

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TİCARİ NANOPARTİKÜLLERİN *P. SUBCAPİTATA* YEŞİL-ALG TÜRÜ
ÜZERİNDEKİ AKUT TOKSİSİTESİNİN İNCELENMESİ**

Merve ÖZKALELİ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

2014

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TİCARİ NANOPARTİKÜLLERİN *P. SUBCAPITATA* YEŞİL-ALG TÜRÜ
ÜZERİNDEKİ AKUT TOKSİSİTESİNİN İNCELENMESİ**

Merve ÖZKALELİ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

Bu tez çalışması, 2013.01.0102.010 proje numarasıyla Akdeniz Üniversitesi
Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi ve 114Y015 proje numarasıyla
TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

2014

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TİCARİ NANOPARTİKÜLLERİN *P. SUBCAPİTATA* YEŞİL-ALG TÜRÜ
ÜZERİNDEKİ AKUT TOKSİSİTESİNİN İNCELENMESİ**

Merve ÖZKALELİ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 25/12/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Ayça ERDEM (Danışman)

Prof. Dr. Cafer TURGUT

Yrd. Doç. Dr. Çiğdem KIVILCIMDAN MORAL

ÖZET

TİCARİ NANOPARTİKÜLLERİN *P. SUBCAPİTATA* YEŞİL-ALG TÜRÜ ÜZERİNDEKİ AKUT TOKSİSİTESİNİN İNCELENMESİ

Merve ÖZKALELİ

Yüksek Lisans Tezi, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı
Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ayça ERDEM
Aralık 2014, 88 sayfa

Nanoteknoloji; boyutları 1-100 nm arasında değişen nanopartiküllerin (NPLerin) özelliklerini, yapılarını kontrol edip değiştirebilme yeteneğine sahip olan, aynı zamanda bu özellikleri kullanarak yeni ürünlerin üretilmesine olanak sağlayan bilim dalıdır. Metal oksit NPLer günümüzde boya endüstrisinden savunma sanayisine, ilaç endüstrisinden otomotiv sanayisine birçok alanda kullanılmaktadır. Dünya genelinde NPLerin üretimi ve ekonomiye olan katkıları her geçen gün artmaktadır. Ancak NPLerin alıcı ortamlardaki canlılar ve insan sağlığına vereceği olumsuz etkiler henüz açıklanamamıştır. Avrupa Birliği başta olmak üzere pek çok uluslararası çevre organizasyonları tarafından NPLerle ilgili mevzuat çalışmaları başlatılmıştır. Aynı zamanda insan ve çevre sağlığı üzerindeki araştırmalar devam ediyor olsa da olası etkiler henüz belirlenememiştir.

Bu tez çalışmasında, farklı konsantrasyonlardaki(1- 500 mg/L)metal oksit TiO_2 , CuO ve ZnO NPLerinin farklı su kalite özelliklerine sahip (Yumuşak- çok sert, düşük - yüksek alkalinite, pH 6,5-8,5) sentetik yüzeysel su örneklerinde, farklı dispersiyon metodları (karıştırma, probu sonikasyon ve banyo sonikasyon) kullanılarak, çeşitli çevresel şartlar altında (pH, iyonik güç vs), yeşil- alg *Pseudokirchneriella subcapitata* üzerindeki ekotoksik etkileri araştırılmıştır. Etki analizleri kapsamında alg inhibisyonu, hücre membranında değişim, hücre solunum aktivitesi ile morfolojik gözlem gerçekleştirilmiştir. Doz-tepki analizlerinden elde edilen sonuçlar kullanılarak Etki Konsantrasyon (EC_{50}) seviyeleri her bir NP için hesaplanmış ve alglerde akut toksisiteye sebep olan etkili metal oksit NP türü belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Metal oksit nanopartiküller, yeşil-alg, ekotoksisite, membran deformasyonu, solunum aktivitesi

JÜRİ: Yrd. Doç. Dr. Ayça ERDEM (Danışman)
Prof. Dr. Cafer TURGUT
Yrd. Doç. Dr. Çiğdem KIVILCIMDAN MORAL

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ACUTE TOXICITY OF COMMERCIAL NANOPARTICLES ON GREEN-ALGAE *P. SUBCAPITATA*

Merve ÖZKALELİ

Master of Science Thesis in Environmental Engineering

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Ayça ERDEM

December 2014, 88 pages

Nanotechnology deals with nanoparticles (NPs), which is in the range of 1 to 100 nm, to understand their novel properties, to increase their controllability and to improve the processes using this technology. Metal oxide NPs are being used in many products; from paint industry to military, and from pharmaceutical industry to automotive industry. The contributions of NP production and their economical value globally increase. However, the adverse effects of NPs on human and environmental health remain questionable. European Union and many other international environmental organizations have started legislative actions on NPs. In the meantime, although the research on the effects of NPs on human and environmental health has still been carried out, the possible effects have not been determined, yet.

In this thesis, the ecotoxic effects of TiO₂, CuO and ZnO metal oxide NPs with different concentrations (1- 500 mg/L) dispersed (mixing, probe sonication and bath sonication) in synthetic surface water samples with different water quality parameters (Soft- very hard, low- high alkalinity, pH 6,5-8,5) on green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* under ambient conditions were investigated. Within the scope of end point analyses, algal inhibition, cell membrane deformation, cellular respiration activity and morphological examination were conducted. Effect Concentration (EC₅₀) values from each NP were calculated using dose- response results, and the effective metal oxide NP causing acute toxicity on algae was determined.

KEYWORDS: Metal oxide nanoparticles, green algae, ecotoxicity, membrane deformation, cellular respiratory

COMMITTEE: Assist. Prof. Dr. Ayça ERDEM (Supervisor)
Prof. Dr. Cafer TURGUT
Assist. Prof. Dr. Çiğdem KIVILCIMDAN MORAL

ÖNSÖZ

Son yıllarda büyük gelişme gösteren nanoteknoloji, kullanıma olanak sunduğu ürünleriyle birlikte yaygın bir uygulama alanı bulmuştur. Bu gelişme üretiminden tüketimine tüm ana ve ara yollardan çevreye yayılan atıklarının artışları da benzer paralellik göstermektedir. Dağılım ortamı olarak sucul ortamlarda etkilerinin var olduğu bilinmekle beraber henüz tam olarak yeterli bilgi düzeyine ulaşılamamıştır.

“Ticari Nanopartiküllerin *P. subcapitata* Yeşil-Alg Türü Üzerindeki Akut Toksisitesinin İncelenmesi” başlıklı tez çalışmada metal oksit nanopartiküllerin farklı yüzeysel su örnekleriyle, farklı dispersiyon metodlarıyla muamele edilmiş ve, sucul organizma olan *Pseudokirchneriella subcapitata* yeşil alg türü üzerindeki ekotoksik etkileri incelenmiştir.

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince ilminden faydalandığım, insani değerleri ile örnek aldığım, birlikte çalışmaktan onur ve gurur duyduğum ayrıca tecrübelerinden faydalanırken göstermiş olduğu sabır ve ilgisinde dolayı, bilgi ve tecrübesini esirgmeden benimle paylaşan, değerli danışman hocam Yrd.Doç.Dr. Ayça ERDEM’e teşekkür ederim.

Projeyi maddi olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (2013.01.0102.010) ve TÜBİTAK’a (114Y015) teşekkür ederim.

Nanopartikül karakterizasyonunun gerçekleştirilmesine olanak sunan, Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi Kimya Bölümü’nden Prof.Dr. Ertuğrul ARPAÇ ve ekibine, mikroskopik görüntüleme için Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden Yrd.Doç.Dr. Mustafa YAVUZ ve ekibine yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında desteklerini aldığım Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümü NanoKOK laboratuvarı mensuplarından Araş.Gör. Emine CAN GÜVEN ve Dilek BOLAT’a, Akdeniz Üniversitesi Makine Mühendisliği Bölümünden Araş. Gör. Fatih GÜVEN’e teşekkür ederim.

İkinci ailem olarak benimsediğim, arkadaşım Hilal OKUMAMIŞ ve ailesine teşekkür ederim.

Son olarak, desteklerini ve varlıklarını her zaman yanımda hissettiğim başta babam ve annem olmak üzere tüm aileme şükranlarımı sunarım.

Merve ÖZKALELİ

25/12/2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİ VE KAYNAK TARAMALARI	3
2.1. Nanoteknolojinin Gelişimi ve Nanoteknolojik Faaliyetler	3
2.2. Nanopartiküller.....	5
2.2.1. Nanopartiküllerin genel özellikleri.....	5
2.2.2. Metal oksit nanopartiküller	7
2.2.3. Nanopartiküllerinkarakterizasyonu	8
2.2.4. Nanopartiküller ile ilgili yasal durum	10
2.2.5. Nanoteknolojik faaliyetlerin Türkiye’deki durumu	12
2.2.6. Nanopartiküllerin ekotoksik etkileri.....	13
3. MATERYAL VE METOT	17
3.1. Çalışmada Kullanılan Alg türü: <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	17
3.2. Stok Alg Kültürlerinin hazırlanması	17
3.3. Çalışmada Kullanılan Metal Oksit Nanopartiküller	18
3.4. Nanopartikül Çözeltilerinin Hazırlanması	19
3.5. Nanopartikül Karakterizasyonu.....	20
3.6. Etki Analizleri	20
3.6.1. Alg inhibisyon analizi	20
3.6.2. Membran deformasyonu: Lipid Peroksidasyon	21
3.6.3. Solunum aktivitesi: TTC indirgenmesi	22
3.6.4. Morfolojik değişim.....	22
4. BULGULAR.....	23
4.1. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	23

4.1.1. Karıştırma dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış nanopartiküllerin karakterizasyonu.....	23
4.1.2. Problu sonikasyon dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış nanopartiküllerin karakterizasyonu.....	24
4.1.3. Banyo sonikasyon dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış nanopartiküllerin karakterizasyonu.....	25
4.2. TiO ₂ Nanopartiküllerinin Algler Üzerindeki Etkileri	26
4.2.1. Karıştırma dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış TiO ₂ nanopartiküllerinin algler üzerindeki etkisi	26
4.2.2. Problu sonikasyon dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış TiO ₂ nanopartiküllerinin algler üzerindeki etkisi.....	31
4.2.3. Banyo sonikasyon dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış TiO ₂ nanopartiküllerinin algler üzerindeki etkisi.....	36
4.3. ZnO Nanopartiküllerinin Algler Üzerindeki Etkileri	41
4.3.1. Karıştırma dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış ZnO nanopartiküllerinin algler üzerindeki etkisi	41
4.3.2. Problu sonikasyon dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış ZnO nanopartiküllerinin algler üzerindeki etkisi.....	46
4.3.3. Banyo sonikasyon dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış ZnO nanopartiküllerinin algler üzerindeki etkisi.....	51
4.4. CuO Nanopartiküllerinin Algler Üzerindeki Etkileri.....	56
4.4.1. Karıştırma dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış CuO nanopartiküllerinin algler üzerindeki etkisi	56
4.4.2. Problu sonikasyon dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış CuO nanopartiküllerinin algler üzerindeki etkisi.....	61
4.4.3. Banyo sonikasyon dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış CuO nanopartiküllerinin algler üzerindeki etkisi.....	66
5. TARTIŞMA	72
5.1. Nanopartikül Çözeltilerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	72
5.2. Nanopartiküllerin Organizma İnhibisyonuna Etkileri	73
5.3. Nanopartiküllerin Organizma Membran Deformasyonuna Etkileri.....	75
5.4. Nanopartiküllerin Organizma Solunum Aktivitesine Etkileri.....	76
6. SONUÇ	78
7. KAYNAKÇA	80
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar

AB	Avrupa Birliği
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AFM	(Atomic Force Microscopy) Atomik Güç Mikroskopisi
BET	(Brunauer, Emmet ve Teller) Yüzey Alanı Ölçümü
CNT	(Carbone nanotube) Karbon Nanotüp
CSA	(Canadian Engineering Standards Association) Kanada Mühendislik Standartları Birliği
CuO	Bakır Oksit
DLS	(Dinamik Light Scattering) Dinamik Işık Saçılımı
DLVO	Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DOM	Doğal Organik Madde
DPT	Devlet Planlama Teşkilatı
EC ₅₀	(Effect Concentration) Etkili Konsantrasyonu
EDL	(Electrical Double Layer) Elektriksel Çift Yüzey
FDA	(Food and Drug Administration) Gıda ve İlaç İdaresi
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
ICP-MS	(Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometer) Etkileşik Çiftlenmiş Plaza
ISO	(International Standard Organization) Uluslararası Standartlar Organizasyonu
LC- GPC	(Liquid Chromatography-Gel Permeation Chromatography) Sıvı Kromatografi-Jel Permeasyon Kromatografisi
LC ₅₀	(Lethal Concentration) Letal Konsantrasyon
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
mM	Milimolar
NM	Nanomalzeme
nm	Nanometre
NNI	(National Nanotechnology Initiative) Ulusal Nanoteknoloji Girişimi
NOEC ₅₀	(No Observed Effect Concentration) Etki Gözlemlenmemiş Konsantrasyon
NP	Nanopartikül
OECD	(Organisation for Economic Co-operation and Development) Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü
OECD (WPNM)	(Organisation for Economic Co-operation and Development Working Party on Manufactured Nanomaterials) Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü'nün Üretilen Nanomalzemeler Grubu

PZC	(Point Zero of Charge) Sıfır Yük Noktası
REACH	(Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) Kimyasalların Kayıt, Değerlendirme, Onaylama, Kısıtlanması
ROS	(Reactive Oxygen Species) Reaktif Oksijen Türü
SEM	(Scanning Electron Microscope)Taramalı Elektron Mikroskopisi
SYS	Sentetik Yüzeysel Su
TBA	(Thiobarbituric Acid) Thiobarbituric Asit
TCA	(Trichloroacetic Acid) Trichloroacetic Asit
TEM	(Transmission Electron Microscope) Transmisyon Elektron Mikroskopisi
TiO ₂	Titanyum Dioksit
TTC	2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride
TTF	2,3,5-triphenyltetra zolium formazan
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
TÜSİAD	Türk Sanayicileri ve İşadamları Derneği
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
ZnO	Çinko Oksit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Web of Science'da NPLerin canlılar üzerindeki "toksisite"sinin çalışıldığı genel yayın (a) ve Türkiye (b) ölçeğinde yapılmış yayın sayıları.....	4
Şekil 2.2. Fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre nanomalzemelerin sınıflandırılması.....	5
Şekil 2.3. Nanomalzemelerin boyut, morfoloji, kompozisyon, homojenlik ve agregasyondurumlarına göre sınıflandırılması.....	6
Şekil 3.1. <i>P. subcapitata</i> alg türünün genel görünümü.....	17
Şekil 3.2. Ticari olarak temin edilen TiO ₂ , CuO ve ZnO nanopartiküllerinin SEM görüntüleri.....	19
Şekil 3.3. Deney düzeneklerinin detaylı gösterimi.	20
Şekil 3.4. Biyolojik kabin içinde test düzeneklerinin yerleştirimi.....	21
Şekil 4.1. Sentetik yüzeysel su örnekleri içinde karıştırma metodu ile hazırlanan nanopartiküllerinpartikül boyutu ve zeta potansiyeli ölçüm sonuçları	24
Şekil 4.2. Sentetik yüzeysel su örnekleri içinde problu sonikasyon dispersiyon yöntemi ile hazırlanan nanopartiküllerinpartikül boyutu ve zeta potansiyeli ölçüm sonuçları	25
Şekil 4.3. Sentetik yüzeysel su örnekleri içinde banyo sonikasyon dispersiyon metodu ile hazırlanan nanopartiküllerinpartikül boyutu ve zeta potansiyeli ölçüm sonuçları.....	26
Şekil 4.4. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde karıştırma metodu ile hazırlanan TiO ₂ nanopartiküllerinin alg inhibisyonuna etkisi	28
Şekil 4.5. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde karıştırma metodu ile hazırlanan TiO ₂ nanopartiküllerininmembran deformasyonuna etkisi	29
Şekil 4.6. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde karıştırma metodu ile hazırlanan TiO ₂ nanopartiküllerinininsolunumaktivitesine etkisi	30
Şekil 4.7. Karıştırma dispersiyon metodu ile hazırlanmış orta sert SYS örneğine ait TiO ₂ nanopartikülünün ışık mikroskobu altındaki görüntüsü.....	31
Şekil 4.8. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde problu sonikasyon metodu ile hazırlanan TiO ₂ nanopartiküllerinin alg inhibisyonuna etkisi	33
Şekil 4.9. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde problu sonikasyon metodu ile hazırlanan TiO ₂ nanopartiküllerininmembran deformasyonuna etkisi	34
Şekil 4.10. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde problu sonikasyon metodu ile hazırlanan TiO ₂ nanopartiküllerinininsolunum aktivitesine etkisi	35
Şekil 4.11. Problu sonikasyon dispersiyon metodu ile hazırlanmış orta sert SYS örneğine ait TiO ₂ nanopartikülünün ışık mikrosbu altındaki görüntüsü.....	36

Şekil 4.12. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde banyo sonikasyon metodu ile hazırlanan TiO ₂ nanopartiküllerinin alg inhibisyonuna etkisi.....	38
Şekil 4.13. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde banyo sonikasyon metodu ile hazırlanan TiO ₂ nanopartiküllerinin membran deformasyonuna etkisi.....	39
Şekil 4.14. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde banyo sonikasyon metodu ile hazırlanan TiO ₂ nanopartiküllerinin solunum aktivitesine etkisi	40
Şekil 4.15. Banyo sonikasyon dispersiyon metodu ile hazırlanmış orta sert SYS örneğine ait TiO ₂ nanopartikülünün ışık mikrosbu altındaki görüntüsü	41
Şekil 4.16. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde karıştırma metodu ile hazırlanan ZnO nanopartiküllerinin alg inhibisyonuna etkisi.....	43
Şekil 4.17. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde karıştırma metodu ile hazırlanan ZnO nanopartiküllerinin membran deformasyonuna etkisi.....	44
Şekil 4.18. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde karıştırma metodu ile hazırlanan ZnO nanopartiküllerinin solunum aktivitesine etkisi.....	45
Şekil 4.19. Karıştırma dispersiyon metodu ile hazırlanmış orta sert SYS örneğine ait ZnO nanopartikülünün ışık mikrosbu altındaki görüntüsü	46
Şekil 4.20. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde problu sonikasyon metodu ile hazırlanan ZnO nanopartiküllerinin alg inhibisyonuna etkisi.....	48
Şekil 4.21. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde problu sonikasyon metodu ile hazırlanan ZnO nanopartiküllerinin membran deformasyonuna etkisi.....	49
Şekil 4.22. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde problu sonikasyon metodu ile hazırlanan ZnO nanopartiküllerinin solunum aktivitesine etkisi	50
Şekil 4.23. Problu sonikasyon dispersiyon metodu ile hazırlanmış orta sert SYS örneğine ait ZnO nanopartikülünün ışık mikroskobu altındaki görüntüsü	51
Şekil 4.24. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde banyo sonikasyon metodu ile hazırlanan ZnO nanopartiküllerinin alg inhibisyonuna etkisi.....	53
Şekil 4.25. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde banyo sonikasyon metodu ile hazırlanan ZnO nanopartiküllerinin membran deformasyonuna etkisi.....	54
Şekil 4.26. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde banyo sonikasyon metodu ile hazırlanan ZnO nanopartiküllerinin solunum aktivitesine etkisi	55
Şekil 4.27. Banyo sonikasyon dispersiyon metodu ile hazırlanmış orta sert SYS örneğine ait ZnO nanopartikülünün ışık mikrosbu altındaki görüntüsü	56

Şekil 4.28. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde karıştırma metodu ile hazırlanan CuO nanopartiküllerinin alg inhibisyonuna etkisi	58
Şekil 4.29. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde karıştırma metodu ile hazırlanan CuO nanopartiküllerinin membran deformasyonuna etkisi	59
Şekil 4.30. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde karıştırma metodu ile hazırlanan CuO nanopartiküllerinin insolunum aktivitesine etkisi.....	60
Şekil 4.31. Karıştırma dispersiyon metodu ile hazırlanmış orta sert SYS örneğine ait CuO nanopartikülünün ışık mikrosbu altındaki görüntüsü	61
Şekil 4.32. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde problu sonikasyon metodu ile hazırlanan CuO nanopartiküllerinin alg inhibisyonuna etkisi	63
Şekil 4.33. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde problu sonikasyon metodu ile hazırlanan CuO nanopartiküllerinin membran deformasyonuna etkisi.....	64
Şekil 4.34. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde problu sonikasyon metodu ile hazırlanan CuO nanopartiküllerinin insolunum aktivitesine etkisi	65
Şekil 4.35. Problu sonikasyon dispersiyon metodu ile hazırlanmış orta sert SYS örneğine ait CuO nanopartikülünün ışık mikrosbu altındaki görüntüsü	66
Şekil 4.36. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde banyo sonikasyon metodu ile hazırlanan CuO nanopartiküllerinin alg inhibisyonuna etkisi	68
Şekil 4.37. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde banyo sonikasyon metodu ile hazırlanan CuO nanopartiküllerinin membran deformasyonuna etkisi.....	69
Şekil 4.38. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde banyo sonikasyon metodu ile hazırlanan CuO nanopartiküllerinin insolunum aktivitesine etkisi	70
Şekil 4.39. Banyo sonikasyon dispersiyon metodu ile hazırlanmış orta sert SYS örneğine ait CuO nanopartikülünün ışık mikrosbu altındaki görüntüsü	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Nanoteknoloji kullanılarak üretilen ürün örnekleri (USEPA 2005)	4
Çizelge 2.2. Nanopartiküllerin karakterizasyonu sırasında incelenen parametreler	8
Çizelge 2.3. NPLerin fiziko-kimyasal özelliklerini belirlemede uygulanan metotlar.....	10
Çizelge 3.1. Alg kültürü için hazırlanan besiyer içeriği.....	18
Çizelge 3.2. TiO ₂ , ZnO ve CuO metal oksit NPLerinin genel özellikleri.....	18
Çizelge 3.3. Sentetik yüzeysel su (SYS) örneklerinin içeriği	19
Çizelge 5.1. Metal oksit nanopartiküllerin organizma inhibisyonu üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması (EC ₅₀).....	74
Çizelge 5.2. Metal oksit nanopartiküllerin organizma membran deformasyonu üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması	75
Çizelge 5.3. Metal oksit nanopartiküllerin organizma solunum aktivitesi üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması.....	76

1. GİRİŞ

Nanoteknolojik faaliyetler son 20 yılda oldukça hızlı bir gelişme göstermiştir. Bu faaliyetler sonucu üretilen nanopartiküllerin (NP) sahip oldukları işlevselyapı, şekil, boyut ve reaktivite gibi özgün fiziksel ve kimyasal özellikleri ile günümüz teknolojisi birleştirildiğinde NPLerin ilaç sanayisinden savunma sanayisine, kişisel ürünlerden yapı malzemelerine kadar hemen her alanda geniş bir kullanım alanına sahiptir. Nanoteknolojik uygulamaların hızlı bir şekilde gelişmesi beraberinde NP üretimini de hızlandırmıştır. NPLerin yüksek miktarlarda ve çoğu zaman kontrolsüz bir şekilde kullanımı, bu malzemelerden kaynaklanabilecek olası olumsuz etkilerin de araştırılması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. NPLerin ham madde olarak kullanımı, üretimi, dağıtımı, tüketimi ve çevreye salınımlarını içeren yaşam boyu döngüleri incelendiğinde hemen her aşamada dolaylı ve/veya dolaysız yollardan çeşitli etkilere neden olduğu görülmüştür. Ancak ulusal ve uluslararası literatür incelendiğinde NPLerin çevre üzerindeki olası olumsuz etkilerinin araştırıldığı az sayıda bilimsel çalışmanın olduğu ve NPLer ile ilgili yürürlüğe girmiş henüz bir çevre standardı veya düzenlemesinin bulunmadığı görülmektedir. Bununla beraber Avrupa Birliği (AB)'nin yayınladığı sınırlı sayıdaki teknik raporlarda NP solüsyonlarının hazırlık aşamasına yönelik bir standart metodun geliştirilmesi önerilmektedir. Ayrıca NPLerin davranış ve akıbetlerinin belirlenmesi amacıyla çalışmaların özellikle gerçek çevresel koşullarda gerçekleştirilmesi gerektiği vurgulanmaktadır. Bu nedenle başta AB olmak üzere pek çok gelişmiş ülke, NPLerin insan ve çevre sağlığına yönelik potansiyel etkilerinin toksikolojik ve ekotoksikolojik çalışmalarla belirlenmesi, NPLerin etkilerinin izlenebilmesi ve en aza indirilebilmesi için uygun metot ve cihazların uygulanması ve NPLerle ilgili düzenlenmekte olan çerçeve yönetmeliklerinin mevcut düzenlemelere adapte edilmesi amacıyla çalışmalar yürütmektedir. Ülkemizde ise NPLerin olumsuz etkilerinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma bulunmakta olup, çoğunlukla yeni NP ve nanoproces üretimi yönünde faaliyetler gerçekleştirilmektedir.

NPLerin özellikle sucul ortamlarda yaşayan organizmalar (algler, su piresi, balık vb.) üzerindeki ekotoksik etkilerinin belirlenmesine yönelik sınırlı sayıda bilimsel çalışma yapılmış olup, (i) sucul organizmaların inaktivasyonuna neden olan ana mekanizma, (ii) NPLerin inaktivasyondaki rolleri (NP-alg ilişkisi) ve ekotoksisiteye neden olan özellikleri, (iii) farklı çevre koşullarında NPLerin davranışı (NP-NP ilişkisi), (iv) farklı dispersiyon yöntemlerinin NPLerin davranışına etkisi konularına açıklık getirilememiştir. Sucul ortamlarda yaşayan algler, ekosistemin ve besin piramidinin önemlibasamaklarından olup, biyokimyasal döngünün temel elemanlarıdır. Bu nedenle, model olarak seçilen alglerin NPLer ile olan karşılıklı ilişkilerinin anlaşılması büyük önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı, farklı dispersiyon yöntemleri kullanılarak sentetik yüzeysel su (SYS) örneklerinde hazırlanmış ticari metal oksit NPLerin (TiO₂, ZnO ve CuO), farklı çevresel koşullar (pH, iyonik güç, sertlik vb) altında, yüzeysel su kaynaklarında birincil üretici ve üst organizmalar için birincil besin niteliği taşıyan yeşil-algler (*Pseudokirchneriella subcapitata*) üzerindeki ekotoksik etkilerinin araştırılması ve toksisiteye neden olan mekanizmaların açıklığa kavuşturulmasıdır. Bu kapsamda metal oksit NPLeri farklı dispersiyon metodları (karıştırma, problu

sonikasyon ve banyo sonikasyon) ile farklı konsantrasyonlarda (1, 10, 50, 100 ve 500 mg/L), farklı su kalite özelliklerine sahip (Yumuşak, orta sert, çok sert, düşük - yüksek alkalinite, pH 6,5-7,5) SYS örnekleri içinde hazırlanmış ve *P. subcapitata* yeşil-algleri üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Etki analizleri kapsamında alg inhibisyonu, hücre membranında değişim, hücresel solunum aktivitesi ile morfolojik gözlem gerçekleştirilmiştir. Doz-tepki analizlerinden elde edilen sonuçlar kullanılarak Etki Konsantrasyon (EC₅₀) seviyeleri her bir NP için hesaplanmış ve alglerde akut toksisiteye sebep olan etkili metal oksit NP türü belirlenmiştir.

2. KURAMSAL BİLGİ VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Nanoteknolojinin Gelişimi ve Nanoteknolojik Faaliyetler

Nanoteknoloji kavramı; malzemelerin atomik veya moleküler bazda ayrılması, birleştirilmesi ve bozulması olarak tanımlanmasından sonra literatürdeki yerini almıştır (Taniguchi, 1974). Bir başka tanıma göre nanoteknoloji, 1- 100 nm arasındaki boyutlarda olan nanomalzemelerin özelliklerini inceleyip anlama, kontrol edebilme ve bu teknolojiyi kullanan sistemleri geliştirmek amacıyla uygulanan bir teknolojidir. Nanoteknolojik faaliyetler ise 1986 yılında fulleren ve karbon nanotüplerin keşfinden sonra hızlı bir gelişme göstermiştir. Özellikle 2001 yılında ABD'nin 'National Nanotechnology Initiative (NNI- Ulusal Nanoteknoloji Girişimi)'i kurması ve 464 milyon US-\$ bütçe ayırması dünya genelinde farkındalık yaratmış, nanoteknolojik çalışmaların başlamasını sağlamıştır (NNI 2010).

Günümüzde nanoteknolojinin dünya ekonomisine katkısı tartışılmaz durumdadır. Özellikle 2000 yılı itibariyle hızla gelişen nanoteknoloji, bugün dünya genelinde öncelik verilen teknolojik faaliyetlerin ilk sırasında yer almaktadır. Renn ve Rocco (2006) nanoteknolojiyi ve nanoteknolojik çalışmaların gelişimlerini yıllarına göre 4 farklı nesile ayırmıştır. Pasif nesil olarak adlandırılan ilk kısımda (2000-2005 yılları arası), nanomalzeme üretimi ile ilgili kaplama çalışmalarının yoğun olduğu, patlama nesli olan ikinci kısımda (2005-2010 yılları arası) çalışmaların ilaç, kimyasal ve lazer teknolojileri üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir. Üçüncü nesilde (2010-2015 yılları arası) nanobiyoteknoloji çalışmalarının hızlandığı, yapay organ ve hücre dokularının sentez çalışmalarının yürütüldüğü bildirilmektedir. Dördüncü ve son nesilde (2015 ve sonrası yıllar) ise biyomedikal ve mikroelektronik uygulamalarda nanoteknolojinin önemli bir yer tutacağı belirtilmektedir.

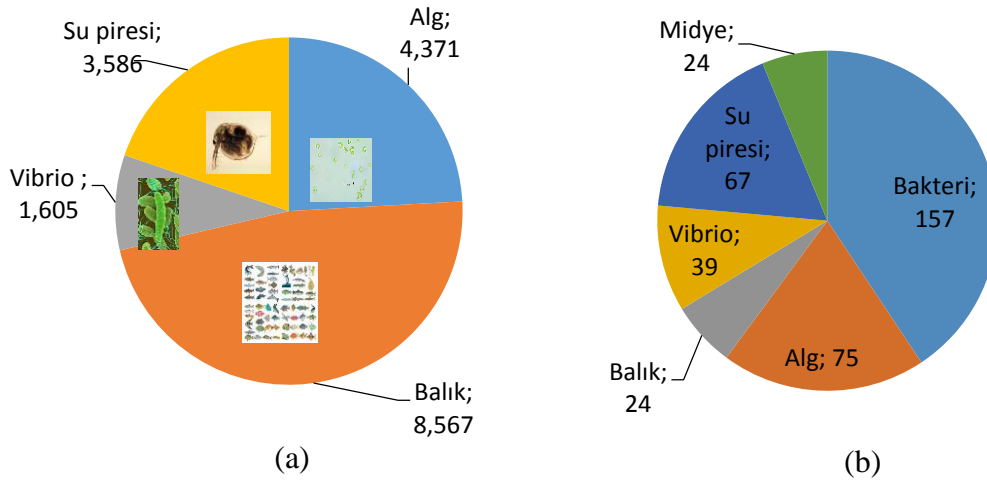
Mart 2006- Ağustos 2009 tarihlerini kapsayan bir envanter çalışmasına göre nanoteknoloji ile üretilmiş 212 adet ürün bulunmaktadır. 2013 verilerine göre ise 30 ülkede faaliyet gösteren 587 şirket, 1317 tane nanotabanlı ürünü tüketicilere sunmuştur. 2014 yılı Ekim ayında yapılan çalışmaya göre bu sayının 1801'e ulaştığı görülmüştür (PEN 2014). Söz konusu nanoürünlerin çeşitliliği (Çizelge 2.1) ve piyasası değerlendirildiğinde, 2012 yılında elde edilen gelirin 207 milyar \$ olduğu ve bu gelirin 2017 yılında %18,7 birleşik yıllık büyüme oranı ile 48,9 milyar \$ ulaşacağı beklenmektedir. Gelecek yıllarda ise bu oranın daha da artacağı, nanoteknoloji bazlı ürünlerden elde edilecek gelirin trilyonlar mertebesinde olacağı öngörülmektedir (BCC 2014). Bununla beraber 2010-2014 yılları arasındaki nanoteknolojik gelişimin değişimini tespit etmek amacıyla Google arama motoru kullanılarak "nanotechnology development (nanoteknoloji gelişimi)" araması yapılan çalışmada 2009 yılında 5,320,000 adet (J.D 2010), 2014 yılı Aralık ayında ise 36,400,000 adet farklı sonucun çıktığı görülmüştür (Google 2014). Buna göre aradan geçen dört yıllık süreçte sonucun yaklaşık 7 kat büyük çıkması, nanoteknolojinin hem tüketici hem de bilim dünyasını uzun yıllar meşgul edeceğini göstermektedir.

Çizelge 2.1. Nanoteknoloji kullanılarak üretilen ürün örnekleri (USEPA 2005)

Son kullanıcı Ürünleri	Sağlık Sistemleri	Bileşimler	Veri Tabanları	Donanım	Görüntüleme
Tenis topu ve raket	İlaç Sprey	Kaplama Malzemeleri	Modelleme Bilgisayar destekli dizayn	Kaplama Konumlayıcı Prop ve engelleyiciler Baskı maskeleri ve korumaları	Mikroskop Elektron Işınları X-Ray
Giysi Kamera Filtre Traş bıçakları Kozmetik Güneş kremleri Cam şişeler	Onarıcı ilaç Sağlık araçları	Katkı maddesi Katalizleyiciler Koruyucular (tampon, çamurluk) Boya Koruyucuları Yakıt Hücreleri			

Ekim 2014’de Web of Science veri tabanı kullanılarak yapılan genel bir bibliyometrik analizde “toxicity (toksisite)” anahtar kelimesi sabit tutularak Alga*(Alg), Daphnia*(Su piresi), Vibrio* (Vibrio) ve Fish* (Balık) kelimeleri taranarak 2000-2014 yılları arasındaki yayın sayıları tespit edilmiştir (Şekil 2.1a). Buna göre en fazla yayının NPLerin balıklardaki toksisitesi üzerine yapılan çalışmalar olduğu görülmüştür. Ayrıca yayın içeriği açısından Balık>Alg>Su piresi>Vibrio şeklinde bir sıralama olduğu ortaya çıkmıştır.

Web of Science’de yapılan diğer bir taramada ise adres satırı ‘Turkey (Türkiye)’ ve anahtar kelime olarak ‘toxicity (toksisite)’ sabit tutulup alga, fish, vibrio, daphnia, mussel (midye), bacteria (bakteri) kelimeleri aranmıştır. Toplamda 4552 adet yayın olduğu saptanmıştır. Bu yayınlarda canlılara ait yayın sayılarının dağılımı Şekil 2.1b’de verilmiştir.



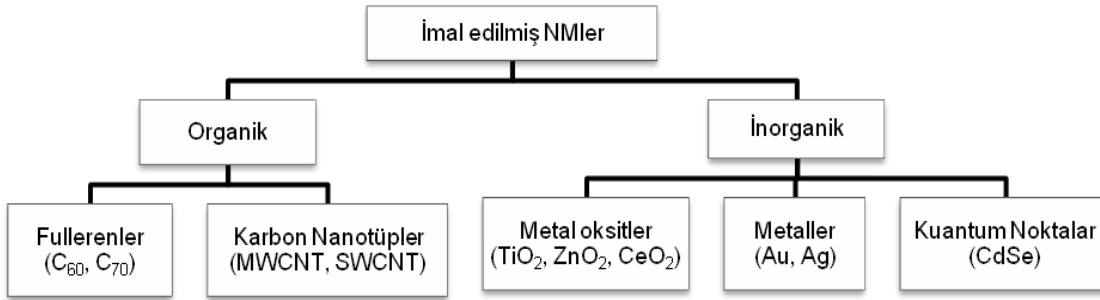
Şekil 2.1. Web of Science’da NPLerin canlılar üzerindeki "toksisite" sinin çalışıldığı genel yayın (a) ve Türkiye (b) ölçeğinde yapılmış yayın sayıları

2.2. Nanopartiküller

2.2.1. Nanopartiküllerin genel özellikleri

Boyutları 100 nm ve altında kalan tozlar olarak tanımlan NPLer, nanoboyutlu malzemelerin ve dolayısıyla nanoteknolojinin temelini oluşturmaktadır (Miller 2004, Rao 2005). NPLer, aynı ismi taşıyan diğer kimyasallardan genelde farklı ve üstün kabul edilen özellikler göstermektedir. Kuantum boyut etkileri, elektronik yapısının boyut bağımlılığı, yüzey atomlarının benzersiz karakterleri ve yüksek yüzey/hacim oranı (Liveri 2006) gibi özgün özellikleri nedeniyle yüksek aktiviteli katalizörler, süperiletkenler, yüzey aktif maddeler, ilaç taşıyıcılar, biyosidal ürünler gibi birçok teknolojik ve farmakolojik ürünlerin hazırlanmasında yer almaktadırlar.

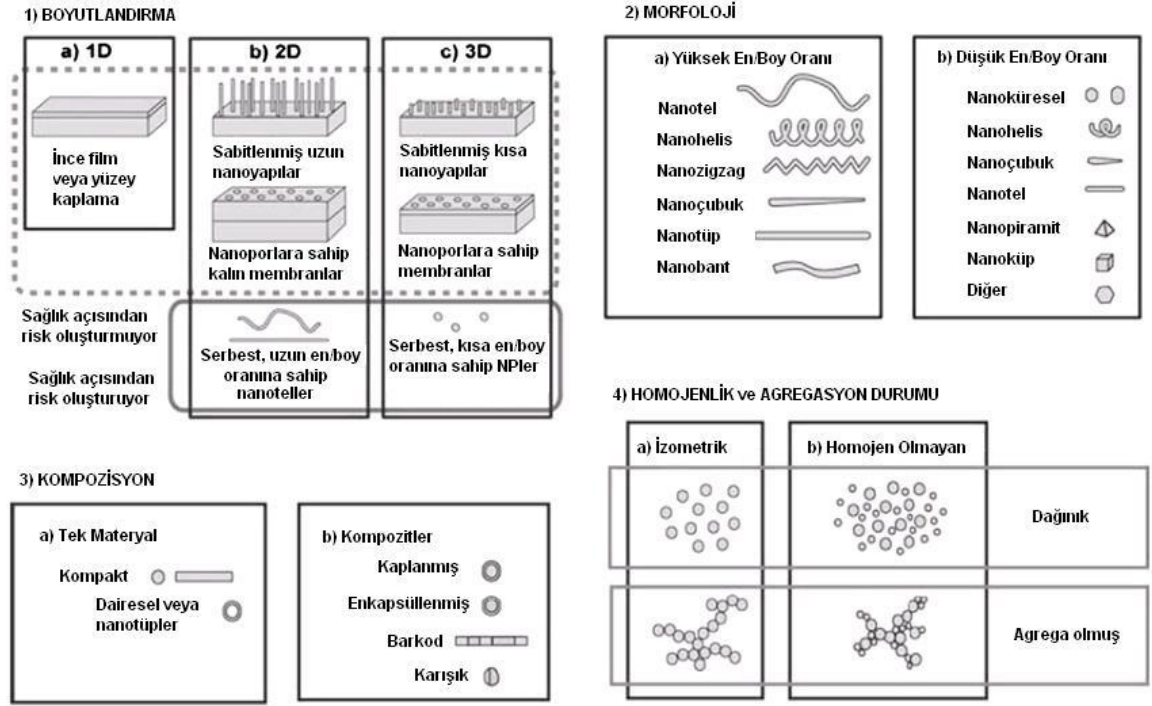
NPLer, fiziksel ve kimyasal davranışlarına bağlı olarak şekil, yüzey alanı, partikül yükü ve kristal dizilişleri modifiye edilebilir (Brar vd 2010) ve kompozisyonları da formülasyonlarına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Şekil 2.2 incelendiğinde, fullerenler ve karbon nanotüplerin (CNT) karbon-bazlı, kuantum noktaların (QD) yarıiletken ve metal oksitlerin inorganik NP olarak değerlendirildiği görülmektedir (Fadeel ve Garcia-Bennett 2010)



Şekil 2.2. Fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre nanomalzemelerin sınıflandırılması

NPLer, yüzeyindeki atomların istenildiği gibi düzenlenebilir olması nedeniyle birbirinden bağımsız nanometrik birimlerde sentezlenebilir ya da NPLerin yapıları bir takım metod ve çözücülerle değiştirilerek tel, levha, disk, halka veya lif haline getirilebilmektedir (Casals vd 2008, Klaine vd 2008). Şekil 2.3'te NPLerin boyut, morfoloji, kompozisyon ve uniformluk durumlarına göre sınıflandırılması verilmektedir (Bystrzejewska-Piotrowska vd 2009).

NPLerin kendilerine has yapıları, geniş yüzey alanı ve yüksek reaktivite gibi özelliklerinin geliştirilebilir ve/veya modifiye edilebilir olması, kullanım alanlarını genişletmektedir. Ancak yüksek reaktiviteye sahip NPLer su içerisinde dağılırken, yüksek Van der Waals kuvvetlerinin etkisiyle hızla agregasyona uğrayabilirler. Kısa sürede yığın (bulk) partiküller oluşturması sonucunda ise NPLer istenilen fiziksel özelliklerini kaybederler. Bu kayıpların enaza indirilmesi için, reolojisi kontrollü su veya organik çözeltiler içinde NPLerin stabil hale getirilmeleri gerekmektedir. Sucul sistemlerde bu işlem iki şekilde gerçekleştirilir; (i) sistemin pH'sinin ayarlanması ile NPLerin yüzey yükü değiştirilerek, NP etrafında bir elektriksel çift yüzey (EDL)



Şekil 2.3. Nanomalzemelerin boyut, morfoloji, kompozisyon, homojenlik ve agregasyondurumlarına göre sınıflandırılması

oluşturulur ve NPLerarası itme gücünün artması ile stabilizasyon sağlanır (itme gücünün büyüklüğü zeta potansiyel ile tespit edilir), (ii) NPLerin polimerik veya moleküler bir tabaka ile enkapsülasyonudur. Böylelikle çekirdek-kabuk (core-shell) halini alan kaplanmış NPLerin Van der Waals kuvvetleri etkisiz hale getirilerek sterik stabilizasyon gerçekleştirilir. Bu haliyle NPLer, ileri düzeyde optik, mekanik ve manyetik özellikleri taşıır hale gelebilmektedir (Bottero vd 2011, Caruso 2001).

NPLerin hareketliliği genel olarak agregasyona ve birikme hızlarına bağlı olarak değişmektedir. Bilindiği üzere, DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) teorisi, sucul ortamlarda yüklü yüzeylerin birbirleriyle olan etkileşimlerini suyun pH ve iyonik gücü verilerine bağlı olarak açıklar (Thio vd 2010). Aynı şekilde NPLer de yüklü parçacıklar olduğundan, sucul ortamın pH'si, iyonik gücü ile NPnin EDL kalınlığı NPLerin agregasyonu ile ilgili fikir vermektedir. Örneğin, sucul sistemin pH'si sıfır yük noktasına (PZC) ulaştığında, NPLer arasındaki itme gücü belirgin bir şekilde azalır ve böylelikle NPLer hızla agrega olmaya başlarlar. Agregasyonun artması, yığın boyutunu büyütür ve toprak veya sedimentte birikim meydana gelir. Benzer şekilde, pH'si bilinen bir sucul ortamın iyonik gücü artırıldığında, NPLeri çevreleyen EDL tabakası zayıflar ve agregasyon meydana gelir. Bazı durumlarda meydana gelen yığın NPLer, mikron veya daha büyük kolloidler halini alırken, NP özelliklerini kaybedebilirler (Zhou ve Keller 2010).

2.2.2. Metal oksit nanopartiküller

Metal oksit NPLer, farklı ve çeşitli özellikleri ve potansiyel uygulamaları nedeniyle nanobilim ve nanoteknolojinin en temel yapıtaşını oluşturmaktadır (Pinna ve Niederberger 2008). Metal oksitler, kimyasal kompozisyon ve davranış açısından oldukça farklı özellikler (yüzeysel yük, reaktivite, optik karakteristik, yüzey morfolojisi, kristal yapı, hidrofilik/hidrofobik olma durumu, yüzey kimyası) taşıyan çeşitli ve çok sayıda NPLerden oluşmaktadır (Farre vd 2011). Örneğin TiO_2 , ZnO , CuO ve CeO_2 gibi metal oksit NPLer enerji, kataliz, biyomedikal, sağlık ürünleri, kendi kendini temizleyen yüzeyler, su ve atıksu arıtımı gibi pek çok farklı uygulamada sıklıkla kullanılmaktadır (Keller vd 2010, Nowack ve Bucheli 2007, Pinna ve Niederberger 2008, Sharma 2009).

TiO_2 NPLerinin üç farklı fazı (anataz, rutil ve brukit) bulunmakta ve herbir faz farklı fotokatalitik özellik göstermekle birlikte anataz fazdaki TiO_2 NPLeri en yüksek aktiviteye sahiptir (Fadeel ve Garcia-Bennett 2010). TiO_2 bir çok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Fotokatalitik özelliklerinden dolayı güneş kremleri ve transparan özelliğinden dolayı farklı birçok kozmetik ürünlerde, su arıtım sistemleri ve yeni nesil solar hücrelerde kullanılmaktadır. Fonksiyonel özellikleri ile TiO_2 uygulamalarının geliştirilmesi amacıyla ışık uygulamalarında katalitik aktivitenin zenginleştirilmesi için TiO_2 'in katkılı versiyonları sentezlenmektedir (Wang vd 2008). Genellikle TiO_2 NPLeri relatif olarak daha düşük toksisiteye sahiptir, ancak özellikle ultraviyole (UV) ışık altında TiO_2 NPLeri reaktif oksijen türlerini (ROS) üretebilmekte ve sonuç olarak toksisiteyi artırmaktadır.

CuO NPLer yarı iletken olup, mono klinik bir yapıya sahiptir (Ren vd 2009). Kristal yapısında boşluklu ve dar yapılar mevcuttur (Xu vd 1999). Yüksek iletkenliklerinden ötürü; gaz sensörleri, katalizör, manyetik faz geçişlerinde ara madde, süper iletkenler ve seramik pigmentlerinde kullanılmaktadır (Marino vd 2007, Zhu vd 2004). Ayrıca son zamanlarda koku yapmayan çoraplar başta olmak üzere antimikrobiyal tekstil adı altında, hastane ekipmanları, ahşap koruma ve çürümeyi önleyici boya malzemelerinde katkı maddesi olarak yaygın kullanımları mevcuttur (Gabbay vd 2006).

Zn element olarak Ti ve Cu gibi periyodik cetvelin geçiş elementleri arasında yer almaktadır. Düşük kaynama noktasına sahiptir (Wikipedia 2014). Yüksek konsantrasyonlarda zehir etkisi artmaktadır ancak bununla beraber yaşamsal faaliyetlerde önemlidir. ZnO NPLeri Zn'nin oksit halde oluşumudur. Yaygın olarak kişisel bakım ürünlerinde, gıda katkı maddelerinde ve kaplama ile boya endüstrisi (Brayner vd 2010, Lin ve Xing 2008); elektronik uygulamalarda, diş macunlarında ve TiO_2 gibi transparan özelliği ile birlikte antibakteriyel özelliğinden dolayı güneş kremlerinde UV filtre olarak (Becheri vd 2008, Serpone vd 2007) ve son yıllarda sensör ve katalist (Strunk vd 2009) sistemlerde kullanılmaktadır. Söz konusu uygulamaların yanı sıra ZnO NPLeri bazı organik bileşikler ile ağır metallerin uzaklaştırılmasında da yer almaktadır (Horie vd 2009, Yang ve Xing 2009). Ancak ZnO NPLerinin güvenlik ve/veya toksik etkilerine yönelik oldukça sınırlı sayıda çalışma yer almaktadır (Sharma vd 2009).

2.2.3. Nanopartiküllerin karakterizasyonu

NPlerin yapısal özelliklerinin belirlenebilmesi için fiziksel ve kimyasal karakterizasyonlarının yapılması, hem uygulamalar açısından hem de olumsuz etkilerinin değerlendirilmesi açısından oldukça önemlidir (Ju-Nam ve Lead 2008). OECD-WPMN (Working Party for Manufactured Nanomaterials) ve ISO/TC229'un birlikte yürüttüğü çalışma sonucunda toksisite testlerinden önce NPlerde değerlendirilmesi gereken fiziko-kimyasal özelliklerin bir listesi oluşturulmuştur. Söz konusu listenin başında partikül boyutu ve dağılımı, agregasyon durumu, kompozisyonu, şekil, çözünürlük, yüzey alanı, yüzey kimyası (örneğin hidrofobiklik durumu) ve yüzey yükü gelmektedir (OECD-WPMN 2009). Çizelge 2.2'de NPlerin karakterizasyonu sırasında incelenen fiziksel ve kimyasal parametreler (SCENIHR 2009) görülmektedir.

Çizelge 2.2. Nanopartiküllerin karakterizasyonu sırasında incelenen parametreler

Fiziksel Parametreler	Kimyasal Parametreler
<ul style="list-style-type: none">• Boyut, şekil, spesifik yüzey alanı, en/boy oranı• Agregasyon durumu• Boyut dağılımı• Yüzey morfolojisi / topoğrafyası• Yapı, kristalinite ve yapı kusuru• Çözünürlük	<ul style="list-style-type: none">• Yapısal formül / moleküler yapı• Kompozisyon (safılık derecesi, bilinen katkı maddeleri)• Fazları• Yüzey kimyası (yük, gerilme durumu, aktif bölgeler, fiziksel yapı, fotokatalitik özellikler, zeta potansiyel)• Hidrofilik / lipofilik olma durumu

Faz saflığı, partikül veya yığın boyutu, yüzey kimyası, çözünürlük, yük ve kristalinite gibi özelliklerin bilinmesi, NPlerin farklı ortamlardaki homojenliği, stabilitesi, reaktivitesi, biyolojik dayanıklılığı ve potansiyel uygulamalarının belirlenmesi açısından önemlidir (Kahru ve Dubourguier 2010). Ancak alıcı ortamda, NPlerin diğer büyük partiküller, NPler ve doğal organik maddelerle etkileşim içinde olmasının yanısıra ışık, oksidantlar ve canlı organizmaların (özellikle mikroorganizmalar) varlığında değişime uğramaları nedeniyle, NPler birtakım değişimler geçirebilmekte ve yukarıda belirtilen özelliklerin tespit edilmesi zor olmaktadır (Silva vd 2011).

NPlerin fiziksel ve kimyasal karakterizasyonlarını yapmak üzere çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Yapısal durum, morfolojik özellikler, agregasyon durumu ile NPlerin difraksiyon (kırılım) verilerini tespit etmek üzere elektron mikroskopi tekniklerinden; transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) ve taramalı elektron mikroskopisinin (SEM) yanısıra atomik güç mikroskopisi (AFM) de kullanılmaktadır (Karlsson vd 2009). TEM'de, SEM'e göre daha yüksek çözünürlükte görüntü alınabilmektedir. Ancak TEM'de yüksek vakum tekniklerinin kullanılması, örnek hazırlama sırasında canlı hücre ve ıslak-partikül yapılarının zarar görme ihtimalinin yüksek olması, NPlerin karakterizasyonunu kısıtlamaktadır. Bunun yanında, SEM ise organizma-NP örneklerinin doğal ortam koşullarına yakın bir sistemde incelenmesini sağlayabilmektedir (Tiede vd 2009). AFM, hava veya su örneği içinde bulunan NPler ile AFM ucu arasında oluşan Van der Waals kuvvetinden yola çıkarak, yüzey

morfolojisinin üç boyutlu ve yüksek çözünürlükte görüntülenmesini sağlayan bir cihazdır (Ju-Nam ve Lead 2008) .

Spektroskopik bir teknik olan dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemiyle NPLerin boyut, agregasyon durumu ve elektroforetik hareketliliği hakkında bilgi edinilebilir. DLS, sulu ortamda süspansiyon edilmiş NPLerin Brownian hareketlerini ölçerken aynı zamanda yüzey yükü gibi elektrokinetik özelliklerin de belirlenmesine yardımcı olur (Karlsson vd 2009).

Hassellöv vd (2008), nanometroloji, partikül boyut analizi ve analitik kimya ile ilgili alanları metodolojik açıdan incelemişlerdir. Çalışmalarında, boyut ölçümleri (uzunluk, çap, açı oranı vb) ile ortalama veya dağılımsal bilgi veren spesifik ölçüm metodlarını karşılaştırmışlardır. Elektron mikroskopi ve AFM gibi tekil partikül metodlarının avantajlarının yanı sıra sayımlama ve örnek hazırlama açısından eksikliklerini de irdelenmişlerdir. Ayrıca çalışmada, birbirini tamamlayan metodlar üzerinde durulmuş ve fiziko-kimyasal özelliklerin belirlenmesinde kullanılan uygulamaların bir tablosu verilmiştir. Tiede vd (2008) yaptıkları derlemede, ürün hazırlama, çevresel matrisler ve gıda ile ilgili ürünlerin karakterizasyonunda öne çıkan fiziksel ve kimyasal özellikleri incelemek üzere kullanılan analitik metodlar üzerinde durmuşlardır. Derlemede, gıdalarda bulunan sentezlenmiş NPLer ile ilgili sınırlı sayıda çalışma olduğu, ham ürünler ile çevresel matrislerde NPLer ile ilgili literatür bilgisine erişimin kolay olduğu bildirilmektedir.

ENRHES (2009) final raporunda NPLerin fiziko-kimyasal özelliklerinin (sayı, boyut dağılımı, şekil, agregasyon durumu, yüzey alanı, kimyasal kompozisyon, saflık durumu, yüzey kimyası, yüzey yükü ve kristal yapısı) karakterizasyonu için uygulanan metodlar Çizelge 2.3'te özetlenmiştir.

NPLerin biyolojik etkilerinin belirlenebilmesi için çevreye bırakılan (veya çevreye dağılan) miktarının doğru tespit edilebilmesi gerekmektedir. NPLerin üretiminden tüketiciye, tüketiciden bertarafına ve en son olarak da alıcı ortamda yayılmasına kadar geçen yaşam döngüsü içinde geçen süreçlerde oluşabilecek riskler de ayrıca değerlendirilmelidir. NPLerin çeşitli alıcı ortamlardaki etkilerinin farklı olacağı göz önünde bulundurulursa, özellikle de sucul ortamlarda meydana gelebilecek yüzey yükü ve reaktivite değişkenliği nedeniyle NPLerin biyolojik hayata olası olumsuz etkilerinin dikkatle incelenmesi gerekmektedir. Ancak NPLerin sucul ortamlardaki yüzey alanı, yüzey yükü ve reaktiviteleri arasındaki ilişkinin tam olarak anlaşılabilmesi nedeniyle, NPLerin toksik etkileri hakkında halen daha cevaplanmamış pek çok soru bulunmaktadır (Auffan vd 2009a, Auffan vd 2009b).

Çizelge 2.3. NPLerin fiziko-kimyasal özelliklerini belirlemede uygulanan metotlar

	Sayı	Boyut Dağılımı	Şekil	Agregasyon Durumu	Yüzey Alanı	Kimyasal Komp.	Saflık	Yüzey Kimyası	Yüzey Yüklü	Kristal Yapı
SEM	x	x	x	X						x
TEM	x	x	x	X						x
AFM	x	x	x	X						
Confocal M		x	x	X						
DLS		x								
BET		x			x					
Zeta Potansiyel									x	
X-ray difraksiyon						x				x
Auger Elektron S.						x		x		
FTIR S.						x	x	x		
UV-VIS S.		x				x	x	x		
Raman S.						x	x	x		x
NMR S.				X		x		x		x
TOF-MS	x	x				x	x			
Ion Mass S.						x				
ICP-MS						x				
LC- GPC		x				x		x		

2.2.4. Nanopartiküller ile ilgili yasal durum

Avrupa Birliği (AB) ülkeleri bünyesinde 2004 yılında “Nanoteknoloji için Avrupa Strateji Yaklaşımı (Towards a European Strategy for Nanotechnology, COM(2002)338)” başlığı altında bir dizi çalışmaya başlanmıştır. Bu strateji yaklaşımı ile nanobilim ve nanoteknolojiyi akademik alanda geliştirerek, Avrupa için entegre bir yaklaşım geliştirme hedeflenmiştir (EU 2004).

AB 2005 yılında “Nanobilim ve Nanoteknolojiler: Avrupa için Aksiyon Planı (Nanosciences and nanotechnologies: an Action Plan for Europe 2005-2009, COM(2005)243)” yürürlüğe koymuştur. Bu planın bendinde nanobilim ve nanoteknolojilerin, özelleştirilmiş NPLerin insan ve çevre sağlığına yönelik potansiyel etkilerinin toksikolojik ve ekotoksikolojik çalışmalarla belirlenmesi, NPLerin etkilerinin izlenebilmesi ve minimize edilebilmesi için uygun metot ve cihazların uygulanması esas gösterilmiştir (EU 2005).

AB Çevre ve Sağlık Aksiyon Planı (The European Union Environment and Health Action Plan, 2004-2010) ve AB 67/548/EEC yönetmeliğine adapte edilen REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances) teklifinde sentezlenmiş NPLer ile ilgili olası zararlarının incelenmesine yönelik çalışmalara hız verilmesine değinilmiştir (EU 2003).

AB kapsamında NMLerin düzenleme koşullarının belirlendiği Komisyon final raporunun (Regulatory Aspects of Nanomaterials, COM(2008)366) son kısmında “NPLerin çevre, sağlık ve güvenliğe yönelik etkilerinin yasal düzenlemelerle belirlenebilmesi için yapılacak her türlü araştırmaya ihtiyaç olduğu” belirtilmektedir. Özellikle NPLerin çeşitli çevre koşullarındaki fiziko-kimyasal ve biyolojik özelliklerinin belirlenmesi, mevcut ve geliştirilecek yeni test metotlarıyla insan ve çevre sağlığı üzerindeki toksik, ekotoksik ve genotoksik etkilerinin ortaya çıkarılması gerekliliği üzerinde durulmaktadır (EU 2008).

Haziran 2005 yılında, OECD’ye bağlı Kimya Komisyonu (CC) ile Kimyasallar, Pestisitler ve Biyoteknoloji çalışma grupları (WPCPB) biraraya gelerek sentezlenmiş NMLerin insan sağlığı ve çevresel güvenlik üzerindeki etkilerinin tartışıldığı özel bir çalıştay düzenlemişlerdir. Bu çalıştay aynı zamanda OECD’ye üye ülke temsilcilerinin konu ile ilgili olarak ilk defa gözlemci ve davetli bilim insanlarıyla biraraya gelmelerine olanak sağlamıştır. Çalıştayın çıktılarında; NMLerin kısa, orta ve uzun vadede meydana gelebilecek etkilerinin belirlenmesi için gerekli tüm çalışmaların ve değerlendirmelerin yapılması önerilmektedir (OECD 2006).

Eylül 2006 yılında, ilk çalıştayın hemen ardından, OECD bünyesinde Sentezlenmiş NMLer Çalışma Grubu (OECD-WPMN) kurulmuştur. WPMN, OECD üye ülke temsilcileri, üye olmayan ülkelerden gözlemciler, Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Uluslararası Standartlar Organizasyonu (ISO), çevre sivil toplum kuruluşları vb. kurum ve kuruluşların temsilcilerinden oluşan yaklaşık 100 kişilik bir çalışma grubudur. Grup, sentezlenmiş NMLerin insan sağlığı ve çevre güvenliğine yönelik uygulamaları ile bu uygulamaların olası toksik etkilerini ve risk değerlendirmelerini yapmak üzere çalışmalarını yürütmekte olup, 2006-2011 yılları arasında hazırladıkları çalışma raporlarını OECD’nin websayfasında düzenli olarak paylaşmışlardır.

A.B.D.’nin Bilim ve Teknoloji Politikaları Bürosu, Yönetim ve Bütçe Bürosu’na bağlı Bilgi ve Düzenleme Birimi ile Ticaret Temsilcilik Bürosu’nun Haziran 2011’de ilan ettiği genelgede nanoteknolojik faaliyetlerin düzenlenmesi ile ilgili temel ilkeler açıklanmıştır. Buna göre; ekonomik büyüme, risk yönetimi ve bilimsel faaliyetlerin birlikte teşvik edilmesi ve yürütülmesi sırasında halk sağlığının korunması ile çevresel güvenliğin sağlanması öncelikler arasında olması gerekliliği öne sürülmüştür. Bununla birlikte, bilimsel olarak kanıtlanmamış nanoteknolojik ürünlerin faydaları ile risklerinin tam olarak belirlenmesi gerektiği bildirilmektedir. Raporda ayrıca A.B.D. Hükümetine bağlı bir çalışma grubunun NMLer ile ilgili terminolojinin tamamlanması ve yasal düzenlemelerin oluşturulması için Çevre Koruma Ajansı (EPA) ile birlikte çalışmalara başlayacağı da verilmektedir (WhiteHouse 2011).

A.B.D. Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) Haziran 2011’de hazırladığı taslak çalışmayı, FDA-lisanslı ürünlerde uygulanacak nanoteknolojik uygulamaların yönetimsel durumları, verimlilikleri veya halk sağlığı yönünden olası tehlikelerinin belirlenebilmesi için endüstriyel kurum ve kuruluşlara bildirilmiştir. Taslakta NM veya nanoteknoloji terminolojileri net bir şekilde tanımlanmamakla birlikte, taslak A.B.D. hükümetinin “malzemenin en az bir boyutunun nano ölçekte olması veya malzemenin gelişmiş özellikler göstermesi” yaklaşımı ile daha uyumlu olduğu görülmektedir. Ayrıca FDA, gelişmiş özelliklerini değerlendirmek amacıyla malzemelerin incelenmesi sırasında göz

önünde bulundurulması gereken boyutun en fazla 1000 nm olması gerektiğini önermektedir (FDA 2011). Haziran 2014'te yayınlanan final raporunda ise 2001 yılında yayınlanan rapora ek olarak FDA ürünlerine özel, pazarlama öncesinde nanoteknoloji uygulamalarını içeren ürünlerde davranış ve özelliklerini daha net belirlemek amacıyla gereklilikleri belirlenmiştir. Böylece üretimin, düzenleme sınıflandırmaları, güvenlik ve geçerlilikleri ya da halk sağlığı üzerindeki etkisi hakkındaki tüm sorulara cevap verilebilir ve yeterli tanımlamaları yapabilir hale gelmiştir (FDA 2014).

Mayıs 2011 tarihinde ISO bir teknik rapor yayınlamak, sentezlenmiş NMLerin geliştirilmesi, üretilmesi ve kullanılması sırasında oluşabilecek risklerin belirlenmesi, değerlendirilmesi ve yönetilmesi konularında kurum ve kuruluşlara destek olmayı hedeflemiştir. ISO TR13121 (2011) Nanotechnologies - Nanomaterial Risk Evaluation (Nanoteknolojiler-Nanomalzeme Risk değerlendirmesi) isimli raporda yaşam boyu/ürün yönetimi tanımlaması ile imal edilmiş NMLerin risk profillerini oluşturma amaçlanmaktadır. Ayrıca NMLerin fiziksel, kimyasal özellikleri ile oluşturabilecekleri tehlike ve maruz bırakma yollarının da belirlenmesi hedeflenmektedir. Bunun yanında hızla ilerleyen nanoteknoloji sektöründe meydana gelebilecek sorunların çözümü için bir yol da raporda önerilmektedir. Rapordaki yönetim modeli, ISO 14001- Çevre Yönetim Sistemi veya ISO 9001- Kalite Yönetim Sistemi ile uyumlu bir şekilde uygulamayı da sağlamaktadır (ISO 2011).

Kanada Mühendislik Standartları Birliği (Canadian Engineering Standards Association- CSA) tarafından 2012 yılında yayınlanan "Nanoteknolojiler- sentezlenmiş NMLer için maruziyet kontrol programı (CSA 2012)" isimli raporda nanoteknoloji ürünü olan NMLer iş sağlığı ve güvenliği açısından değerlendirilmiş ve sürekli iyileştirme modeli geliştirilmiştir.

2.2.5. Nanoteknolojik faaliyetlerin Türkiye'deki durumu

AB'ye uyum aşamasında açılan çevre faslı ile birlikte ülkemizde uygulanmakta olan mevzuat, yönerge ve yönetmeliklerin büyük bir çoğunluğu AB normlarına uygun hale getirilmeye çalışılmaktadır. Ancak gelişmelerin bu kadar hızlı olmasına karşın nanoteknolojik faaliyetler ile ilgili henüz bir düzenleme bulunmamaktadır. AB REACH yönetmeliğine benzer şekilde Yeni Kimyasallar Politikasını oluşturan "Kimyasalların Kaydı, Değerlendirilmesi, İzni ve Kısıtlanmasına ilişkin REACH Tüzüğü" ile kimyasal maddeler için ayrı bir kayıt mekanizması oluşturulmasına karar verilmiş, kullanımdan kaynaklanan risklerin değerlendirmesini ise kullanan endüstriye bırakılmıştır (ABB 2013).

(TÜSİAD 2008) tarafından hazırlanan raporda, nanoteknolojinin dünyadaki gelişimi ve farklı alanlarda Türkiye için yaratabileceği fırsatlara yer verilmiştir. Bunun yanı sıra Türkiye için yeni bakış açıları ve teknolojik gelişmelerin Avrupa normlarına daha kolay uyum sağlanması açısından ülkemize sağlayacağı faydalar değerlendirilmiştir. Ancak söz konusu raporda uygulanması önerilen nanoteknolojik faaliyetlerin çevresel boyutları ile ilgili ulusal bir çevre politikasının geliştirilmesine yönelik bir hedef bulunmamaktadır.

Ülkemizde de gerçekleştirilen Ar-Ge çalışmaları 19 farklı üniversite, kurum ve kuruluşlarda kurulan nanoteknoloji laboratuvarları ve ürünlerinin kullanımının gelişimini amaçlayan ve çalışmaların her geçen gün geliştiği bir alan haline gelmiştir. Aynı gelişimci politika Vizyon 2023 (TÜBİTAK 2004) ve Devlet Planlama Teşkilatının koordinasyonu ile hazırlanan 9. Kalkınma Planı (DPT 2006) çerçevesinde de oluşturulmuş nanoteknoloji ve ürünlerinin gelecekte büyük bir gelişme sağlayacağına yönelik öngörüler sunulmuş ve bu alanlara yönelik yatırımların artırılması konusuna dikkat çekilmiştir.

2.2.6. Nanopartiküllerin ekotoksik etkileri

Sucul organizmalar çeşitli sebeplerden dolayı ekotoksikite testlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. OECD (1994) ve USEPA (2002a)'nın önerdiği standart toksisite testlerinde besin zincirinin farklı basamaklarından türler kullanılmaktadır. En çok kullanılan organizmalar: su piresi (*Daphnia magna* ve *Ceriodaphnia dubia*), balık (*Pimephales promelas* ve *Oncorhynchus mykiss*) ve yeşil algler (*Pseudokirchneriella subcapitata*) olup, bu organizmalar basit yaşam döngüleri, çeşitlilikleri ve kolaylıkla üretilibilmeleri nedeniyle ekotoksikite testlerinde sıklıkla tercih edilmektedir.

Metal oksit NPLerin çevre ve insan sağlığı üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Metal oksit NPLerden özellikle TiO₂ ve ZnO en çok çalışılan NPLer olmasına rağmen, ekotoksik mekanizmalarının açıklandığı yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır.

TiO₂ benzeri metaloksit NPLerin ticari uygulamalarının artışına paralel olarak doğada görülme riskleri de artmaktadır. TiO₂ genellikle fotokatalizör ve UV emici olarak güneş kremi ve sterilizasyonda katalizör olarak kullanılmaktadır (Fujishima vd 2000, Meng vd 2005, Pena vd 2005). Metaloksit NP'lerin kullanımı son yıllarda artış gösterdiği için henüz sucul ortamdaki etki ve akıbetleri büyük oranda bilinmemektedir (Maynard vd 2006, Nowack ve Bucheli 2007). *Pseudokirchneriella subcapitata* ve *Desmodesmus subspicatus* gibi alglere TiO₂, ZnO ve CuO NPLerin ekotoksikitesi Aruoja vd (2009) tarafından çalışmıştır. Titanyum içeren NPLer saf kültür içeren tatlısu algleriyle (Hartmann vd 2010, Ji vd 2011, Peller vd 2007) ve deniz algleri (Miller vd 2010) üzerinde pek çok çalışma yürütülmüştür. Sadiq vd (2011a) sentezlenmiş NPLerin ekotoksikolojik etkilerinin araştırıldığı çalışmalarında alüminyum NPLerin tatlısu algleri için büyüme inhibisyonuna etkisi (72 saat EC₅₀ değeri *Chlorella sp.* için 45,4 mg/L; *Scenedesmus sp.* için 39,4 mg/L) olduğunu tespit etmişlerdir.

Zn ve Nano-TiO₂ sinerjistik etkisini inceleyen çalışmada (Tang vd 2013) *Anabaena sp.* üzerinde 96 saatlik toksisite testi uygulanmıştır. Çalışma sürecinde klorofil-a içeriği ve fotosentez verimleri gözlemlenmiştir. 96 saat sonunda yalnız Zn varlığında EC₅₀ değeri 0,38±0,004 mg/L, Zn nano-TiO₂ ile katkılılandırıldığında EC₅₀ 0,29±0,003 mg/L olarak tespit edilmiştir.

Yapılmış bir çalışmada antibakteriyal ürünlerde sıkça kullanılan AgNPLerinin *Staphylococcus aureus* bakterisinin mikrobiyal büyümesine etkisi izlenmiştir. Çalışma

sonunda AgNP konsantrasyonunun 4 µg/mL olduğunda bakteriyel büyümeyi tamamen inhibe ettiği tespit edilmiştir (Mirzajani vd 2011).

CeO₂ NPlerinin 3 farklı boyuttaki (14, 20 ve 29 nm) partiküllerinin 4 farklı canlı türü (*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna*, *Thamnocephalus platyurus* ve *Danio rerio*) üzerindeki akıbet ve etkisini incelemek için sucul toksisite testi kullanılmıştır. 14, 20 ve 29 nm partikül çapına ait yapılan deneysel çalışmalar sonunda *Pseudokirchneriella subcapitata* için EC₅₀ değerleri sırasıyla 10,2 ±4,4 mg/L, 11,7± 4.9 mg/L ve 19,1± 6,8 mg/L olarak tespit edilmiştir (Van Hoecke vd 2009).

Tatlısulara yaşayan mikroalglerden izole edilen *Scenedesmus sp.* ve *Chlorella sp.* üzerine nano boyutlu TiO₂'lerin etkisinin incelendiği bir çalışmada, büyüme inhibisyon etkisi olarak 72 saat EC₅₀ değeri *Chlorella sp.* için 16,12 mg/L ve *Scenedesmus sp.* için 21,2 mg/L elde edilmiştir (Sadiq vd 2011b). Çalışmada çoğunluğu mikron boyutlu TiO₂ varlığında daha az değerler elde edilmiştir (72 saat EC₅₀ değeri *Chlorella sp.* için 35,5 mg/L, *Scenedesmus sp.* için 44,4 mg/L). *Scenedesmus sp.* ve *Chlorella sp.* arasında TiO₂ NPlere karşı hassasiyette değişkenlik gözlenmiştir. Klorofil içeriğinde azalmaya bağlı büyüme inhibisyonu etkisi konsantrasyona bağımlı olduğu açıkça ortaya konulmuştur.

Nano-boyutlu ve nano-boyutlu olmayan TiO₂ ve ZnO parçacıklarının su piresi *Daphnia magna* üzerinde etkilerini görmek üzere yürütülen bir araştırmada üç farklı test araçları, çeşitli pigment formulasyonları ve farklı ön hazırlık adımları kullanılarak 48 saat akut toksisite testleri yürütülmüştür (Wiench vd 2009). Ayrıca çalışmada TiO₂ kaplanmış NPler kullanılarak 21 günlük kronik *D. magna* üremesi araştırılmıştır. Araştırmada nano ve nano olmayan boyutlu TiO₂ pigmentlerinin *D. magna* üzerinde 25 akut toksiste testinden (48 saat) 19 tanesinde etkisi (EC₅₀>100 mg/L), gözlemlenmemiş, altı akut testte her iki boyut TiO₂ pigment için de küçük ölçekte etki (EC₁₀, 0,5–91,2 mg/L) tespit edilmiştir. Nano ve nano olmayan boyutlu ZnO pigmentleri için ise 48 saat akut toksisite EC₅₀ değerleri 1 mg/L seviyesinde bulunmuştur. Genel olarak akut testlerdeki toksisitenin parçacık boyutuna, partikülün kaplanmasına, parçacık agregasyonu, ortamın çeşidi, veya test çözeltilerinin ön hazırlık uygulamasına bağlı olmadığı belirtilmiştir. Benzer şekilde TiO₂ NPlerin su piresi üzerine akut etkileri olduğunu gözlemleyen pekçok çalışma (Adams vd 2006a, Adams vd 2006b, Hund-Rinke ve Simon 2006, Lovern ve Klaper 2006, Lovern vd 2007) bulunurken, Griffitt vd (2008) *Daphnia pulex* üzerinde ölçülebilir bir etki bulamamışlardır. Heinlaan vd (2008), nano ve nano olmayan boyutlu TiO₂'ye maruz bırakılan *D. magna* üzerindeki akut etkilerin önemsiz olduğu belirtmiştir. TiO₂ NPler toksisitesi üzerinde çalışmalar farklı bulgular gösterirken, ZnO üzerinde yapılan çalışmalarda etkinin varlığı tutarlı bir şekilde gösterilememiştir (Adams vd 2006a, Heinlaan vd 2008, Zhu vd 2009).

TiO₂ NP toksisitesinin belirlenmesinde boyut önemli bir parametredir. Parçacık boyutu küçüldükçe yüzeylerin kaplanmasında penetrasyon ve biyoerişilebilirlik kolaylaşmakta ve böylece hücre içerisinde daha fazla parçacık birikmektedir (Limbach vd 2005, Rothen-Rutishauser vd 2006). 25 nm'den küçük TiO₂ NPler algde (*Desmodesmus subspicatus*) daha yüksek büyüme inhibisyonuna neden olmakta ve 100 nm'den büyüklerde *Daphnia magna*'da daha fazla hareketsizlik görülmektedir (Hund-Rinke ve Simon 2006). Ayrıca 0.22 µm-filtrelenmiş TiO₂ NPler filtrelenmemişlere

oranla *D.magna*'da daha fazla ölüme sebebiyet vermesi toksisitenin çözülmüş NPLerin boyutu ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir (Lovern ve Klaper 2006). Fakat tam olarak TiO₂ NP parçacık boyutu dağılımının olumsuz etkileri tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır (Kim vd 2010).

TiO₂ NPLerin yeşil alg *Desmodesmus subspicatus* üzerine etkisinde NPnin spesifik yüzey alanına önemli oranda bağlı olduğu Navarro vd (2008) tarafından ifade edilmiştir. Küçük parçacıklarda açık olarak konsantrasyon-etki ilişkisi görülürken, büyük olanlar daha az toksisiteye neden olmaktadır (Hund-Rinke ve Simon 2006). Bununla birlikte inhibisyon etkisi yaratabilecek agregasyon boyutunun ölçümüne yönelik bir çalışma da bulunmamaktadır. Al₂O₃ NPLerin kök büyümesi üzerine etkisinde boyutun kimyasal kompozisyonundan daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Yang ve Watts 2005).

Aruoja vd (2009) *Pseudokirchneriella subcapitata* üzerinde ZnO, TiO₂ ve CuO NPLerin toksisitelerini OECD 201 algal büyüme inhibisyon testini (OECD, 1984) ışık gölgesini de dikkate alınarak kullanılarak araştırmışlardır. Elde edilen sonuçlar NPLerin gölge etkisinin önemsiz olduğunu göstermektedir. ZnO NPLer en toksik olup bunu sırasıyla CuO ve TiO₂ NPLer takip etmektedir. Yığın ve nano ZnO parçacıklarının toksisiteleri ZnSO₄ değerine benzerdir (72 saat EC₅₀ ~0.04 mg Zn/L). Böylece düşük konsantrasyon aralığında toksisitenin doğrudan çözülmüş Zn²⁺ iyonlarından kaynaklandığı anlaşılmaktadır. Yığın TiO₂ (EC₅₀=35,9 mg Ti/L) ve yığın CuO (EC₅₀=11,55 mg Cu/L) kendilerinin nano formülasyonlarından (EC₅₀=5,83 mg Ti/L ve 0,71 mg Cu/L) daha az toksik olduğu belirlenmiştir. Risk değerlendirmesi amacıyla kullanılan NOEC (etki konsantrasyonunun gözlenmeme durumu) değeri (~0,02 mg Zn/L) yığın ve nano ZnO için bir fark yaratmadığı gözlenmiştir. Nano CuO için NOEC değeri 0,42mg Cu/L ve yığın CuO için 8,03 mg Cu/L elde edilmiştir. Ayrıca nano TiO₂ için NOEC değeri 0,98 mg Ti/L ve yığın TiO₂ için 10,1 mg Ti/L olarak bulunmuştur. Oluşan nano TiO₂ agregasyonu ile alg hücrelerinin sürüklenmesi engellenerek alglere olan toksik etkinin artmasına neden olabilmektedir. Nano ve yığın CuO'ların 72 saat EC₅₀ değerleri incelendiğinde %25 bakırın nano CuO için biyolojik olarak uygun olurken yalnızca %0.18 bakır yığın CuO için elde edilmiştir. Bu da bakırın nano CuO'da iken 141 kez daha yığın CuO'dan biyolojik olarak uygun olduğunu göstermiştir.

Sucul risk değerlendirmesinde algalbüyümeinhibisyon testiyaygın olarak kullanılmaktadır (Blinova 2004, Radix vd 2000). OECD alg büyüme inhibisyon testi tatlısu algleri için *Pseudokirchneriella subcapitata* model organizma olarak ele alınmakta ve USEPA yeşil alg büyüme inhibisyon testi (US EPA, 1996) için de yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu canlı türleri ağır metaller için de çok hassas oldukları bilinmektedir (Blinova 2004). Fakat birkaç sınırlı çalışmada algler üzerinde NP toksisitesi araştırılmıştır. Hund-Rinke ve Simon (2006) 25 nm ve 100 nm boyutlu TiO₂ parçacıkların *Desmodesmus subspicatus* yeşil algleri üzerine etkisini incelemiş ve daha küçük boyutlu parçacıkların daha fazla toksik olduğunu tespit etmişlerdir (72 saat EC₅₀ değeri 25 nm parçacıkları için 44 mg/L, ve 100 nm parçacıklar için ise >50 mg/L). Aynı çalışmada gölgelemenin önemli bir etkisi olmadığı görülmüştür. Warheit vd (2007) yaptıkları çalışmada TiO₂ parçacıklarını *P. subcapitata* algleri üzerinde test yürütmüşlerdir. Çok ince ve ultra-ince parçacıklar için sırasıyla 16 mg/L ve 21 mg/L

elde edilen EC₅₀ değerlerinde düşük farklılık bulunmuştur. Bir başka çalışmada ZnO parçacıklarının *P. subcapitata* üzerinde etkisi ZnO'da elde edilen çözünmüş Zn konsantrasyonları kullanılarak araştırılmıştır (Franklin vd 2007). ZnO parçacıkları kadar ZnCl₂'nin de toksisitesinin çözünmüş Zn'den ötürü olduğu belirlenmiştir.

Model organizma olarak *Daphnia magna*'nın kullanıldığı TiO₂'nin toksisite değerlendirilmesinin yapıldığı araştırma akut (72 saat) ve kronik (21 gün) testleri Zhu vd (2010) tarafından gerçekleştirilmiştir. *Daphnia* 48 saat TiO₂'ya maruz bırakıldığında çok az olan toksisite, 72 saate uzatıldığında yüksek toksisite gözlemlendiği belirtilmiştir. Böylece maruz bırakılma zamanının NP toksisitesinde etken olduğu ortaya konulmuştur. Bunun yanısıra 21 gün kronik maruziyette yüksek büyüme geriliği ve ölümlerle birlikte üreme bozuklukları da görülmüştür.

Hartmann vd (2010) yaptıkları bir çalışmada üç farklı boyutta TiO₂ parçacıklarının (10, 30, ve 300 nm) tatlısu yeşil alg *Pseudokirchneriella subcapitata* üzerinde ekotoksitesini incelemişlerdir. Her üç boyut için de alg büyüme inhibisyonu gözlenmiş. Bununla birlikte NPLerin ekotoksisite etkisinde çevresel kirleticilerin varlığının da önemlice etkisi olduğu belirtilmiştir.

Quik vd (2010) NPLerin çevredeki davranışlarını tespit etmek ve gelecekte suda meydana gelebilecek konsantrasyonlarını tahmin edebilmek amacıyla farklı konsantrasyon ve boyut dağılımlarında bulunan CeO₂ NPLeri kullanmışlardır. CeO₂ NPLerini alg büyüme besiyeri ve deiyonize suda farklı konsantrasyonlarda ve iki tür doğal organik madde (DOM) ile birlikte hazırlamışlardır. Deneyler sonucunda DOM varlığında, süspansiyondaki NPLerin stabilize olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca DOM içeren süspansiyonların 12 günlük çökeltmesi sonucunda, deiyonize suya eklenen CeO₂ NPLerinde %88 ve alg besiyerine eklenen NPLerde %41 oranında askıda hal gözlemlendiği belirtilmektedir. Bunun yanında adsorplanmış organik maddelerin, zeta potansiyel değerini 15 mV'dan 55 mV'a yükseltmesi sonucunda elektrostatik itme gücünde artış meydana gelmiş ve NP agregasyonunun azaldığı tespit edilmiştir.

Peng vd (2011), ZnO NPLerinin deniz diatomları (*Thalassiosira pseudonana*, *Chaetoceros gracilis*, *Phaeodactylum tricornutum*) üzerindeki toksik etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada kullanılan nano-ZnO partikül boyutları küresel olanlar için 6,3-15,7 nm arasında değişirken, çubuksu şeklindeki NPLerin boyutları 242-862 nm arasında bulunmaktadır. Deneyler sonucunda, 72 saat içinde Zn NPLerinin %4,1-4,9 oranında, şekil ve konsantrasyondan bağımsız olarak, test ortamında çözüldüğünü tespit etmişlerdir. Ayrıca kullanılan tüm NP konsantrasyonlarının, *T. pseudonana* ve *C. gracilis* diatomlarında meydana gelen biyoakümülyasyon nedeniyle büyümelerini durdurduğunu, *P. tricornutum*'a ise enaz etkisi olduğunu gözlemişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Çalışmada Kullanılan Alg türü: *Pseudokirchneriella subcapitata*

Pseudokirchneriella subcapitata, mavi-yeşil alg grubunun yeşil alg ailesindedir. Biyolojik seceresine göre *Chlorophyta* şubesi, *Chlorophyceae* sınıfı, *Chlorococcales* takımı, *Chlorellaceae* familyası, *Pseudokirchneriella* cinsi ve *Pseudokirchneriella subcapitata* türündedir. İlk kez 1914 yılında *Selenastrum Capricornutum* olarak isimlendirilen tür, daha sonra *Kirchneriella subcapitata* (1953), *Raphidocelis subcapitata* (1977), *Kirchneria subcapitata* (1988), *Pseudokirchneriella subcapitata* (1990) (Aruoja 2011) ve *Raphidocelis subcapitata* (2014) (SAG 2014) isimlerini almıştır.

P. subcapitata'nın hücreleri çoğunlukla tek olarak bulunmakta ve uzunlukları 8-14 µm arasında değişirken, genişlikleri 2-3 µm arasında değişmektedir. Şekil 3.1'de görüldüğü üzere, hücreler genelde sarmal (kavisli yarım daire, hilali andıran) şekilde bulunmaktadır (Algalweb 2014). Çoğalmaları genelde anne hücrenin 2, 4 ya da 8'e bölünmesi ile gerçekleşmektedir (Aruoja 2011).



Şekil 3.1. *P. subcapitata* alg türünün genel görünümü

3.2. Stok Alg Kültürlerinin hazırlanması

Testlerde kullanılan *P. subcapitata* alg kültürleri Göttingen Üniversitesi Alg Kültür Koleksiyonundan (SAG61.81) temin edilmiş olup, içeriği Çizelge 3.1'de tanımlanan alg besiyerinde, AB'nin önerdiği alg üretim yöntemi esas alınarak üretilmiştir (OECD 2002). Yaklaşık 10^4 alg/mL içeren stok kültürden alınan algleri 500 mL'lik erlenmayerleriçerisinde son hacimleri 100 mL olacak şekilde ayarlanıp sürekli ışık altında (ışık akısı: toplam 6000 lm, ışık rengi: 4300 K) ve 23 ± 2 °C sıcaklıkta günde 2-3 defa çalkalama yöntemi ile inkübe edilmiştir. Ortalama 4 gün sonunda istenilen popülasyon yoğunluğuna (10^4 alg/mL veya 0,5 mg/L kuru ağırlık) ulaşıldıktan sonra etki analizleri (alg inhibisyon, lipid peroksidasyon ve solunum aktivitesi analizleri) için deneylere başlanmıştır.

Çizelge 3.1. Alg kültürü için hazırlanan besiyer içeriği

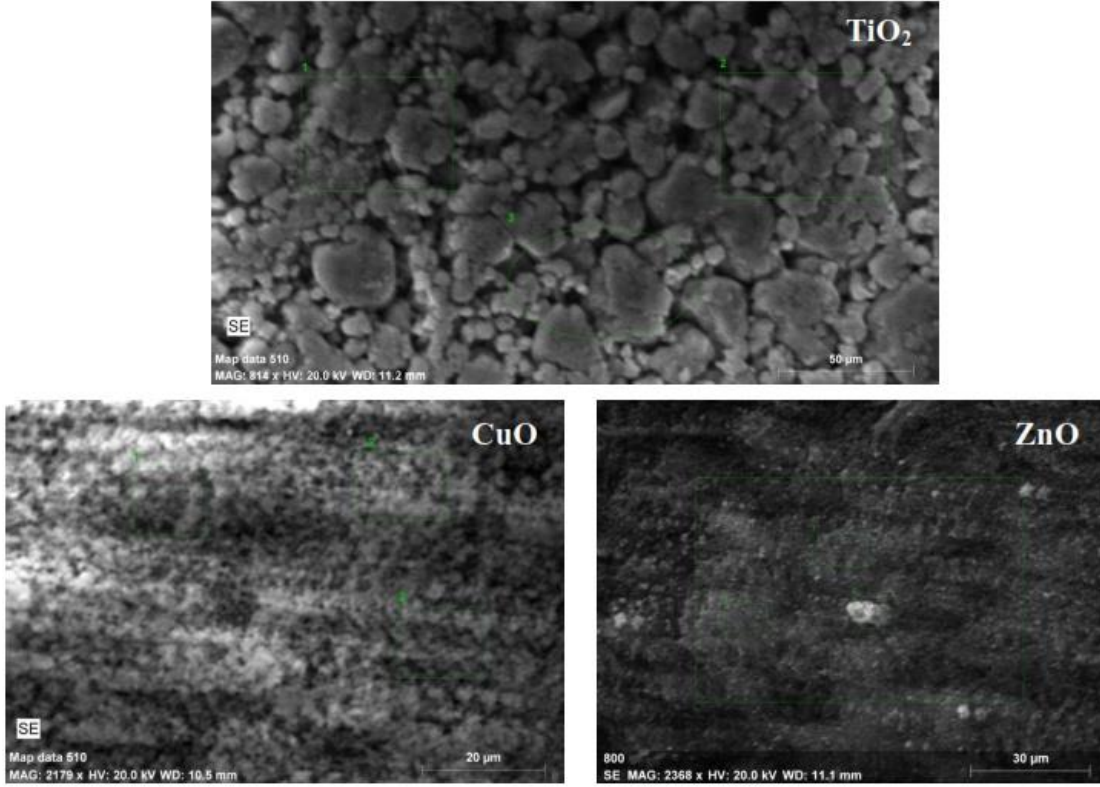
Stok No	Eklenen Kimyasal	Miktar (mg/L)
Stok 1. Makrobesin Elementleri	NH ₄ Cl	1,5
	MgCl ₂ . 6H ₂ O	1,2
	CaCl ₂ . 2H ₂ O	1,8
	MgSO ₄ . 7H ₂ O	1,5
	KH ₂ PO ₄	0,16
Stok 2.	FeCl ₃ .6H ₂ O	0,08
Fe-EDTA	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,1
Stok 3. Eser elementler	H ₃ BO ₃	0,185
	MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,415
	ZnCl ₂	0,003
	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,0015
	CuCl ₂ . 2H ₂ O	0,00001
	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,007
Stok 4	NaHCO ₃	50,0

3.3. Çalışmada Kullanılan Metal Oksit Nanopartiküller

DeneySEL çalışmalarında kullanılan TiO₂, ZnO ve CuO metal oksit NPLerinin genel özellikleri Çizelge 3.2'de, SEM görüntüleri Şekil 3.2'de verilmektedir. Moleküler ağırlıkları birbirine yakın olan NPLer yüksek bant boşluk enerjisine sahip olup, uygun UV dalga boyunun sağlanması halinde fotoaktiviteleri sırasıyla ZnO>TiO₂>CuO şeklindedir (Wikipedia 2014).

Çizelge 3.2. TiO₂, ZnO ve CuO metal oksit NPLerinin genel özellikleri

	TiO ₂	ZnO	CuO
Boyut aralığı	32 nm	40 – 100 nm	30 – 50 nm
Yüzey alanı	45 m ² /g	25 m ² /g	13 m ² /g
Moleküler Ağırlık	79,866 g/mol	81,408 g/mol	79,545 g/mol
Görünüm	Beyaz toz	Beyaz toz	Siyah toz
Yoğunluk	3,78 g/cm ³ (Anataz)	5,606 g/cm ³	6,315 g/cm ³
Buharlaşma Noktası	1843 °C	1975 °C	1326 °C
Kaynama Noktası	2972 °C	1975 °C	2000 °C
Sudaki çözünürlük	Çözünmez	Çözünmez	Çözünmez
Bant Boşluk Enerjisi	3,2 eV (Anataz)	3,3 eV	1,2 eV
Refraktif indeks (n _D)	2,488 (Anataz)	2,004	2,630



Şekil 3.2. Ticari olarak temin edilen TiO₂, CuO ve ZnO nanopartiküllerinin SEM görüntüleri

3.4. Nanopartikül Çözeltilerinin Hazırlanması

Tez kapsamında, ticari olarak temin edilen TiO₂ (Anataz), ZnO ve CuO NPLer ile önceden 121°C'de 30 dakika otoklavlanmış ve içeriği Çizelge 3.3'te verilen sentetik yüzeysel su (SYS) (USEPA 2002) çözeltileri kullanılarak 500 mg/L konsantrasyonda NP-SYS stok çözeltileri hazırlanmıştır.

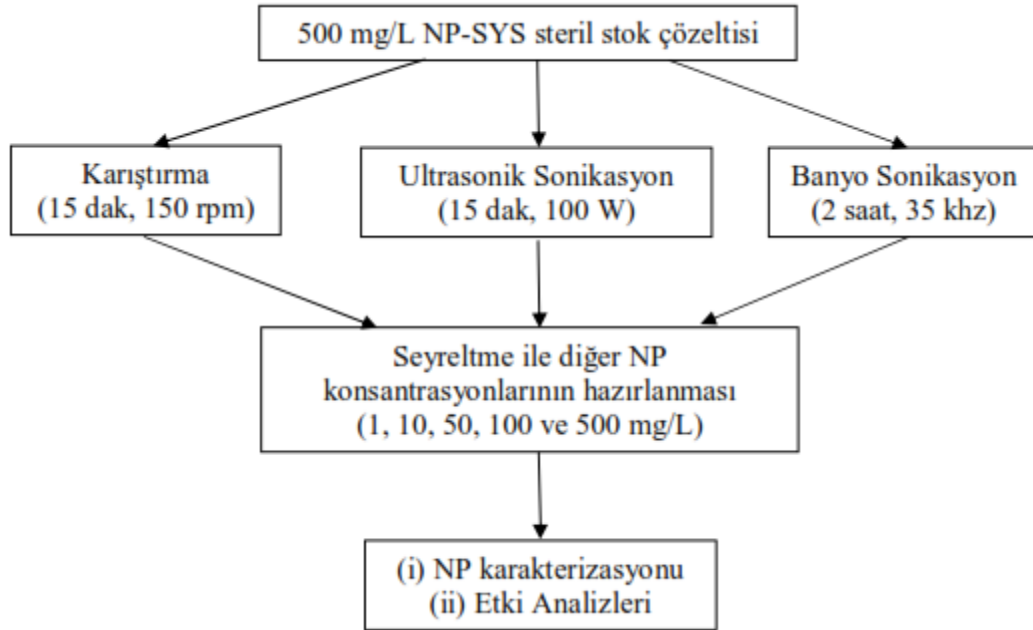
Çizelge 3.3. Sentetik yüzeysel su (SYS) örneklerinin içeriği

Su türleri	Safsuya Eklenen Kimyasal Miktarı (mg/L)				Elde Edilen Nihai Su Kalitesi		
	NaHCO ₃	CaSO ₄ .2H ₂ O	Mg SO ₄	KCl	pH ¹	Sertlik ²	Alkalinite ²
Yumuşak	48,0	30,0	30,0	2,0	7,2-7,6	40-48	30-35
Orta sert	96,0	60,0	60,0	4,0	7,4-7,8	80-100	57-64
Çok sert	384,0	240,0	240,0	16,0	8,0-8,4	280-320	225-245

¹24 saat sonraki pH dengesi, ²mg CaCO₃/L

Dispersiyon yönteminin etkisini tespit etmek amacıyla stok çözeltilere (i) sürekli karıştırma (15 dak, 150 rpm), (ii) sürekli ultrasonik sonikasyon (15 dak, 100 W) ve (iii) sürekli banyo sonikasyon (2 saat, 35 khz) dispersiyon yöntemleri uygulanmıştır. Dispersiyon işleminin ardından NP konsantrasyonları 1, 10, 50, 100 ve 500 mg/L olacak

şekilde seyreltme yapılarak NP çözeltileri hazırlanmış ve sonrasında etki analizleri gerçekleştirilmiştir. Deneysel düzenekleri ile ilgili detaylar Şekil 3.3'te verilmektedir.



Şekil 3.3. Deneysel düzeneklerinin detaylı gösterimi.

3.5. Nanopartikül Karakterizasyonu

NPlerin fiziksel özelliklerinde; özellikle boyut, boyut dağılımı ve agregasyon durumunda meydana gelebilecek değişiklikler, Wyatt marka Dynapro Nanostar model cihaz ile dinamik ışık saçılımı (DLS) tekniği uygulanarak tespit edilmiştir. Farklı NP konsantrasyonlarını içeren SYS çözeltilerinden alınan 2 mL örnek, önce 0,45 µm Whatman markalı filtre kağıdından geçirilmiş ve ardından cihazda ölçümleri yapılmıştır. Boyut analizi üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

NPlerin kimyasal özelliklerinde; özellikle kompozisyon ve zeta potansiyellerinde meydana gelebilecek değişiklikler, A.Ü. Fen Fakültesi Kimya Bölümünde bulunan Malvern marka NanoZ90 model cihaz ile ölçülmüştür. Farklı NP konsantrasyonlarını içeren SYS çözeltilerinden alınan 2 mL örneklerin ölçümleri 633 nm dalgaboyunda yapılmıştır. Zeta potansiyel ölçümleri üç tekrarlı olacak şekilde tamamlanmıştır.

3.6. Etki Analizleri

3.6.1. Alg inhibisyon analizi

Alglerde meydana gelen inhibisyon, canlı hücrelerin sayımı ile gerçekleştirilmiştir. Başlangıç popülasyonu 10^5 alg/mL olan *P. subcapitata* alg kültürü,

NP-SYS çözeltilerine eklenmiş ve Alg İnhibisyon Testi (OECD 2002)'nde önerildiği şekilde 72 saat süre ile inhibisyon deneyleri uygulanmıştır. Metoda göre, alg-NP örnekleri sürekli ışık altında (4300 K ışık renk sıcaklığına ve 3500 lx ışık yoğunluğuna sahip iki adet 30 W'lık beyaz floresan lamba), biyolojik kabin içerisinde muhafaza edilmiştir (Şekil 3.4).

Test ortamı olarak hacmi 100 mL olan steril plastik kaplar kullanılmıştır. NP-SYS çözeltilerinden 45 mL, alg kültüründen 5 mL alınarak toplam hacim 50 mL olacak şekilde test düzeneği hazırlanmıştır. Her bir test kabından 24, 48 ve 72 saat süre sonlarında alınan 1 mL Alg-NP örneği, 0.1 mL trypan blue boyar madde ile boyandıktan sonra 10 dk süreyle karanlık ortamda reaksiyona bırakılmıştır. Reaksiyon süresi sonunda örnekler Neubauer model hemositometreye alınmış ve ışık mikroskobu altında incelenerek sayım yapılmıştır. Sayımlar her bir örnek için üç defa tekrar edilerek, inhibisyon değerleri % olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.4. Biyolojik kabin içinde test düzeneklerinin yerleştirimi

Alg inhibisyon değerleri kullanılarak, popülasyonun %50'sine etki eden NP dozunu (EC₅₀) tespit etmek amacıyla USEPA- TRAP v1.22 (ABD Çevre Ajansı- Toksik İlişkileri Analizleme Programı- Toxicity Relationship Analysis Program) kullanılmıştır.

3.6.2. Membran deformasyonu: Lipid Peroksidasyon

SYS örneklerinde hazırlanmış Alg-NP örneklerinde 24, 48 ve 72 saat süren reaksiyon sonunda lipid peroksidasyon, malondialdehit (MDA) oluşumu belirlenmiştir. MDA'nın miktarı, Maness vd (1999) tarafından önerilen metodun modifiye edilmiş haline göre analiz edilmiştir. Metoda göre; Alg-NP örneklerinden alınan 1 mL numune üzerine 2 mL %10 (a/h) trichloroacetic acid (TCA) ilave edilerek 14000 rpm dönüş hızında 35 dk santrifüjledikten sonra karışımdan 3 mL alınıp üzerine 3 mL %67 thiobarbituric acid (a/h) (TBA) ilave edilerek 10 dk kaynatılmıştır. Kaynatma işlemi tamamlandıktan sonra numuneler oda sıcaklığına gelene kadar bekletilmiştir. Soğuma işlemi gerçekleştiğinde asit solüsyonu içindeki pembe renkli MDA-TBA kompleksin 532 nm'deki maksimum absorpsiyon değerinin Hach-Dr2800 model spektrofotometrede

okunması ile elde edilmiştir. Her bir metal oksit NP'nin etkisiyle alglerde oluşan net MDA üretimi Eşitlik (3.1) yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\text{MDA Üretimi (nM/#alg)} = [\text{MDA}_{(\text{Alg+NP})}] - [\text{MDA}_{\text{Alg}}] \quad (3.1)$$

Membran deformasyon değerleri kullanılarak, popülasyonun %50'sine etki eden NP dozunu (EC_{50}) tespit etmek amacıyla USEPA- TRAP v1.22 (ABD Çevre Ajansı- Toksik İlişkileri Analizleme Programı- Toxicity Relationship Analysis Program) kullanılmıştır.

3.6.3. Solunum aktivitesi: TTC indirgenmesi

SYS örneklerinde hazırlanmış Alg-NP örneklerinde 24, 48 ve 72 saat süren reaksiyon sonunda gerçekleşen hücre solunum aktiviteleri, TTC (2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride)'nin TTF (2,3,5-triphenyltetra zolium formazan)'e indirgenmesi esasına dayanarak incelenmiştir. TTC miktarı, (Maness vd 1999)'nin önerdiği metot modifiye edilerek uygulanmıştır. Buna göre örnekler, önce 14000 rpm dönüş hızında 15 dk santrifüjlenmiştir. Ardından üstsıvı atılıp, pelet 2 mL %1'lik (*a/h*) TTC, 100 µL potasyum fosfat tampon çözeltisi, 100 µL disodyum sukkinat ile süspansedilmiş ve örnekler 21 ± 2 °C'de karanlıkta 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi dolduktan sonra 14000 rpm dönüş hızında 10 dk santrifüjlenip, işlem sonucunda oluşan üstsıvı atılmış ve pelet 4 mL metanol içerisinde süspansedilerek, 15 dk çalkalama işlemine tabi tutulmuştur. Çalkalama işlemi takiben karışım 14000 rpm dönüş hızında 10 dk santrifüjlenmiştir. Oluşan pembe renkli kompleksin 485 nm'deki maksimum absorpsiyon değerinin Hach-Dr2800 model spektrofotometrede okunması ile sonuç elde edilmiştir. Her bir metal oksit NP'nin alglerde oluşan net TTC eşitlik (3.2) yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\text{TTC İndirgenmesi (nM/#alg.dak)} = [\text{TTC}_{(\text{Alg+NP})}] - [\text{TTC}_{\text{Alg}}] \quad (3.2)$$

TTC indirgenmesi değerleri kullanılarak, popülasyonun %50'sine etki eden NP dozunu (EC_{50}) tespit etmek amacıyla USEPA- TRAP v1.22 (ABD Çevre Ajansı- Toksik İlişkileri Analizleme Programı- Toxicity Relationship Analysis Program) kullanılmıştır.

3.6.4. Morfolojik değişim

Alg inhibisyon analiz sonuçlarına göre en etkili konsantrasyondaki örneklerde ışık mikroskobu ile görüntüleme yapılmıştır. Görüntüleme A.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde bulunan Leica marka ICC50 HD model ışık mikroskobuyla 40X yakınlaştırmada gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Tez çalışmasında karakterizasyon analizleri kapsamında NPLerin partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümlerinin yapıldığı cihazlarda anlamlı sonuçların elde edilebilmesi için 10- 50 mg/L konsantrasyon aralığında bulunan bir düşük konsantrasyona sahip NP çözeltisinin kullanılması önerilmektedir. Bu nedenle NP karakterizasyon çalışması kapsamında yumuşak, orta sert ve çok sert SYS örnekleri içinde karıştırma, problu sonikasyon ve banyo sonikasyon dispersiyon yöntemleri uygulanarak 10 mg/L konsantrasyonda NP çözeltileri hazırlanmış ve NP karakterizasyon analizleri tamamlanmıştır. Ayrıca cihazların teknik bilgi önerileri dikkate alınarak, her iki cihazda ölçüm öncesinde NP-SYS örnekleri 0,45 µm gözenek çaplı filtre kağıdından geçirilmiş ve daha büyük mikron ölçüdeki partiküller sistemden uzaklaştırılmıştır. Elde edilen bulgular Şekil 4.1- 4.3'te detaylı şekilde verilmiştir.

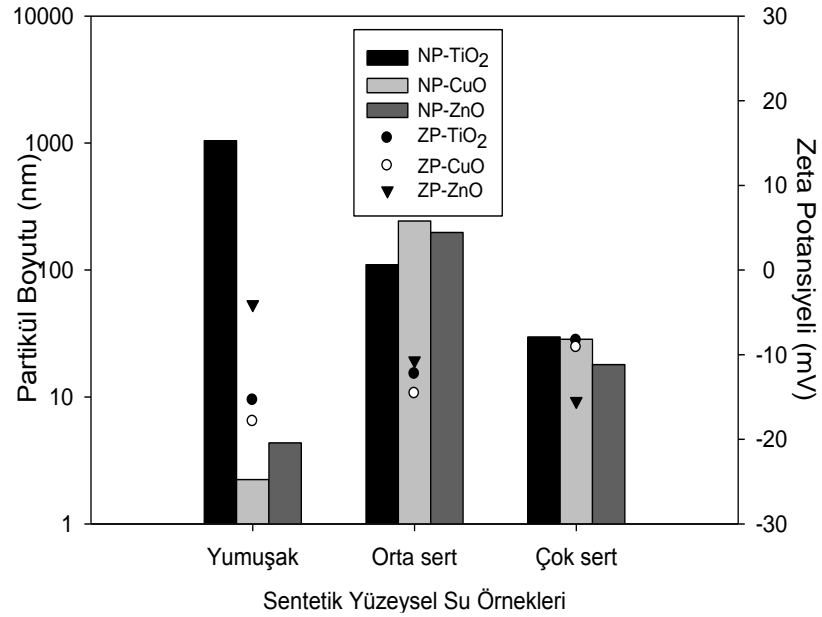
4.1.1. Karıştırma dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış nanopartiküllerin karakterizasyonu

Karıştırma dispersiyon metodu ile hazırlanmış TiO₂, ZnO ve CuO NPLerine ait partikül boyutu ve zeta potansiyeli ölçüm sonuçları Şekil 4.1 'de verilmiştir.

TiO₂ NPLerinin yumuşak, orta sert ve çok sert SYS örneklerinde partikül boyutları sırasıyla 1044 nm, 110 nm ve 30 nm olarak ölçülmüştür. Aynı NP örneklerinin zeta potansiyel ölçüm sonuçları ise sırasıyla +15,4 mV, -12,3 mV ve -8,34 mV olarak elde edilmiştir. TiO₂ NPLerinin yumuşak ve orta sert SYS çözeltileri içinde nanoboyuttan uzaklaştığı, çok sert SYS örneklerinde nanoboyut özelliklerini korudukları görülmektedir. Aynı zamanda yumuşak SYS örneklerinde TiO₂ NPLeri pozitif yüklü partikül olarak davranırken, orta sert ve çok sert SYS çözeltilerinde negatif yüklü olarak stabil olmayan davranış gösterdikleri tespit edilmiştir.

ZnO NPLerinin partikül boyutları yumuşak, orta sert ve çok sert SYS örneklerinde sırasıyla 4,5 nm, 198 nm ve 18 nm olarak ölçülürken, zeta potansiyelleri sırasıyla -4,1 mV, -10,7 mV ve -15,5 mV olarak tespit edilmiştir. SYS örneklerinde negatif yüklü ve stabil olmayan davranış sergileyen ZnO NPLerinin orta sert SYS örneklerinde nanoboyuttan uzaklaştığı görülmüştür.

CuO NPLerinin yumuşak, orta sert ve çok sert SYS örneklerinde partikül boyutları sırasıyla 2,3 nm, 243 nm ve 28 nm olarak tespit edilirken, aynı SYS örnekleri için zeta potansiyeli ölçümleri -17,9 mV, -14,6 mV, -9,14 mV olarak tespit edilmiştir. ZnO-SYS örneklerinde olduğu gibi NPLerin negatif yüklü ve stabil olmayan davranış sergiledikleri görülmüştür. CuO NPLeri yumuşak ve çok sert SYS örneklerinde nanoboyutta kaldıkları tespit edilmiştir.



Şekil 4.1.Sentetik yüzeysel su örnekleri içinde karıştırma metodu ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyeli ölçüm sonuçları

4.1.2. Probu sonikasyon dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış nanopartiküllerin karakterizasyonu

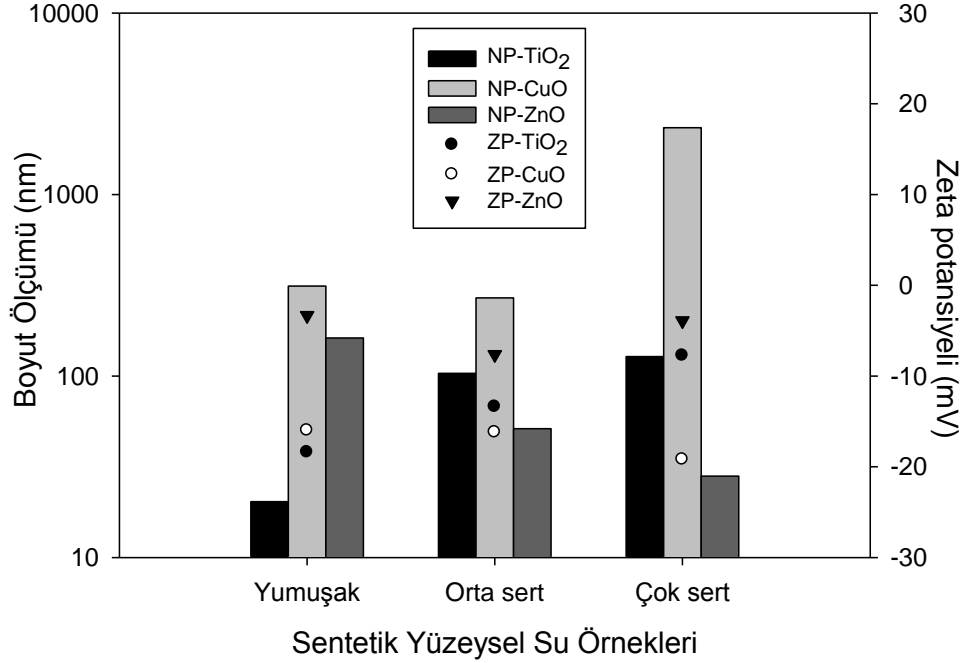
Probu sonikasyon dispersiyon metodu ile hazırlanmış TiO₂, ZnO ve CuO NPlerine ait partikül boyutu ve zeta potansiyeli ölçüm sonuçları Şekil 4.2’de verilmiştir.

TiO₂ NPlerinin yumuşak, orta sert ve çok sert SYS örneklerinde ölçülen partikül boyutları sırasıyla 20 nm, 103 nm ve 128 nm’dir. Zeta potansiyeli ölçüm sonuçları ise sırasıyla -18,4 mV, -13,4 mV ve -7,8 mV olarak tespit edilmiştir. TiO₂ NPlerinin SYS içeriğinden bağımsız olarak tüm örneklerde negatif yüklü stabil olmayan davranış sergilediği görülmüştür. Ayrıca çok sert SYS örneklerinde NPlerin partikül boyutları nanoboyuttan uzaklaşırken, diğer örneklerde nanoboyutta kaldıkları tespit edilmiştir.

ZnO NPlerine yapılan karakterizasyon ölçümleri sonucunda partikül boyutu yumuşak, orta sert ve çok sert SYS örneklerinde sırasıyla 162 nm, 51 nm ve 28 nm olarak tespit edilirken, zeta potansiyeli ölçümleri -3,3 mV, -7,8 mV ve -3,9 mV olarak bulunmuştur. ZnO NPlerinin SYS içeriğinden bağımsız olarak tüm örneklerde negatif yüklü stabil olmayan davranış sergilediği tespit edilmiştir. Ayrıca orta ve çok sert SYS örneklerinde NPlerin nanoboyutta kaldıkları görülmüştür.

CuO NPlerinin yumuşak, orta sert ve çok sert SYS örneklerinde ölçülen partikül boyutları sırasıyla 3113 nm, 269 nm ve 2335 nm olarak ölçülmüştür. Aynı NP’ye ait zeta potansiyeli ölçümleri ise sırasıyla -16,0 mV, -16,2 mV ve -19,2 mV olarak tespit

edilmiştir. CuO NPlerinin SYS örneklerinde negatif yüklü stabil olmayan davranış sergilediği görülmüştür. Ayrıca NPlerin partikül boyutlarının mm düzeyinde olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. Sentetik yüzeysel su örnekleri içinde problu sonikasyon dispersiyon yöntemi ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyeli ölçüm sonuçları

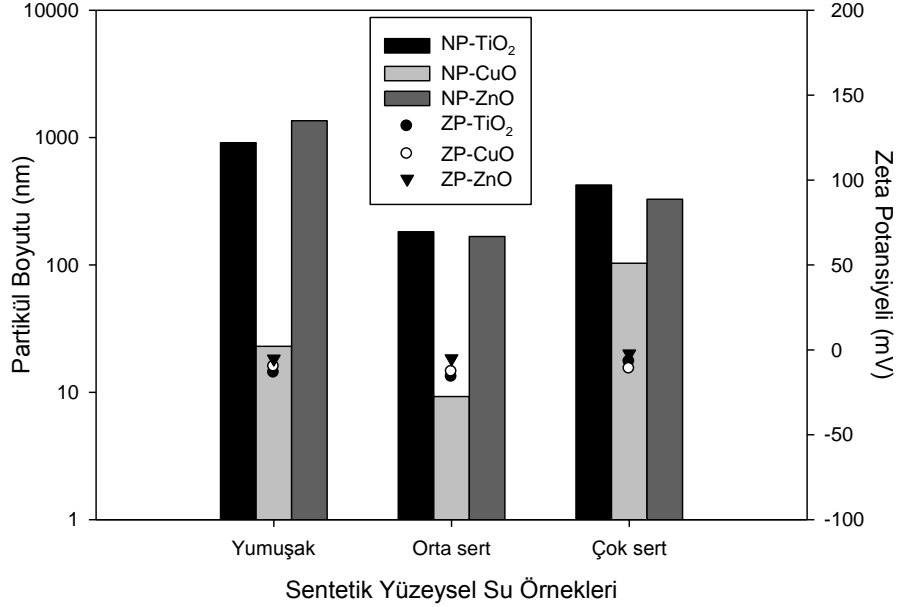
4.1.3. Banyo sonikasyon dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış nanopartiküllerin karakterizasyonu

Şekil 4.3’de banyo sonikasyon dispersiyon metodu ile hazırlanmış TiO₂, ZnO ve CuO NPlerine ait partikül boyutu ve zeta potansiyeli ölçüm sonuçları verilmiştir.

TiO₂ NPlerinin yumuşak, orta sert ve çok sert SYS örneklerinde ölçülen partikül boyutları sırasıyla 911 nm, 182 nm ve 424 nm olup, zeta potansiyeli ölçümleri ise sırasıyla -13,5 mV, -16,0 mV ve -6,9 mV olarak ölçülmüştür. TiO₂ NPlerinin SYS örneklerinde negatif yüklü stabil olmayan davranış sergilediği görülmüştür. Ayrıca NPlerin partikül boyutlarının nanoboyutta olmadıkları tespit edilmiştir.

ZnO NPlerinin partikül boyutları yumuşak, orta sert ve çok sert SYS örneklerinde sırasıyla 1358 nm, 167 nm ve 328 nm olarak ölçülmüş, zeta potansiyelleri ise sırasıyla -5,3 mV, -5,2 mV ve -2,3 mV olarak ölçülmüştür. ZnO NPlerinin yumuşak SYS örneklerinde mm boyutuna ulaştığı, diğer SYS örneklerindeki NPlerin de benzer şekilde nanoboyutta olmadıkları görülmüştür.

CuO NPLerinin yumuşak, orta sert ve çok sert SYS örneklerinde ölçülen partikül boyutları sırasıyla 23 nm, 9 nm ve 103 nm olup, zeta potansiyel değerleri ise sırasıyla -9,9 mV, -12,9 mV ve -11,1 mV olarak tespit edilmiştir. CuONPLerinin SYSörneklerinde negatif yüklü stabil olmayan davranış sergilediği görülmüştür. Ayrıca NPLerin partikül boyutlarının nanoboyutta oldukları tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. Sentetik yüzeysel su örnekleri içinde banyo sonikasyon dispersiyon metodu ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyeli ölçüm sonuçları

4.2. TiO₂ Nanopartiküllerinin Algler Üzerindeki Etkileri

Tez çalışmasının Materyal ve Metot kısmında deneysel koşulları tanımlanan ve farklı SYS içeriğine sahip TiO₂NP örnekleri önce sırasıyla karıştırma, problu sonikasyon ve banyo sonikasyon dispersiyon yöntemleri uygulanmış, ardından alg kültürü eklenmiş ve etki analizleri kapsamında inhibisyon, MDA üretimi, TTC indirgenmesi ve morfolojik gözlem çalışmaları tamamlanmıştır. Tüm bulgular Şekil 4.4–4.7'de sunulmuştur.

4.2.1. Karıştırma dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış TiO₂ nanopartiküllerinin algler üzerindeki etkisi

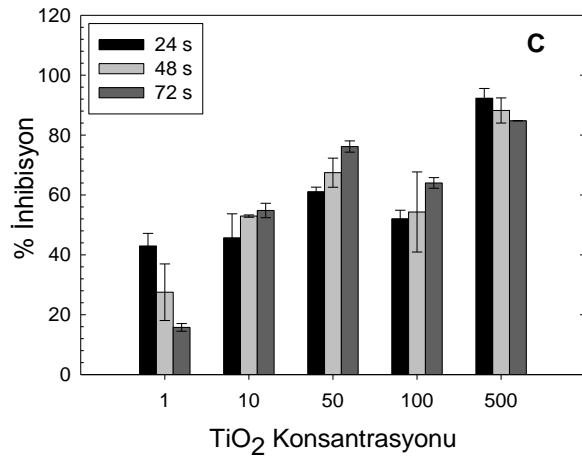
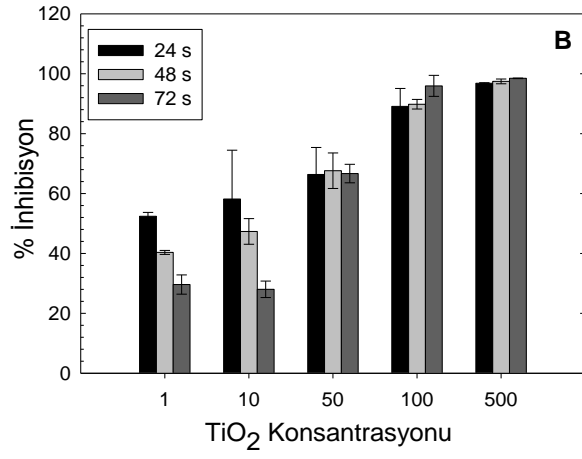
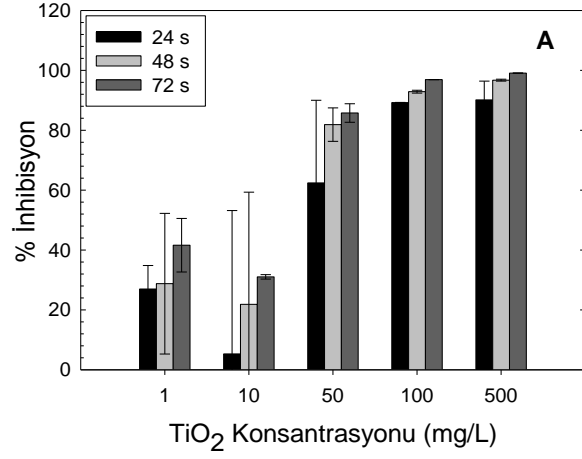
TiO₂ NPLerinin *P. subcapitata* alg türü üzerindeki inhibisyon sonuçları Şekil 4.4'te verilmiştir. SYS içeriğinden bağımsız olarak NP konsantrasyonundaki artışın alg inhibisyonu ile doğru orantılı olduğu görülmüştür. Bununla beraber NP konsantrasyon artışından bağımsız olarak en yüksek inhibisyon değerleri tüm SYS türü için 72 saat

deney süresi sonunda tespit edilmiştir. Buna göre en yüksek inhibisyon değeri 500 mg/L NP konsantrasyonunda, yumuşak SYS örneğinde % 99, orta sert SYS örneğinde %98 ve çok sert SYS örneğinde ise %84 olarak hesaplanmıştır. Tüm inhibisyon sonuçları beraber ele alındığında yumuşak ve orta sert SYS içeriğinin alg inhibisyonu üzerinde daha etkili olduğu görülmüştür.

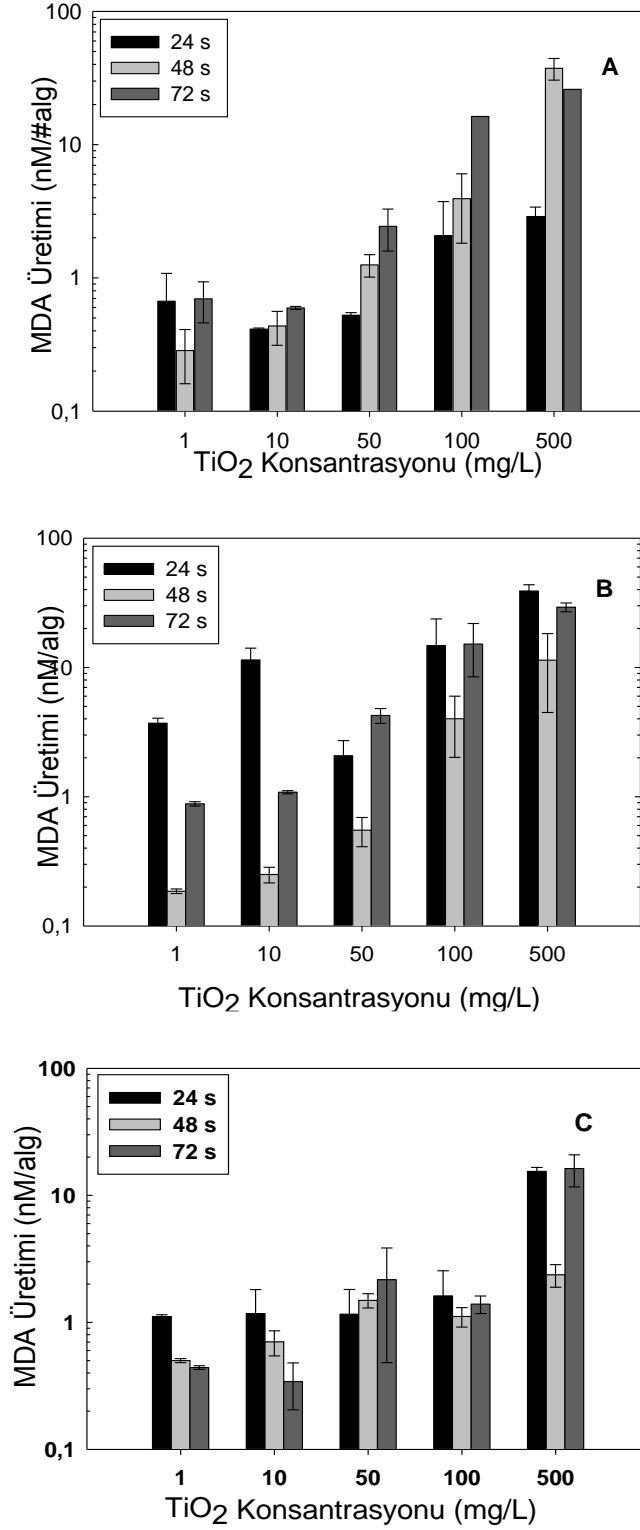
Şekil 4.5'te TiO₂ NPlerinin MDA üretimine etkisigörülmektedir. Tüm SYS örneklerinde NP konsantrasyonunun artışına bağlı olarak MDA üretimlerinin arttığı tespit edilmiştir. MDA üretim sonuçlarının inhibisyon sonuçları ile uyumlu olduğu görülmüştür. Buna göre en yüksek MDA üretimi (39±4,59 nM/alg) orta sert SYS içeriğine sahip, 500 mg/L NP konsantrasyonuna 24 saat süre maruz bırakılmış alg-NP deney düzeneğinden elde edilirken, en düşük MDA üretimi (0,186 ±0,01 nM/alg)orta sert SYS içeriğine sahip, 1 mg/L NP konsantrasyonuna 48 saat süre maruz bırakılmış örneklerde bulunmuştur.

TiO₂ NPlerinin hücre sel solunum aktivitesi üzerindeki etkileri Şekil 4.6'da sunulmuştur. İnhibisyon ve MDA üretim sonuçlarına benzer şekilde, NP konsantrasyonundaki artışla doğru orantılı bir şekilde TTC indirgenme miktarında artış olduğu görülmüştür. En yüksek TTC indirgenme miktarı 324 ±0,01 nM/alg olarak ölçülmüş olup, bu değer yumuşak SYS içeriğine sahip 500 mg/L TiO₂NP konsantrasyonuna 72 saat maruz bırakılmış alg-NP deney düzeneğinden elde edilmiştir. En düşük değer (0,060±0,03 nM/alg) ise orta sert SYS içeriğine sahip 500 mg/L TiO₂NP konsantrasyonuna 72 saat maruz bırakılmış alg-NP örneklerinde tespit edilmiştir.

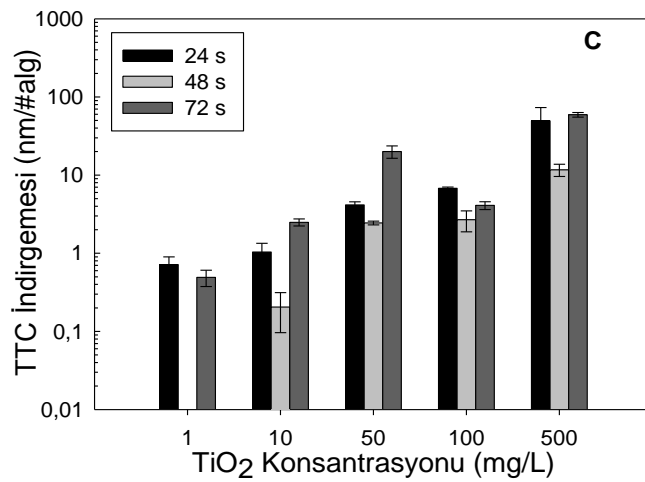
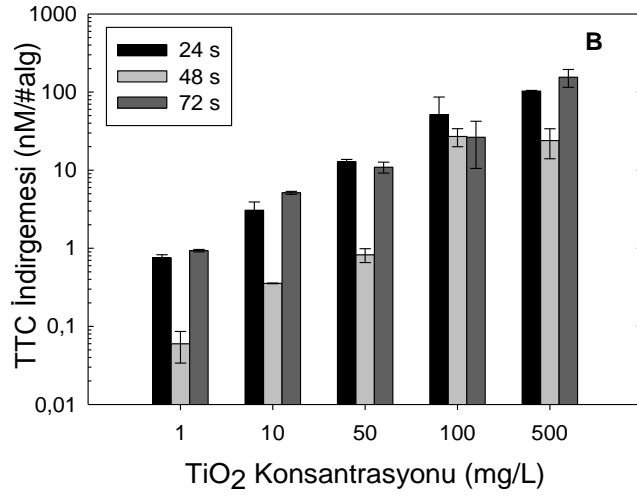
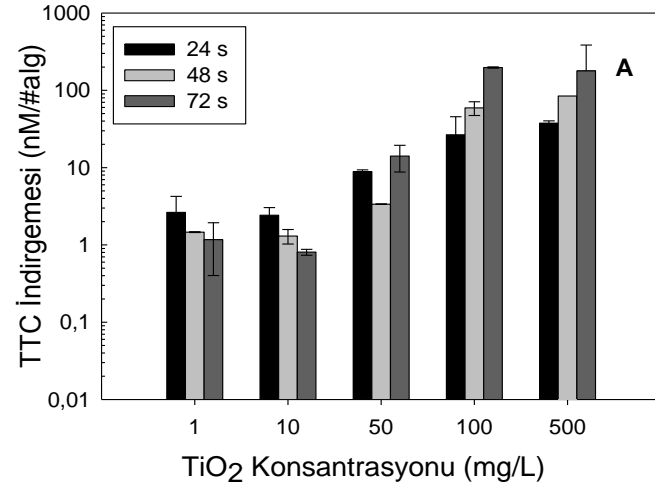
Karıştırma dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış TiO₂ NPlerinin *P. subcapitata* algleri üzerindeki etkilerinin morfolojik gözlem ile belirlenmesi kapsamında orta sert SYS içeriğine sahip Alg-NP örnekleri incelenmiştir. Şekil 4.7'de karıştırma Alg-TiO₂NPlerinin mikroskop görüntüsü verilmiştir. En yüksek NP konsantrasyonu olan 500 mg/L'de gerçekleştirilen görüntüleme alglerin tamamen parçalanmış olduğu, sağlıklı alg hücrelerinin hemen hemen hiç bulunmadığı görülmektedir. Bununla beraber alg-alg, alg-NP ve NP-NP olmak üzere kümelenmeler olduğu tespit edilmiştir.



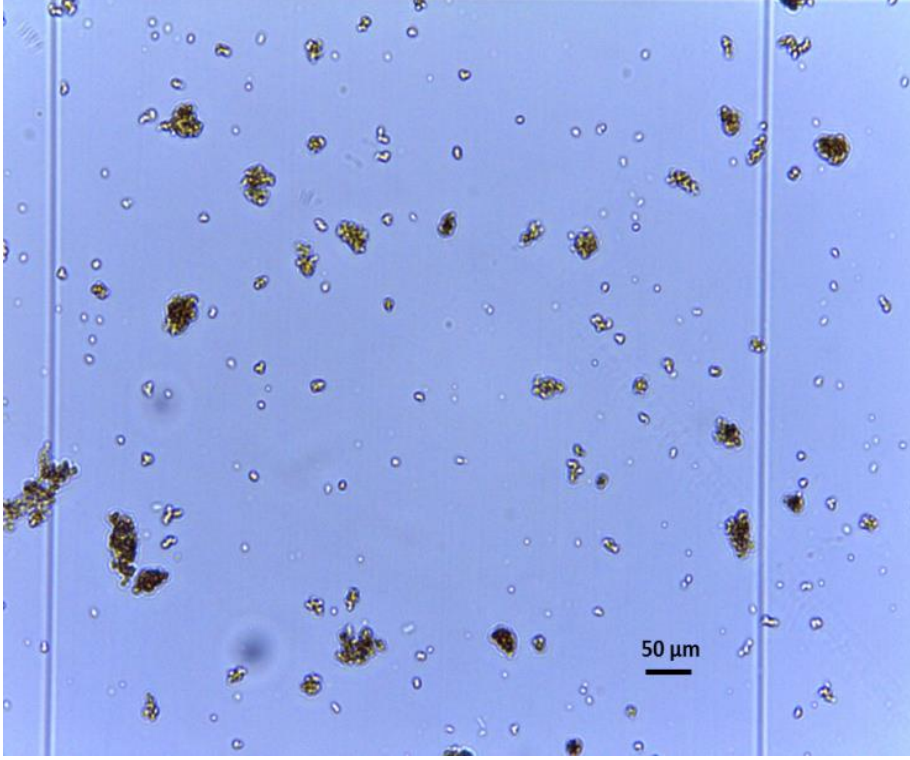
Şekil 4.4.Sentetik yüzeyel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde karıştırma metodu ile hazırlanan TiO₂ nanopartiküllerinin alg inhibisyonuna etkisi



Şekil 4.5. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde karıştırma metodu ile hazırlanan TiO₂ nanopartiküllerinin membran deformasyonuna etkisi



Şekil 4.6. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde karıştırma metodu ile hazırlanan TiO₂ nanopartiküllerinin solunum aktivitesine etkisi



Şekil 4.7. Karıştırma dispersiyon metodu ile hazırlanmış orta sert SYS örneğine ait TiO₂ nanopartikülünün ışık mikroskobu altındaki görüntüsü

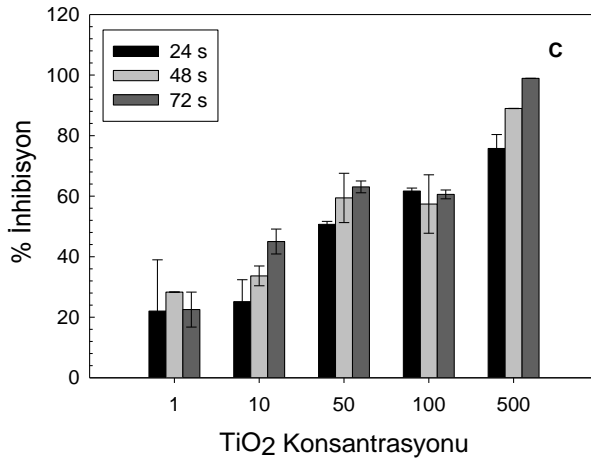
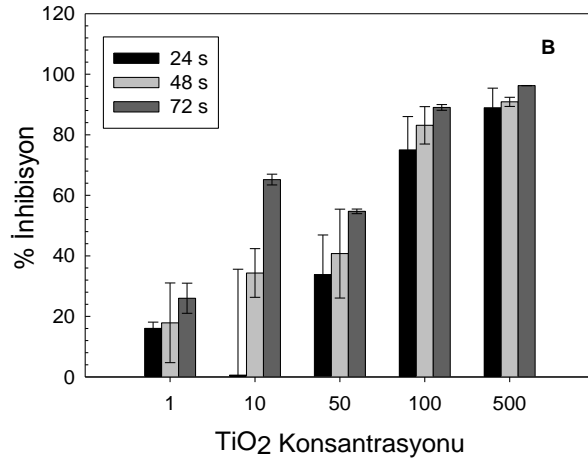
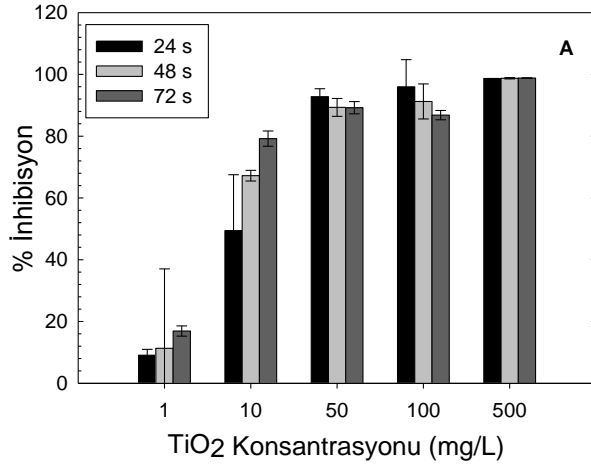
4.2.2. Probu sonikasyon dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış TiO₂ nanopartiküllerinin algler üzerindeki etkisi

Probu sonikasyon yöntemiyle hazırlanmış TiO₂ Nplerinin *P. subcapitata* alg türü üzerindeki inhibisyon sonuçları Şekil 4.8’de verilmiştir. SYS içeriğinden bağımsız olarak NP konsantrasyonundaki artışın alg inhibisyonu ile doğru orantılı olduğu görülmüştür. Bununla beraber 500 mg/L NP konsantrasyonlarında en yüksek inhibisyon değerleri tüm SYS türü için 72 saat deney süresi sonunda yaklaşık %99 olarak tespit edilmiştir. Tüm inhibisyon sonuçları incelendiğinde özellikle yumuşak SYS örneklerinde 50, 100 ve 500 mg/L NP konsantrasyonlarının bulunduğu deney setlerinde %90’ın üzerinde alg inhibisyonu elde edilmiştir.

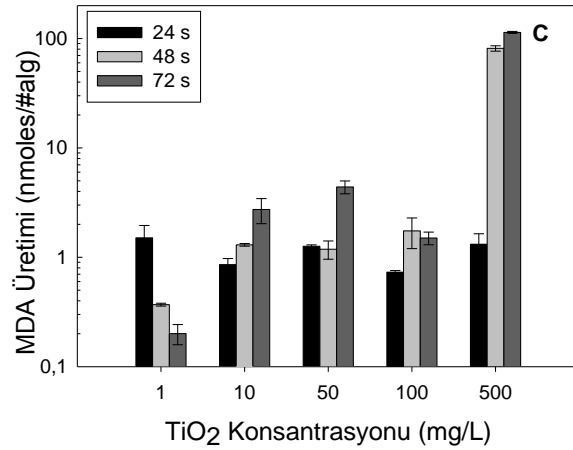
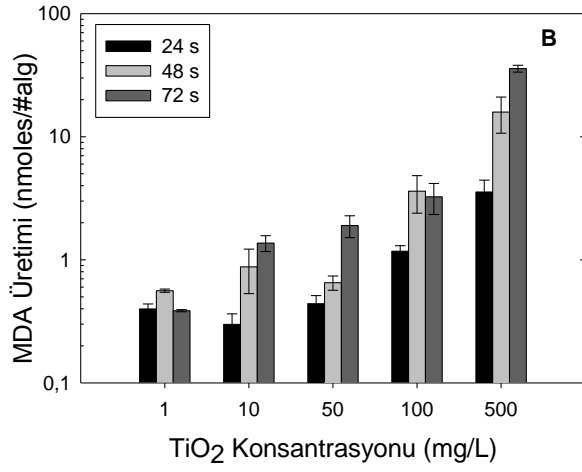
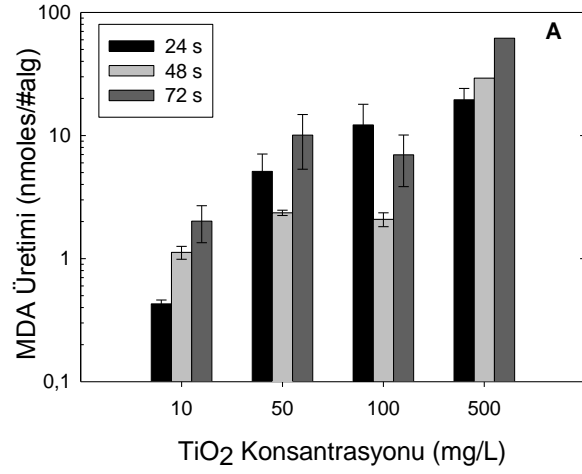
Şekil 4.9’da TiO₂ Nplerinin MDA üretimine etkisi görülmektedir. Tüm SYS örneklerinde NP konsantrasyonunun artışına bağlı olarak MDA üretimlerinin arttığı tespit edilmiştir. En yüksek MDA üretimi (81±4,59 nM/alg) çok sert SYS içeriğine sahip, 500 mg/L NP konsantrasyonuna 48 saat süre maruz bırakılmış alg-NP deney düzeneğinden elde edilirken, en düşük MDA üretimi (0,2 ±0,04 nM/alg) çok sert SYS içeriğine sahip, 1 mg/L NP konsantrasyonuna 72 saat süre maruz bırakılmış örneklerde bulunmuştur. Çok sert SYS içeriğinde hazırlanmış Nplerden kaynaklanan MDA üretimleri incelendiğinde konsantrasyonun 1 mg/L’den 500 mg/L’ye artırılması durumunda MDA üretiminin 1000kattan daha fazla arttığı görülmüştür. Söz konusu sonucun inhibisyon sonuçları ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

TiO₂ NPlerininhücre sel solunum aktivitesi üzerindeki etkileri Şekil 4.10'da sunulmuştur. SYS içeriğinden bağımsız olarak, NP konsantrasyonundaki artışla doğru orantılı bir şekilde TTC indirgenme miktarında artış olduğu görülmüştür. En yüksek TTC indirgenme miktarı 159±1,99 nM/alg olarak ölçülmüş olup, bu değer yumuşak SYS içeriğine sahip 500 mg/L TiO₂NP konsantrasyonuna 48 saat maruz bırakılmış alg-NP deney düzeneğinden elde edilmiştir. En düşük değer (0,091±0,02 nM/alg) ise benzer şekilde yumuşak SYS içeriğine sahip 1 mg/L TiO₂NP konsantrasyonuna 72 saat maruz bırakılmış alg-NP örneklerinde tespit edilmiştir. NP konsantrasyonu 50 mg/L ve daha yüksek konsantrasyonlarda 72 saat maruziyet süresi sonucu ortalama TTC indirgeme miktarları sırasıyla yumuşak, orta sert ve çok sert SYS örnekleri için sırasıyla 39,6, 52,2 ve 31,9 nM/alg olarak hesaplanmıştır.

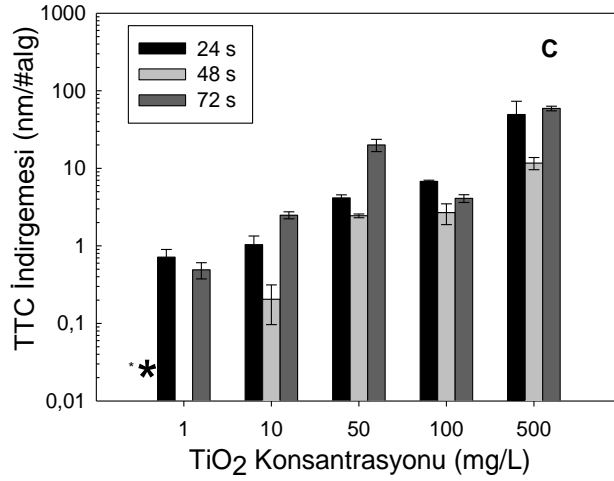
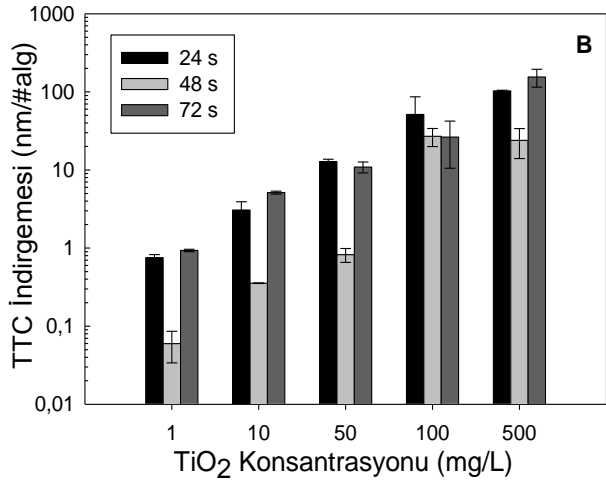
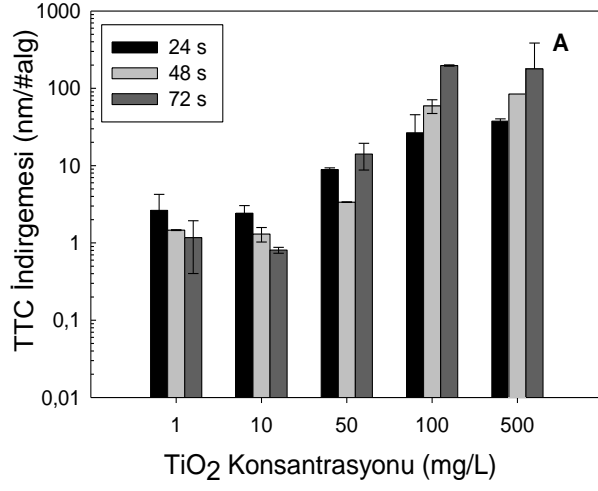
Şekil 4.11'de problu sonikasyon dispersiyon metodu ile orta sert SYS içeriğinde hazırlanmış TiO₂ NPlerin algal üzerindeki etkilerinin mikroskop görüntüsü verilmiştir. En yüksek NP konsantrasyonu olan 500 mg/L'de gerçekleştirilen görüntüleme de alglerin tamamen parçalanmış olduğu görülmektedir. Diğer etki analiz (alg inhibisyonu, MDA üretimi ve TTC indirgenmesi) sonuçlarını destekler şekilde, membran deformasyonunu takiben alg yapı bütünlüğünün bozulduğu düşünülmektedir. Bununla beraber parçalanmış alglerin TiO₂ NPleriyle agregasyona uğradıkları, 50 µm'yi aşan boyutlara ulaştıkları görülmektedir.



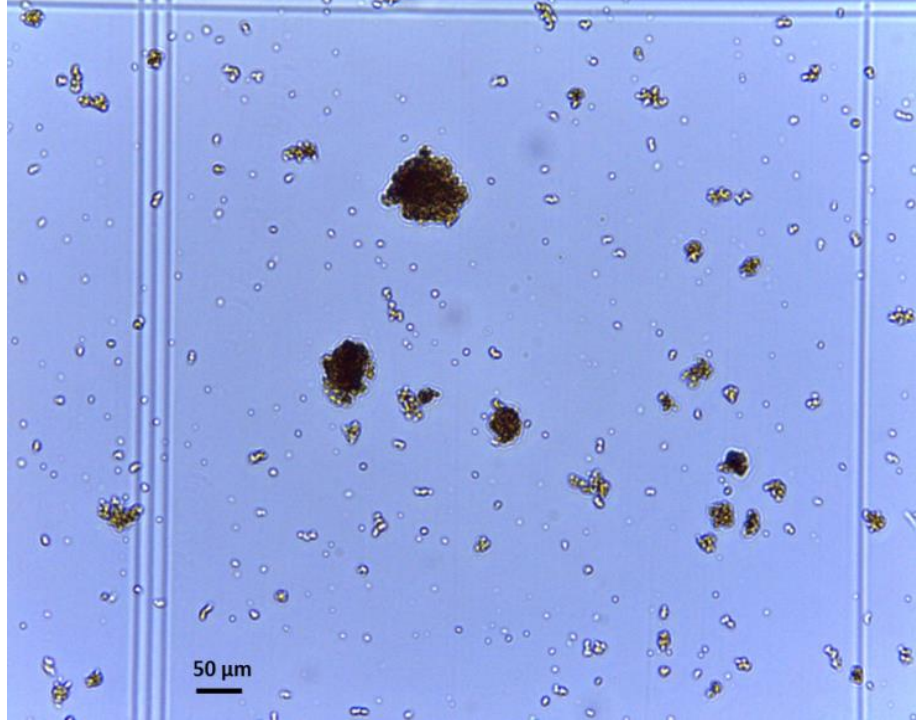
Şekil 4.8. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde problu sonikasyon metodu ile hazırlanan TiO₂ nanopartiküllerinin alg inhibisyonuna etkisi



Şekil 4.9. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde problu sonikasyon metodu ile hazırlanan TiO₂ nanopartiküllerinin membran deformasyonuna etkisi



Şekil 4.10. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde problu sonikasyon metodu ile hazırlanan TiO₂ nanopartiküllerinininsolunum aktivitesine etkisi



Şekil 4.11. Probu sonikasyon dispersiyon metodu ile hazırlanmış orta sert SYS örneğine ait TiO₂ nanopartikülünün ışık mikrosbu altındaki görüntüsü

4.2.3. Banyo sonikasyon dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış TiO₂nanopartiküllerinin algler üzerindeki etkisi

Banyo sonikasyon dispersiyon yöntemi ile yumuşak, orta sert ve çok sert SYS içeriğine sahip deney setlerinde hazırlanmış farklı konsantrasyonlardaki TiO₂ NPLerinin alg inhibisyonu üzerindeki etkileri Şekil 4.12’de verilmiştir. Yumuşak ve orta sert SYS içeriğine sahip örneklerde 50, 100 ve 500 mg/L NP konsantrasyonu uygulandığında, alg inhibisyonunun %99,99’a ulaştığı görülmüştür. Çok sert SYS içeriğinde bulunan NP-alg örneklerinde ise en yüksek konsantrasyon (500 mg/L) uygulandığında en yüksek inhibisyon değeri (%99,99) elde edilmiştir.

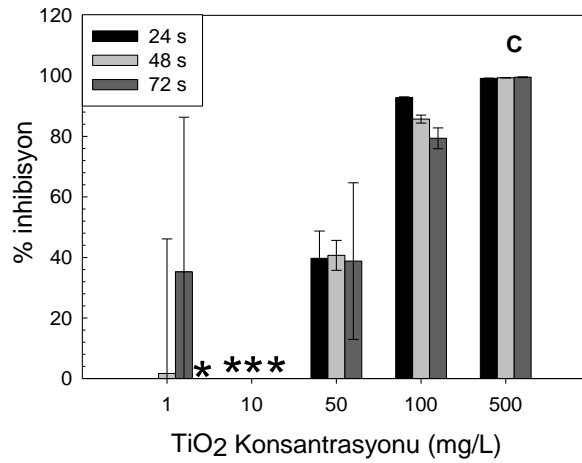
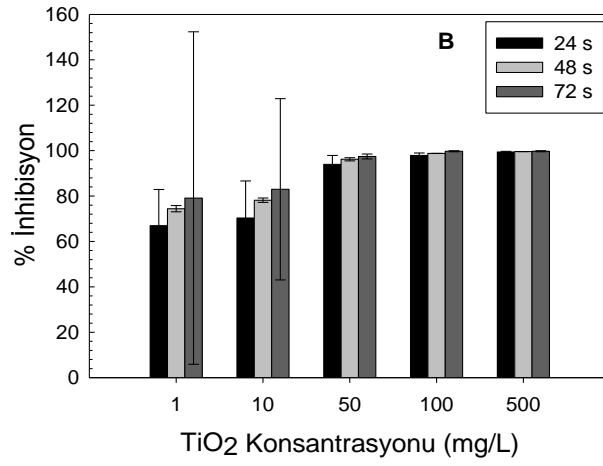
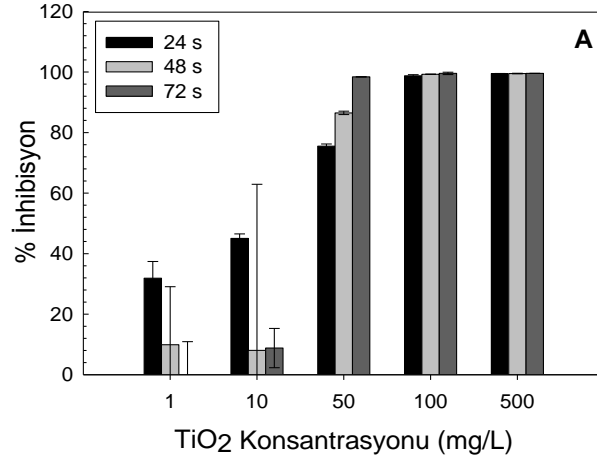
Şekil 4.13’te banyo sonikasyon dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış TiO₂ NPLerinin MDA üretimine olan etkileri gösterilmektedir. Orta sert SYS içeriğine sahip örnekler incelendiğinde, en yüksek MDA üretimi 72 saat maruziyet süresi sonunda, 500 mg/L NP konsantrasyonda 247 nM/alg tespit edilirken, en düşük MDA üretimi 0,014 nM/alg olarak 48 saat maruziyet süresi sonunda 1 mg/L NP konsantrasyonun uygulandığı örneklerde hesaplanmıştır. 50 mg/L ve daha yüksek NP konsantrasyonların uygulandığı 72 saatlik deney setlerinin yumuşak, orta sert ve çok sert SYS örneklerinde ortalama MDA üretim miktarları sırasıyla 18,2, 122,5 ve 25,8 nM/alg olarak hesaplanmıştır.

Banyo sonikasyon dispersiyon yöntemi ile yumuşak, orta sert ve çok sert SYS içeriğine sahip deney setlerinde hazırlanmış farklı konsantrasyonlardaki TiO₂ NPLerinin

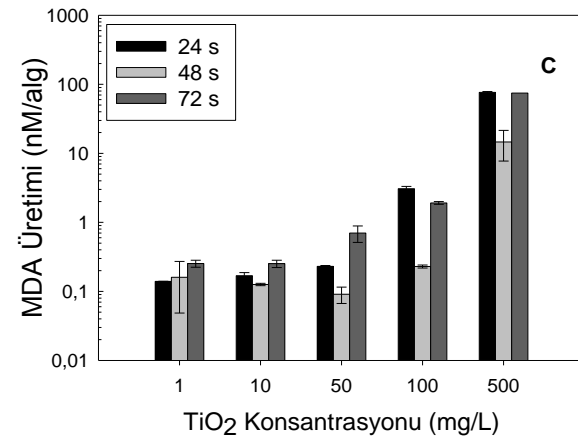
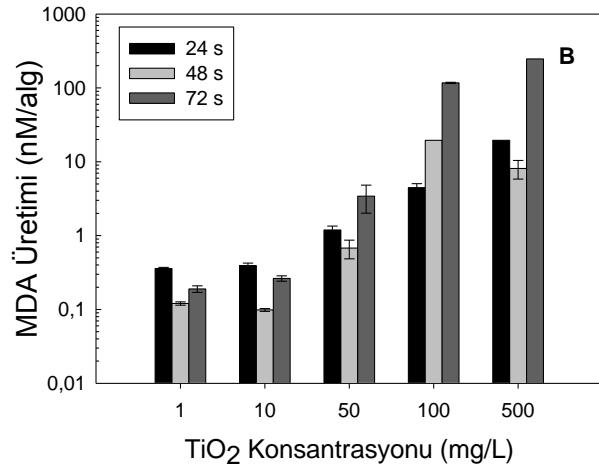
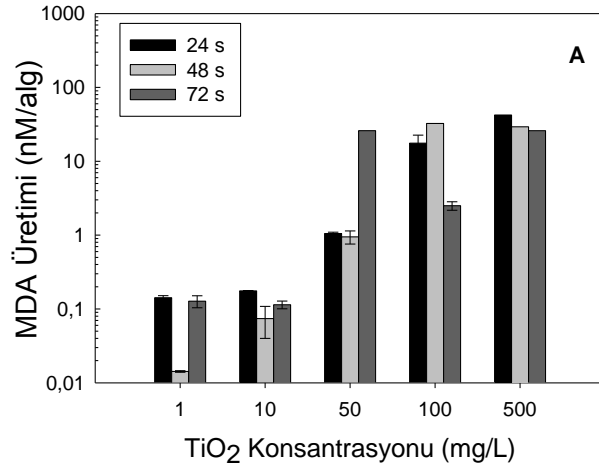
alglerdeki solunum aktivitesi üzerindeki etkileri Şekil 4.14'te verilmiştir. Alg inhibisyon ve MDA üretim analiz sonuçlarına benzer şekilde, NP konsantrasyonu arttıkça TTC indirgeme miktarının arttığı görülmüştür. Yumuşak SYS içeriğine sahip örnekler (72 saat) incelendiğinde en yüksek TTC indirgeme miktarının 500 mg/L NP konsantrasyonuna sahip örneklerde $256,6 \pm 23,9$ nM/alg ve en düşük TTC indirgeme miktarının 1 mg/L NP konsantrasyonuna sahip örneklerde ise $0,19 \pm 0,03$ nM/alg olarak hesaplanmıştır.

Şekil 4.15'te banyo sonikasyon dispersiyon metodu ile hazırlanmış orta sert SYS örneğine ait TiO₂NPlerinin algler üzerindeki etkilerinin mikroskop görüntüsü verilmiştir. En yüksek NP konsantrasyonu olan 500 mg/L'de gerçekleştirilen görüntülemelerde alglerin tamamen parçalanmış olduğu, sağlıklı alg hücrelerinin hemen hemen hiç bulunmadığı, kümelenmiş halde alg-NPlerin bulunduğu gözlemlenmiştir.

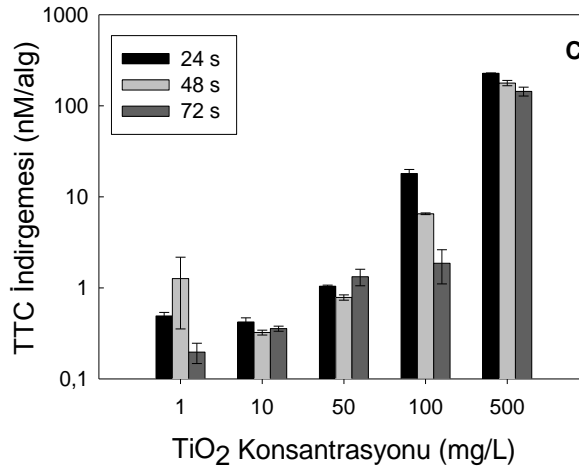
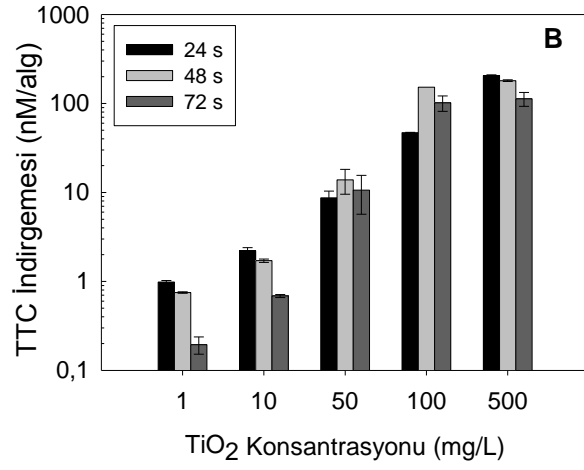
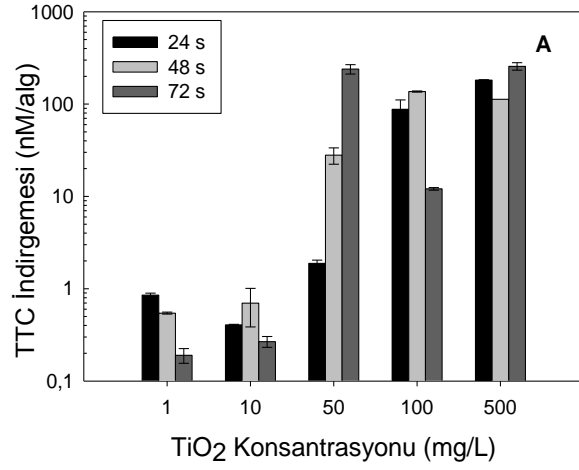
Banyo sonikasyon dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış TiO₂ NPlerinin *P. subcapitata* algleri üzerindeki etkilerinin morfolojik gözlem ile belirlenmesi kapsamında orta sert SYS içeriğine sahip Alg-NP örnekleri incelenmiştir (Şekil 4.15). En yüksek NP konsantrasyonu olan 500 mg/L'de gerçekleştirilen görüntülemelerde, diğer dispersiyon yöntemleri ile hazırlanmış Alg-NP mikroskop görüntülerine benzer şekilde parçalanmış algler tespit edilmiştir. Sağlıklı hücre sayısı neredeyse hiç görülmemekle birlikte alg-alg, alg-NP ve NP-NP olmak üzere kümelenmeler olduğu belirlenmiştir.



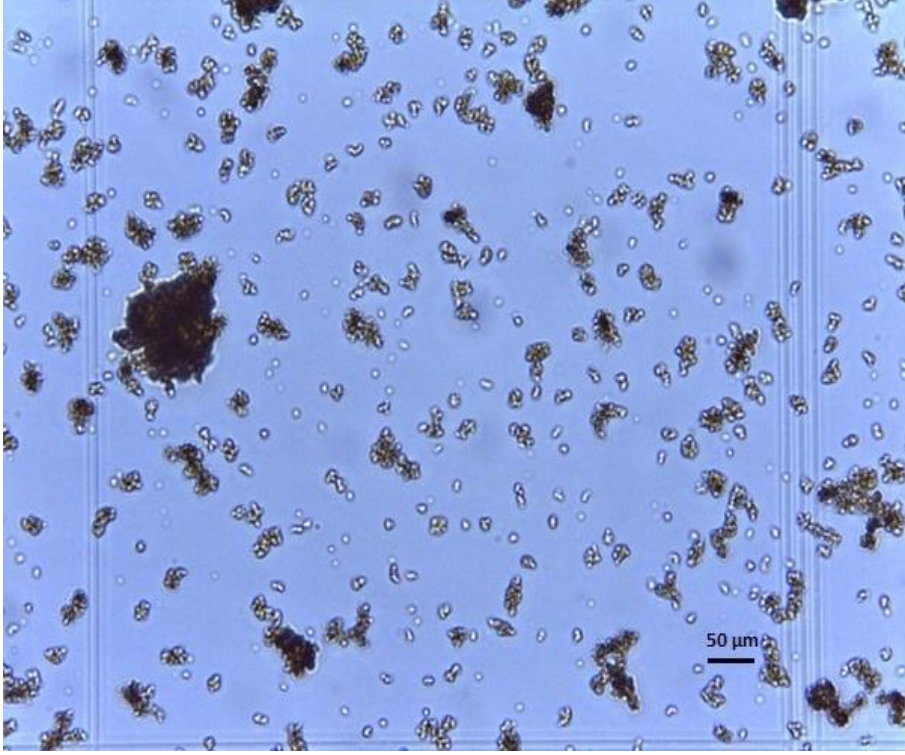
Şekil 4.12. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde banyo sonikasyon metodu ile hazırlanan TiO₂ nanopartiküllerinin alg inhibisyonuna etkisi (* Anlamlı sonuç elde edilememiştir.)



Şekil 4.13. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde banyo sonikasyon metodu ile hazırlanan TiO₂ nanopartiküllerinin membran deformasyonuna etkisi



Şekil 4.14. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde banyo sonikasyon metodu ile hazırlanan TiO₂ nanopartiküllerinininsolunum aktivitesine etkisi



Şekil 4.15. Banyo sonikasyon dispersiyon metodu ile hazırlanmış orta sert SYS örneğine ait TiO₂nanopartikülünün ışık mikrosbu altındaki görüntüsü

4.3. ZnO Nanopartiküllerinin Algler Üzerindeki Etkileri

Tez çalışmasının Materyal ve Metot kısmında deneysel koşulları tanımlanan ve farklı SYS içeriğine sahip ZnO NP gruplarına önce sırasıyla karıştırma, problu sonikasyon ve banyo sonikasyon dispersiyon yöntemleri uygulanmış, ardından alg kültürü eklenmiş ve etki analizleri kapsamında inhibisyon, MDA üretimi, TTC indirgenmesi ve morfolojik gözlem çalışmaları tamamlanmıştır. Tüm bulgular Şekil 4.16–4.24'te sunulmuştur.

4.3.1. Karıştırma dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış ZnO nanopartiküllerinin algler üzerindeki etkisi

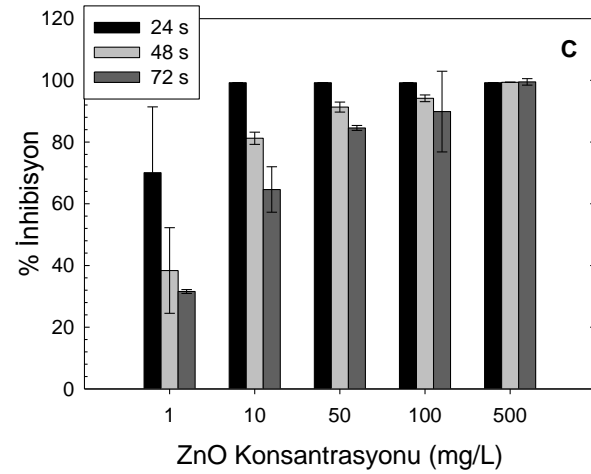
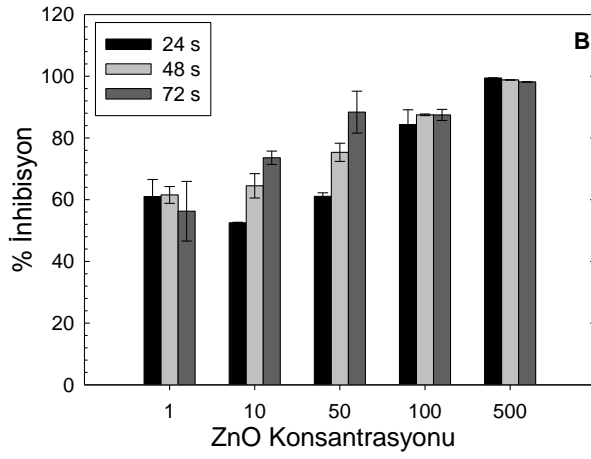
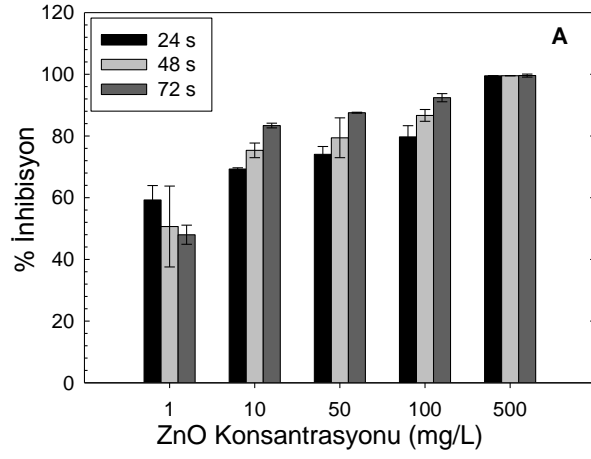
Karıştırma sonikasyon yöntemiyle hazırlanmış ZnO NPlerinin *P. subcapitata* alg türü üzerindeki inhibisyon sonuçları Şekil 4.16'da verilmiştir. SYS içeriğinden bağımsız olarak NP konsantrasyonundaki artışın alg inhibisyonu ile doğru orantılı olduğu görülmüştür. Bununla beraber 500 mg/L NP konsantrasyonlarında en yüksek inhibisyon değerlerinin, tüm SYS türü için 72 saat deney süresi sonunda, %91'in üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Tüm inhibisyon sonuçları incelendiğinde özellikle yumuşak SYS örneklerinde 500 mg/L NP konsantrasyonlarının bulunduğu deney setlerinde %99,99 alg inhibisyonu elde edilmiştir. En düşük alg inhibisyon değeri ise çok sert SYS içeriğe

sahip ve 1 mg/L NP konsantrasyonunun uygulandığı 72 saatlik deney setlerinde % 32 olarak tespit edilmiştir.

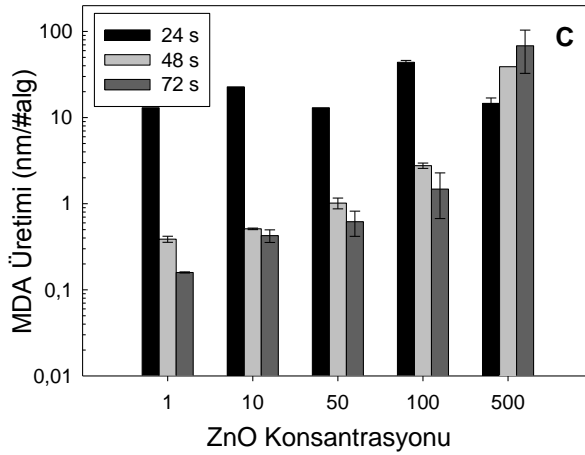
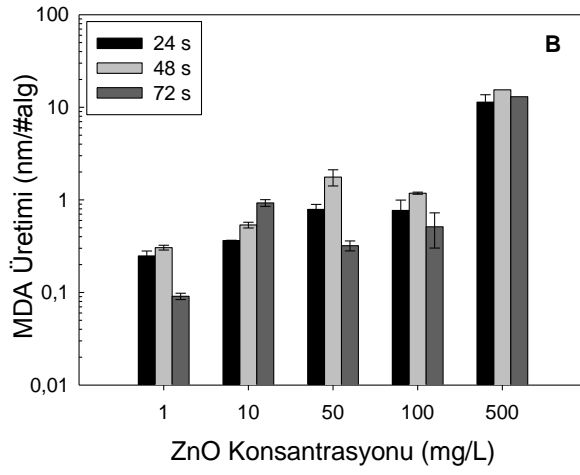
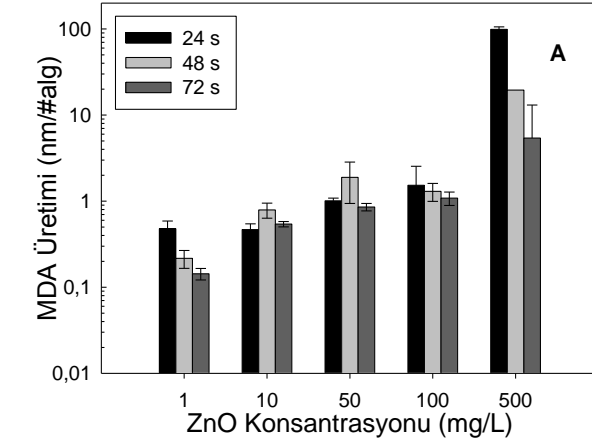
ZnO NPlerinin alg membran deformasyonu üzerindeki etkileri MDA üretimi olarak Şekil 4.17’de verilmektedir. Tüm SYS örneklerinde NP konsantrasyonunun artışına bağlı olarak MDA üretimlerinin arttığı tespit edilmiştir. MDA üretim sonuçlarının inhibisyon sonuçları ile uyumlu olduğu görülmüştür. Buna göre en yüksek MDA üretimi ($99\pm 6,89$ nM/alg) yumuşak SYS içeriğine sahip, 500 mg/L NP konsantrasyonuna 24 saat süre maruz bırakılmış alg-NP deney düzeneğinden elde edilirken, en düşük MDA üretimi ($0,09 \pm 0,01$ nM/alg) orta sert SYS içeriğine sahip, 1 mg/L NP konsantrasyonuna 72 saat süre maruz bırakılmış örneklerde bulunmuştur.

Karıştırma dispersiyon yöntemi ile yumuşak, orta sert ve çok sert SYS içeriğine sahip deney setlerinde hazırlanmış farklı konsantrasyonlardaki ZnONPlerinin alglerdeki solunum aktivitesi üzerindeki etkileri Şekil 4.18’de verilmiştir. Alg inhibisyon ve MDA üretim analiz sonuçlarına benzer şekilde, NP konsantrasyonu arttıka TTC indirgeme miktarının arttığı görülmüştür. Çok sert SYS içeriğine sahip örnekler incelendiğinde, NP konsantrasyonu 1 mg/L’den 500 mg/L’e arttığında, TTC indirgenme miktarının yaklaşık 400 kat arttığı görülmüştür. Bununla beraber yumuşak SYS içeriğine sahip örnekler (24 saat) incelendiğinde en yüksek TTC indirgeme miktarının 500 mg/L NP konsantrasyonuna sahip örneklerde $22,6\pm 0,01$ nM/alg ve en düşük TTC indirgeme miktarının ise 1 mg/L NP konsantrasyonunun uygulandığı deney setlerinde $0,19\pm 0,03$ nM/alg olarak hesaplanmıştır.

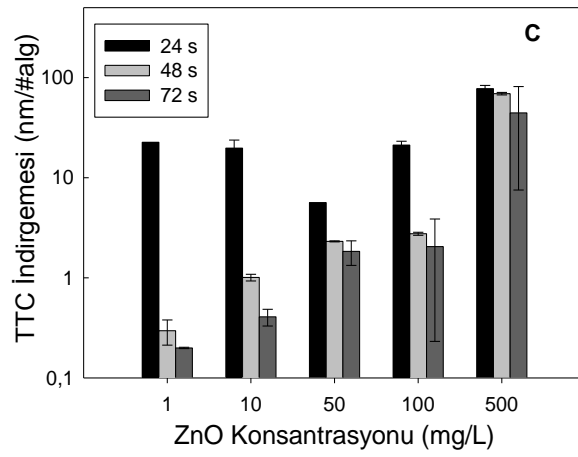
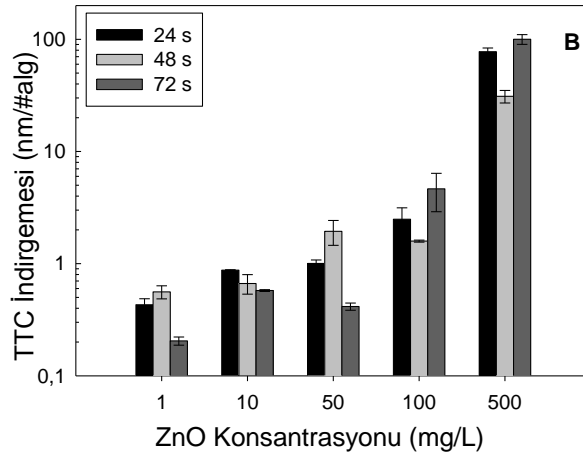
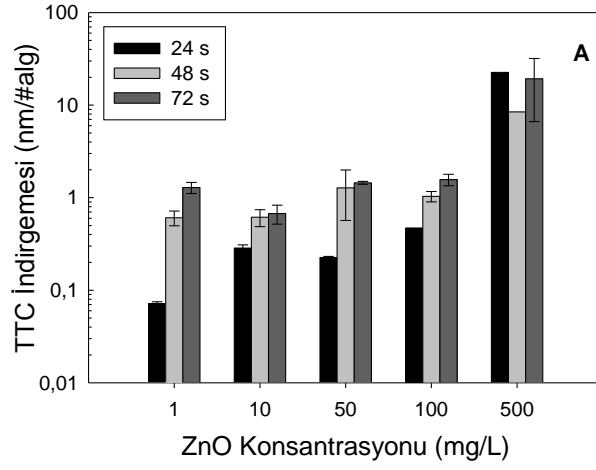
Şekil 4.19’da karıştırma dispersiyon metodu ile orta sert SYS içeriğinde hazırlanmış ZnONPlerinin algler üzerindeki etkilerinin mikroskop görüntüsü verilmiştir. En yüksek NP konsantrasyonu olan 500 mg/L’de gerçekleştirilen görüntüleme alglerin tamamen parçalanmış olduğu görülmektedir. Diğer etki analiz (alg inhibisyonu, MDA üretimi ve TTC indirgenmesi) sonuçlarını destekler şekilde, membran deformasyonunu takiben alg yapı bütünlüğünün bozulduğu düşünölmektedir. Bununla beraber mikroskop görüntüsünün üst kısmında henüz yapısı bozulmamış bir alg görölmektedir.



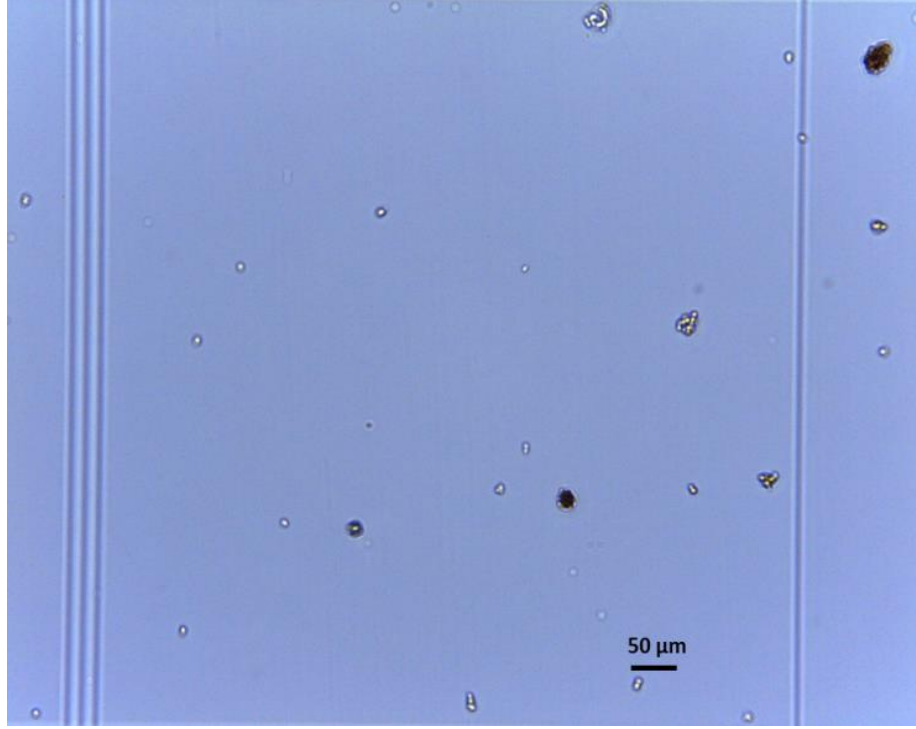
Şekil 4.16. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde karıştırma metodu ile hazırlanan ZnO nanopartiküllerinin alg inhibisyonuna etkisi



Şekil 4.17. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde karıştırma metodu ile hazırlanan ZnO nanopartiküllerinin membran deformasyonuna etkisi



Şekil 4.18. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde karıştırma metodu ile hazırlanan ZnO nanopartiküllerininin solunum aktivitesine etkisi



Şekil 4.19.Karıştırma dispersiyon metodu ile hazırlanmış orta sert SYS örneğine ait ZnO nanopartikülünün ışık mikrosbu altındaki görüntüsü

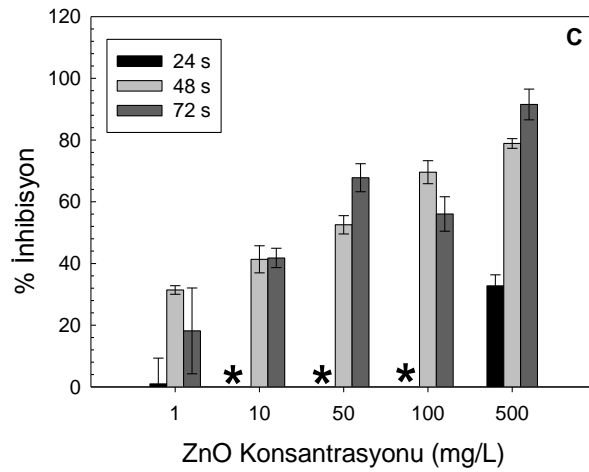
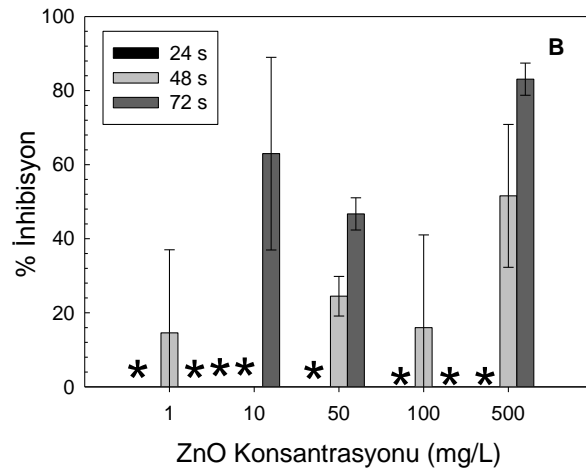
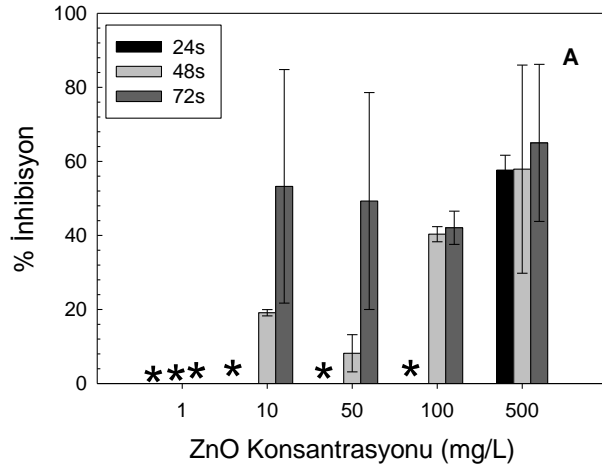
4.3.2. Probu sonikasyon dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış ZnO nanopartiküllerinin algler üzerindeki etkisi

ZnO NPlerinin *P. subcapitata* alg türü üzerindeki inhibisyon sonuçları Şekil 4.20’de verilmiştir. Her bir maruziyet süresi (24, 48 ve 72 saat) sonunda elde edilen inhibisyon sonuçları incelendiğinde 24 ve 48 saatlik inhibisyon sonuçlarında yüksek standart hata saptanmış ve anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Analizler, ikili kontrollü set olarak farklı hafta tekrarlanmış ancak beklenen sonuçlar elde edilememiştir. Buna göre yalnız çok sert SYS içeriğine sahip 500 mg/L NP konsantrasyonun bulunduğu örneklerde 72 saat sonunda en yüksek alg inhibisyonu % 92 olarak belirlenebilmiştir.

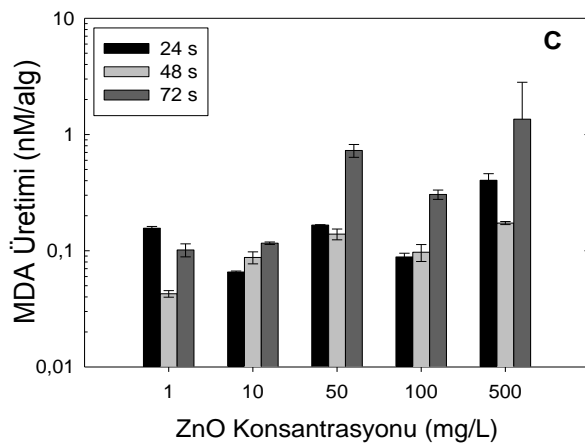
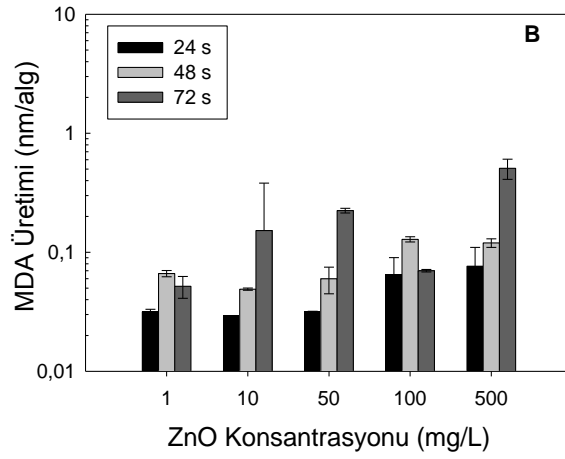
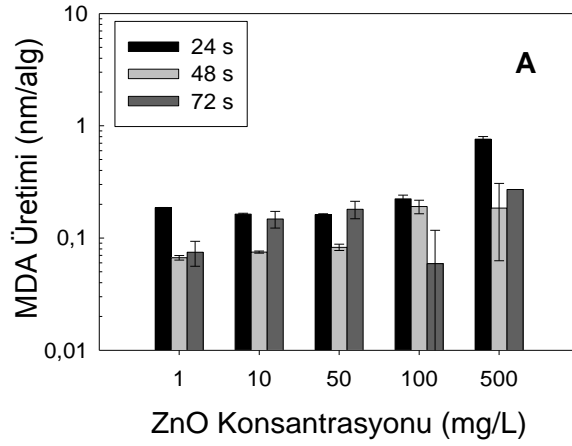
Şekil 4.21’de problu sonikasyon dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış ZnONPlerinin membran deformasyonu üzerine etkileri MDA üretimi olarak gösterilmektedir. Çok sert SYS içeriğine sahip örnekler incelendiğinde, en yüksek MDA üretimi 72 saat maruziyet süresi sonunda, 500 mg/L NP konsantrasyonun uygulandığı düzenekte 2,4 nm/alg olarak tespit edilirken, en düşük MDA üretimi ise 0,03 nm/alg olarak 24 saat maruziyet süresi sonunda 10 mg/L NP konsantrasyonun uygulandığı örneklerde hesaplanmıştır. 50 mg/L ve daha yüksek NP konsantrasyonların uygulandığı 72 saatlik deney setlerinin yumuşak, orta sert ve çok sert SYS örneklerinde ortalama MDA üretim miktarları sırasıyla 0,2, 0,3 ve 1,2 nM/alg olarak hesaplanmıştır.

ZnO NPlerininhücre sel solunum aktivitesi üzerindeki etkileri Şekil 4.22’deTTC indirgenmesi olarak sunulmuştur. En yüksek TTC indirgenme miktarı $8,8\pm 5,6$ nM/alg olarak ölçülmüş olup, bu değer yumuşak SYS içeriğine sahip 500 mg/L NP konsantrasyonuna 72 saat maruz bırakılmış alg-NP deney düzeneğinden elde edilmiştir. En düşük değer ($0,084\pm 0,003$ nM/alg) ise orta sert SYS içeriğine sahip 10mg/L TiO₂NP konsantrasyonuna 24 saat maruz bırakılmış alg-NP örneklerinde tespit edilmiştir. NP konsantrasyonu 50 mg/L ve daha yüksek konsantrasyonlarda 72 saat maruziyet süresi sonucu ortalama TTC indirgeme miktarları sırasıyla yumuşak, orta sert ve çok sert SYS örnekleri için sırasıyla 1,3, 0,7 ve 5,6 nM/alg olarak hesaplanmıştır.

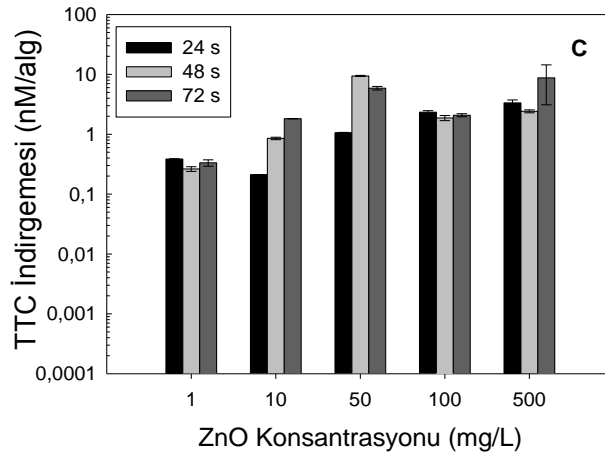
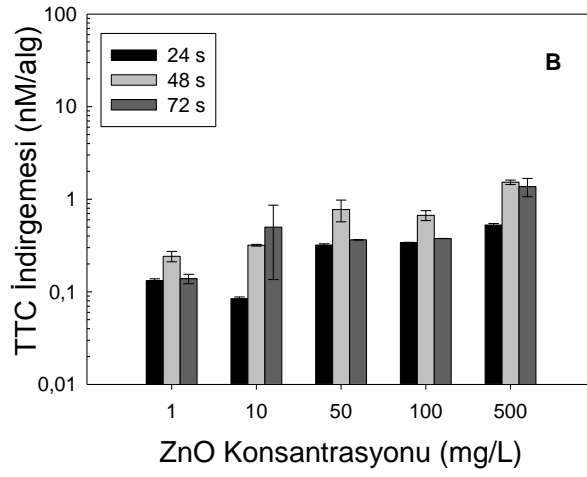
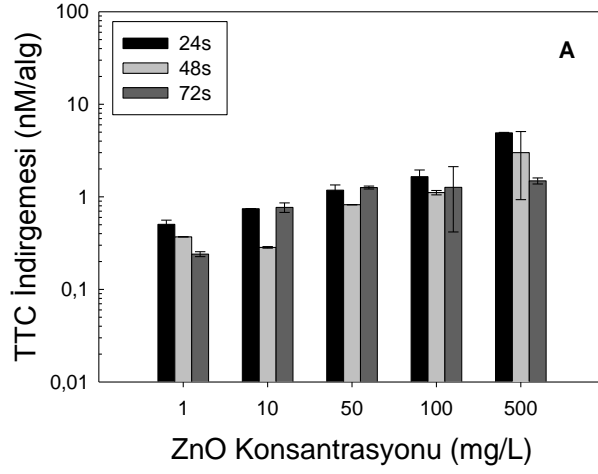
Probu sonikasyon dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış ZnO NPlerin *P. subcapitata* algleri üzerindeki etkilerinin morfolojik gözlem ile belirlenmesi kapsamında orta sert SYS içeriğine sahip Alg-NP örnekleri incelenmiştir. Şekil 4.23’te Alg- ZnONPlerin mikroskop görüntüsü verilmiştir. En yüksek NP konsantrasyonu olan 500 mg/L’de gerçekleştirilen görüntüleme de alg yapı bütünlüğünün tamamen ortadan kalktığı, alg-alg, alg-NP ve NP-NP olmak üzere kümelenmeler olduğu tespit edilmiştir.



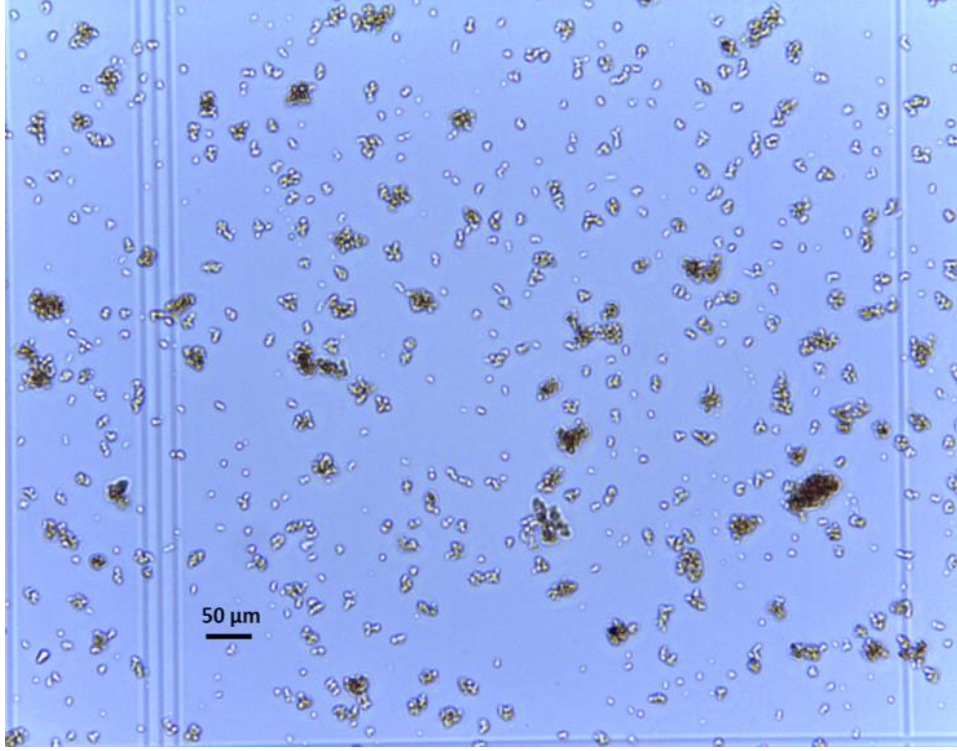
Şekil 4.20. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde problu sonikasyon metodu ile hazırlanan ZnO nanopartiküllerininalg inhibisyonuna etkisi (* Anlamli sonuç elde edilememiştir.)



Şekil 4.21. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde problu sonikasyon metodu ile hazırlanan ZnO nanopartiküllerinin membran deformasyonuna etkisi



Şekil 4.22. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde problu sonikasyon metodu ile hazırlanan ZnO nanopartiküllerinininsolunum aktivitesine etkisi



Şekil 4.23. Probu sonikasyon dispersiyon metodu ile hazırlanmış orta sert SYS örneğine ait ZnO nanopartikülünün ışık mikroskobu altındaki görüntüsü

4.3.3. Banyo sonikasyon dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış ZnO nanopartiküllerinin algler üzerindeki etkisi

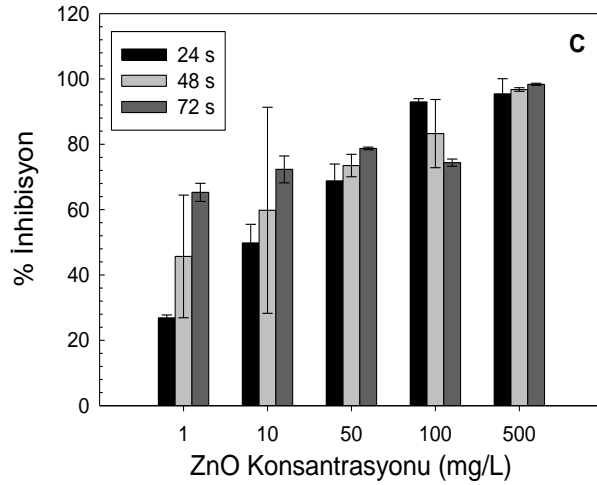
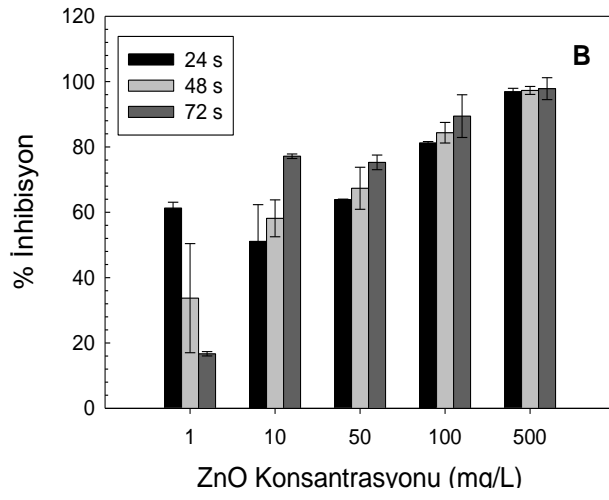
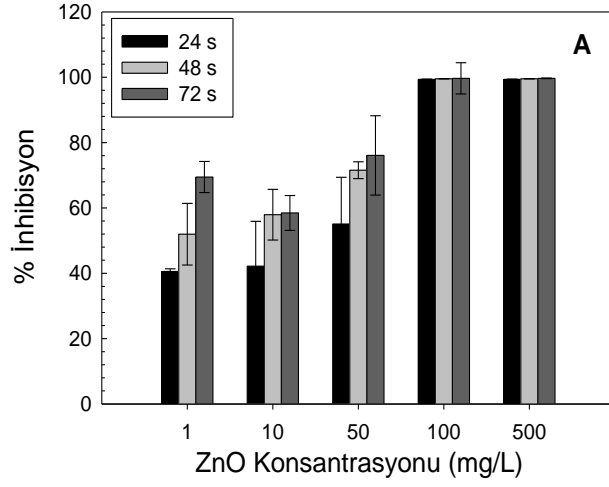
Banyo sonikasyon dispersiyon yöntemiyle hazırlanmış ZnO NPLerinin *P. subcapitata* alg türü üzerindeki inhibisyon sonuçları Şekil 4.24'te verilmiştir. SYS içeriğinden bağımsız olarak NP konsantrasyonundaki artışın alg inhibisyonu ile doğru orantılı olduğu görülmüştür. Bununla beraber NP konsantrasyon artışından bağımsız olarak en yüksek inhibisyon değerleri tüm SYS türü için 72 saat deney süresi sonunda, 500 mg/L NP konsantrasyonunda, % 99,99 olarak hesaplanmıştır. En düşük alg inhibisyon değeri ise %17 olarak orta sert SYS içeriğine sahip 1 mg/L NP konsantrasyonu uygulanmış deney setlerinden elde edilmiştir. Tüm inhibisyon sonuçları beraber ele alındığında yumuşak SYS içeriğinin alg inhibisyonu üzerinde daha etkili olduğu görülmüştür.

Şekil 4.25'te ZnONPLerinin MDA üretimine etkisi görülmektedir. Tüm SYS örneklerinde NP konsantrasyonunun artışına bağlı olarak MDA üretimlerinin arttığı tespit edilmiştir. En yüksek MDA üretimi (39 nM/alg) yumuşak SYS içeriğine sahip, 500 mg/L NP konsantrasyonuna 72 saat süre maruz bırakılmış alg-NP deney düzeneğinden elde edilirken, en düşük MDA üretimi (0,14 nM/alg) orta sert SYS içeriğine sahip, 1 mg/L NP konsantrasyonuna 48 saat süre maruz bırakılmış örneklerde bulunmuştur. Tüm MDA üretim sonuçları beraber ele alındığında, inhibisyon

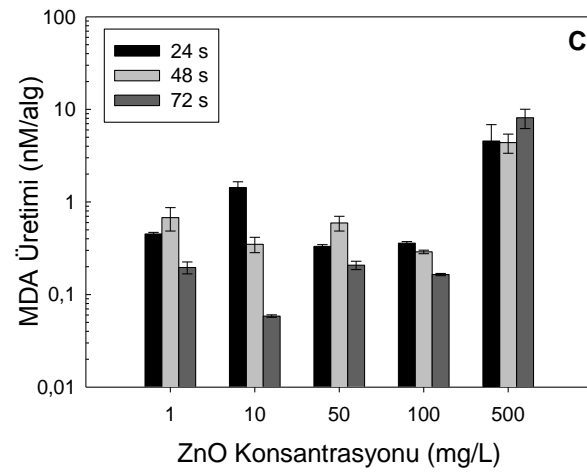
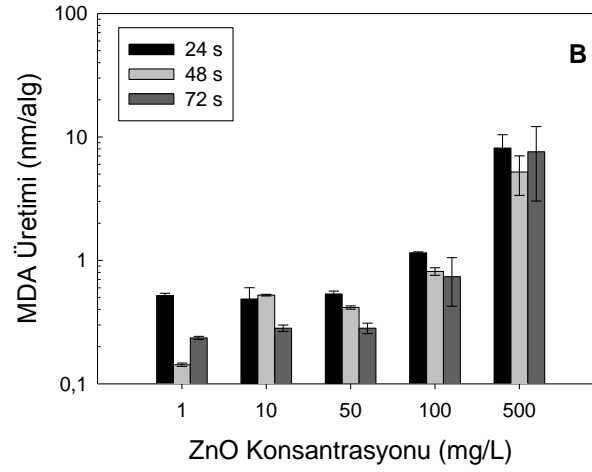
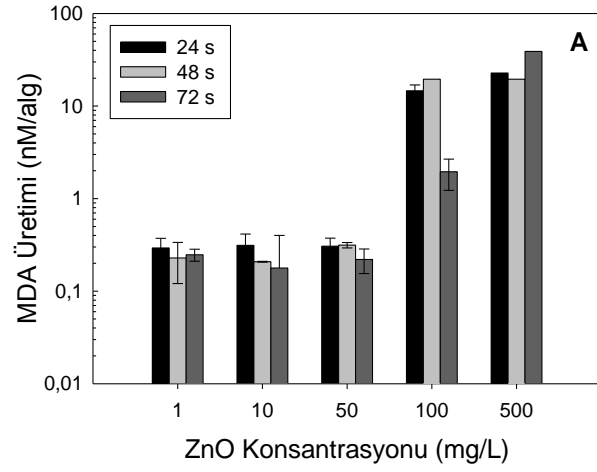
sonuçlarını destekler şekilde yumuşak SYS içeriğine sahip deney setlerinin membran deformasyonu üzerinde daha etkili olduğu görülmüştür.

ZnO NPlerinin hüresel solunum aktivitesi üzerindeki etkileri TTC indirgenmesi olarak Şekil 4.26'da sunulmuştur. SYS içeriğinden bağımsız olarak, NP konsantrasyonundaki artışla doğru orantılı bir şekilde TTC indirgenme miktarında artış olduğu görülmüştür. En yüksek TTC indirgenme miktarı $356 \pm 57,8$ nM/alg olarak ölçülmüş olup, bu değer yumuşak SYS içeriğine sahip 500 mg/L ZnONP konsantrasyonuna maruz bırakılmış alg-NP deney düzeneğinden elde edilmiştir. En düşük değer ($0,098 \pm 0,02$ nM/alg) ise çok sert SYS içeriğine sahip 1 mg/L ZnONP konsantrasyonuna 24 saat maruz bırakılmış alg-NP örneklerinde tespit edilmiştir. NP konsantrasyonu 50 mg/L ve daha yüksek konsantrasyonlarda 72 saat maruziyet süresi sonucu ortalama TTC indirgeme miktarları sırasıyla yumuşak, orta sert ve çok sert SYS örnekleri için sırasıyla 17,3, 5,5 ve 12,5 nM/alg olarak hesaplanmıştır.

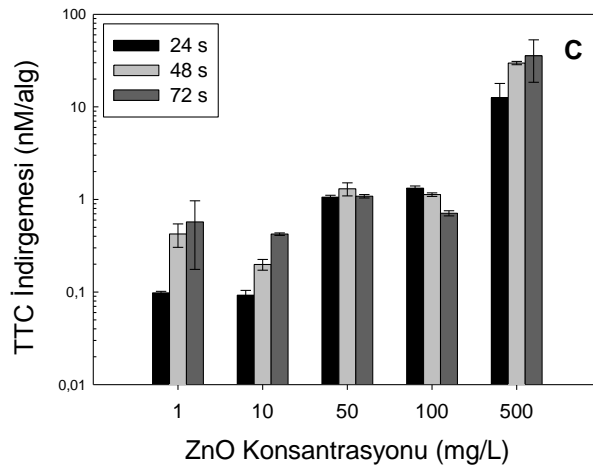
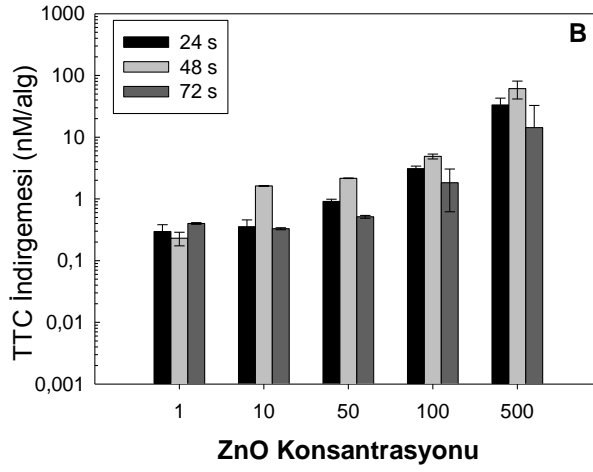
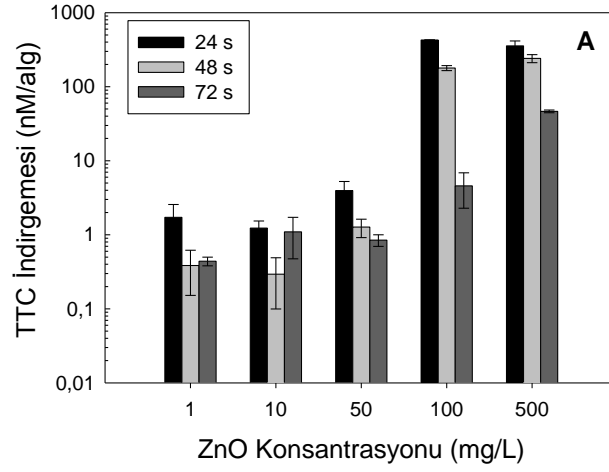
Şekil 4.27'de banyo sonikasyon dispersiyon metodu ile orta sert SYS içeriğinde hazırlanmış ZnONPlerinin algler üzerindeki etkilerinin mikroskop görüntüsü verilmiştir. En yüksek NP konsantrasyonu olan 500 mg/L'de gerçekleştirilen görüntülemelerde alglerin tamamen parçalanmış olduğu görülmektedir. Diğer etki analiz (alg inhibisyonu, MDA üretimi ve TTC indirgenmesi) sonuçlarını destekler şekilde, membran deformasyonunu takiben alg yapı bütünlüğünün bozulduğu düşünülmektedir. Bununla beraber parçalanmış alglerin ZnO NPleriyle agregasyona uğradıkları, 50 µm boyuta ulaştıkları görülmektedir.



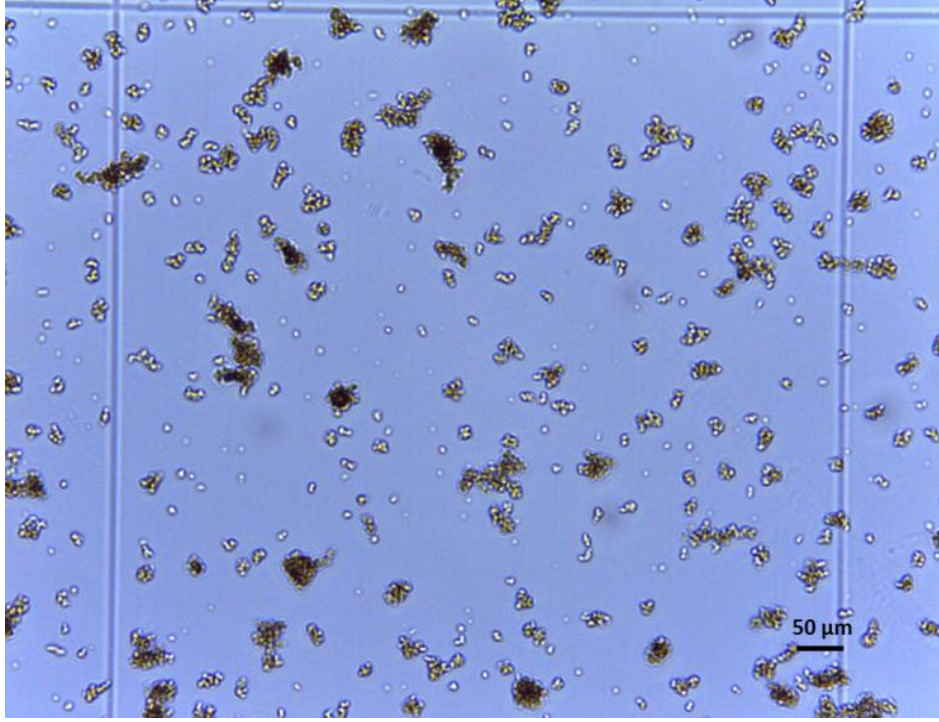
Şekil 4.24. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde banyo sonikasyon metodu ile hazırlanan ZnO nanopartiküllerinin alg inhibisyonuna etkisi



Şekil 4.25. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde banyo sonikasyon metodu ile hazırlanan ZnO nanopartiküllerinin membran deformasyonuna etkisi



Şekil 4.26. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde banyo sonikasyon metodu ile hazırlanan ZnO nanopartiküllerinin solunum aktivitesine etkisi



Şekil 4.27. Banyo sonikasyon dispersiyon metodu ile hazırlanmış orta sert SYS örneğine ait ZnO nanopartikülünün ışık mikrosbu altındaki görüntüsü

4.4. CuO Nanopartiküllerinin Algler Üzerindeki Etkileri

Tez çalışmasının Materyal ve Metot kısmında deneysel koşulları tanımlanan ve farklı SYS içeriğine sahip CuO NP örneklerine önce sırasıyla karıştırma, problu sonikasyon ve banyo sonikasyon dispersiyon yöntemleri uygulanmış, ardından alg kültürleri eklenmiş ve etki analizleri kapsamında inhibisyon, MDA üretimi, TTC indirgenmesi ve morfolojik gözlem çalışmaları tamamlanmıştır. Tüm bulgular Şekil 4.28–4.36'da sunulmuş ve ayrıntılı bir şekilde tartışılmıştır.

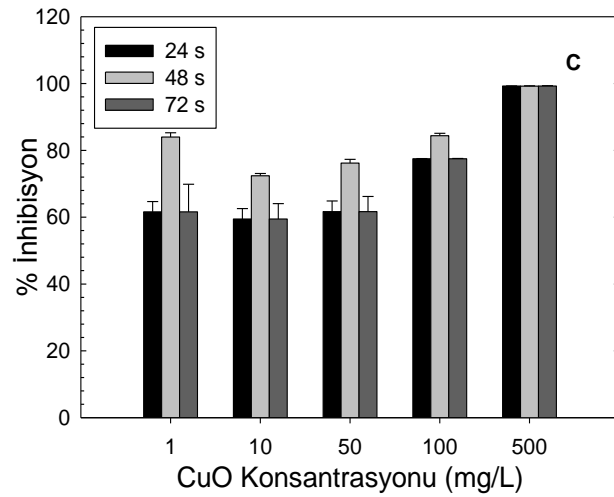
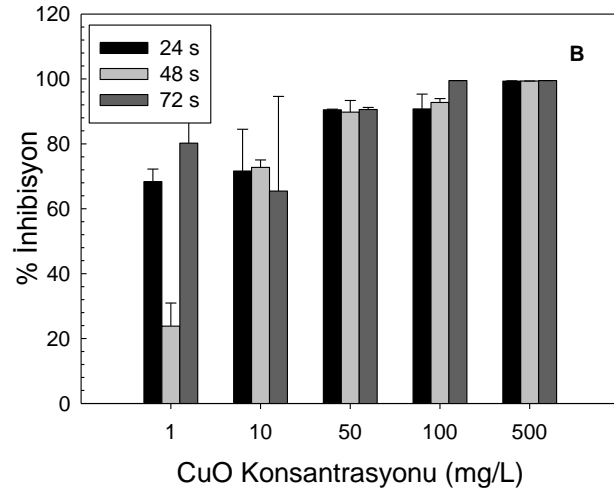
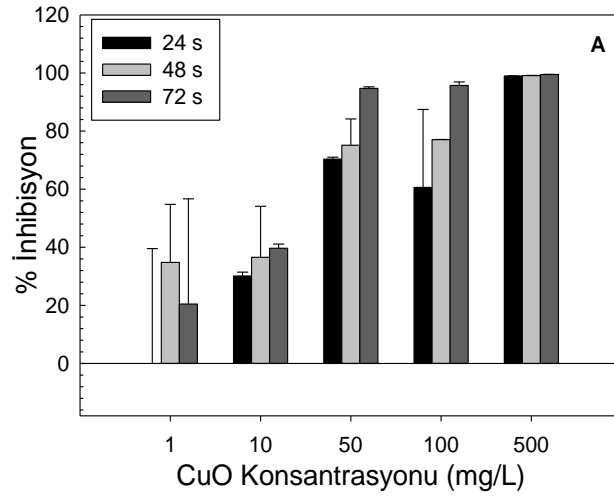
4.4.1. Karıştırma dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış CuO nanopartiküllerinin algler üzerindeki etkisi

Karıştırma dispersiyon yöntemi ile yumuşak, orta sert ve çok sert SYS içeriğine sahip deney setlerinde hazırlanmış farklı konsantrasyonlardaki CuO NP'lerinin alg inhibisyonu üzerindeki etkileri Şekil 4.28'de verilmiştir. En yüksek alg inhibisyon değeri orta sert SYS içeriğinde hazırlanmış 500mg/L NP konsantrasyonuna 72 saat maruz bırakılmış örneklerde %99,99 olarak hesaplanırken, en düşük alg inhibisyon değeri (%20) yumuşak SYS içeriğinde hazırlanmış 1mg/L NP konsantrasyonuna 72 saat maruz bırakılmış örneklerde bulunmuştur.

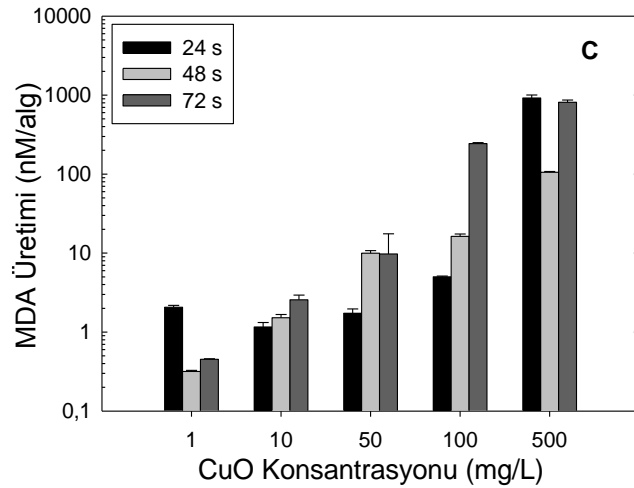
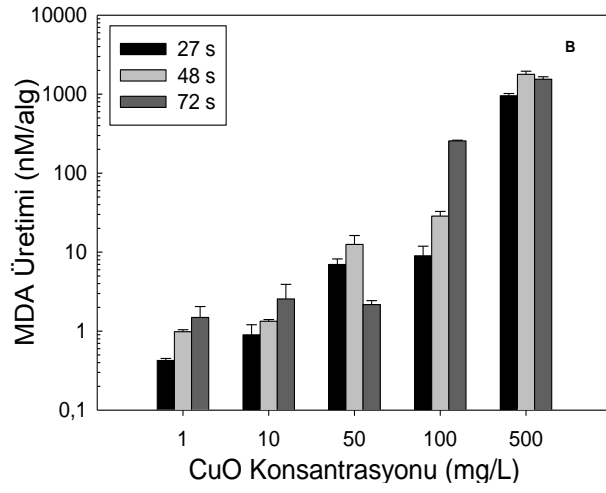
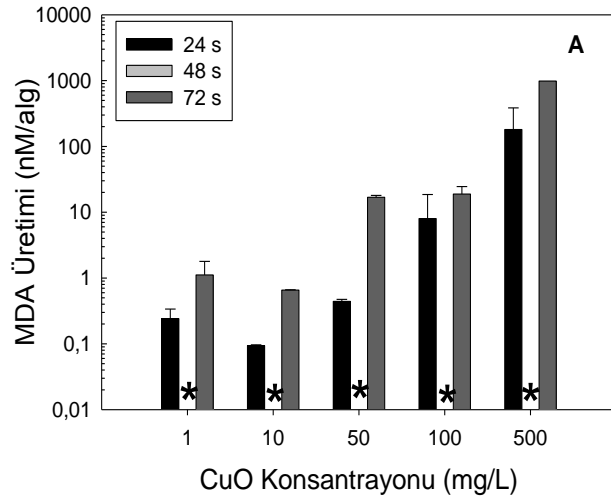
Şekil 4.29'daki karıştırma dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış CuONPlerinin MDA üretimine olan etkileri gösterilmektedir. Yumuşak SYS içeriğine sahip örnekler incelendiğinde, en yüksek MDA üretimi 72 saat maruziyet süresi sonunda, 500 mg/L NP konsantrasyonda 985 nM/alg olarak tespit edilirken, en düşük MDA üretimi 0,094 nM/alg olarak 24 saat maruziyet süresi sonunda 10 mg/L NP konsantrasyonun uygulandığı örneklerde hesaplanmıştır. SYS içeriğinden bağımsız olarak NP konsantrasyon artışına bağlı olarak MDA üretimlerinde artış olduğu gözlenmiştir.

CuO NPLerinin hüresel solunum aktivitesi üzerindeki etkileri Şekil 4.30'da sunulmuştur. İnhibisyon ve MDA üretim sonuçlarına benzer şekilde, CuO NP konsantrasyonundaki artışla doğru orantılı bir şekilde TTC indirgenme miktarında artış olduğu görülmüştür. En yüksek TTC indirgenme miktarı 147 ± 12 nM/alg olarak ölçülmüş olup, bu değer yumuşak SYS içeriğine sahip 500 mg/L NP konsantrasyonuna 24 saat maruz bırakılmış alg-NP deney düzeneğinden elde edilmiştir. En düşük TTC indirgenme değeri olan $0,09 \pm 0,03$ nM/alg ise orta sert SYS içeriğine sahip 1 mg/L NP konsantrasyonuna 24 saat maruz bırakılmış alg-NP örneklerinde tespit edilmiştir. CuO NP konsantrasyonu 50 mg/L ve daha yüksek konsantrasyonlarda 72 saat maruziyet süresi sonucu ortalama TTC indirgeme miktarları sırasıyla yumuşak, orta sert ve çok sert SYS örnekleri için sırasıyla 6,5, 2,9 ve 52,0 nM/alg olarak hesaplanmıştır.

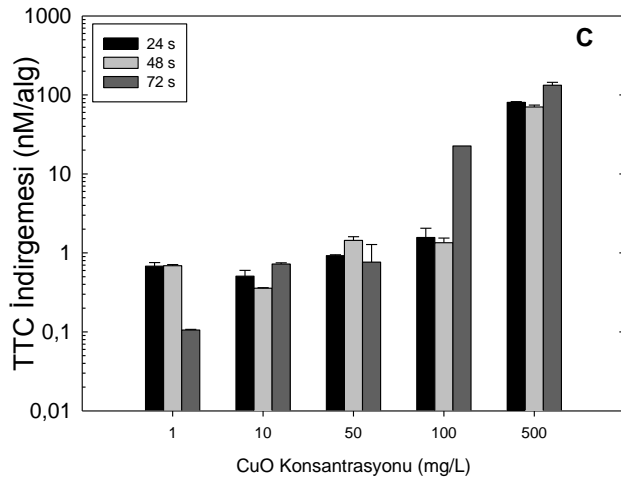
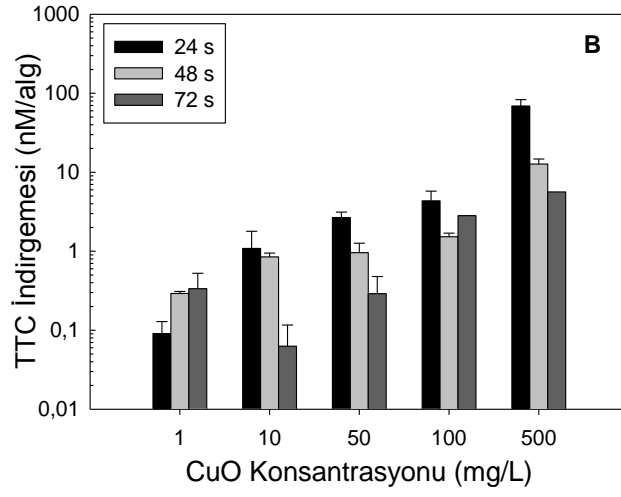
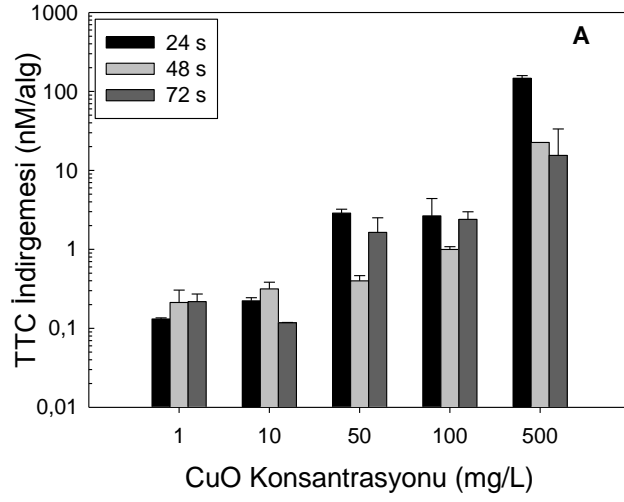
Şekil 4.31'de karıştırma dispersiyon metodu ile orta sert SYS içeriğinde hazırlanmış CuONPlerinin algler üzerindeki etkilerinin mikroskop görüntüsü verilmiştir. En yüksek NP konsantrasyonu olan 500 mg/L'de gerçekleştirilen görüntüleme alglerin tamamen parçalanmış olduğu görülmektedir. Alg inhibisyonu, MDA üretimi ve TTC indirgenmesi sonuçlarını destekler şekilde, membran deformasyonunu takiben alg yapı bütünlüğünün bozulduğu görülmektedir. Bununla beraber parçalanmış alglerin CuO NPLeriyle agregasyona uğradıkları, 50 µm'yi aşan boyutlara ulaştıkları görülmektedir.



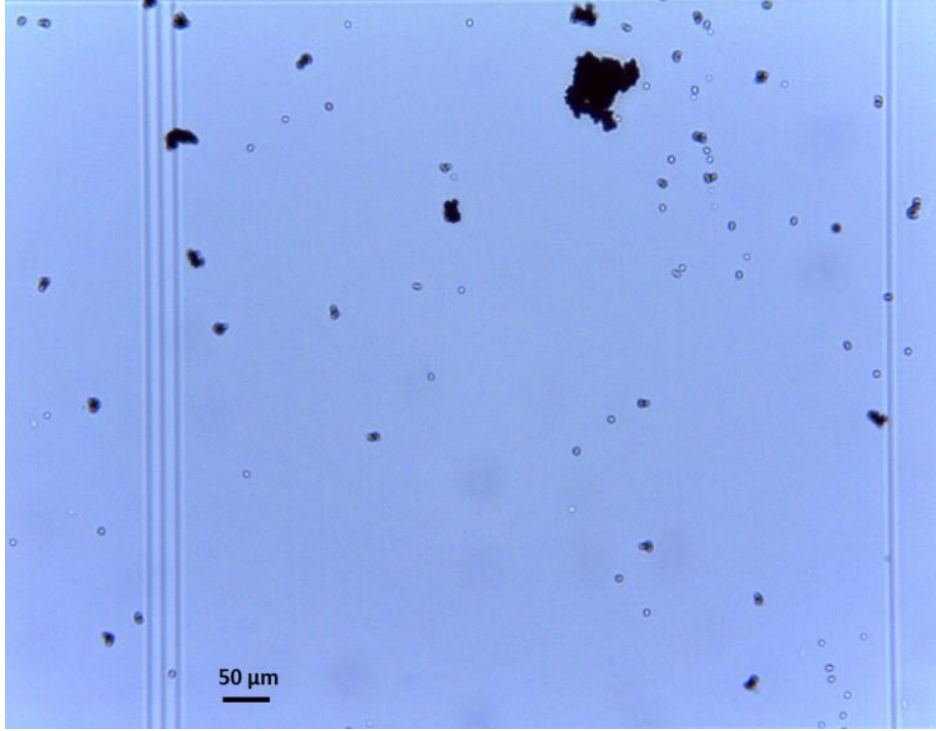
Şekil 4.28. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde karıştırma metodu ile hazırlanan CuO nanopartiküllerinin alg inhibisyonuna etkisi



Şekil 4.29. Sentetik yüzeyel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde karıştırma metodu ile hazırlanan CuO nanopartiküllerinin membran deformasyonuna etkisi



Şekil 4.30. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde karıştırma metodu ile hazırlanan CuO nanopartiküllerinininsolunum aktivitesine etkisi



Şekil 4.31. Karıştırma dispersiyon metodu ile hazırlanmış orta sert SYS örneğine ait CuO nanopartikülünün ışık mikrosbu altındaki görüntüsü

4.4.2. Probu sonikasyon dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış CuO nanopartiküllerinin algler üzerindeki etkisi

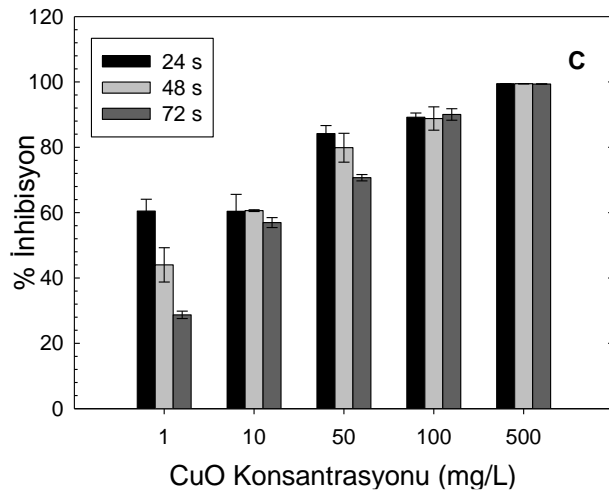
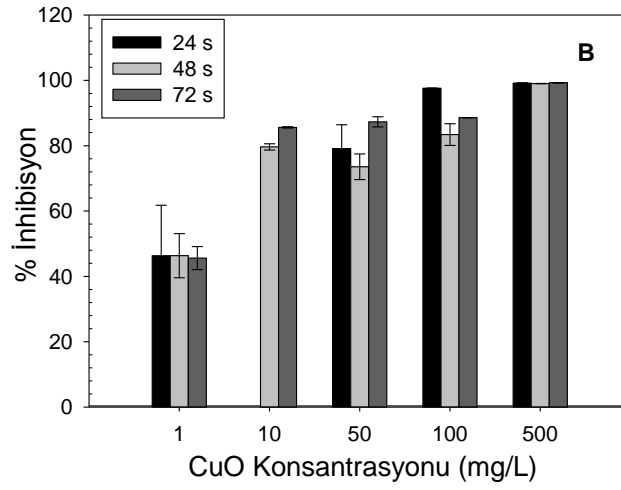
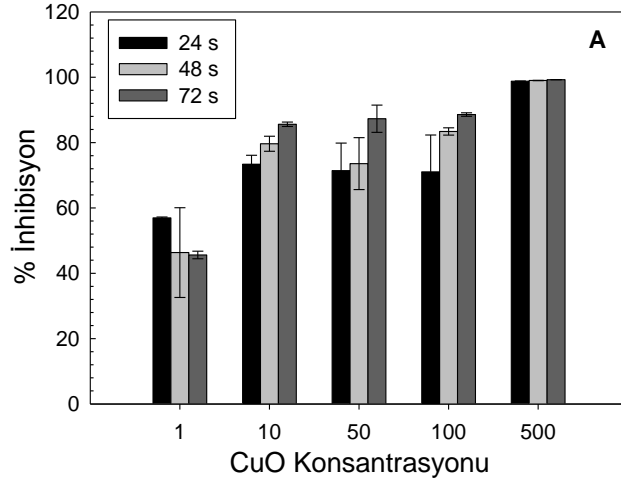
Probu sonikasyon yöntemiyle hazırlanmış CuO NPLerinin *P. subcapitata* alg türü üzerindeki inhibisyon sonuçları Şekil 4.32’de sunulmuştur. SYS içeriğinden bağımsız olarak 500 mg/L CuO NP konsantrasyonlarında en yüksek inhibisyon değerleri tüm SYS türü için 72 saat deney süresi sonunda yaklaşık %99,99 olarak tespit edilmiştir. Tüm inhibisyon sonuçları incelendiğinde özellikle orta sert SYS örneklerinde 500 mg/L NP konsantrasyonlarının bulunduğu 48 ve 72 saatlik deney setlerinde %99,99 alg inhibisyonu elde edilmiştir. En düşük alg inhibisyonu ise 72 saat sonunda 1 mg/L NP konsantrasyonun sağlandığı çok sert SYS içeriğinde %29 olarak tespit edilmiştir.

CuONPLerinin MDA üretimine etkisi Şekil 4.33’te görülmektedir. Tüm SYS örneklerinde su içeriğinden bağımsız bir şekilde, NP konsantrasyonunun artışına bağlı olarak MDA üretimlerinin arttığı tespit edilmiştir. En yüksek MDA üretimi 24 saat sonunda 500 mg/L CuO NP konsantrasyonun sağlandığı yumuşak SYS içeriğinde 832 nM/alg olarak tespit edilmiştir. En düşük MDA üretimi ise (0,072 nM/alg) orta sert SYS içeriğine sahip, 1 mg/L NP konsantrasyonuna 48 saat süre maruz bırakılmış örneklerde bulunmuştur.

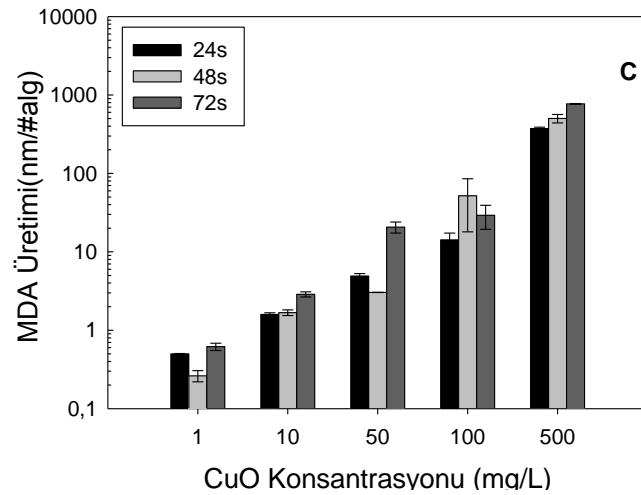
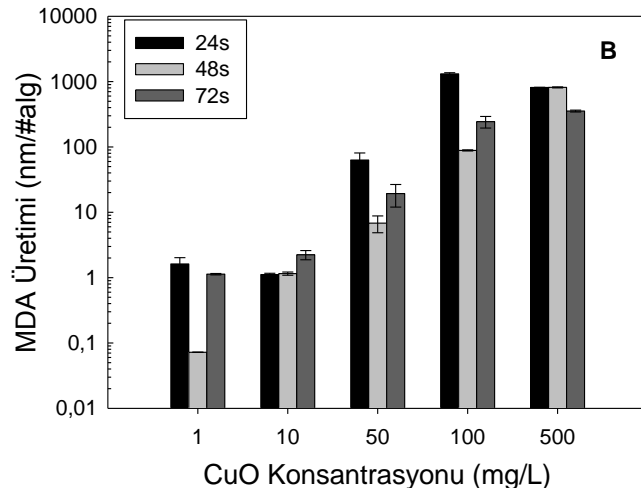
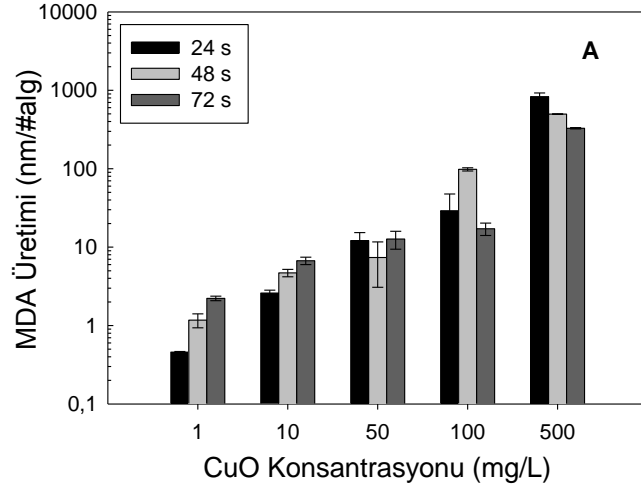
CuO NPLerinin *P. subcapitata* algleri üzerinde yol açtıkları hücresel solunum aktivitesine bağlı olarak elde edilen TTC indirgenmesi sonuçları Şekil 4.34’te sunulmuştur. Çok sert SYS içeriğinde hazırlanmış örneklerde NP konsantrasyon

artışına paralel olarak TTC indirgenmesinde artış görülürken, diğer SYS içeriklerinde özellikle düşük NP konsantrasyonlarının sağlandığı örneklerde belirgin bir artış tespit edilmemiştir. En yüksek TTC indirgenme miktarı $162 \pm 9,9$ nM/alg olarak ölçülmüş olup, bu değer çok sert SYS içeriğine sahip 500 mg/L CuONP konsantrasyonuna 24 saat maruz bırakılmış alg-NP deney düzeneğinden elde edilmiştir. En düşük değer ($0,03 \pm 0,01$ nM/alg) ise orta sert SYS içeriğine sahip 10mg/L CuONP konsantrasyonuna 48 saat maruz bırakılmış alg-NP örneklerinde tespit edilmiştir.

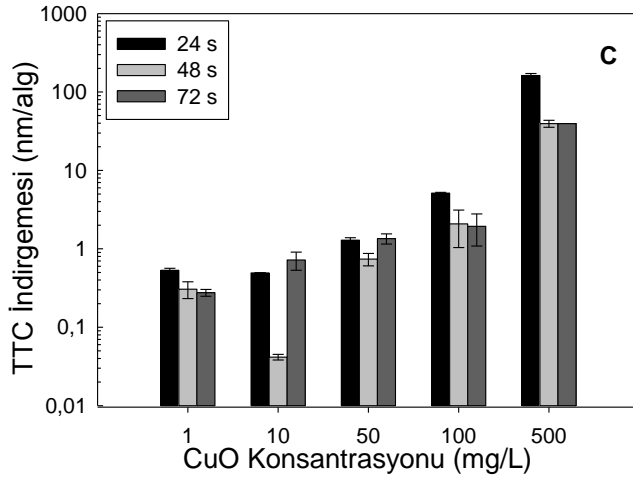
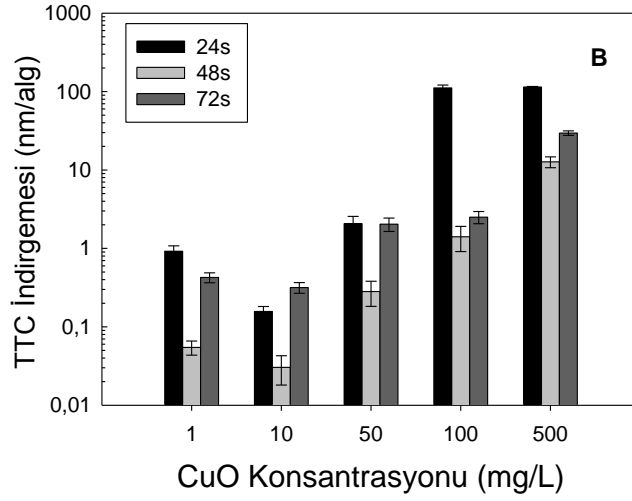
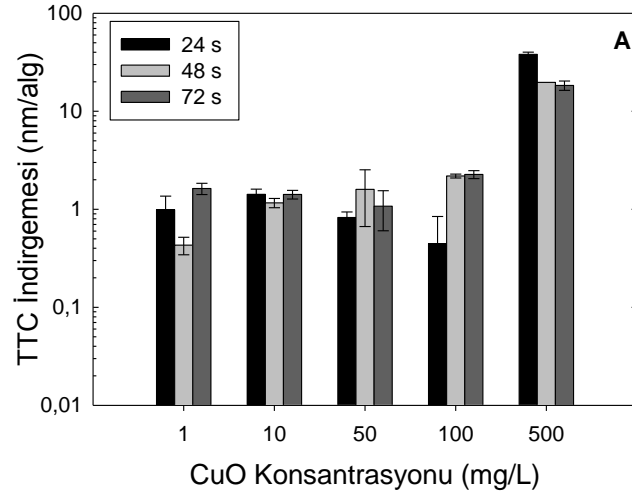
Şekil 4.35'te problu sonikasyon dispersiyon metodu ile orta sert SYS içeriğinde hazırlanmış CuONPlerinin *P. subcapitata* algleri ile beraber yer aldıkları mikroskop görüntüsü verilmiştir. En yüksek NP konsantrasyonu olan 500 mg/L'de gerçekleştirilen görüntüleme NPlerin kümelenerek alg hücrelerinin üzerinde yığın oluşturdukları ve sistem içerisinde sağlıklı alg hücrelerinin bulunmadığı gözlemlenmiştir. Bununla beraber kümelenen Alg-NPlerin boyutlarının $50 \mu\text{m}$ 'ye ulaştıkları görülmektedir.



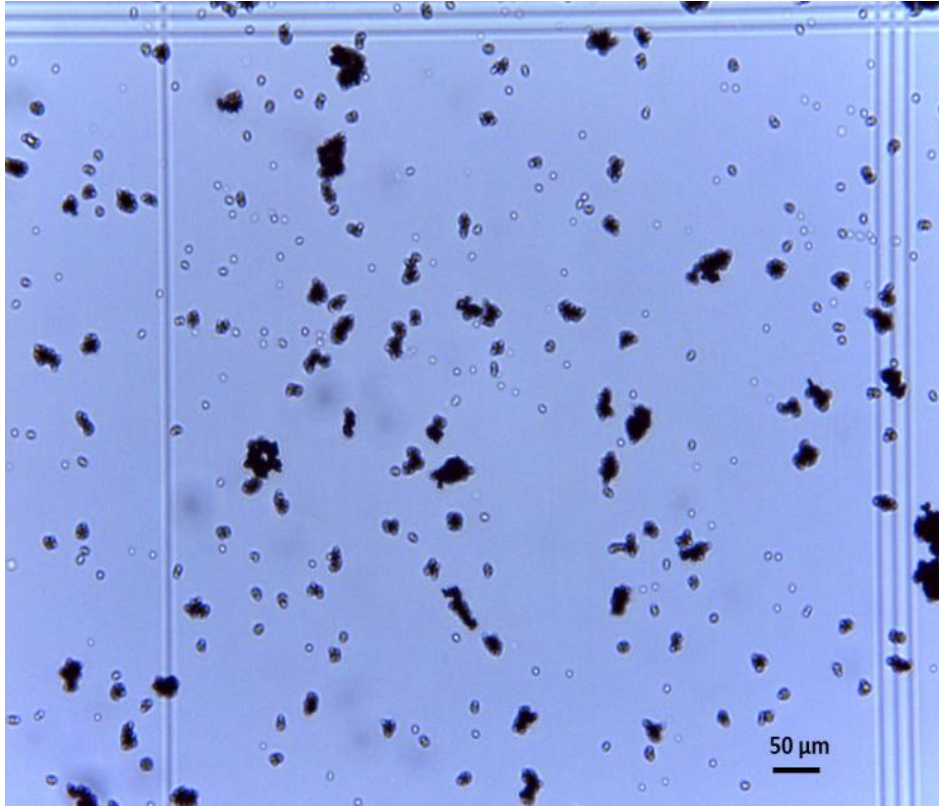
Şekil 4.32. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde problu sonikasyon metodu ile hazırlanan CuO nanopartiküllerinin alg inhibisyonuna etkisi



Şekil 4.33. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde problu sonikasyon metodu ile hazırlanan CuO nanopartiküllerinin membran deformasyonuna etkisi



Şekil 4.34. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde problu sonikasyon metodu ile hazırlanan CuO nanopartiküllerinin solunum aktivitesine etkisi



Şekil 4.35.Problu sonikasyon dispersiyon metodu ile hazırlanmış orta sert SYS örneğine ait CuO nanopartikülünün ışık mikrosbu altındaki görüntüsü

4.4.3. Banyo sonikasyon dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış CuO nanopartiküllerinin algler üzerindeki etkisi

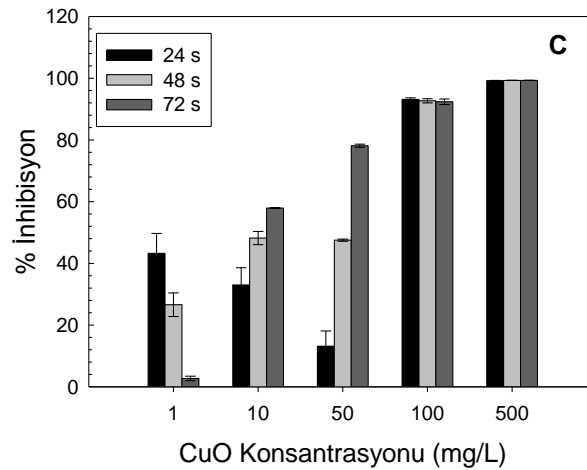
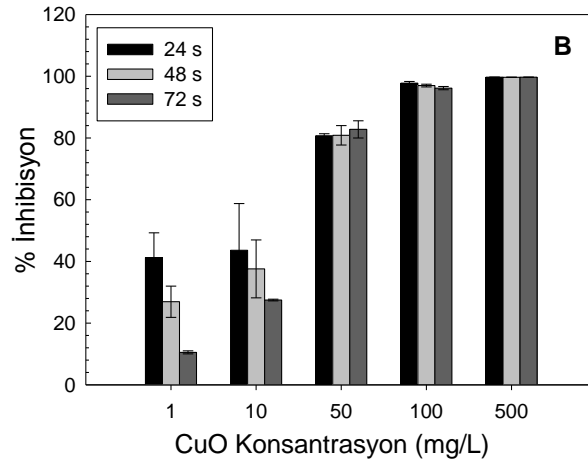
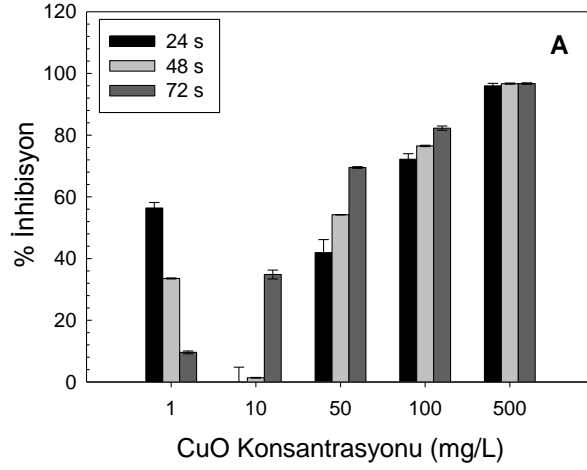
Banyo sonikasyon dispersiyon yöntemi ile hazırlanmış CuO NPLerinin *P. subcapitata* algleri üzerindeki inhibisyon sonuçları Şekil 4.36'da sunulmuştur. SYS içeriğinden bağımsız olarak NP konsantrasyonundaki artışın alg inhibisyonu ile doğru orantılı olduğu görülmüştür. Bununla beraber yüksek NP konsantrasyonlarının sağlandığı örneklerde en yüksek inhibisyon değerleri 72 saat deney süresi sonunda % 99,99 olarak tespit edilmiştir. En düşük inhibisyon değeri ise 1 mg/L CuO NP konsantrasyonunda, orta sert SYS örneğinde %11 olarak hesaplanmıştır. Tüm inhibisyon sonuçları beraber ele alındığında orta sert ve çok sert SYS içeriğinin alg inhibisyonu üzerinde daha etkili olduğu görülmüştür.

CuONPLerinin MDA üretimine etkisi Şekil 4.37'de görülmektedir. Tüm SYS örneklerinde NP konsantrasyonunun artışına bağlı olarak MDA üretimlerinin arttığı tespit edilmiştir. En yüksek MDA üretimi (1054 ± 16 nM/alg) orta sert SYS içeriğine sahip, 500 mg/L NP konsantrasyonuna 24 saat süre maruz bırakılmış alg-NP deney düzeneğinden elde edilmiştir. En düşük MDA üretimi ise ($0,014 \pm 0,01$ nM/alg) yumuşak SYS içeriğine sahip, 1 mg/L NP konsantrasyonuna 48 saat süre maruz bırakılmış örneklerde bulunmuştur. En fazla MDA üretiminin gerçekleştiği orta sert SYS-NP

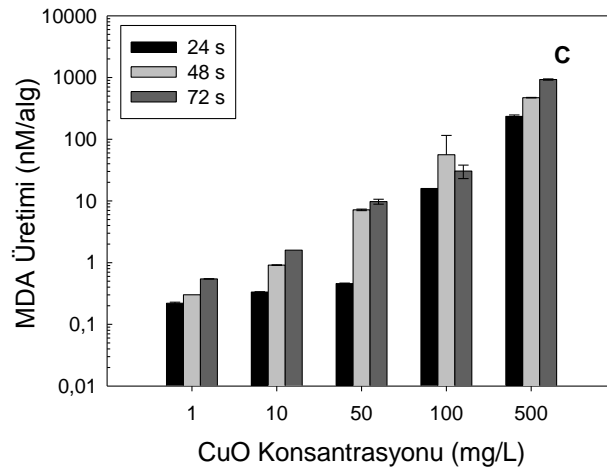
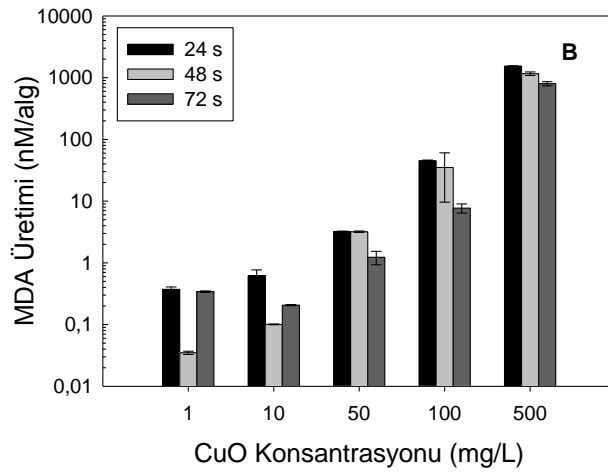
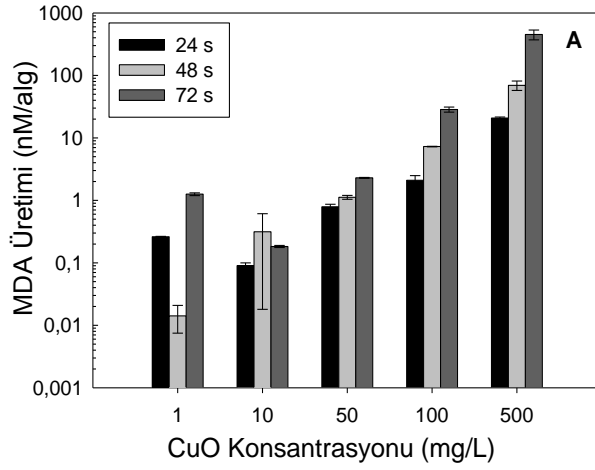
örnekleri incelendiğinde, konsantrasyonun 1 mg/L'den 500 mg/L'ye artması durumunda 24 saatlik maruziyet sonunda MDA üretiminin yaklaşık 2500×kat arttığı görülmüştür. Söz konusu sonucun inhibisyon sonuçları ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

CuO NPlerinin hücre sel solunum aktivitesi üzerindeki etkileri Şekil 4.38'de sunulmuştur. NP konsantrasyonundaki artışla doğru orantılı bir şekilde TTC indirgenme miktarında artış olduğu görülmüştür. En yüksek TTC indirgenme miktarı $117 \pm 5,9$ nM/alg olarak ölçülmüş olup, bu değer çok sert SYS içeriğine sahip 500 mg/L NP konsantrasyonuna 48 saat maruz bırakılmış alg-NP deney setlerinden elde edilmiştir. En düşük değer ($0,047 \pm 0,04$ nM/alg) ise çok sert SYS içeriğine sahip 1 mg/L TiO_2 NP konsantrasyonuna 72 saat maruz bırakılmış alg-NP örneklerinde tespit edilmiştir. NP konsantrasyonu 50 mg/L ve daha yüksek konsantrasyonlarda 72 saat maruziyet süresi sonucu ortalama TTC indirgeme miktarları sırasıyla yumuşak, orta sert ve çok sert SYS örnekleri için sırasıyla 4,3, 9,0 ve 12,4 nM/alg olarak hesaplanmıştır.

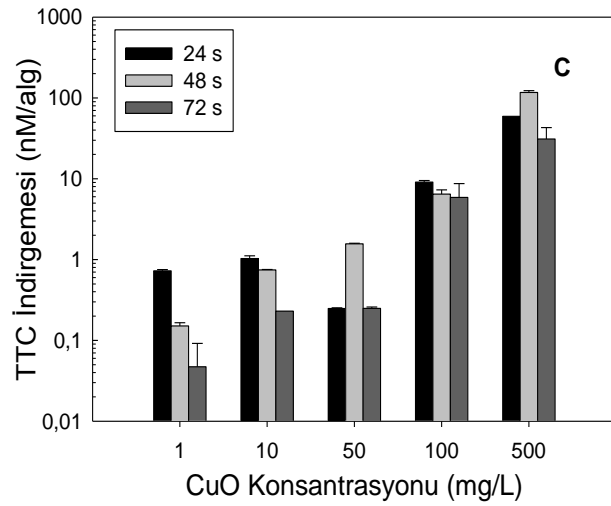
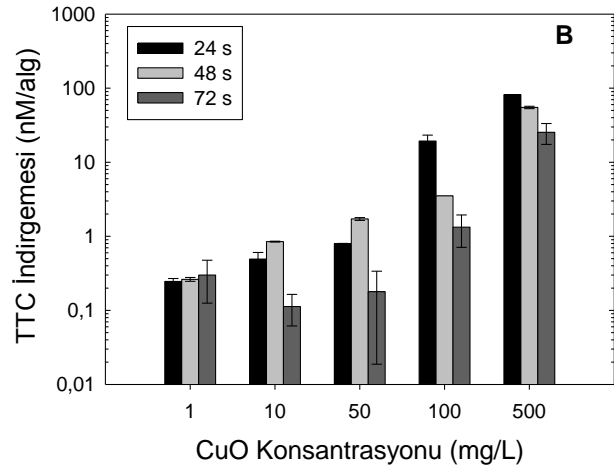
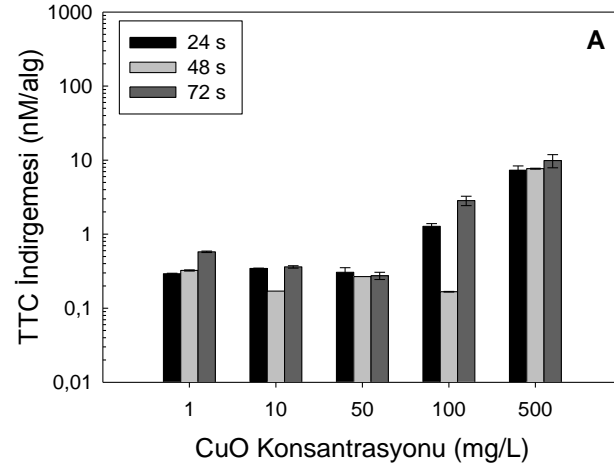
Şekil 4.39'da banyo sonikasyon dispersiyon metodu ile hazırlanmış orta sert SYS örneğine ait CuO NP-alg mikroskop görüntüsü verilmiştir. En yüksek NP konsantrasyonu olan 500 mg/L'de gerçekleştirilen görüntülemelerde NPlerin kümelenerek alg hücrelerinin üzerinde yığın oluşturdukları görülmüştür. Meydana gelen kümelerin boyutlarının diğer dispersiyon yöntemleriyle hazırlanan örneklere kıyasla daha büyük olduğu, yaklaşık 150 µm boyutlara ulaşan alg-NP kümeleri olduğu tespit edilmiştir.



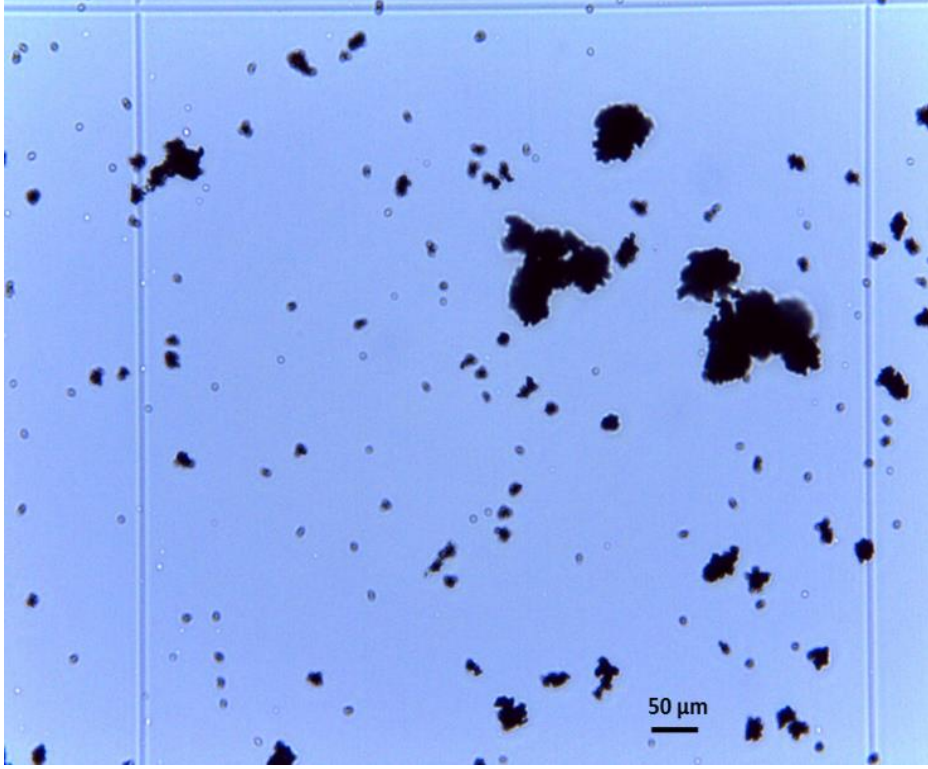
Şekil 4.36. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde banyo sonikasyon metodu ile hazırlanan CuO nanopartiküllerinin alg inhibisyonuna etkisi



Şekil 4.37. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde banyo sonikasyon metodu ile hazırlanan CuO nanopartiküllerinin membran deformasyonuna etkisi



Şekil 4.38. Sentetik yüzeysel su örnekleri (A: Yumuşak, B: Orta sert, C: Çok sert) içinde banyo sonikasyon metodu ile hazırlanan CuO nanopartiküllerinin solunum aktivitesine etkisi



Şekil 4.39. Banyo sonikasyon dispersiyon metodu ile hazırlanmış orta sert SYS örneğine ait CuO nanopartikülünün ışık mikrosbu altındaki görüntüsü

5. TARTIŞMA

5.1. Nanopartikül Çözeltilerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

NPlerin özellikle sucul sistemlerde yaşayan organizmalar üzerindeki ekotoksik etkilerinin araştırıldığı çalışmalar (Aruoja vd 2009, Handy vd 2012, Hartmann vd 2010, Klaine vd 2012, Metzler vd 2011) incelendiğinde, NP çözelti hazırlama ve karakterizasyonu ile ilgili standart bir yöntemin bulunmadığı görülmektedir. Deneysel sistemlerde farklı çevresel koşulların uygulanmasına bağlı olarak NP boyut ve boyut dağılımlarının değiştiği, özellikle deney öncesi uygulanan farklı dispersiyon yöntemlerinin söz konusu NP boyut değişimine etkisinin büyük olduğu tespit edilmiş (Cohen vd 2013, Nel vd 2006, Taurozzi vd 2013), ancak geniş çaplı bir çalışmanın yürütülmediği görülmüştür. Bununla beraber literatürde ele alınan yayınlarda karıştırma (Handy 2012), sürekli veya kesikli ultrasonik sonikasyon (Metzler vd 2012), sürekli veya kesikli banyo sonikasyon (Handy 2012) gibi farklı dispersiyon metodlarının kullanılması nedeniyle çalışmalar arasındakarşılaştırma yapılamamaktadır. Mevzuat ve yönetmelikler açısından değerlendirildiğinde ise NP solüsyonlarının hazırlık aşamasında herhangi bir standart metodun bulunmadığı görülmekte ve AB tarafından yayınlanan teknik raporlarda (EU 2004, EU 2005, SCENIHR 2009) konu ile ilgili çalışmaların geliştirilmesi önerilmektedir. Ayrıca NPlerin davranış ve akibetlerinin belirlenmesi amacıyla çalışmaların özellikle gerçek çevresel koşullarda gerçekleştirilmesi gerektiği vurgulanmaktadır (Hotze vd 2010, SCENIHR 2009)

Tez çalışması kapsamında yukarıda verilen bilgi boşluğunun doldurulması amacıyla farklı su içeriğine sahip SYS örnekleri içinde farklı dispersiyon yöntemleri ile hazırlanmış TiO_2 , ZnO ve CuO NPlerinin boyut ve yüzey yükü özellikleri ile davranışları incelenmiştir. Söz konusu NPler ticari olarak temin edilmiş olup, üretici firmanın kutu üzerinde verdiği bilgiler göz önünde bulundurularak, NPlerin birbirine yakın boyut dağılımına ve spesifik yüzey alanına sahip olmalarına dikkat edilmiştir. Bununla beraber çalışmalarda kullanılmak üzere seçilen NPlerin genel olarak tüketici ürünlerinde sıkça kullanılan, fotokatalitik ve yarı-iletken özellikler taşımasına önem verilmiştir. NPlerin karakterizasyon çalışmaları kapsamında boyut ve boyut dağılımı DLS yöntemi uygulanarak, yüzey yükü ise zeta potansiyel ölçümleri ile belirlenmiştir.

Farklı çevresel koşulların (pH, iletkenlik, iyonik güç) sağlanması amacıyla üç farklı SYS içeriği (yumuşak, orta sert ve çok sert su, düşük – yüksek alkalinite, pH 7,4 – 8,4, düşük – yüksek iletkenlik) hazırlanmıştır. NPlere üç farklı dispersiyon yöntemi (karıştırma, problu sonikasyon ve banyo sonikasyon) uygulanarak söz konusu farklı SYS içeriğine sahip su örnekleri ile çözelti haline getirilmiş ve NP karakterizasyon çalışmaları tamamlanmıştır.

Boyut analizi sonunda elde edilen bulgular incelendiğinde NPlerin SYS içeriğine ve farklı ortam koşullarına bağlı olarakla agregasyona uğradıkları tespit edilmiştir. Elde edilen boyut analizleri ile üretici firmanın verdiği partikül boyutları karşılaştırıldığında farklı SYS içeriğinde TiO_2 NP boyutunun 3–32×kat arttığı, ZnO NP boyutunun 2–19×kat arttığı ve CuO NP boyutunun ise 3–78×kat arttığı tespit edilmiştir. NP-SYS örnekleri içinde en büyük partikül boyutu $<3,5 \mu m$ olarak görülürken, Alg-NP-SYS örnekleri içinde alg-NP kümelenmeleri nedeniyle söz konusu boyutun $150 \mu m$ 'ye

kadar ulaştığı görülmüştür. Bununla beraber deney düzeneklerinde bulunan nanoboyutta partikül sayısının minimum sayıya ulaştığı DLS analizi ile tespit edilmiştir. Partiküllerde meydana gelen nanoboyuttan mikroboyuta geçiş durumu, sistem içerisinde oluşturulan ekstrem koşulların (yüksek iyonik güç, yüksek iletkenlik, yüksek NP konsantrasyonu gibi) sonucunda ortaya çıktığı düşünülmektedir. Benzer sonuçlar (Adams vd 2006a, Adams vd 2006b), (Nel vd 2006), Klaine vd (2008), Hotze vd (2010), Lee ve Song (2012) ve Clément vd (2013)'nin yaptıkları çalışmalarda da görülmektedir.

Zeta potansiyel ölçümü sonunda elde edilen bulgular incelendiğinde yumuşak (pH 7,2-7,4 aralığında), orta sert (pH 7,4-7,8 aralığında) ve çok sert SYS (pH 8,0-8,4 aralığında) içeriğinde hazırlanmış TiO₂ NP örneklerinde zeta potansiyel değerlerinin +15,4 ile -18,4 mV arasında, ZnO NP örneklerinde -2,3 ile -15,5 mV arasında, CuO NP örneklerinde ise -9,9 ile -19,2 mV arasında değiştiği tespit edilmiştir. Literatürde benzer şekilde TiO₂ (anataz) NPLerinin zeta potansiyeli -21,6 mV olarak ölçülmüştür (Ji vd 2011). Lee ve An (2013), alg toksisitesi çalışması kapsamında 10 mg/L NP konsantrasyonda hazırlanan ZnO ve TiO₂ (P25, Evoik Degussa) NPLerinin zeta potansiyeli ölçüm sonuçlarını sırasıyla -23,27 ve -13,28 mV olarak bulmuşlardır. Literatürde ayrıca düşük pH değerlerinde partiküllerin pozitif yüklendiği, yüksek pH değerlerinde ise negatif yüklendiği belirtilmektedir (Jiang vd 2009). Literatürle uyumlu olarak tez çalışmasında kullanılan NPLerin genelde negatif yüklü stabil olmayan davranış sergilediği tespit edilmiştir. Söz konusu stabil olmayan davranış nedeniyle NP-NP agregasyonu artarken, negatif yüklü olarak sucül ortamda hareket etmeleri nedeniyle alg membran yapısını kapladığı ve alg-NP kümelenmelerine neden olduğu sonucuna varılmıştır.

5.2. Nanopartiküllerin Organizma İnhibisyonuna Etkileri

Metal oksit NPLerin organizma üzerindeki inhibisyon etkilerini gösteren bulgular incelendiğinde, düşük UV içeriğine sahip görünür ışık (Floresan lamba, ışık akısı: 6000 lm, ışık rengi: 4300 K) kullanılmış olmasına rağmen ışıklı ortamda %100'e ulaşan organizma inhibisyonu tespit edilmiştir. Literatürde yer alan bazı çalışmalarda (Brunner vd 2006, Griffitt vd 2008, Hund-Rinke ve Simon 2006, Karlsson vd 2009, Klaine vd 2012) benzer sonuçlar elde edilmiş, ancak söz konusu çalışmalarda ulaşılan yüksek inhibisyon sonuçlarının genellikle yüksek UV içerikli ışık kaynakları kullanılması nedeniyle ortaya çıktığı görülmüştür.

Farklı NP konsantrasyonlarının kullanıldığı tez çalışmasında, NP konsantrasyonunun artışına bağlı olarak *P. subcapitata* alglerinde meydana gelen inhibisyonun arttığı, özellikle yüksek NP konsantrasyonlarına (500 mg/L) maruz kaldıklarında, mikroskop görüntülerinde de verildiği üzere organizmaların tamamen parçalandığı ortaya çıkmıştır. Söz konusu durum metal oksit NPLerin fotokatalitik etkilerinin görünür ışık altında dahi etkili olması sonucunda oluşan ROSlerin membran deformasyonuna yol açtığı ve alg yapı bütünlüğünü bozduğu sonucunu desteklemektedir.

Alg inhibisyonu analizleri sonunda elde edilen bulgulara TRAP analizi uygulandığında EC_{50} değerleri hesaplanmış ve NP etki sıralaması Çizelge 5.1'de verildiği şekilde ortaya çıkmıştır. Literatürde verilen bazı çalışmalardan (Adams vd 2006a, Adams vd 2006b, Aruoja vd 2009, Heinlaan vd 2008) farklı olarak, yumuşak SYS içeriğine sahip sucul ortamlarda TiO_2 Nplerinin (3,17 mg/L), orta sert SYS örneklerinde ZnO Nplerinin (14,93 mg/L) ve çok sert SYS örneklerinde ise CuO Nplerinin (9,08 mg/L) algler üzerinde en etkili Npler olduğu görülmüştür. Farklı su içeriklerinde, farklı dispersiyon yöntemleri ile hazırlanan NP çözeltilerinin *P. subcapitata* alg türünde yol açtığı inhibisyonun belirlenmesi açısından değerlendirildiğinde, tez kapsamında elde edilen bulgular literatüre önemli bir katkı sunmaktadır.

Çizelge 5.1. Metal oksit nanopartiküllerin organizma inhibisyonu üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması (EC_{50})

Dispersiyon Yöntemi	EC_{50} (mg/L)		
	Yumuşak SYS	Orta Sert SYS	Çok Sert SYS
Karıştırma	ZnO- 6,88	ZnO- 18,42	CuO- 12,77
Probu Sonikasyon	TiO_2 - 3,17	TiO_2 - 17,91	TiO_2 - 37,41
Banyo Sonikasyon	TiO_2 - 20,75	ZnO- 14,93	CuO- 9,08

TiO_2 Nplerinin algler üzerinde ekotoksik etkilere neden olduğu sınırlı sayıda çalışma ile literatürde verilmektedir (Lee ve An 2013, Wiench vd 2009). Lee ve An (2013), görünür, UVA ve UVB ışıklandırması altında TiO_2 ve ZnO Nplerinin *P. subcapitata* yeşil alg türü üzerindeki toksik etkilerini belirlemek amacıyla NP solüsyonlarına 10 dakika 40 kHz'lik bir frekansla banyo sonikasyon uygulaması gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonunda görünür, UVA ve UVB aydınlatma durumunda ZnO Nplerinin EC_{50} değerleri 0,05 mg/L'den küçük bulunurken, TiO_2 Nplerinin sırasıyla 2,53, 3,00 ve 2,95 mg/L olarak verilmiştir.

Tez çalışmasında en yüksek NP konsantrasyonun (500 mg/L) sağlandığı farklı SYS örneklerinde TiO_2 Nplerinin neden olduğu alg inhibisyon değerleri %88 ile 99,99 arasında değişirken, ZnO Nplerinden kaynaklanan inhibisyonun %91 ile 99,99 arasında olduğu tespit edilmiştir. Farklı NP konsantrasyonlarının kullanıldığı bir başka çalışmada daha düşük inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Ji vd. (2011) çalışmalarında 1000 mg/L konsantrasyondaki oksit Npleri (Al_2O_3 , SiO_2 , ZnO ve TiO_2 (rutil ve anataz)) 20 dakika boyunca banyo sonikasyon işlemi uygulayıp farklı bir yeşil alg türü olan *Chlorella sp.* üzerindeki toksik etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda Al_2O_3 , SiO_2 ve TiO_2 rutil-Nplerinin inhibisyon ve/veya algal büyüme oranını etkilemediğini tespit etmişlerdir. Bunun yanı sıra TiO_2 anataz-Nplerin %70,5, nano-ZnO Nplerin ise %59 inhibisyona yol açtığı hesaplanmıştır.

5.3. Nanopartiküllerin Organizma Membran Deformasyonuna Etkileri

Tez çalışması kapsamında farklı su içeriğine sahip SYS örnekleri içinde farklı dispersiyon yöntemleri ile hazırlanmış NPLerin *P. subcapitata* alg membran deformasyonu üzerindeki etkileri lipid peroksidasyon sonucunda meydana gelen MDA üretimi ile belirlenmiştir. Hücre membran yapısı önemli ölçüde lipid tabakasından meydana gelmekte ve bu tabaka hücrenin yapısını oluşturmada ana rolü üstlenirken aynı zamanda hücrel sinyalizasyon işlevini de görmektedir. Ancak söz konusu membran yapı özellikle fotokatalitik yapıdaki metal oksit NPLerin ürettiği ROS ile hidroksil radikallerin birincil hedefidir (Cooper 2000, Maness vd 1999, Yin vd 2011). Otoksidasyon olarak da bilinen lipid peroksidasyon reaksiyonu: (i) proksil ve alkoksil radikalleri ile hidrojen azaltımı, (ii) karbon radikallerine oksijen ilavesi, (iii) proksil radikal fragmentasyonu veya yeniden düzenlenmesi, (iv) karbona peroksil radikali eklenmesi ve (v) peroksilin sonlandırılması aşamalarından oluşmaktadır (Yin vd 2011). Bu reaksiyonların tamamlanması sonucunda membran yapısında başlayan bozulmalar hücrel ölümün gerçekleşmesi ile sona ermektedir (Cooper 2000, Yin vd 2011). Dolayısıyla yüksek miktarda tespit edilen MDA miktarı, membran deformasyonunun gerçekleştiğini işaret etmektedir.

Tez çalışması kapsamında metal oksit NPLerin organizma membran deformasyonu üzerindeki etkilerini gösteren bulgular incelenmiş ve NPLerin etki sıralaması Çizelge 5.2’de verildiği şekilde ortaya çıkmıştır. Lipid peroksidasyon sonucu üretilen MDA miktarları karşılaştırıldığında, CuO NPLerinin diğer NPLere göre, buldukları deney ortamlarında daha yüksek membran deformasyonuna yol açtığı görülmektedir. Metzler vd. (2012)’nin yürüttüğü çalışmada Al₂O₃, TiO₂ ve SiO₂ NPLeri kullanılmış ve *P. subcapitata* alg türünün lipid peroksidasyon sonucunda ürettikleri MDA miktarına göre NPLerin etki sıralaması Al₂O₃>TiO₂>CeO₂ olarak açıklanmıştır. CuO NPLerinin *P. subcapitata* alg türünde membran deformasyonuna yol açtığı bulgusunu desteklemek amacıyla literatür araştırması yapıldığında, farklı su içeriğine sahip ortam koşullarında yürütülmüş bir çalışmaya ve/veya sonuca ulaşılammıştır. Bu açıdan değerlendirildiğinde, elde edilen sonuç literatüre önemli bir katkı sunmaktadır.

Çizelge 5.2. Metal oksit nanopartiküllerin organizma membran deformasyonu üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması

Dispersiyon Yöntemi	Etki Sıralaması		
	Yumuşak SYS	Orta Sert SYS	Çok Sert SYS
Karıştırma	CuO>TiO ₂ >ZnO	CuO>TiO ₂ >ZnO	CuO> ZnO>TiO ₂
Probu Sonikasyon	CuO>TiO ₂ >ZnO	ZnO>CuO>TiO ₂	CuO>TiO ₂ >ZnO
Banyo Sonikasyon	CuO>ZnO>TiO ₂	CuO>TiO ₂ >ZnO	CuO>TiO ₂ >ZnO

5.4. Nanopartiküllerin Organizma Solunum Aktivitesine Etkileri

Tez çalışması kapsamında farklı su içeriğine sahip SYS örnekleri içinde farklı dispersiyon yöntemleri ile hazırlanmış NPLerin *P. subcapitata* alg solunum aktivitesinde meydana gelen değişim belirlenmiştir. Hücre membran yapısında, hücresel solunumun gerçekleşmesini sağlayan solunum zincirlerinin önemli parçaları bulunmakta ve bu yapıların zarar görmesi durumunda hücresel fonksiyonlar yavaşlamakta veya tamamen tahrip olmaktadır. Hücresel solunum TTC'nin TTF'e indirgenmesi esasına dayanan metoda göre ölçülmüş ve succinate elektron sağlayıcı olarak kullanılmıştır. TTC, stabil ve suda çözünebilen bir heterosiklik organik tuz olup, kırmızı renkli suda çözünmeyen bir ürün olan TTF'e oldukça kolay bir şekilde indirgenebilmektedir. Söz konusu TTF kolorimetrik olarak görünür ışık absorpsiyonu ile ölçülmekte ve yüksek miktarda gerçekleşen indirgenme reaksiyonu ile solunum aktivitesi belirlenebilmektedir.

Doğal şartlarda, klorofile sahip *P. subcapitata* yeşil alg türü, gündüz fotosentez, gece solunum yapmaktadır. Bu durumda alglerin, tez kapsamında oluşturulan deney düzeneklerinde, 24, 48 ve 72 saat süreyle sürekli görünür ışık altında solunum gerçekleştiremeyeceği, fotosentez yapacağı düşünülmektedir. Ancak fotokatalitik NPLere maruz kalan alglerin, membran yapısının bozulması sonucunda küçük parçalara ayrılmakta ve klorofillerini kaybetmektedirler (Metzler vd. 2011, Metzler vd. 2012). Fotosentez yapma yeteneğini kaybeden alglerin, membran yapıdaki lipid peroksidasyona bağlı olarak hücresel faaliyetleri inhibe olmakta ve solunum reaksiyonuna benzer şekilde TTC indirgenmesi gerçekleştirmektedirler. Bu durumda stres altında olan veya faaliyetleri inhibe olmuş alg-NP örneklerinde TTC indirgenmesi yüksek olmaktadır.

Tez kapsamında metal oksit NPLerin organizma solunum aktivitesi üzerindeki etkilerini gösteren bulgular incelenmiş ve NPLerin etki sıralaması Çizelge 5.3'te verildiği şekilde ortaya çıkmıştır. Alg inhibisyon analiz sonuçlarını destekler şekilde, TiO₂ NPLerinin ortam koşullarından bağımsız olarak solunum aktivitesi üzerinde en etkili NP türü olduğu görülmektedir. Farklı su içeriklerinde hazırlanan NP çözeltilerinin *P. subcapitata* alg türünün solunum aktivitesine etkisi açısından değerlendirildiğinde, tez kapsamında elde edilen bulgular literatüre katkıda bulunmaktadır.

Çizelge 5.3. Metal oksit nanopartiküllerin organizma solunum aktivitesi üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması

Dispersiyon Yöntemi	Etki Sıralaması		
	Yumuşak	Orta Sert	Çok Sert
Karıştırma	TiO ₂ >ZnO>CuO	TiO ₂ >ZnO>CuO	CuO> TiO ₂ >ZnO
Probu Sonikasyon	TiO ₂ >CuO>ZnO	TiO ₂ >CuO>ZnO	TiO ₂ >CuO>ZnO
Banyo Sonikasyon	TiO ₂ >ZnO>CuO	TiO ₂ >CuO>ZnO	TiO ₂ >ZnO>CuO

Yukarıda verilen bulgu ve tartışmalar göz önünde bulundurulduğunda metal oksit NPLerin algler üzerindeki toksisite etki mekanizmasının açıklanması kapsamında iki mekanizma önerilmektedir:

İlk mekanizma, NPLerin, ışıklı ortamda ROS oluşturması ve membran yapısını deforme etmesi ile başlayan inhibisyon sürecidir. Bilindiği üzere fotokatalitik özellik taşıyan metal oksit NPLer ROS üretimine neden olmakta ve organik yapıyı kolaylıkla parçalamaktadırlar. Ortamda bulunan NPLerin az miktarda olması dahi NPLerin hücre ile birleşip oldukça büyük miktarda ROS üretimi sağlayabilmektedir (Toduka vd 2012). Bununla beraber NPLer asidik ortam şartlarına maruz kaldıklarında lizozom (Nohl ve Gille 2005) yada mitokondri gibi organellerle etkileşim içerisinde bulunarak direkt olarak ROS üretimine sebep olabilmektedir (Zhang ve Gutterman 2007). Ortamda bulunan NP tetikleme ile oksidatif stresin hücreler için zararlı olduğu yaygın mekanizma olarak önerilmektedir (Pulskamp vd 2007). Ancak ROS üretiminde süreci olumlu/olumsuz etkileyen hem NPLere hem de alıcı ortamının özelliklerine bağlı olarak değişen parametreler bulunmaktadır.

İkinci mekanizma ise, sucul ortamın içeriğine, biyotik ve abiyotik ilişkilere bağlı olarak alglerin NPLerle kaplanması veya beraber agregasyona uğramaları sonucunda alglerin yaşamsal fonksiyonlarının inhibe edilmesi şeklinde açıklanabilir. NPLer boyut itibarı ile çekirdek boyunca dağılabilmekte yada NPLer yeteri kadar küçükse bir araya gelerek mitoz bölünme sırasında hücreye erişebilmektedir (Ma vd 2013). Tez çalışmada ele alınan SYS içeriklerinin farklılık göstermesi, ortamın pH ve iyonik güç özelliklerinin değişmesi NPLerin partikül boyutu ve dağılımı, agregasyon eğilimi, fotokatalitik aktivitesi, yüzey yükü gibi özelliklerinin değişmesine neden olmakta, bu durum NPLerin sucul ortamdaki davranışlarını etkilemekte vesöz konusu etki de NPLerin toksisitelerini değiştirmektedir.

6. SONUÇ

Bu tez çalışmasında, tüketici ürünlerinin yanı sıra ilaç sektöründen savunma sanayine pek çok alanda yaygın kullanıma sahip metal oksit NPlerden TiO₂, ZnO ve CuO NPlerinin ekosistemin temel yapıtaşlarından olan bir alg türü (*P. subcapitata*) üzerindeki ekotoksik etkileri incelenmiştir. Bu kapsamda farklı su içeriğine sahip SYS içinde farklı dispersiyon yöntemleri (karıştırma, problu sonikasyon ve banyo sonikasyon) ile hazırlanmış NPlerin neden olduğu organizma inhibisyonu belirlenmiş, hücresel membranda meydana gelen deformasyon lipid peroksidasyon ve morfolojik gözlem ile incelenmiş ve solunum aktivitesinde oluşabilecek değişiklikler TTC indirgenmesi ile tespit edilmiştir. Deneysel çalışmalar neticesinde elde edilen tüm bulgular değerlendirilmiş ve sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

Metal oksit NPlerin alg inhibisyonu üzerindeki etkileri genel olarak incelendiğinde altta verilen sonuçlar elde edilmiştir:

- NP türünden bağımsız olarak, yüksek konsantrasyonlardaki NP türlerinin daha yüksek alg inhibisyonuna sebep olduğu bulunmuştur.
- NP türlerinin fotokatalitik özellik taşımaları nedeniyle ışıklı ortamda inhibisyon etkisi göstermeleri beklenmektedir. Söz konusu etkinin düşük ışık yoğunluğu altında da gözlenmiş olması, NPlerin yüksek UV ışık kaynağına gerek duymadan görünür ışık ve güneş ışığına yakın ışık kaynakları tarafından da aktif hale getirilebileceklerini göstermiştir.
- Alg türünde meydana gelen inhibisyonlar çoğunlukla yüksek NP konsantrasyonlarında (500 mg/L) gerçekleşmiş ve özellikle söz konusu konsantrasyonda alg yapı bütünlüğünün tamamen bozulduğu, alg parçacıklarının sistem içerisine dağıldığı ve/veya NPler ile agregasyona uğradıkları görülmüştür.
- Yüksek iyonik güç ve iletkenlik çevresel ortam koşullarının, sucul ortamda NPlerin biraraya gelerek agregasyona uğramalarına neden olduğu görülmüştür. Meydana gelen NP-NP yığınlarının boyutlarının üretici firmanın bildirdiği boyut dağılımına göre 2-78×kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. NP türlerinin büyük çoğunluğunun nanoboyuttan mikroboyuta geçiş yapması nedeniyle sucul sistem içerisinde organizmaların karşılaşabileceği nanoboyutta partikül oranı minimum sayıya ulaştığı düşünülmektedir.

Metal oksit NPlerin membran deformasyonu üzerindeki etkileri incelendiğinde altta verilen sonuçlar elde edilmiştir:

- Dispersiyon metodlarındaki MDA üretim miktarları karşılaştırıldığında, metal oksit NPlerin fotokatalitik özelliklerinden dolayı görünür ışıklı ortamda etkili oldukları görülmüş, yüksek miktarda lipid peroksidasyona yol açtıkları tespit edilmiştir.
- Yüksek NP konsantrasyonları bulunan ve düşük iyonik güç değerlerine sahip deney düzeneklerinden daha yüksek MDA üretimi elde edilmiştir.
- Membranda meydana gelen deformasyon sonucunda ölü organizma mevcut hücre yükünü kaybetmekte ve diğer hücrelerle kümelenmeye başlamaktadır. Organizma membran yapısındaki bozulmalar ışık mikroskobu sonuçları ile de belirlenmiştir. Alg

yapısındaki morfolojik bozulmalar ile özellikle yüksek NP konsantrasyonlarında (50 ve 500 mg/L) gerçekleşen durumda alglerin tamamen parçalanarak sistem içerisine dağıldıkları görülmüştür.

- Literatüre katkı olarak, ilk defa CuO NPlerin *P. subcapitata* alg türü üzerinde membran deformasyonuna neden olduğu tespit edilmiştir.

Metal oksit NPlerin solunum aktivitesi üzerindeki etkileri incelendiğinde altta verilen sonuçlar elde edilmiştir:

- SYS örneklerine ait sonuçlar karşılaştırıldığında, TiO₂ NPlerin fotokatalitik özelliğinin daha aktif olmasından dolayı organizmalar tarafından indirgenen TTC miktarının daha fazla olduğu görülmüştür. Aynı zamanda en yüksek alg inhibisyonuna da neden olan TiO₂ NPleri tüm dispersiyon metodlarında en yüksek TTC indirgenmeye yol açmıştır. Mikroskopik görüntüleme sonuçlarından da görüldüğü üzere alglerin parçalanması sonucunda algler klorofillerini kaybetmekte ve bunun sonucunda fotosentez yapma yetenekleri azalmaktadır. Membran yapısındaki lipid peroksidasyona bağlı olarak hücresel faaliyetleri inhibe olan algler ve solunum reaksiyonuna benzer şekilde TTC indirgenmesi gerçekleştirmektedirler. Sonuç olarak faaliyetleri inhibe olmuş alg-TiO₂NP örneklerinde TTC indirgenmesi yüksek tespit edilmiştir.
- Yüksek NP konsantrasyonları bulunan ve düşük iyonik güç/iletkenlik değerlerine sahip SYS deney düzeneklerinden daha yüksek solunum aktivitesi tespit edilmiştir.
- Membranda meydana gelen deformasyon sonucunda ortaya çıkan organizma-organizma ve organizma-NP kümelenmeleri nedeniyle, diğer bir deyişle sağlıklı organizmaların ölü organizmalarla ve/veya NPlerle kaplanması sonucunda, organizmaların fotosentetik aktiviteleri yavaşlamakta, solunum aktiviteleri daha fazla ortaya çıkmaktadır.

7. KAYNAKÇA

- ABB (2013). Avrupa Birliği bakanlığı-Avrupa Birliği Sürecinde ÇEVRE FASLI. T. C. A. B. Bakanlığı. Ankara: 64.
- ADAMS, L.K. LYON, D.Y. and ALVAREZ, P. J. J. 2006a. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water research*, 40 (19) 3527-3532.
- ADAMS, L.K. LYON, D.Y. MCINTOSH, A. and ALVAREZ, P. J. J. 2006b. Comparative toxicity of nano-scale TiO₂, SiO₂ and ZnO water suspensions. *Water Science and Technology*, 54 (11-12) 327-334.
- ALGALWEB 2014. <http://algalweb.net/plankton.htm> Son Erişim Tarihi: 19.11.2014
- ARUOJA, V. DUBOURGUIER, H.-C. KASEMETS, K. AND KAHRU, A. 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of The Total Environment*, 407 (4) 1461-1468.
- ARUOJA, V., 2011. Algae *Pseudokirchneriella Subcapitata* in Environmental Hazard Evaluation of Chemicals and Synthetic Nanoparticles PhD, Eesti Maaülikool Estonian University 114
- AUFFAN, M. ROSE, J. BOTTERO, J.-Y. LOWRY, G. V. JOLIVET, J.-P. AND WIESNER, M. R. 2009a. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature nanotechnology*, 4 (10) 634-641.
- AUFFAN, M. ROSE, J. WIESNER, M. R. AND BOTTERO, J.-Y. 2009b. Chemical stability of metallic nanoparticles: a parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. *Environmental Pollution*, 157 (4) 1127-1133.
- BCC 2014. <http://www.bccresearch.com/marketresearch/nanotechnology/nanotechnology-market> applications-products-nan031e.html. Son Erişim Tarihi: Acces Date
- BECHERI, A. DÜRR, M. NOSTRO, P. L. AND BAGLIONI, P. 2008. Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles: application to textiles as UV-absorbers. *Journal of Nanoparticle Research*, 10 (4) 679-689.
- BLINOVA, I. 2004. Use of freshwater algae and duckweeds for phytotoxicity testing. *Environmental toxicology*, 19 (4) 425-428.
- BOTTERO, J.-Y. AUFFAN, M. ROSE, J. MOUNEYRAC, C. BOTTA, C. LABILLE, J. MASON, A. THILL, A. AND CHANEAC, C. 2011. Manufactured metal and metal-oxide nanoparticles: Properties and perturbing mechanisms of their biological activity in ecosystems. *Comptes Rendus Geoscience*, 343 (2-3) 168-176.
- BRAR, S. K. VERMA, M. TYAGI, R.D. and SURAMPALLI, R.Y. 2010. Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge - Evidence and impacts. *Waste Management*, 30 (3) 504-520.
- BRAYNER, R. DAHOUMANE, S.A. YÉPRÉMIAN, C. DJEDIAT, C. MEYER, M. COUTÉ, A. and FIÉVET, F. 2010. ZnO nanoparticles: synthesis, characterization, and ecotoxicological studies. *Langmuir*, 26 (9) 6522-6528.
- BRUNNER, T.J. WICK, P. MANSER, P. SPOHN, P. GRASS, R. N. LIMBACH, L. K. BRUININK, A. and STARK, W. J. 2006. In Vitro Cytotoxicity of Oxide Nanoparticles: Comparison to Asbestos, Silica, and the Effect of Particle Solubility†. *Environmental science & technology*, 40 (14) 4374-4381.

- BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA, G. GOLIMOWSKI, J. and URBAN, P.L. 2009. Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management. *Waste Management*, 29 (9) 2587-2595.
- CARUSO, F. 2001. Nanoengineering of particle surfaces. *Advanced Materials*, 13 (1) 11-22.
- CASALS, E. VAZQUEZ-CAMPOS, S. BASTUS, N. G. and PUNTES, V. 2008. Distribution and potential toxicity of engineered inorganic nanoparticles and carbon nanostructures in biological systems. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 27 (8) 672-683.
- CLÉMENT, L. HUREL, C. and MARMIER, N. 2013. Toxicity of TiO₂ nanoparticles to cladocerans, algae, rotifers and plants—Effects of size and crystalline structure. *Chemosphere*, 90 (3) 1083-1090.
- COHEN, J. DELOID, G. PYRGIOTAKIS, G. and DEMOKRITOU, P. 2013. Interactions of engineered nanomaterials in physiological media and implications for in vitro dosimetry. *Nanotoxicology*, 7 (4) 417-431.
- COOPER, G.M. 2000. *The Cell: A Molecular Approach*. Sunderland, USA.
- CSA (2012). Z12885-12: Nanotechnologies - Exposure Control Program for Engineered Nanomaterials in Occupational Settings: 122.
- DPT (2006). 9. Kalkınma Planı (2007-2013), Resmi Gazete- 26215
- ENRHES (2009). *Engineered Nanoparticles: Review of Health and Environmental Safety*. Edinburgh, Napier University: 426 pp.
- EU. 2003. "The European Union Environment and Health Action Plan", 2004-2010.
- EU. 2004. Towards a European Strategy for Nanotechnology, COM(2002)338.
- EU. 2005. Nanosciences and nanotechnologies: an Action Plan for Europe 2005-2009, COM(2005)243, final. E. Commission. Brussels: 1-12.
- EU. 2008. Regulatory Aspects of Nanomaterials, COM(2008)366.
- FADEEL, B. and GARCIA-BENNETT, A.E. 2010. Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62 (3) 362-374.
- FARRE, M. SANCHIS, J. and BARCELO, D. 2011. Analysis and assessment of the occurrence, the fate and the behavior of nanomaterials in the environment. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 30 (3) 517-527.
- FDA 2011. Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology-Guidance for Industry, FDA.
- FDA. 2014. Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology-Guidance for Industry, Final Report. *U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Office of the Commissioner*,
- FRANKLIN, N.M. ROGERS, N.J. APTE, S. C. BATLEY, G.E. GADD, G. E. and CASEY, P.S. 2007. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility. *Environmental science & technology*, 41 (24) 8484-8490.

- FUJISHIMA, A. RAO, T. N. and TRYK, D. A. 2000. Titanium dioxide photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 1 (1) 1-21.
- GABBAY, J. BORKOW, G. MISHAL, J. MAGEN, E. ZATCOFF, R. and SHEMER-AVNI, Y. 2006. Copper oxide impregnated textiles with potent biocidal activities. *Journal of Industrial Textiles*, 35 (4) 323-335.
- GOOGLE 2014. nanotechnology development. https://www.google.com.tr/?gfe_rd=cr&ei=7DtZVNuol4He8geZxYC4CQ#q=%22nanotechnology+development%22 Son Erişim Tarihi: 10.10.2014.
- GRIFFITT, R. J. LUO, J. GAO, J. BONZONGO, J. C. and BARBER, D. S. 2008. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27 (9) 1972-1978.
- HANDY, R. D. CORNELIS, G. FERNANDES, T. TSYUSKO, O. DECHO, A. SABO-ATTWOOD, T. METCALFE, C. STEEVENS, J. A. KLAINE, S. J. and KOELMANS, A. A. 2012. Ecotoxicity test methods for engineered nanomaterials: practical experiences and recommendations from the bench. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31 (1) 15-31.
- HANDY, R. D. 2012. TiO₂ Nanoparticle Stock Preparation, Final version. *E.F.P. MARINA*.
- HARTMANN, N. VON DER KAMMER, F. HOFMANN, T. BAALOUSHA, M. OTTOFUELLING, S. and BAUN, A. 2010. Algal testing of titanium dioxide nanoparticles—testing considerations, inhibitory effects and modification of cadmium bioavailability. *Toxicology*, 269 (2) 190-197.
- HASSELLÖV, M. READMAN, J. W. RANVILLE, J. F. and TIEDE, K. 2008. Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles. *Ecotoxicology*, 17 (5) 344-361.
- HEINLAAN, M. IVASK, A. BLINOVA, I. DUBOURGUIER, H.-C. and KAHRU, A. 2008. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*, 71 (7) 1308-1316.
- HORIE, M. NISHIO, K. FUJITA, K. ENDOH, S. MIYAUCHI, A. SAITO, Y. IWAHASHI, H. YAMAMOTO, K. MURAYAMA, H. NAKANO, H. NANASHIMA, N. NIKI, E. and YOSHIDA, Y. 2009. Protein Adsorption of Ultrafine Metal Oxide and Its Influence on Cytotoxicity toward Cultured Cells. *Chemical Research in Toxicology*, 22 (3) 543-553.
- HOTZE, E. M. PHENRAT, T. and LOWRY, G. V. 2010. Nanoparticle aggregation: challenges to understanding transport and reactivity in the environment. *Journal of environmental quality*, 39 (6) 1909-1924.
- HUND-RINKE, K. and SIMON, M. 2006. Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO₂) on algae and daphnids (8 pp). *Environmental Science and Pollution Research*, 13 (4) 225-232.
- ISO. 2011. Nanotechnologies-Nanomaterial Risk Evaluation, ISO TR13121.
- J.D, C.R. M.A. 2010. The Need for Practical Regulation of Developing Commercial Nanotechnology.
- JI, J. LONG, Z. and LIN, D. 2011. Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella sp.* *Chemical Engineering Journal*, 170 (2) 525-530.

- JIANG, J. OBERDÖRSTER, G. and BISWAS, P. 2009. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research*, 11 (1) 77-89.
- JU-NAM, Y. and LEAD, J. R. 2008. Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Science of the Total Environment*, 400 (1) 396-414.
- KAHRU, A. and DUBOURGUIER, H.-C. 2010. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology*, 269 (2) 105-119.
- KARLSSON, H. L. GUSTAFSSON, J. CRONHOLM, P. and MÖLLER, L. 2009. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicology letters*, 188 (2) 112-118.
- KELLER, A. A. WANG, H. T. ZHOU, D. X. LENIHAN, H. S. CHERR, G. CARDINALE, B. J. MILLER, R. and JI, Z. X. 2010. Stability and Aggregation of Metal Oxide Nanoparticles in Natural Aqueous Matrices. *Environmental science & technology*, 44 (6) 1962-1967.
- KIM, K. T. KLAINÉ, S. J. CHO, J. KIM, S.-H. and KIM, S. D. 2010. Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO₂ nanoparticles according to size fraction. *Science of the total environment*, 408 (10) 2268-2272.
- KLAINÉ, S. J. ALVAREZ, P. J. J. BATLEY, G. E. FERNANDES, T. F. HANDY, R. D. LYON, D. Y. MAHENDRA, S. MCLAUGHLIN, M. J. and LEAD, J. R. 2008. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27 (9) 1825-1851.
- KLAINÉ, S. J. KOELMANS, A. A. HORNE, N. CARLEY, S. HANDY, R. D. KAPUSTKA, L. NOWACK, B. and VON DER KAMMER, F. 2012. Paradigms to assess the environmental impact of manufactured nanomaterials. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31 (1) 3-14.
- LEE, N. SONG, N. 2012. Photochemical properties and cytotoxicity of TiO₂ nanoparticles depending on the degree of agglomeration. XX IMEKO World Congress, Metrology for Green Growth. Busan, Republic of Korea.
- LEE, W.-M. AND AN, Y.-J. 2013. Effects of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles on green algae under visible, UVA, and UVB irradiations: No evidence of enhanced algal toxicity under UV pre-irradiation. *Chemosphere*, 91 (4) 536-544.
- LIMBACH, L. K. LI, Y. GRASS, R. N. BRUNNER, T. J. HINTERMANN, M. A. MULLER, M. GUNTHER, D. and STARK, W. J. 2005. Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations. *Environmental science & technology*, 39 (23) 9370-9376.
- LIN, D. XING, B. 2008. Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environmental science & technology*, 42 (15) 5580-5585.
- LIVERI, V.T. 2006. Methods of Nanoparticle Synthesis in Microheterogeneous Systems. Controlled Synthesis of Nanoparticles in Microheterogeneous Systems. New York, Springer Science+Business Media, Inc., : 115-164.

- LOVERN, S. B. and KLAPER, R. 2006. Daphnia magna mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C60) nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25 (4) 1132-1137.
- LOVERN, S. B. STRICKLER, J. R. and KLAPER, R. 2007. Behavioral and physiological changes in Daphnia magna when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C60, and C60HxC70Hx). *Environmental science & technology*, 41 (12) 4465-4470.
- MA, H. WILLIAMS, P. L. and DIAMOND, S. A. 2013. Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles – A review. *Environmental Pollution*, 172 (0) 76-85.
- MANESS, P.-C. SMOLINSKI, S. BLAKE, D. M. HUANG, Z. WOLFRUM, E. J. and JACOBY, W. A. 1999. Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: toward an understanding of its killing mechanism. *Applied and environmental microbiology*, 65 (9) 4094-4098.
- MARINO, E. HUIJSER, T. CREYGHTON, Y. and VAN DER HEIJDEN, A. 2007. Synthesis and coating of copper oxide nanoparticles using atmospheric pressure plasmas. *Surface & Coatings Technology*, 201 (22-23) 9205-9208.
- MAYNARD, A. AITKEN, R. J. BUTZ, T. COLVIN, V. DONALDSON, K. OBERDÖRSTER, G. PHILBERT, M. A. RYAN, J. SEATON, A. and STONE, V. 2006. Safe handling of nanotechnology. *NATURE-LONDON*-, 444 (7117) 267.
- MENG, X. DADACHOV, M. KORFIATIS, G. P. and CHRISTODOULATOS, C. (2005). Methods of preparing a surface-activated titanium oxide product and of using same in water treatment processes, Google Patents.
- METZLER, D. ERDEM, A. TSENG, Y. and HUANG, C. 2012. Responses of algal cells to engineered nanoparticles measured as algal cell population, chlorophyll a, and lipid peroxidation: effect of particle size and type. *Journal of Nanotechnology*, 2012
- METZLER, D. M. LI, M. ERDEM, A. and HUANG, C. P. 2011. Responses of algae to photocatalytic nano-TiO₂ particles with an emphasis on the effect of particle size. *Chemical Engineering Journal*, 170 (2–3) 538-546.
- MILLER, J. C., SERRATO, R., REPRESASCARDENAS, J. M. and KUNDAHL, G., 2004. *The Handbook of Nanotechnology*. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.
- MILLER, R. J. LENIHAN, H. S. MULLER, E. B. TSENG, N. HANNA, S. K. and KELLER, A. A. 2010. Impacts of metal oxide nanoparticles on marine phytoplankton. *Environmental science & technology*, 44 (19) 7329-7334.
- MIRZAJANI, F. GHASSEMPOUR, A. ALIAHMADI, A. and ESMAEILI, M. A. 2011. Antibacterial effect of silver nanoparticles on Staphylococcus aureus. *Research in Microbiology*, 162 (5) 542-549.
- NAVARRO, E. BAUN, A. BEHRA, R. HARTMANN, N. B. FILSER, J. MIAO, A.-J. QUIGG, A. SANTSCHI, P. H. and SIGG, L. 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 17 (5) 372-386.
- NEL, A. XIA, T. MÄDLER, L. and LI, N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311 (5761) 622-627.
- NNI 2010. National Nanotechnology Initiatives.
- NOHL, H. AND GILLE, L. 2005. Lysosomal ROS formation. *Redox Report*, 10 (4) 199-205.

- NOWACK, B. and BUCHELI, T. D. 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution*, 150 (1) 5-22.
- OECD-WPMN (2009). Guidance Manual for the Testing of Manufactured Nanomaterials-OECD- Working Party for Manufactured Nanomaterials Sponsorship Programme. Paris.
- OECD 1994. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Organization for Economic.
- OECD (2002). 92/69EEC, C3. Algal Inhibition Test Official journal of European Commission, : 1-8.
- OECD (2006). Report of the OECD Workshop on the Safety of Manufactured Nanomaterials: Building Co-operation, Co-ordination and Communication-ENV/JM/MONO(2006)19", .
- PELLER, J. R. WHITMAN, R. L. GRIFFITH, S. HARRIS, P. PELLER, C. and SCALZITTI, J. 2007. TiO₂ as a photocatalyst for control of the aquatic invasive alga, *Cladophora*, under natural and artificial light. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 186 (2) 212-217.
- PEN 2014. <http://www.nanotechproject.org/cpi/products/?sort=-datestamp>. Son Erişim Tarihi:02.07.2014
- PENA, M. E. KORFIATIS, G. P. PATEL, M. LIPPINCOTT, L. and MENG, X. 2005. Adsorption of As (V) and As (III) by nanocrystalline titanium dioxide. *Water Research*, 39 (11) 2327-2337.
- PENG, X. PALMA, S. FISHER, N. S. and WONG, S.S. 2011. Effect of morphology of ZnO nanostructures on their toxicity to marine algae. *Aquatic Toxicology*, 102 (3) 186-196.
- PINNA, N. and NIEDERBERGER, M. 2008. Oxide synthesis as Cornerstone of nanoscience. *European Journal of Inorganic Chemistry*, (6) 825-825.
- PULSKAMP, K. DIABATÉ, S. and KRUG, H. F. 2007. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicology letters*, 168 (1) 58-74.
- QUIK, J. T. LYNCH, I. HOECKE, K. V. MIERMANS, C. J. DE SCHAMPHELAERE, K. A. JANSSEN, C. R. DAWSON, K. A. STUART, M. A. C. and MEENT, D. V. D. 2010. Effect of natural organic matter on cerium dioxide nanoparticles settling in model fresh water. *Chemosphere*, 81 (6) 711-715.
- RADIX, P. LÉONARD, M. PAPANTONIOU, C. ROMAN, G. SAOUTER, E. GALLOTTI-SCHMITT, S. THIÉBAUD, H. and VASSEUR, P. 2000. Comparison of four chronic toxicity tests using algae, bacteria, and invertebrates assessed with sixteen chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47 (2) 186-194.
- RAO, C. N. R. M., A. CHEETHAM, A. K. .2005. The Chemistry of Nanomaterials Weinheim., WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, .
- REN, G. HU, D. CHENG, E. W. C. VARGAS-REUS, M. A. REIP, P. and ALLAKER, R. P. 2009. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33 (6) 587-590.
- ROTHEN-RUTISHAUSER, B. M. SCHÜRCH, S. HAENNI, B. KAPP, N. and GEHR, P. 2006. Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with

- advanced microscopic techniques. *Environmental science & technology*, 40 (14) 4353-4359.
- SADIQ, I. M. DALAI, S. CHANDRASEKARAN, N. and MUKHERJEE, A. 2011A. Ecotoxicity study of titania (TiO₂) NPs on two microalgae species: *Scenedesmus* sp and *Chlorella* sp. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74 (5) 1180-1187.
- SADIQ, I. M. PAKRASHI, S. CHANDRASEKARAN, N. and MUKHERJEE, A. 2011B. Studies on toxicity of aluminum oxide (Al₂O₃) nanoparticles to microalgae species: *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. *Journal of Nanoparticle Research*, 13 (8) 3287-3299.
- SCENIHR. 2009. Risk Assessment of Products of Nanotechnologies. H. C. D. European Commission. Brussels
- SERPONE, N. DONDI, D. and ALBINI, A. 2007. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. *Inorganica Chimica Acta*, 360 (3) 794-802
- SHARMA, V. SHUKLA, R. K. SAXENA, N. PARMAR, D. DAS, M. and DHAWAN, A. 2009. DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology letters*, 185 (3) 211-218.
- SHARMA, V. K. 2009. Aggregation and toxicity of titanium dioxide nanoparticles in aquatic environment-A Review. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 44 (14) 1485-1495.
- SILVA, B. F. D. PÉREZ, S. GARDINALLI, P. SINGHAL, R. MOZETO, A. A. and BARCELÓ, D. 2011. Analytical chemistry of metallic nanoparticles in natural environments. *TrAc Trends in Analytical Chemistry*, 30 (3) 528-540.
- STRUNK, J. KÄHLER, K. XIA, X. and MUHLER, M. 2009. The surface chemistry of ZnO nanoparticles applied as heterogeneous catalysts in methanol synthesis. *Surface Science*, 603 (10) 1776-1783.
- TANG, Y. L. LI, S. Y. QIAO, J. L. WANG, H. T. and LI, L. 2013. Synergistic Effects of Nano-Sized Titanium Dioxide and Zinc on the Photosynthetic Capacity and Survival of *Anabaena* sp. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (7) 14395-14407.
- TAUROZZI, J. S. HACKLEY, V. A. and WIESNER, M. R. 2013. A standardised approach for the dispersion of titanium dioxide nanoparticles in biological media. *Nanotoxicology*, 7 (4) 389-401.
- THIO, B. J. R. LEE, J.-H. MEREDITH, J. C. and KELLER, A. A. 2010. Measuring the Influence of Solution Chemistry on the Adhesion of Au Nanoparticles to Mica Using Colloid Probe Atomic Force Microscopy. *Langmuir*, 26 (17) 13995-14003.
- TIEDE, K. BOXALL, A. B. TEAR, S. P. LEWIS, J. DAVID, H. and HASSELLÖV, M. 2008. Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. *Food Additives and Contaminants*, 25 (7) 795-821.
- TIEDE, K. TEAR, S. P. DAVID, H. and BOXALL, A. 2009. Imaging of engineered nanoparticles and their aggregates under fully liquid conditions in environmental matrices. *Water research*, 43 (13) 3335-3343.
- TODUKA, Y. TOYOOKA, T. and IBUKI, Y. 2012. Flow Cytometric Evaluation of Nanoparticles Using Side-Scattered Light and Reactive Oxygen Species-Mediated

- Fluorescence–Correlation with Genotoxicity. *Environmental science & technology*, 46 (14) 7629-7636.
- TÜBİTAK. 2004. Ulusal Bilim ve Teknoloji Politikaları 2003-2023 Strateji Belgesi, Versiyon 19. 1-137.
- TÜSİAD. 2008. Nanoteknoloji ve Türkiye. *TÜSİAD Rekabet Stratejileri Dizisi*, 11
- USEPA 2002. Short term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water.
- USEPA. 2005. U.S. Environmental Protection Agency EXTERNAL REVIEW DRAFT Nanotechnology White Paper. *Science Policy Council U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC 20460*,
- VAN HOECKE, K. QUIK, J. T. K. MANKIEWICZ-BOCZEK, J. DE SCHAMPHELAERE, K. A. C. ELSAESSER, A. VAN DER MEEREN, P. BARNES, C. MCKERR, G. HOWARD, C. V. VAN DE MEENT, D. RYDZYNSKI, K. DAWSON, K. A. SALVATI, A. LESNIAK, A. LYNCH, I. SILVERSMIT, G. DE SAMBER, B. VINCZE, L. and JANSSEN, C. R. 2009. Fate and Effects of CeO₂ Nanoparticles in Aquatic Ecotoxicity Tests. *Environmental science & technology*, 43 (12) 4537-4546.
- WANG, J. ZHANG, X. CHEN, Y. SOMMERFELD, M. and HU, Q. 2008. Toxicity assessment of manufactured nanomaterials using the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chemosphere*, 73 (7) 1121-1128.
- WARHEIT, D. B. HOKE, R. A. FINLAY, C. DONNER, E. M. REED, K. L. and SAYES, C. M. 2007. Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicology letters*, 171 (3) 99-110.
- WHITEHOUSE, U. 2011. Memorandum for the heads of executive departments and agencies. *Enhancing Learning and Education Through Technology*,
- WIENCH, K. WOHLLEBEN, W. HISGEN, V. RADKE, K. SALINAS, E. ZOK, S. and LANDSIEDEL, R. 2009. Acute and chronic effects of nano-and non-nano-scale TiO₂ and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 76 (10) 1356-1365.
- WIKIPEDIA 2014. http://en.wikipedia.org/wiki/Titanium_dioxide Son Erişim Tarihi:14.11.2014
- XU, J. F. JI, W. SHEN, Z. X. TANG, S. H. YE, X. R. JIA, D. Z. and XIN, X. Q. 1999. Preparation and Characterization of CuO Nanocrystals. *Journal of Solid State Chemistry*, 147 (2) 516-519.
- YANG, K. and XING, B. 2009. Sorption of Phenanthrene by Humic Acid-Coated Nanosized TiO₂ and ZnO. *Environmental science & technology*, 43 (6) 1845-1851.
- YANG, L. and WATTS, D. J. 2005. Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicology letters*, 158 (2) 122-132.
- YIN, H. XU, L. and PORTER, N. A. 2011. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical reviews*, 111 (10) 5944-5972.

- ZHANG, D. X. and GUTTERMAN, D. D. 2007. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 292 (5) H2023-H2031.
- ZHOU, D. X. and KELLER, A. A. 2010. Role of morphology in the aggregation kinetics of ZnO nanoparticles. *Water Research*, 44 (9) 2948-2956.
- ZHU, J. LI, D. CHEN, H. YANG, X. LU, L. and WANG, X. 2004. Highly dispersed CuO nanoparticles prepared by a novel quick-precipitation method. *Materials Letters*, 58 (26) 3324-3327.
- ZHU, X. ZHU, L. CHEN, Y. and TIAN, S. 2009. Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to *Daphnia magna*. *Journal of Nanoparticle Research*, 11 (1) 67-75.
- ZHU, X. CHANG, Y. and CHEN, Y. 2010. Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 78 (3) 209-215.

ÖZGEÇMİŞ

Merve ÖZKALELİ 1987 yılında Şanlıurfa/Birecik'te doğdu. İlk öğrenimini Birecik'te tamamlayıp, orta ve lise öğrenimlerini Gaziantep'te bitirdi. 2010 yılı Haziran ayında Fatih Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümünden mezun oldu. 2012 Ocak ayında Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Araştırma faaliyetleri kapsamında İzmir, Antalya, İstanbul ve Yunanistan'da gerçekleştirilen uluslararası konferanslara, İzmir, Ankara ve Antalya'da düzenlenen ulusal konferanslara poster ve sözlü sunumlarla katılım sağlamıştır. İzmir ve Antalya'da düzenlenen ulusal çalıştaylarda görev almıştır. Çek Cumhuriyeti, İzmir ve Antalya'da gerçekleştirilen uluslararası yaz kurslarına katılmıştır. TÜBİTAK projelerinde (110Y136 ve 114Y015) bursiyer ve Akdeniz Üniversitesi bilimsel araştırma projesinde (2013.01.0102.010) araştırmacı olarak görev almıştır.