden geriye dönen koloni sayısının iki katından az olup, doza bağlı bir artış söz konusu ise bu durumda da bu maddeye mutajen denilebilmektedir (Maron ve Ames, 1983)

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

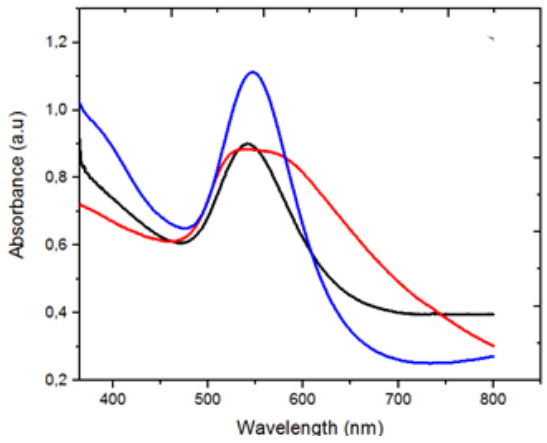
Bu tez çalışmasında çevre dostu yollarla altın nanoyapıların sentezi gerçekleştirilmiş ve sentezlenen altın nanoyapıların biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır. Nanoyapıların sentezi için tetrakloro aurik asit çözeltisi, Rosaceae familyasından Rosa türü gül, Punicaceae familyasından Punica granatum, L. türü nar ve Rubiacea familyasından coffea arabica türü kahve ile hazırlanan karışımlarla muamele edilmiştir. Sentezlenen nanoyapılar ultraviyole ve görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi, taramalı elektron mikroskobu ve geçirimli elektron mikroskobu ile karakterize edilmiştir. Karakterizasyon sonrasında, insan ve hayvanlar için patojen olan *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (MSSA), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 ve *Candida albican'a* karşı antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Sentezlenen nanoyapıların birçok olumlu biyolojik aktiviteye sahip olmasının yanında, mutasyona neden olan mutajenik etkilerinin de olması muhtemeldir. Bu faktör nanoyapıların kullanımını sınırlayan bir etken olmuştur. Bu doğrultuda farklı materyallerden sentezlenen farklı şekilllere sahip altın nanoyapıların organizmaya zararlı olası mutajenik etkileri araştırılmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlar altın nanoyapıların şekilsel farklılıklarıyla ve literatür çalışmalarıyla karşılaştırmalı olarak alt bölümlerde verilmiştir.

4.1. Altın Nanoyapıların Karakterizasyonu

4.1.1. Ultraviyole ve görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi ile yapılan karakterizasyon

Üç farklı kaynağın kullanımı sonucu çevre dostu yollarla sentezlenen farklı şekillere sahip altın nanoyapılara ait ultraviyole ve görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi ölçümleri Şekil 4.1.'de verilmiştir. Şekil 4.1. incelendiğinde üç farklı şekildeki altın nanoyapı için de 540 nm dalga boyunda ama farklı absorbans değerlerinde spektrumların kaydedildiği görülmektedir. Bu durum incelenen makale çalışmaları ile uyum içerisindedir (Sinha ve Ahmaruzzaman, 2015; Alvarez ve ark., 2016; Ullah ve ark., 2019). Ahmed ve ark.'ı (2016) altın nanoyapı sentezi için bitki ekstraktı ve tuz çözeltisi kullanmış ve kullanılan ekstraktın konsantrasyon değişimi ile ultraviyole ve görünür bölge

absorpsiyon spektroskopisi ölçümlerinin değişiklik gösterdiğini rapor etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada altın nanoyapıların dalga boylarının 553-573 nm arasında olduğunu belirtmişlerdir (Ahmed ve ark., 2016). Buna benzer sonuçlar elde edilen bir diğer çalışma da Owaid ve ark. (2017) tarafından gerçekleştirilmiştir. İlgili çalışmada altın nanoyapı sentezi için taze ve kuru sarı istiridye mantar ekstraktları kullanılmıştır. Taze istiridye mantarı ile kurutulmuş istiridye mantarından sentezlenen altın nanoyapıların ultraviyole ve görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi ölçümlerinde farklılık olduğunu ve dalga boylarının 540-550 nm arasında olduğunu belirtmişlerdir (Owaid ve ark., 2017). Irfan ve ark.'ı (2017) ise nanoyapı sentezi için palmiye yapraklarından elde ettikleri ekstraktı kullanmış ve sentezlenen nanoyapıların ultraviyole ve görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi ölçümlerinde dalga boylarının 531-543 nm arasında olduğunu belirtmişlerdir (Irfan ve ark., 2017). Bu çalışmada gül, nar ve kahve ile sentezlenen altın nanoyapıların, sırasıyla, AuNY-G, AuNY-N ve AuNY-K'nin görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi ölçümlerinde farklı absorbans değerlerindeki dalga boylarının 540 nm olması sebebiyle çalışmanın yapılan diğer çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür (Ahmed ve ark., 2016; Irfan ve ark., 2017; Owaid ve ark., 2017).

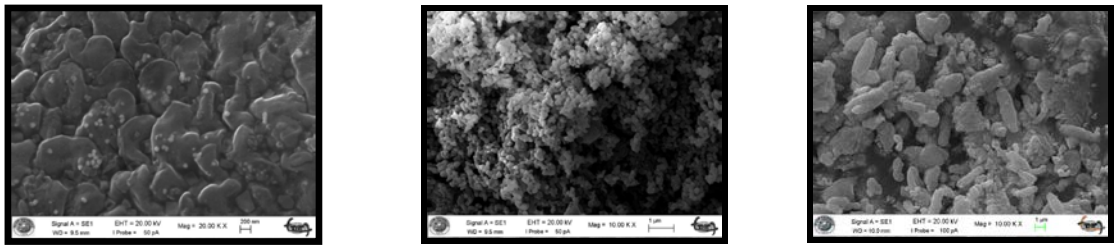


Şekil 4.1. Farklı kaynaklardan sentezlenen altın nanoyapıların ultraviyole ve görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi ile kaydedilen spektrumları: **Mavi:** AuNY-G (1,0 mM); **Kırmızı:** AuNY-N (1,0 mM); **Siyah:** AuNY-K (5,0 mM)

4.1.2. Taramalı elektron mikroskobu ile yapılan karakterizasyon

Farklı kaynaklardan sentezlenen altın nanoyapıların taramalı elektron mikroskobu ile kaydedilen ve Şekil.4.2.'de verilen görüntüler kaynağın değişimi ile nanoyapıların morfolojik özelliklerinin değişebildiğini göstermektedir. Şekil 4.2. (a)'da verilen AuNY-G yüzey genişliğinin daha fazla olduğu, Şekil 4.2. (b)'de verilen AuNY-

N'nın birbirine tutunmuş küresel şekilde olduğu ve Şekil 4.2. (c)'de AuNY-K'nın ise diğer iki altın nanoyapıya göre daha keskin hatları olan forma sahip olduğu tespit edilmiştir.



a **b** **c**

Şekil 4.2. Farklı kaynaklardan sentezlenen altın nanoyapıların taramalı elektron mikroskobu görüntüleri **a)** AuNY-G, **b)** AuNY-N ve **c)** AuNY-K

Bu tez çalışmasına benzer yapılan çalışmalarda da değişen süre, sıcaklık, konsantrasyon gibi etmenler ile altın nanoyapıların taramalı elektron mikroskobundaki görüntülerinin farklı olduğu rapor edilmiştir (Byranvand ve Kharat, 2014; Islam ve ark., 2015; Dhamecha ve ark., 2016). Dhamecha ve ark.'ı (2016) hem oda sıcaklığında hazırlanan hem de 40°C'de hazırlanan tropikal sürahi bitkisi ekstraktı kullanarak altın nanoyapı sentezlemişler ve altın nanoyapıların taramalı elektron mikroskobu ile alınan görüntülerinin farklı olduğunu ve oda sıcaklığındaki altın nanoyapıların diğerlerine göre daha dağınık şekilde istiflendiğini rapor etmişlerdir (Dhamecha ve ark., 2016). Islam ve ark.'nın (2017) söğütgiller familyasından olan ak söğüt yapraklarının farklı konsantrasyonlardaki ekstraktları ile sentezledikleri altın nanoyapıların taramalı elektron mikroskobundaki görüntülerinin konsantrasyon değişikliğine bağlı olarak farklılık gösterdiğini belirtmişlerdir (Islam ve ark., 2015). Yapılan benzer çalışmalardaki altın nanoyapıların taramalı elektron mikroskobu görüntüleri incelendiğinde farklı değişkenler (sentezde kullanılan kaynak maddeler, ısı uygulamaları, konsantrasyon gibi) ile altın nanoyapıların şekilsel olarak farklı özellikte oldukları, dolayısıyla yapılan tez çalışmasıyla tutarlı veriler olduğu tespit edilmiştir (Dhamecha ve ark., 2016; Naimi-Shamel ve ark., 2019) .

4.1.3. Geçirimli elektron mikroskobu ile yapılan karakterizasyon

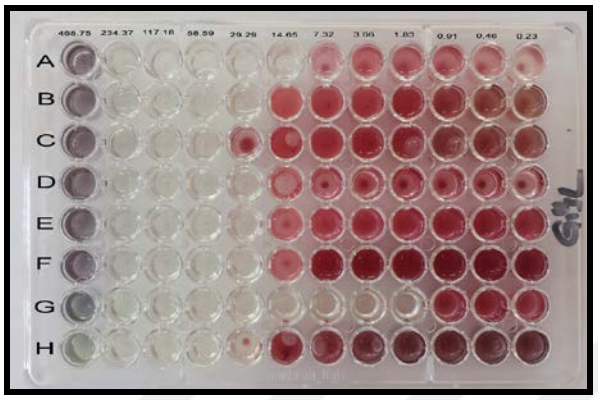
AuNY-G, AuNY-N ve AuNY-K tanecik boyutlarının geçirimli elektron mikroskobu ile alınan görüntüler sonucu sırasıyla 35 nm, 40-90 nm ve 5-30 nm gibi

sabit/değişken değerlerde olduğu tespit edilmiştir. Geçirimli elektron mikroskobu ile yapılan ölçümlerde kaynağa bağlı olarak boyutların 5-90 nm arasında olması nanoyapıların şekilsel farklılığını kanıtlamaktadır. Abdel-Raouf ve ark.'nın (2017) galaxaura elongata'dan sentezledikleri altın nanoyapıların çubuk, kesik üçgen, altıgen şeklinde üç farklı morfolojiye sahip olduğu ve boyutlarının 3,85-77,13 nm arasında olduğu; Ahmad ve ark.'nın (2013) mantardan sentezledikleri altın nanoyapıların ortalama 5 nm boyutunda olduğu; Alvarez ve ark.'nın (2016) hint incirinden sentezledikleri altın nanoyapıların altıgen, üçgen ve küresel şekillerde, 10-20 nm arasında boyutlara sahip olduğu; Hoshar ve ark.'nın (2016) çiğdem ve gardenya çiçeklerinden sentezledikleri altın nanoyapıların küresel şekillerde, 20 nm boyutunda olduğu rapor edilmiştir (Ahmad ve ark., 2013; Alvarez ve ark., 2016; Hoshyar ve ark., 2016; Abdel-Raouf ve ark., 2017). Dolayısıyla üç farklı kaynaktan sentezlenen AUNY-G, AuNY-N ve AuNY-K için farklı boyutların alınmış olması yapılan çalışmalarla uyum içerisindedir.

4.2. Altın Nanoyapıların Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi

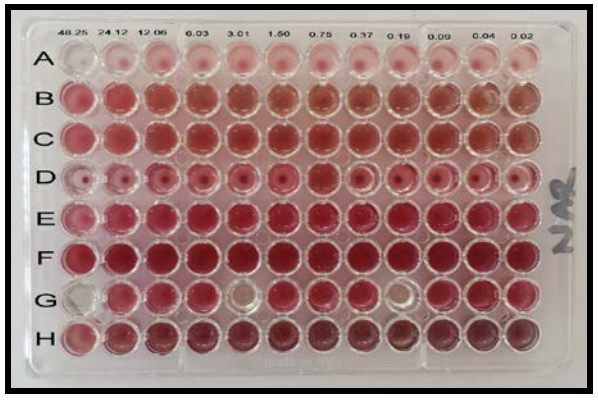
Bu çalışmada sentezlenen altın nanoyapıların sıvı mikrodüsyon testi ile çeşitli *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (MSSA), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Candida albicans* gibi patojen mikroorganizmalara karşı etkinliği test edilmiştir. Bu metotta test maddesinin mikroorganizmayla etkileşen miktarı belirlidir. Test maddesinin, hazırlanan stok çözeltisinden seyreltmeler yapılarak düzenli şekilde azalan konsantrasyonlar elde etmek, bu sayede de minimal inhibe edici konsantrasyonu belirlemek mümkün olmaktadır. İzlenen bu yöntem ile düşük miktardaki test maddesi ile minimum inhibüsyon değeri (MİK) değeri belirlenebilmektedir. Bu yöntem ile yapılan denemeler Şekil 4.3.-4.5. ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.1.'de verilmiştir. Tablo 4.1. incelendiğinde sentezlenen AuNY-G'nin 1,83 µg/mL gibi oldukça düşük bir konsantrasyonda önemli bir gıda patojeni olan *Listeria monocytogenes*'e karşı AuNY-N ve AuNY-K'ya kıyasla daha etkin olduğu, diğer bir suş olan *Escherichia coli* karşı da 14,65 µg/mL'lik bir dozda etkili olduğu, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* ve *Proteus mirabilis* suşlarının da 29,3 µg/mL'lik dozlarda AuNY-G'nin etkisinde kalmış olduğu görülmektedir. *Klebsiella penumoniae*

ve *Staphylococcus epidermidis* ise 58,6 µg/mL'lik MİK değeri ile test kimyasalına karşı en dirençli suşlar olarak görülmüştür. Buna rağmen kendilerine karşı belirlenen MİK değerleri kontrol antibiyotiği olan gentamisin ile kıyaslandığında, oldukça etkili antimikrobiyal etkinliği olduğu söylenebilir. Bu sonuçlardan AuNY-G'nin suşlar üzerinde etkisi en fazla olan materyal olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. AuNY-G antimikrobiyal sonuçları
A: *Escherichia coli*; **B:** *Pseudomonas aeruginosa*; **C:** *Klebsiella pneumoniae*; **D:** *Staphylococcus aureus* (MRSA); **E:** *Salmonella typhimurium*; **F:** *Proteus mirabilis*; **G:** *Listeria monocytogenes*; **H:** *Staphylococcus epidermidis*

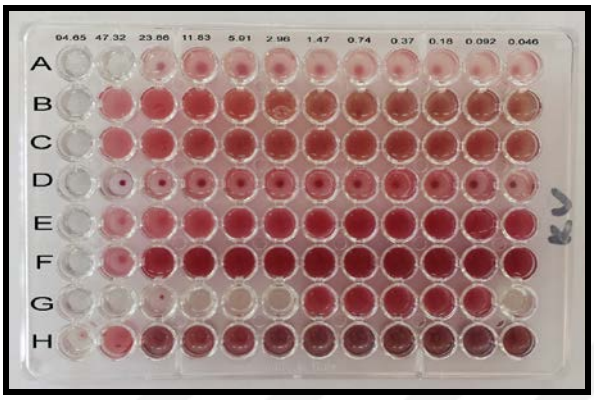
Tablo 4.1. incelendiğinde AuNY-N'nin 48,25 µg/mL dozunda sadece *Listeria monocytogenes*'e karşı etkili olduğu görülmektedir. *Listeria monocytogenes* suşunun gentamisine karşı dirençli olduğu gözönüne alındığında AuNY-N etkili olması öenme arz etmektedir. Bunun dışındaki bakteri suşlarının ise AuNY-N'dan herhangi bir şekilde etkilenmeyip dirençli olduğu görülmektedir (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. AuNY-N antimikrobiyal sonuçları
A: *Escherichia coli*; **B:** *Pseudomonas aeruginosa*; **C:** *Klebsiella pneumoniae*; **D:** *Staphylococcus aureus* (MRSA); **E:** *Salmonella typhimurium*; **F:** *Proteus mirabilis*; **G:** *Listeria monocytogenes*; **H:** *Staphylococcus epidermidis*

Tablo 4.1. incelendiğinde AuNY-K'nin iki farklı MİK değerine sahip olduğu, *Escherichia coli* ve *Listeria monocytogenes'in* AuNY-K'nin 47,32 µg/mL'lik dozundan

etkilenmesiyle en duyarlı iki suş olduğu ve AuNY-K'nin *Staphylococcus epidermidis* dışındaki bakterilerde ise 94,65 µg/mL dozunda etkiye sahip olduğu ve gentamisin ile kıyaslandığında AuNY-K'nin suşlar üzerinde önemli bir antimikrobiyal etkinliği olduğu ve *Staphylococcus epidermidis* suşunun ise AuNY-K'den hiç etkilenmediği dolayısıyla en dirençli suş olduğu görülmektedir (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. AuNY-K antimikrobiyal sonuçları
A: *Escherichia coli*; **B:** *Pseudomonas aeruginosa*; **C:** *Klebsiella pneumoniae*; **D:** *Staphylococcus aureus* (MRSA); **E:** *Salmonella typhimurium*; **F:** *Proteus mirabilis*; **G:** *Listeria monocytogenes*; **H:** *Staphylococcus epidermidis*

Tablo 4.1. AuNY-G, AuNY-N ve AuNY-K'nın antimikrobiyal etkisi

Suşlar	**(MİK) Konsantrasyon µg/mL**			
	AuNY-G	**AuNY-K**	**AuNY-N**	**Gentamisin**
***Escherichia coli* ATCC 25922**	14,65	47,32	-	2,44
***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**	29,3	94,65	-	9,76
***Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603**	58,6	94,65	-	2,44
***Staphylococcus aureus* (MRSA)ATCC 43300**	29,3	94,65	-	78,12
***Salmonella typhimurium* NRRLE 4463**	29,3	94,65	-	4,88
***Proteus mirabilis* ATCC 25933**	29,3	94,65	-	9,76
***Listeria monocytogenes* NRRL B33314**	1,83	47,32	48,25	-
***Staphylococcus epidermidis* NRRL B-4268**	58,6	-	-	4,88

Sonuçlar doğrultusunda AuNY-G, AuNY-N ve AuNY-K'nin her biri altın nanoyapı olsa da kaynak maddesindeki farklılıktan ötürü oluşan şekilsel farklılıklara bağlı olarak antimikrobiyal etkilerinin de birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir.

4.3. Altın Nanoyapıların Mutajenik Aktivite Sonuçları

Salmonella typhimurium TA 98 ve TA 100 için sentezlenen altın nanoyapıların S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğundaki plak inkorporasyon testi sonuçları Tablo 4.2.'de verilmiştir.

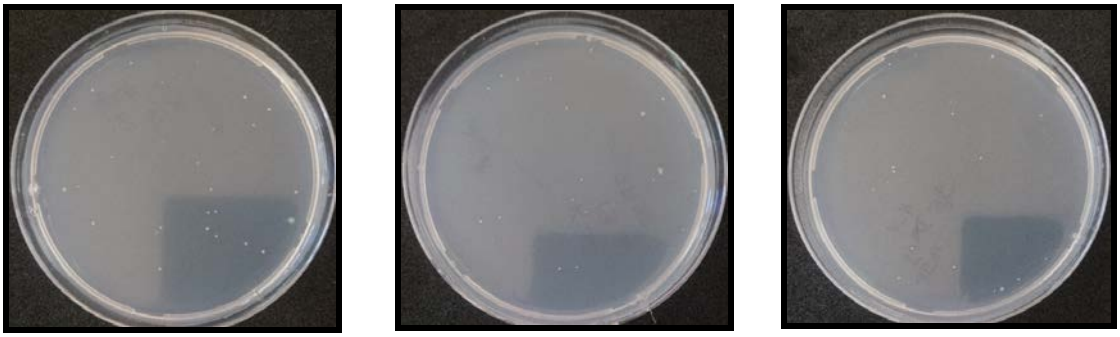
Tablo 4.2. AuNY-K, AuNY-N ve AuNY-G'nin *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları ile yapılan mutajenik aktivite belirleme testi sonuçları

	Konsantrasyon (µg/plak)	TA 98		TA 100	
		S9 (-)	S9 (+)	S9 (-)	S9 (+)
Negatif kontrol (Su)		34±7	28±4	151±13	139±17
Pozitif kontrol *		611±123	2875±379	1880±381	2227±299
Bakteri kontrol (0 µg/plak)		31±5	30±2	138±9	174±28
AuNY-K	**38**	33±1	26±4	151±12	141±10
	19	38±4	27±3	175±13	133±6
	9.5	40±3	24±4	157±11	151±8
AuNY-N	**19**	53±5	27±3	163±6	149±10
	9.5	25±1	26±3	145±10	130±8
	5	29±2	34±2	151±16	145±22
AuNY-G	**4.7**	54±4	24±2	121±24	134±9
	2.35	27±2	24±2	119±7	133±11
	1.17	37±3	24±3	143±2	157±24

Salmonella typhimurium TA 98 suşu için S9 karışımı varlığında pozitif kontrol olarak 2-aminofluoren (7.5 µg/plak), S9 karışımı yokluğunda ise 4-nitro-o-fenilendiamin (5 µg/plak); *Salmonella typhimurium* TA 100 suşu için S9 karışımı varlığında 2-aminoantrasen (5 µg/plak), S9 karışımı yokluğunda ise sodyum azid (5 µg/plak) kullanılmıştır.

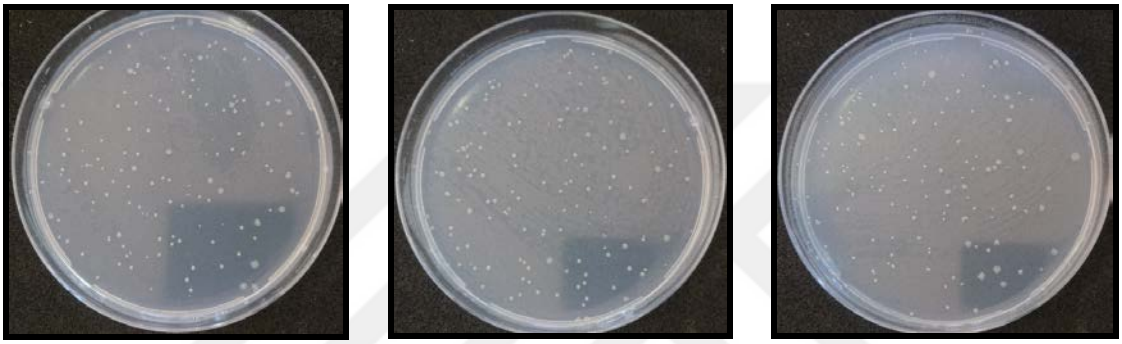
Test edilen AuNY-G, AuNY-N ve AuNY-K'nın *Salmonella typhimurium* TA 98 ve *Salmonella typhimurium* TA 100 üzerinde herhangi bir mutajenik etkisinin olması için, her materyal ile aynı zamanlı olarak hazırlanan kontrol plaklarındaki (0 µg dozu) koloni sayısının; maksimum sayılarının iki katından fazla veya iki katına yakın değerlerde olması gerekmektedir (Maron ve Ames, 1983)

Tablo 4.2. incelendiğinde AuNY-K'nın 38; 19 ve 9,5 µg/plak olmak üzere üç farklı dozlarda TA 98 suşu koloni sayılarında kontrol plağında gözlenen sayının iki katına yakın veya iki katını aşan bir değere ulaşmadığı görülmektedir (Şekil 4.6.a,b,c). Buradan bu maddenin Ames test sistemine göre mutajenik etkisinin bulunmadığı söylenebilir. Yine S9 karışımı varlığında dahi koloni sayısı kontrol plağındaki sayının iki katından fazla değildir. Bu durumda AuNY-K'nın TA 98 suşu üzerinde S9 karışımı varlığında ve yokluğunda baz kaymasına sebep olacak bir mutasyona neden olmadığı belirlenmiştir. TA 100 suşu içinde S9 karışımı varlığında ve S9 karışımı yokluğunda kontrol plaındaki koloni sayısının iki katından fazla veya iki katına yakın değerlerde olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.7.a,b,c). Dolayısıyla AuNY-K'nin TA 100 suşu üzerinde baz çifti değişimi mutasyonuna neden olmadığı sonucuna varılmıştır.



a b c

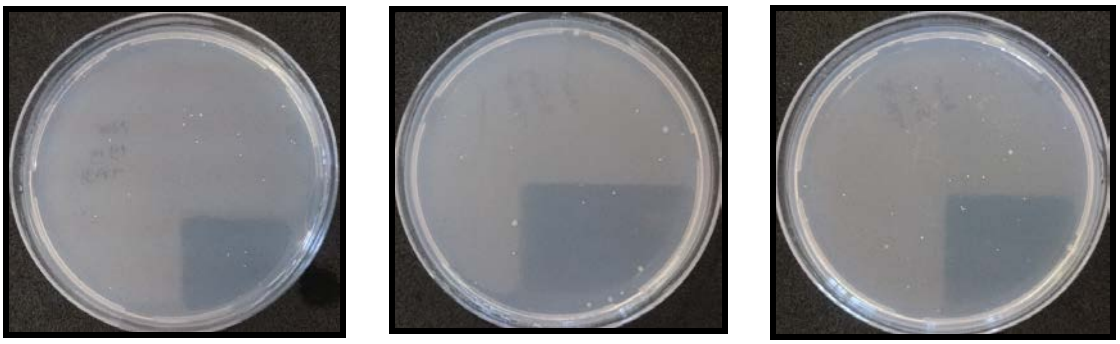
Şekil 4.6. a) AuNY-K 38 µg/plak doz uygulanan plak **b)** AuNY-K 19 µg/plak doz uygulanan plak **c)** AuNY-K 9,5 µg/plak doz uygulanan plak (*Salmonella typhimurium* TA 98 suşları, S9 karışımı yokluğunda)



a b c

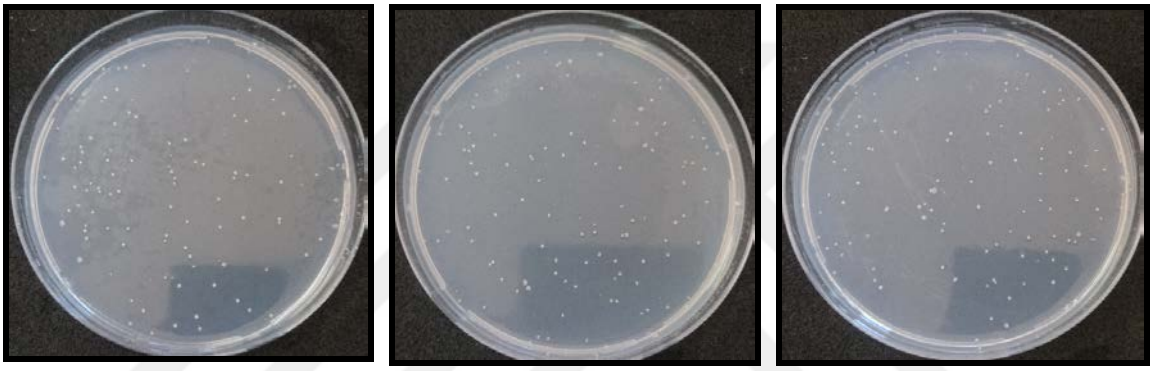
Şekil 4.7. a) AuNY-K 38 µg/plak doz uygulanan plak **b)** AuNY-K 19 µg/plak doz uygulanan plak **c)** AuNY-K 9,5 µg/plak doz uygulanan plak (*Salmonella typhimurium* TA 100 suşları, S9 karışımı yokluğunda)

Tablo 4.2. incelendiğinde AuNY-N'nin 19; 9,5 ve 5,0 µg/plak dozlardaki etkilerine bakıldığında TA 98 suşu üzerinde S9 karışımı varlığında ve yokluğunda herhangi bir mutajenik etkisi olmadığı görülmektedir (Şekil 4.8.a, b, c). Elde edilen ters mutasyon gösteren koloni sayıları sınırlar içerisindedir. TA 100 suşu için de bu durum söz konusudur. Geri dönen koloni sayılarında anormal bir artış gözlenmemiştir. TA 98 ve TA 100 suşları için S9 karışımı varlığı ve yokluğunda yapılan çalışmalarda AuNY-N'nin mutajen olmadıkları ve baz kayması ve baz çifti mutasyonlarını tetiklemedikleri tespit edilmiştir (Şekil 4.9. a, b, c).



a b c

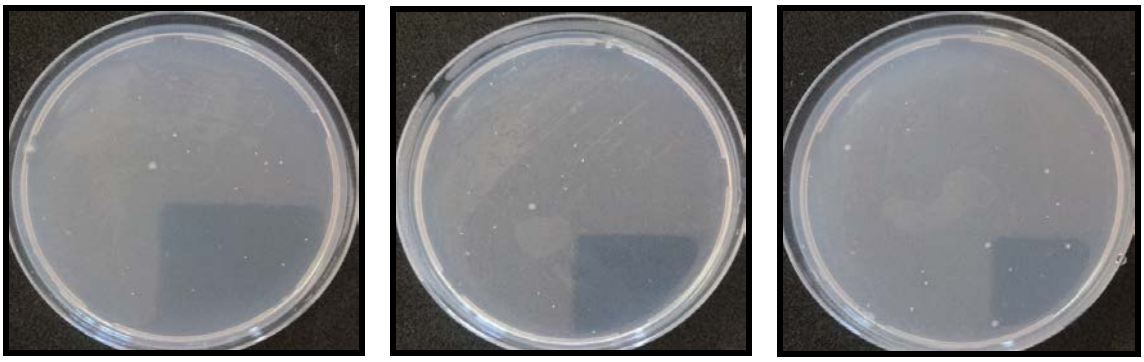
Şekil 4.8. a) AuNY-N 38 µg/plak doz uygulanan plak **b)** AuNY-N 19 µg/plak doz uygulanan plak **c)** AuNY-N 9,5 µg/plak doz uygulanan plak (*Salmonella typhimurium* TA 98 suşları, S9 karışımı yokluğunda)



a b c

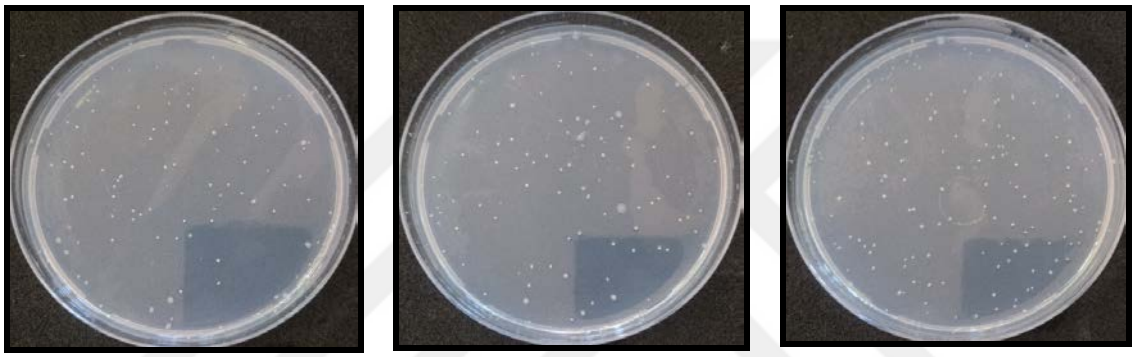
Şekil 4.9. a) AuNY-N 38 µg/plak doz uygulanan plak **b)** AuNY-N 19 µg/plak doz uygulanan plak **c)** AuNY-N 9,5 µg/plak doz uygulanan plak (*Salmonella typhimurium* TA 100 suşları, S9 karışımı yokluğunda)

Tablo 4.2. ve Şekil 4.10. ve 4.11.a, b, c incelendiğinde AuNY-G'nin 4,7; 2,35 ve 1,17 µg/plak konsantrasyonlarda TA 98 suşu üzerinde kontrol plağı ile kıyaslandığında koloni sayısı yükselmesine yani baz kayması mutasyonuna sebep olmadığı, hem S9 karışımı varlığında hem de yokluğunda benzer sonuçların elde edildiği görülmektedir. Buradan yola çıkarak AuNY-G'nin herhangi bir mutajenik etkiye sahip olmadığı ve baz çifti değişimi mutasyonlarını tespit eden TA 100 suşu üzerinde AuNY-G'nin belirtilen dozlarda metabolik aktivasyon enzim varlığında mutajenik etkisi olmadığı belirlenmiştir. Bu da test suşları üzerinde direk veya indirek bir mutasyona sebep olmadıklarını göstermektedir.



a b c

Şekil 4.10. a) AuNY-G 38 µg/plak doz uygulanan plak **b)** AuNY-G 19 µg/plak doz uygulanan plak **c)** AuNY-G 9,5 µg/plak doz uygulanan plak (*Salmonella typhimurium* TA 98 suşları, S9 karışımı yokluğunda)



a b c

Şekil 4.11. a) AuNY-G 38 µg/plak doz uygulanan plak **b)** AuNY-N 19 µg/plak doz uygulanan plak **c)** AuNY-N 9,5 µg/plak doz uygulanan plak (*Salmonella typhimurium* TA 100 suşları, S9 karışımı yokluğunda)

Günümüzde artan antibiyotik kullanımının getirdiği bir sonuç olan bakterilerin antibiyotik direncinin gelişmesi büyük bir sorun haline gelmiştir. Kullanılan ilaçlar, bu anlamda direnç gösteren bu suşlara karşı yetersiz kalmaktadır. Bu sebeple bu direnci kıracak etkili ve yeni maddelere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu ihtiyaç doğrultusunda biyolojik olarak sentezlenen metalik nanoyapıların mikroorganizmalar üzerindeki etkisi sıkça çalışılan bir konu olmuştur. Bu çalışmada da Rosaceae familyasından Rosa türü gül, Punicaceae familyasından Punica granatum, L. türü nar ve Rubiacea familyasından coffea arabica türü kahve ile hazırlanan sırasıyla AuNY-G, AuNY-N ve AuNY-K'nin kaynaklarındaki içeriklerin dolayısıyla $HAuCl_4$'teki Au (III) iyonlarının indirgenmesini sağlayan indirgeyici ajanların farklılıklarına paralel olarak şekilsel olarak birbirinden farklı nanoyapılar sentezlenmiş ve şekilsel farklılıklar spektroskobik/mikroskobik sonuçlarla ortaya konulmuştur. Şekilsel farklılıkların aynı zamanda biyolojik

çalışmalarda da etkisi araştırılmış ve antimikrobiyal aktivite ve mutajenite testi sonuçlarında da bu farklılıkların etkili olduğu görülmüştür.

Nanoyapılar DNA üzerinde direk veya indirek mekanizmalarda zarara neden olabilmektedir. Direk mekanizmalarda nanoyapılar genomik DNA ile etkileşime girmektedir. İndirek mekanizmalar da ise nanoyapıların serbest radikal oluşturarak oksidatif strese yol açtıkları ve DNA üzerinde hasara neden oldukları bilinmektedir. Bu hasarı hücre zarından geçerek DNA ile temas etmesi yolu ile verdiği öne sürülmektedir (George ve ark., 2017). Bu nedenle sentezlenen nanoyapıların DNA'da zincir kırıkları, mutasyonlar ya da kromozom anormalliklerine neden olup olmadığı genotoksisite testleri ile belirlenmektedir (Singh ve ark., 2009). Birçok çalışmada bu araştırılmış ve testler uygulanmıştır (Valdiglesias ve ark., 2013; Patlolla ve ark., 2015; Woźniak ve ark., 2017). Yapılan çeşitli çalışmalar sonucunda nanoyapıların mutasyona sebep olan etkilerinin gözlenmediği ancak güvenilirlik için tek test sistemi yerine daha çeşitli *in vitro* testler yapılarak kullanılmasının aydınlatıcı olacağı düşünülmüştür (Iglesias ve ark., 2017; Mahaye ve ark., 2017). Bu hedef doğrultusunda yapılan tez çalışmasının daha ileri *in vivo* araştırmalar için yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

Mutajenite ve antimikrobiyal test sonuçları beraber değerlendirildiğinde kuvvetli antimikrobiyal etki gösteren altın nanoyapıların bakteriyel mutajenite testinde de olumlu sonuçlar elde etmesi bu maddelerin sağlık, gıda ve birçok alanda güvenilir olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Bu durumun kesin sonuçlarla uygulanabilir olması için daha ileri özellikle *in vivo* testlerle de bu sonuçların desteklenmesi gerekmektedir.

Sonuçlardan yola çıkarak AuNY-G, AuNY-K ve AuNY-N'nin kullanım sınırlarının genişletilebilir olduğu öngörülmüştür.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Günümüzde teknoloji birçok alanda yaşam standartlarını iyileştirerek, etkili ve önemli çalışmalara imza atmıştır. Son yıllarda daha özel bir alanı olan nanoteknolojik çalışmalarla birçok alanda ilerleme kaydedilmiş, hayatımızı iyileştirme yönünde etkili çalışmalar yapılmıştır. Nanoteknoloji ile nanoyapı kavramı ortaya çıkmış ve enerji, sağlık, tekstil gibi bir çok alanda uygulamaları mevcut hale gelmiştir. Nanoyapıların çevre dostu yollarla sentezlenmesi, diğer sentez yöntemlerinden farklı olarak canlı yaşamına katkı sağlarken çevresel zararın daha aza indirgenmiş olmasıyla sağlayacağı katkıları daha anlamlı hale getirmiştir. Bu yöntemde kirliliğin temizlenmesinden ziyade kirlilik oluşturmamak hedeflenmektedir. Yeşil Kimya yöntemi ile sentezlenen nanoyapıların kimyasal ve fiziksel sentezinin yanı sıra biyolojik olarak sentezlenmesi ve uygulanılabilirliği çalışmalarda yer almış özellikle sağlık alanında ilgi çekmiştir.

Bu tez çalışmasında çevre dostu yollarla altın nanoyapılar sentezlenmiş ve spektroskobik/mikroskobik yöntemlerle karakterize edilmiştir. Yapılan karakterizasyonlar sonucunda ultraviyole ve görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi ile yapılan ölçümlerde 540 nm dalga boyunda AuNY-G, AuNY-K ve AuNY-N için farklı absorbans değerlerinde spektrumlar kaydedilmiş, taramalı elektron mikroskobu ile yapılan ölçümlerde farklı morfolojik görüntüler elde edilmiş ve geçirimli elektron mikroskobu ile yapılan ölçümlerde ise AuNY-G, AuNY-K ve AuNY-N sentezinde kullanılan Rosaceae familyasından Rosa türü güle, Punicaceae familyasından Punica granatum, L. türü nara ve Rubiacea familyasından coffea arabica türü kahveye bağlı olarak boyutlarının 5-90 nm arasında olması sonucu nanoyapıların şekilsel farklılığı kanıtlanmıştır. Sentezlenen AuNY-G, AuNY-K ve AuNY-N'nin insan ve hayvanlar için patojen olan *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (MSSA), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Candida albicans* gibi mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile ve organizmaya zararlı olası mutajenik etkilerinin olup olmadığı ise *Salmonella typhimurium* suşları kullanılarak Ames Testi ile araştırılmıştır. AuNY-G antimikrobiyal etkisinin düşük dozlarda dahi etkili olduğu, AuNY-N ve AuNY-K'nin de önemsenecek oranda antimikrobiyal aktivitesi olduğu tespit edilmiştir. Sentezlenen AuNY-G'nin 1,83 μg/mL gibi düşük bir dozda *Listeria monocytogenes* üzerinde etkili olduğu ve yine oldukça dirençli suşlar olan *Pseudomonas* ve

*Staphylococcus aureus'*a karşı 29,3 µg/mL konsantrasyonda güçlü antimikrobiyal etkiye sahip olduğu, AuNY-N'nin 48,25 µg/mL dozda *Listeria monocytogenes'*a karşı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu ve AuNY-K'nin ise *Staphylococcus epidermidis* hariç pek çok suşa karşı 94,65 µg/mL dozda orta derecede, *Escherichia coli* ve *Listeria monocytogenes*'a karşı ise önemli düzeyde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Sentezlenen AuNY-G, AuNY-K ve AuNY-N'nin *Salmonella typhimurium* suşları kullanılarak yapılan AMES Testi sonuçları ile mutajenik etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Bu sonuçlar doğrultusunda farklı kaynak maddeleri ile sentezlenen altın nanoyapıların sentez ertesi yapılan karakterizasyonlarının yanı sıra uygulama amacıyla yapılan antimikrobiyal aktivite ve mutajenik etki araştırmalarında da şekilsel farklılıkların etkili olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu tez çalışması aracılığıyla her ne kadar tek tip metalin nanoformu kullanılmış olsa da kaynak materyalin içeriğindeki indirgeyici ajan, sentez şartları gibi parametrelerle nanoyapıların kimyasal, fiziksel ve biyolojik özelliklerindeki değişimin uygulama tabanlı deney sonuçlarını da etkilediği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

Abdel-Raouf, N., Al-Enazi, N. M. ve Ibraheem, I. B. M., 2017, Green biosynthesis of gold nanoparticles using Galaxaura elongata and characterization of their antibacterial activity, *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S3029-S3039.

Ahmad, B., Hafeez, N., Bashir, S., Rauf, A. ve Mujeeb Ur, R., 2017, Phytofabricated gold nanoparticles and their biomedical applications, *Biomed Pharmacother*, 89, 414-425.

Ahmad, T., Wani, I. A., Manzoor, N., Ahmed, J. ve Asiri, A. M., 2013, Biosynthesis, structural characterization and antimicrobial activity of gold and silver nanoparticles, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 107, 227-234.

Ahmed, S., Annu, Ikram, S. ve Yudha, S. S., 2016, Biosynthesis of gold nanoparticles: A green approach, *J Photochem Photobiol B*, 161, 141-153.

Alvarez, R. A. B., Cortez-Valadez, M., Bueno, L. O. N., Britto Hurtado, R., Rocha-Rocha, O., Delgado-Beleño, Y., Martinez-Nuñez, C. E., Serrano-Corrales, L. I., Arizpe-Chávez, H. ve Flores-Acosta, M., 2016, Vibrational properties of gold nanoparticles obtained by green synthesis, *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, 84, 191-195.

Angel Ezhilarasi, A., Vijaya, J., Kasinathan, K., Maaza, M., Mariam, A. ve John Kennedy, L., 2016, Green synthesis of NiO nanoparticles using Moringa oleifera extract and their biomedical applications: Cytotoxicity effect of nanoparticles against HT-29 cancer cells, p.

Aswathy Aromal, S. ve Philip, D., 2012, Green synthesis of gold nanoparticles using Trigonella foenum-graecum and its size-dependent catalytic activity, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 97, 1-5.

Beik, J., Khateri, M., Khosravi, Z., Kamrava, S. K., Kooranifar, S., Ghaznavi, H. ve Shakeri-Zadeh, A., 2019, Gold nanoparticles in combinatorial cancer therapy strategies, *Coordination Chemistry Reviews*, 387, 299-324.

Bindhu, M. R. ve Umadevi, M., 2014, Antibacterial activities of green synthesized gold nanoparticles, *Materials Letters*, 120, 122-125.

Byranvand, M. M. ve Kharat, A. N., 2014, One pot green synthesis of gold nanowires using pomegranate juice, *Materials Letters*, 134, 64-66.

Cakić, M., Glišić, S., Nikolić, G., Nikolić, G. M., Cakić, K. ve Cvetinov, M., 2016, Synthesis, characterization and antimicrobial activity of dextran sulphate stabilized silver nanoparticles, *Journal of Molecular Structure*, 1110, 156-161.

Chen, T., Sheng, A., Hu, Y., Mao, D., Ning, L. ve Zhang, J., 2019, Modularization of three-dimensional gold nanoparticles/ferrocene/liposome cluster for electrochemical biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 124-125, 115-121.

Dean, B. J., Brooks, T. M., Hodson-Walker, G. ve Hutson, D. H., 1985, Genetic toxicology testing of 41 industrial chemicals, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 153 (1), 57-77.

Dhamecha, D., Jalalpure, S. ve Jadhav, K., 2016, Nepenthes khasiana mediated synthesis of stabilized gold nanoparticles: Characterization and biocompatibility studies, *J Photochem Photobiol B*, 154, 108-117.

Dhand, V., Soumya, L., Bharadwaj, S., Chakra, S., Bhatt, D. ve Sreedhar, B., 2016, Green synthesis of silver nanoparticles using Coffea arabica seed extract and its antibacterial activity, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 58, 36-43.

Dhanemozhi, A. C., Rajeswari, V. ve Sathyajothi, S., 2017, Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticle Using Green Tea Leaf Extract for Supercapacitor Application, *Materials Today: Proceedings*, 4 (2, Part A), 660-667.

Durak, Y., Uysal, A. ve Gunes, E., 2016, Investigation mutagenic and antimutagenic potentials of root methanol extract of Ferula elaeochytris Korovin by salmonella/microsome test system, *Journal of Biotechnology*, 231, S14.

Elumalai, K. ve Velmurugan, S., 2015, Green synthesis, characterization and antimicrobial activities of zinc oxide nanoparticles from the leaf extract of Azadirachta indica (L.), *Applied Surface Science*, 345 (Supplement C), 329-336.

Es'haghi, Z., Vafaeinezhad, F. ve Hooshmand, S., 2016, Green synthesis of magnetic iron nanoparticles coated by olive oil and verifying its efficiency in extraction of nickel from environmental samples via UV–vis spectrophotometry, *Process Safety and Environmental Protection*, 102, 403-409.

Gao, L., Wang, L., Yang, L., Zhao, Y., Shi, N., An, C., Sun, Y., Xie, J., Wang, H., Song, Y. ve Ren, Y., 2019, Preparation, characterization and antibacterial activity of silver nanoparticle/graphene oxide/diatomite composite, *Applied Surface Science*, 484, 628-636.

Gemmi, M., Serravalle, E. ve Roberti di Sarsina, P., 2019, A new method based on electron diffraction for detecting nanoparticles in injectable medicines, *Journal of Pharmaceutical Sciences*.

George, J. M., Magogotya, M., Vetten, M. A., Buys, A. V. ve Gulumian, M., 2017, From the Cover: An Investigation of the Genotoxicity and Interference of Gold Nanoparticles in Commonly Used In Vitro Mutagenicity and Genotoxicity Assays, *Toxicol Sci*, 156 (1), 149-166.

Guigas, C., Walz, E., Gräf, V., Heller, K. J. ve Greiner, R., 2017, Mutagenicity of silver nanoparticles in CHO cells dependent on particle surface functionalization and metabolic activation, *Journal of Nanoparticle Research*, 19 (6).

Hepokur, C., Kariper, İ. A., Mısır, S., Ay, E., Tunoğlu, S., Ersez, M. S., Zeybek, Ü., Kuruca, S. E. ve Yaylım, İ., 2019, Silver nanoparticle/capecitabine for breast cancer cell treatment, *Toxicology in Vitro*, 61, 104600.

Hoshyar, R., Khayati, G. R., Poorgholami, M. ve Kaykhaii, M., 2016, A novel green one-step synthesis of gold nanoparticles using crocin and their anti-cancer activities, *J Photochem Photobiol B*, 159, 237-242.

Iglesias, T., Dusinska, M., El Yamani, N., Irache, J. M., Azqueta, A. ve López de Cerain, A., 2017, In vitro evaluation of the genotoxicity of poly(anhydride) nanoparticles designed for oral drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 523 (1), 418-426.

Irfan, M., Moniruzzaman, M., Ahmad, T., Mandal, P. C., Bhattacharjee, S. ve Abdullah, B., 2017, Ionic liquid based extraction of flavonoids from Elaeis guineensis leaves and their applications for gold nanoparticles synthesis, *Journal of Molecular Liquids*, 241, 270-278.

Islam, N. U., Jalil, K., Shahid, M., Rauf, A., Muhammad, N., Khan, A., Shah, M. R. ve Khan, M. A., 2015, Green synthesis and biological activities of gold nanoparticles functionalized with Salix alba, *Arabian Journal of Chemistry*.

Kashale, A. A., Gattu, K. P., Ghule, K., Ingole, V. H., Dhanayat, S., Sharma, R., Chang, J.-Y. ve Ghule, A. V., 2016, Biomediated green synthesis of TiO2 nanoparticles for lithium ion battery application, *Composites Part B: Engineering*, 99, 297-304.

Koc, Z. E. ve Uysal, A., 2016, Investigation of novel monopodal and dipodal oxy-Schiff base triazine from cyanuric chloride: Structural and antimicrobial studies, *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 53 (2), 111-115.

Lokina, S., Suresh, R., Giribabu, K., Stephen, A., Lakshmi Sundaram, R. ve Narayanan, V., 2014, Spectroscopic investigations, antimicrobial, and cytotoxic activity of green synthesized gold nanoparticles, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 129, 484-490.

Mahaye, N., Thwala, M., Cowan, D. A. ve Musee, N., 2017, Genotoxicity of metal based engineered nanoparticles in aquatic organisms: A review, *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 773, 134-160.

Malekshahi Byranvand, M. ve Nemati Kharat, A., 2014, One pot green synthesis of gold nanowires using pomegranate juice, p.

Maron, D. M. ve Ames, B. N., 1983, Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 113 (3), 173-215.

Mochochoko, T., Oluwafemi, O. S., Jumbam, D. N. ve Songca, S. P., 2013, Green synthesis of silver nanoparticles using cellulose extracted from an aquatic weed; water hyacinth, *Carbohydr Polym*, 98 (1), 290-294.

Muthukumar, T., Sudhakumari, Sambandam, B., Aravinthan, A., Sastry, T. P. ve Kim, J.-H., 2016, Green synthesis of gold nanoparticles and their enhanced synergistic antitumor activity using HepG2 and MCF7 cells and its antibacterial effects, *Process Biochemistry*, 51 (3), 384-391.

Naimi-Shamel, N., Pourali, P. ve Dolatabadi, S., 2019, Green synthesis of gold nanoparticles using Fusarium oxysporum and antibacterial activity of its tetracycline conjugant, *Journal de Mycologie Médicale*, 29 (1), 7-13.

Noruzi, M., Zare, D., Khoshnevisan, K. ve Davoodi, D., 2011, Rapid green synthesis of gold nanoparticles using Rosa hybrida petal extract at room temperature, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 79 (5), 1461-1465.

Owaid, M. N., Al-Saeedi, S. S. S. ve Abed, I. A., 2017, Biosynthesis of gold nanoparticles using yellow oyster mushroom Pleurotus cornucopiae var. citrinopileatus, *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 8, 157-162.

Park, S., Kim, H., Lim, S. C., Lim, K., Lee, E. S., Oh, K. T., Choi, H.-G. ve Youn, Y. S., 2019, Gold nanocluster-loaded hybrid albumin nanoparticles with fluorescence-based optical visualization and photothermal conversion for tumor detection/ablation, *Journal of Controlled Release*, 304, 7-18.

Patlolla, A. K., Hackett, D. ve Tchounwou, P. B., 2015, Genotoxicity study of silver nanoparticles in bone marrow cells of Sprague–Dawley rats, *Food and Chemical Toxicology*, 85, 52-60.

Patra, S., Mukherjee, S., Barui, A. K., Ganguly, A., Sreedhar, B. ve Patra, C. R., 2015, Green synthesis, characterization of gold and silver nanoparticles and their potential application for cancer therapeutics, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 53, 298-309.

Prakash, P., Gnanaprakasam, P., Emmanuel, R., Arokiyaraj, S. ve Saravanan, M., 2013, Green synthesis of silver nanoparticles from leaf extract of Mimusops elengi, Linn. for enhanced antibacterial activity against multi drug resistant clinical isolates, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 108, 255-259.

Reddy, K. R., 2017, Green synthesis, morphological and optical studies of CuO nanoparticles, *Journal of Molecular Structure*, 1150, 553-557.

Roshni, V. ve Ottoor, D., 2015, Synthesis of carbon nanoparticles using one step green approach and their application as mercuric ion sensor, *Journal of Luminescence*, 161, 117-122.

Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G. J. S., Griffiths, S. M., Williams, P. M., Maffeis, T. G. G., Wright, C. J. ve Doak, S. H., 2009, NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials, *Biomaterials*, 30 (23), 3891-3914.

Sinha, T. ve Ahmaruzzaman, M., 2015, A novel and greener approach for shape controlled synthesis of gold and gold–silver core shell nanostructure and their application in optical coatings, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 145, 280-288.

Ullah, N., Odda, A. H., Li, D., Wang, Q. ve Wei, Q., 2019, One-pot green synthesis of gold nanoparticles and its supportive role in surface activation of non-woven fibers as heterogeneous catalyst, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 571, 101-109.

Valdiglesias, V., Costa, C., Kiliç, G., Costa, S., Pásaro, E., Laffon, B. ve Teixeira, J. P., 2013, Neuronal cytotoxicity and genotoxicity induced by zinc oxide nanoparticles, *Environment International*, 55, 92-100.

Woźniak, A., Walawender, M., Tempka, D., Coy, E., Załęski, K., Grześkowiak, B. F. ve Mrówczyński, R., 2017, In vitro genotoxicity and cytotoxicity of polydopamine-coated magnetic nanostructures, *Toxicology in Vitro*, 44, 256-265.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Şule BULUT
Uyruğu	**:**	TC
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	İZMİR 06.08.1992
Telefon	**:**	05415886774
Faks	**:**	
e-mail	**:**	bulutsule1992@gmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	Mehmet Akif Ersoy Lisesi Biga Çanakkale	2010
Üniversite	:	Selçuk Üniversitesi Selçuklu Konya	2014
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi Selçuklu Konya	Devam ediyor

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
2018	Coster Aerosol Valf San. A.Ş	Kalite kontrol sorumlusu

YABANCI DİLLER

İngilizce

PROJELER

1. Bakır Nanopartiküllerin Şekilsel Farklılıklarının Biyoelektrokimyasal Yanıtlara Etkisinin İncelenmesi (Selçuk üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü, Proje no: 15401163)
2. Çevre Dostu Yollarla Metal Nanoyapıların Sentezi ve Bazı Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması (Selçuk üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü, Proje no: 16201080)

YAYINLAR

1. **Bulut, S.,** Oztekin, Y., Green synthesis of gold nanoforms in various structures *10th Aegean Analytical Chemistry Days,* Canakkale, Turkey, 29 September-2 October 2016 (Yüksek Lisans Tezinden üretilmiş bildiridir.)